UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS



TESIS DOCTORAL

Respuesta celular a biomateriales diseñados para tratamiento de hueso osteoporótico

Cell response to biomaterials designed for treatment of osteoporotic bone

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Laura Casarrubios Molina

Directoras

María Teresa Portolés Pérez
María José Feito Castellano

Madrid

© Laura Casarrubios Molina, 2022

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS



TESIS DOCTORAL

Respuesta celular a biomateriales diseñados para tratamiento de hueso osteoporótico

Cell response to biomaterials designed for treatment of osteoporotic bone

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTORA

PRESENTADA POR

Laura Casarrubios Molina

DIRECTORAS

María Teresa Portolés Pérez
María José Feito Castellano

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

Programa de Doctorado en Bioquímica, Biología Molecular y Biomedicina



TESIS DOCTORAL

Respuesta celular a biomateriales diseñados para tratamiento de hueso osteoporótico

Cell response to biomaterials designed for treatment of osteoporotic bone

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
DOCTORADO INTERNACIONAL

Laura Casarrubios Molina

Directoras

María Teresa Portolés Pérez

María José Feito Castellano

Madrid, 2022

Amor es deseo de conocimiento.

CESARE PAVESE

AGRADECIMIENTOS

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, Teresa, gracias por la oportunidad que me diste cuando estando en 3º de Grado respondiste al correo que envié mostrándote mis ganas de aprender y lo mucho que me atraía vuestra investigación. Al instante me llamaste, y hasta ahora. Durante 8 años me has acompañado en este camino, guiándome y estando siempre al pie del cañón. Gracias por tu incesante esfuerzo, sea cual sea el día de la semana, por tu tenacidad llegando siempre a tiempo a cualquier deadline, por tu apoyo para conseguir quedarme en el grupo y por hacer que me haya sentido guiada en todo momento. María José, gracias por tu luz. Gracias por nuestras charlas, por tu apoyo, por instarme siempre a perseverar, a buscar las mejores soluciones a los problemas, a afrontar las cosas con buen carácter, con buena actitud y, sobre todo, con generosidad y buen corazón. Tienes una energía y un carácter inspiradores. No he podido tener mejores directoras de Tesis. Gracias a las dos.

Mamá, Papá, habéis sido los primeros responsables en despertar mi curiosidad, alimentando mis ganas de entender. De niña fuisteis la inspiración que provocó que os imitara leyendo un libro al ver cómo Mamá disfrutaba de esos ratos, o creando las múltiples empresas que duraban un día y con las que obligaba a mis clientes (los amigos y familiares que venían a casa) a pasar por mi negocio (y meterse en el papel), imitando la pasión que veía en Papá con sus proyectos. Siempre habéis apoyado todos y cada uno de mis movimientos, aconsejándome y guiándome, siempre habéis creído en mí y, sobre todo, siempre me habéis hecho sentir capaz de hacer absolutamente todo lo que pudiera imaginar. Con los años y la experiencia he sido consciente de lo importante que ha sido sentirme así desde mi niñez. Gracias.

Gracias a mis segundos padres, Jesús y Luisa. Abuelos, me habéis enseñado qué es la generosidad, la humildad, el inmenso valor de la familia y del amor. Tomarse la vida con tu carácter, Abuelo, reír, conectar de verdad con las personas, disfrutar de las pequeñas cosas. No he dejado de sentirte cerquita de mí. Gracias a toda mi familia, abuelo Pedro, yaya María, titos, primos, por hacerme sentir vuestro apoyo y vuestro orgullo en este camino.

A todos los amigos que me han acompañado en este camino. Mis amigos de la infancia, David, Eva, Aida, Nati, y de la carrera, Esti, Sara, Víctor, Cris, Marta, Estefi.

Pero sobre todo, gracias a mis amigos del laboratorio, por compartir dudas, éxitos y agobios juntos, por tantos cafés, tantas charlas y tantas risas. Laura, te adoro, eres bondad y alegría. Gracias por ser tan pura conmigo desde que nos vimos por primera vez, te siento como a una hermana. Cris, gracias por tu buen humor y por tener siempre la forma de hacerme reír, ¿a quién no le va a gustar? Javito, aunque siempre acabemos riéndonos, sabes que el plan es no tener plan. Gracias por saber siempre ser prudente y generoso. Mi dúo estrella, Alberto y Adri, ¿qué os digo que no sepáis? Habéis sido toda

una sorpresa para mí, nos hemos abierto en canal los unos con los otros, nos hemos reído y hemos llorado. Y lo que nos queda. Sois geniales. Rubén, gracias por irrumpir siempre por el laboratorio con ganas de hacernos reír y por ser tan lindo. A todos los compañeros que pasaron y dejaron su huella, y a los presentes, Juancar, Pablo, Espe, Carmen, Cami, Selene, Isra, Nati, Sara, Juan, Diego, Jorge, los chicos del L19. Gracias Mónica, por mostrarme tu visión realista de las cosas y por guiarme, y por nuestras risas con acento manchego, hermosona.

Y a todos los profesores del Dpto., especialmente a Álvaro, gracias por tu tesón por brindar oportunidades a los que estamos empezando y por tenerme siempre en cuenta para participar en los proyectos y actividades con los que tanto he disfrutado y aprendido.

A toda la gente que conocí durante mi estancia en Aveiro. Iola, obrigada por ser tão acolhedora, por me tratar com tanta proximidade e ao mesmo tempo com tanto profissionalismo. Tenho certeza de que nosso relacionamento continuará ao longo do tempo, é um prazer trabalhar e aprender com você. Maite, Joana, Leti, César y Adri, hicistéis de mi estancia una de las experiencias más bonitas y divertidas que he vivido. Si me dais boleia vuelvo, fofinhos.

Almu, gracias por nuestra amistad. Porque contigo los kilómetros no cuentan, por ser mi duendecillo de la conciencia, mi compañera de aventuras y de vida, mi confidente. Te quiero cachorra.

Gracias Mario. Gracias por aportarme tanta luz, apoyo, generosidad, bondad, tanto amor. Gracias por hacer que siempre vea las cosas más fáciles, por saber entender mis malos ratos y hacer que duren medio minuto. Gracias por motivarme, por alimentar mi curiosidad, por abrirme tu mundo y querer compartirlo conmigo. Por nuestro proyecto juntos. De fotografía y de vida. Gracias por aparecer. De Crainwana a Lasoteri.

Finalmente quiero agradecer a la Dra. María Vallet y al Dr. Daniel Arcos, el diseño, la síntesis y la caracterización de los biomateriales empleados en este estudio; al Dr. Jose María Rojo y a la Dra. Rosalía Díez, su colaboración en los estudios de respuesta inmune e inmunocompetencia; a la Dra. María Concepción Serrano, su colaboración con los estudios con células progenitoras endoteliales; al Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Clínico San Carlos, el análisis histológico de las muestras óseas; al Centro de Cirugía de Mínima Invasión Jesús Usón, los estudios de implantación *in vivo* de los biomateriales. Asimismo, agradezco a la Unidad de Citometría de Flujo y Microscopía de Fluorescencia, al Centro Nacional de Microscopía Electrónica y a la Unidad de Genómica de la Universidad Complutense de Madrid, su asistencia en los diferentes estudios realizados.

TABLA DE CONTENIDOS

SIGLAS, ACRÓNIMOS Y ABREVIATURAS……23

RESUMEN…… 27

ABSTRACT……33

GRAPHICAL ABSTRACT……37

INTRODUCCIÓN……41

1.Biomateriales……41

1.1. Concepto de biomaterial……41

1.2. Evolución histórica de los biomateriales……41

1.3. Tipos de biomateriales……43

1.4. Biocerámicas……45

1.5. Nanomateriales……48

2. Tejido óseo……50

2.1. Tipos de hueso……51

2.2. Componentes del tejido óseo……52

2.3. Proceso de osificación……58

2.4. Remodelado óseo……59

2.5. Osteoporosis……61

2.6. Tratamientos actuales para la osteoporosis……63

2.7. Implantes óseos……66

3. Respuesta inmune……68

3.1. Respuesta inmune innata……68

3.2. Respuesta inmune adaptativa……70

3.3. Osteoinmunomodulación……72

3.4. Respuesta inmune a biomateriales……75

4. Angiogénesis……82

4.1. Características de la angiogénesis……82

4.2. Factor de crecimiento de endotelio vascular (VEGF)……83

4.3. Células progenitoras endoteliales (EPCs)……86

4.4. Biomateriales angiogénicos……87

OBJETIVOS GENERALES……91

CAPITULO I: RESPUESTA CELULAR A ANDAMIOS 3D PREPARADOS CON HIDROXIAPATITAS SUSTITUIDAS CON SILICIO Y TRATADOS CON FACTOR DE CRECIMIENTO DE ENDOTELIO VASCULAR……95

Objetivos específicos……101

Metodología…… 105

Resultados

ARTÍCULO 1: Silicon substituted hydroxyapatite/VEGF scaffolds stimulate bone regeneration in osteoporotic sheep. Acta Biomaterialia 2020, 101: 544–553.……**111**

CAPITULO II: RESPUESTA CELULAR A NANOESFERAS DE SÍLICE MESOPOROSA CARGADAS CON IPRIFLAVONA COMO FÁRMACO ANTIOSTEOPORÓTICO……125

Objetivos específicos……133

Metodología…… 137

Resultados

ARTÍCULO 2: Incorporation and effects of mesoporous bioactive glass nanospheres loaded with ipriflavone on osteoblast/osteoclast cocultures. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics 2018, 133: 258–268.……**153**

ARTÍCULO 3: Ipriflavone-loaded mesoporous nanospheres with potential applications for periodontal treatment. Nanomaterials 2020, 10: 2573.……**167**

ARTÍCULO 4: Effects of ipriflavone-loaded mesoporous nanospheres on the differentiation of endothelial progenitor cells and their modulation by macrophages. Nanomaterials 2021, 11: 1102……**187**

RESPUESTA DE LINFOCITOS TH2 A NANOESFERAS DE SÍLICE MESOPOROSA……..**207**

ESTUDIOS DE METABOLÓMICA EN PREOSTEOBLASTOS TRATADOS CON NANOESFERAS DE SÍLICE MESOPOROSA……..**225**

DISCUSIÓN……241

CONCLUSIONES……251

CONCLUSIONS……255

BIBLIOGRAFÍA…… 279

APÉNDICE…… 281

SIGLAS, ACRÓNIMOS Y ABREVIATURAS

SIGLAS, ACRÓNIMOS Y ABREVIATURAS

- ALP: Fosfatasa alcalina
- Ang: Angiopoyetina
- APC: Célula presentadora de antígeno
- Arg-1: Arginasa 1
- ATCC: *American type culture collection*
- BMP: Proteína morfogenética ósea
- BSA: Albúmina de suero bovino
- BSP: Sialoproteína ósea
- CAII: Anhidrasa carbónica II
- CFU-GM: Unidades formadoras de colonias de granulocitos y macrófagos
- CHA: Hidroxiapatita carbonatada
- CT: Tomografía computerizada
- CTR: Receptor de calcitonina
- DAG: Diacilglicerol
- DAMP: Patrones moleculares asociados al daño
- DEX: Dexametasona
- DMO: Densidad mineral ósea
- DMOG: Dimetiloxaloglicina
- ELISA: Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas
- EISA: Autoensamblaje inducido por evaporación
- eNOS: Óxido nítrico sintasa endotelial
- EPCs: Células progenitoras de endotelio
- FBS: Suero fetal bovino
- FBR: Reacción a cuerpo extraño
- FDA: Food and Drug Administration
- FGF: Factor de crecimiento fibroblástico
- FGFR: Receptor del factor de crecimiento fibroblástico
- FITC: Isotiocianato de fluoresceína
- FSC: Forward Scatter (dispersión frontal)
- G-CSF: Factor estimulante de colonias de granulocitos
- GM-CSF: Factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos
- GPCR: Receptor acoplado a proteínas G
- HA: Hidroxiapatita
- CHA: Hidroxiapatita carbonatada
- H&E: Tinción de hematoxilina-eosina
- HGF: Factor de crecimiento de hepatocitos
- HIF: Factores inducibles por hipoxia
- HUVEC: Células endoteliales de vena de cordón umbilical humano
- ICOS: Coestimulador inducible de linfocitos T
- IGF-1: Factor de crecimiento insulínico-1
- IFN-γ: Interferón gamma
- IL: Interleuquina
- iNOS: Óxido nítrico sintasa inducible
- IP: Ipriflavona
- IP3: Inositol 1,4,5-trisfosfato
- MAPK: Proteína quinasas activadas por mitógenos
- MBG: Vidrio mesoporoso bioactivo
- M-CSF: Factor estimulante de colonias de macrófagos
- MHC: Complejo mayor de histocompatibilidad
- MNC: Células mononucleares

- MMP: Metaloproteinasas de matriz
- MSC: Célula madre mesenquimática
- mTOR: Blanco de rapamicina en mamíferos (*mammalian Target of Rapamycin*)
- nano-HA: Hidroxiapatita nanocristalina
- nano-SiHA: Hidroxiapatita sustituída con silicio nanocristalina
- NK: Célula *natural killer*
- NF-κB: Factor nuclear kappaB
- NRP1: Neuropilina 1
- OCN: Osteocalcina
- OPG: Osteoprotegerina
- OST: Osteostatina
- Osx: Factor de transcripción Osterix
- PAMP: Patrones moleculares asociados a patógenos
- PDGF: Factor de crecimiento derivado de plaquetas
- PECAM: Molécula de adhesión de plaquetas del endotelio celular
- PEG: Polietilenglicol
- PGE2: Prostaglandina E2
- PHD: Proteína prolil-hidroxilasa
- PHSRN: Prolina-histidina-serina-arginina-asparagina
- PIGF: Factor de crecimiento placentario
- PI3K: Fosfatidilinositol 3 quinasa
- PKC: Proteína quinasa C
- PLCγ: Fosfolipasa C γ
- PTH: Hormona paratiroidea
- PVA: Polivinil alcohol
- RANKL: Ligando del receptor activador de NF-κB
- RGD: Arginina-glicina-asparagina
- RMN: Resonancia magnética nuclear
- ROS: Especies reactivas de oxígeno
- RTK: Receptor tirosina quinasa
- Runx2/Cbfa1: Factor de transcripción 2 relacionado con Runt
- SBF: Fluido corporal simulado
- SEM: Microscopía electrónica de barrido
- SERM: Modulador selectivo de los receptores de estrógenos
- SiHA: Hidroxiapatita sustituída con silicio
- siRNA: RNA de silenciamiento
- SR.D10: Clon D10 de linfocitos T singenéicos reactivos
- STH: Hormona de crecimiento humana somatotropa
- SSC: Side Scatter (dispersión lateral)
- TEM: Microscopía electrónica de transmisión
- TGF-β: Factor de crecimiento transformante β
- TNF-α: Factor de necrosis tumoral α
- TCR: Receptor de células T
- TLR: Receptor de tipo toll
- TRAP: Fosfatasa ácida resistente a tartrato
- UV: Ultravioleta
- VEGF: Factor de crecimiento de endotelio vascular
- VEGFR: Receptor de factor de crecimiento de endotelio vascular
- vWF: Factor de von Willebrand
- Wnt: Wingless e Int

RESUMEN

RESUMEN

La osteoporosis es la enfermedad degenerativa con mayor prevalencia en el mundo. Se trata de una enfermedad metabólica ósea, progresiva y crónica. Está causada por un desequilibrio en el proceso de remodelado óseo, donde la actividad resortiva de los osteoclastos se ve favorecida frente a la síntesis de nuevo hueso, llevada a cabo por los osteoblastos. Predispone a un aumento del riesgo de fractura a quien la padece, estimándose que 1 de cada 3 mujeres y 1 de cada 5 hombres sufrirá una fractura osteoporótica a o largo de su vida, con el elevado impacto socioeconómico que esto conlleva.

Existen diferentes estrategias para el tratamiento de la osteoporosis que incluyen la utilización de fármacos específicos para frenar la actividad resortiva de los osteoclastos y potenciar la función de los osteoblastos, así como el diseño de biomateriales capaces de inducir los procesos de osteogénesis y angiogénesis, implicados en la regeneración del tejido óseo.

La hidroxiapatita sustituida con silicio (SiHA) y las hidroxiapatitas nanocristalinas (nano-HA), ocupan una posición clave con respecto a otras biocerámicas para la preparación de andamios 3D destinados al tratamiento de hueso osteoporótico y a la reparación de defectos óseos. La decoración de los andamios con factores de crecimiento como el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), inductor de angiogénesis y osteogénesis, representa una de las alternativas más útiles para mejorar el rendimiento de los andamios.

Por otra parte, las nanoesferas de vidrio bioactivo mesoporoso (nanoMBGs) tienen un gran potencial para el tratamiento del hueso osteoporótico debido a sus características específicas y a la posibilidad de cargar fármacos antiosteoporóticos en su interior, que serán liberados en las células óseas tras su captación intracelular. Entre estos fármacos, la ipriflavona (IP) es una isoflavona sintética que inhibe la resorción ósea, mantiene la densidad ósea y previene la osteoporosis. La administración de IP cargada en nanopartículas (nanoMBG-IPs) para su liberación intracelular es una alternativa muy prometedora, ya que la cantidad de IP necesaria para modificar la actividad de las células óseas sería mucho menor que la utilizada por vía sistémica, evitando además posibles efectos secundarios del fármaco.

El objetivo de esta Tesis Doctoral es el estudio de la respuesta celular a dos tipos de biomateriales diseñados para el tratamiento de hueso osteoporótico mediante diferentes estrategias experimentales:

- Andamios 3D preparados con hidroxiapatitas sustituidas con silicio y tratados con factor de crecimiento de endotelio vascular (Capítulo 1)
- Nanoesferas de sílice mesoporosa cargadas con ipriflavona como fármaco antiosteoporótico (Capítulo 2)

Los estudios realizados *in vitro* e *in vivo* en esta Tesis Doctoral demuestran que los andamios macroporosos de hidroxiapatita cristalina tratados y sin tratar con VEGF (SiHA

y SiHA/VEGF, respectivamente) son excelentes candidatos para el tratamiento de hueso osteoporótico, puesto que permiten el remodelado óseo favoreciendo la adhesión y el crecimiento de osteoblastos y retrasando la diferenciación de los osteoclastos y su actividad resortiva. Además, los preosteoblastos son capaces de adherirse a su superficie, proliferar y diferenciarse a osteoblastos maduros, procesos claves para que se produzca la osteogénesis. Estos andamios permiten el crecimiento de células progenitoras endoteliales (EPCs), pudiendo así desarrollarse la angiogénesis o vascularización alrededor del biomaterial y en los tejidos colindantes. Al implantarse en ovejas osteoporóticas se ha observado que los andamios de SiHA y SiHA/VEGF mejoran el grosor de las trabéculas óseas de nueva síntesis y el porcentaje de osificación. Sin embargo, los andamios de hidroxiapatita sustituida con silicio nanocristalina tratados y sin tratar con VEGF (nanoSiHA y nanoSiHA/VEGF, respectivamente) retrasan *in vitro* la diferenciación de los preosteoblastos y su degradación *in vivo* se produce de forma acelerada, provocando la migración de partículas fuera del área de implantación y la aparición de componentes inflamatorios. Todo ello hace descartar estos materiales de hidroxiapatita sustituida con silicio nanocristalina (nanoSiHA y nanoSiHA/VEGF) como sustitutos óseos y permite proponer los andamios de hidroxiapatita cristalina tratados con VEGF (SiHA/VEGF) como excelentes candidatos para el tratamiento de hueso osteoporótico.

Por otra parte, en esta Tesis Doctoral se han optimizado dos modelos de cocultivo *in vitro* para evaluar el efecto de nanomateriales en condiciones que mimetizan la comunicación intercelular que se produce *in vivo* entre diferentes tipos celulares. Uno de ellos consiste en el crecimiento de osteoblastos y osteoclastos (diferenciados *in vitro* a partir de macrófagos RAW 264.7), modelo experimental que ha permitido comprobar que la presencia de los osteoblastos retrasa la diferenciación de los osteoclastos, probablemente mediante la modulación de la liberación de moléculas como RANKL y OPG. El segundo modelo de cocultivo consiste en el crecimiento de macrófagos RAW 264.7 y células progenitoras endoteliales (EPCs), en el que se pudo analizar el efecto modulador de los macrófagos sobre estas células angiogénicas.

Los estudios llevados a cabo *in vitro* con las nanoesferas de vidrio mesoporoso bioactivo (nanoMBGs) sin cargar y cargadas con ipriflavona (nanoMBG-IPs) han demostrado su eficaz incorporación intracelular por todos los tipos celulares evaluados (osteoblastos, osteoclastos, preosteoblastos, EPCs, macrófagos y linfocitos), a través de diversos mecanismos de endocitosis y de forma dosis-dependiente. Ninguno de los dos tipos de nanoesferas utilizados presentan efectos negativos sobre la proliferación o la actividad específica de los tipos celulares estudiados. Cuando el fármaco está presente (nanoMBG-IPs) se produce un efecto osteogénico al potenciar la diferenciación de preosteoblastos a osteoblastos maduros, medida a través de la actividad ALP, así como un efecto positivo en el balance del remodelado óseo, puesto que permiten la correcta proliferación y actividad de los osteoblastos y reducen la actividad resortiva de los osteoclastos diferenciados *in vitro.* La incorporación intracelular de nanoMBGs y nanoMBG-IPs en EPCs promueve la expresión de VEGFR2, de forma más pronunciada tras la liberación intracelular del fármaco, evidenciando el potencial de estas nanoesferas para inducir el proceso de angiogénesis. En cuanto a la respuesta inmune desencadenada por estas nanoesferas, se ha evaluado utilizando macrófagos RAW 264.7

y las líneas celulares AE103 y SR.D10, representativas de linfocitos Th1 y Th2, respectivamente. Se ha comprobado que estos nanomateriales no inducen la polarización de macrófagos a fenotipo proinflamatorio M1 y además favorecen el fenotipo antiinflamatorio/reparador M2, clave en los procesos de reparación tisular. Estas nanoesferas tampoco alteran la respuesta inmune adaptativa, medida a través de la activación y producción de citoquinas proinflamatorias en linfocitos Th1 y Th2.

Los resultados obtenidos *in vivo* en conejas osteopénicas, que actualmente continúan en desarrollo, muestran que las nanoMBG-IPs producen un aumento en el grosor de las trabéculas y en su densidad ósea. Todas estas evidencias conducen a proponer las nanoMBG-IPs como excelente nanomaterial para el tratamiento de la osteoporosis por administración local en áreas que comienzan a mostrar pérdidas de densidad ósea debidas a un desequilibrio en el proceso de remodelado óseo.

ABSTRACT

Abstract

ABSTRACT

Osteoporosis is the most prevalent degenerative disease worldwide. It is a progressive and chronic metabolic bone disease. It is caused by an imbalance in the bone remodeling process, where the resorptive activity of osteoclasts is favored over the synthesis of new bone, carried out by osteoblasts. It predisposes those who suffer the disease to an increased risk of fracture, estimating that 1 in 3 women and 1 in 5 men will suffer an osteoporotic fracture throughout their lives, with the high socioeconomic impact that this entails.

There are different strategies for the treatment of osteoporosis that include the use of specific drugs to slow down the resorptive activity of osteoclasts and enhance the function of osteoblasts, and the design of biomaterials with the ability to induce the processes of osteogenesis and angiogenesis, involved in the regeneration of bone tissue.

Silicon substituted hydroxyapatite (SiHA) and nanocrystalline hydroxyapatites (nano-HA), are especially promising for the preparation of 3D scaffolds for the treatment of osteoporotic bone and the repair of bone defects, compared to other bioceramics. The decoration of these scaffolds with growth factors such as vascular endothelial growth factor (VEGF), an angiogenesis and osteogenesis inducer, represents one of the most useful alternatives to improve scaffold performance.

On the other hand, mesoporous bioactive glass nanospheres (nanoMBGs) have great potential for the treatment of osteoporotic bone due to their specific characteristics and the possibility of loading anti-osteoporotic drugs inside them, which will be released into bone cells after their intracellular uptake. Among these drugs, ipriflavone (IP) is a synthetic isoflavone that inhibits bone resorption, maintains bone density, and prevents osteoporosis. The administration of IP loaded in nanoparticles (nanoMBG-IPs) for its intracellular release is a very promising alternative, since the amount of IP needed to modify the activity of bone cells would be much less than the amount applied systemically, and this strategy could avoid possible drug side effects.

The objective of this Doctoral Thesis is the evaluation of the cellular response to two types of biomaterials designed for the treatment of osteoporotic bone through different experimental strategies:

- 3D scaffolds prepared with silicon-substituted hydroxyapatites and treated with vascular endothelial growth factor (Chapter 1)
- Mesoporous silica nanospheres loaded with ipriflavone as an antiosteoporotic drug (Chapter 2)

The *in vitro* and *in vivo* studies carried out in this Doctoral Thesis demonstrate that macroporous crystalline hydroxyapatite scaffolds treated and untreated with VEGF (SiHA and SiHA/VEGF, respectively) are excellent candidates for the treatment of osteoporotic bone, since they allow bone remodeling, favoring the adhesion and growth of osteoblasts but delaying the differentiation of osteoclasts and their resorptive activity. In addition, preosteoblasts are capable of adhering to its surface, proliferating

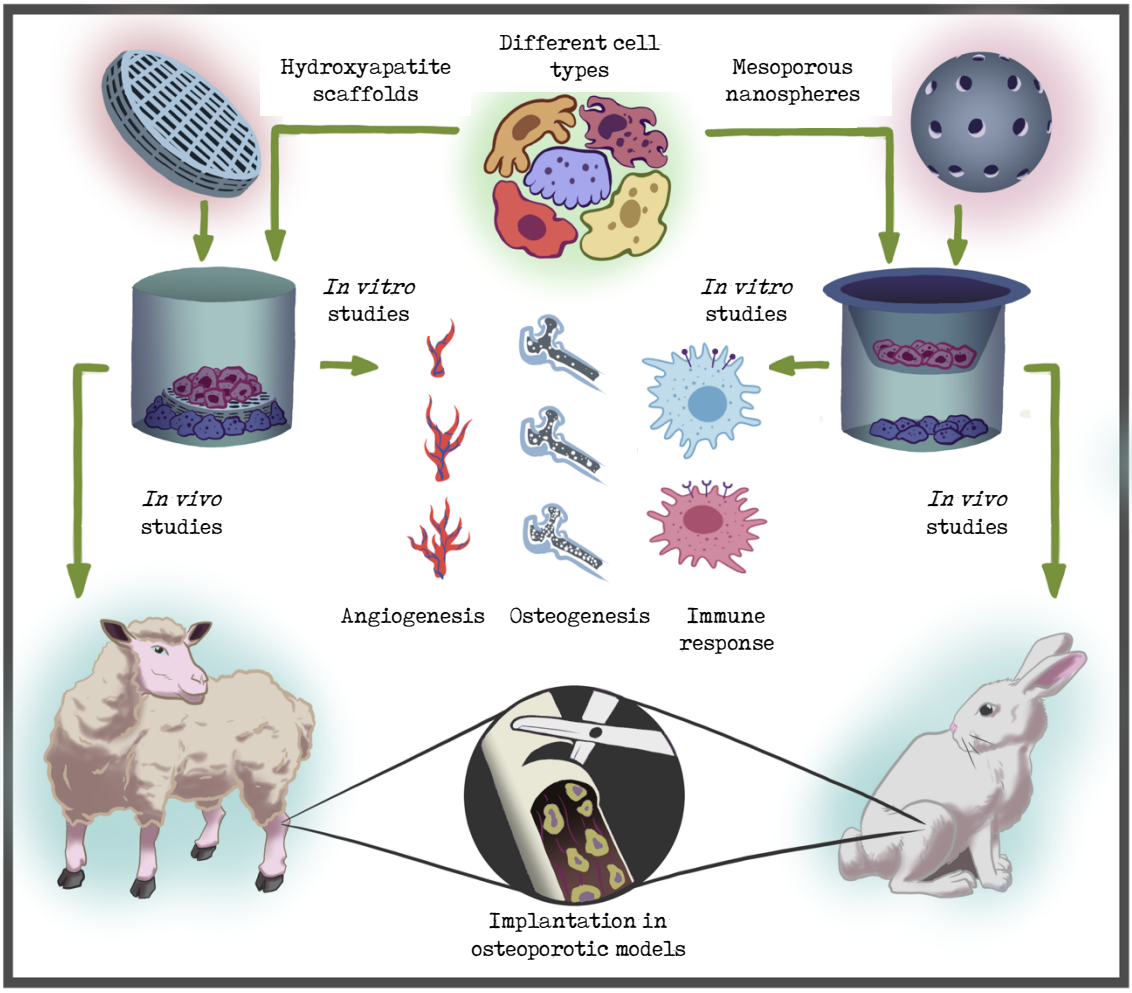
and differentiating into mature osteoblasts, key processes for osteogenesis. These scaffolds allow the growth of endothelial progenitor cells (EPCs), thus being able to develop angiogenesis, or vascularization, around the biomaterial and in the surrounding tissues. When implanted in osteoporotic sheep, it has been observed that SiHA and SiHA/VEGF scaffolds improve the thickness of newly synthesized bone trabeculae and the percentage of ossification. However, nanocrystalline silicon-substituted hydroxyapatite scaffolds treated and untreated with VEGF (nanoSiHA and nanoSiHA/VEGF, respectively) delay *in vitro* differentiation of preosteoblasts and their degradation *in vivo* is accelerated, causing particle migration outside the area of implantation and the appearance of inflammatory components. All this results lead to discard these nanocrystalline silicon-substituted hydroxyapatite materials (nanoSiHA and nanoSiHA/VEGF) as bone substitutes and allows us to propose VEGF-treated crystalline hydroxyapatite scaffolds (SiHA/VEGF) as excellent candidates for the treatment of osteoporotic bone.

On the other hand, in this Doctoral Thesis, two *in vitro* co-culture models have been optimized to evaluate the effect of nanomaterials under conditions that mimic the intercellular communication that occurs *in vivo* between different cell types. One of them consists on the growth of osteoblasts and osteoclasts (differentiated *in vitro* from RAW 264.7 macrophages), an experimental model that has shown that the presence of osteoblasts delays osteoclast differentiation, probably by modulating the release of molecules such as RANKL and OPG. The second co-culture model consists on the growth of RAW 264.7 macrophages and endothelial progenitor cells (EPCs), in which the modulatory effect of macrophages on these angiogenic cells can be analyzed.

Studies carried out *in vitro* with unloaded (nanoMBGs) and ipriflavone-loaded bioactive mesoporous glass nanospheres (nanoMBG-IPs) have demonstrated their efficient intracellular incorporation by all cell types evaluated (osteoblasts, osteoclasts, preosteoblasts, EPCs, macrophages and lymphocytes), through various mechanisms of endocytosis and in a dose-dependent manner. The two types of nanospheres used do not have negative effects on the proliferation or specific activity of the cell types studied. When the drug is present (nanoMBG-IPs), an osteogenic effect is produced by enhancing the differentiation of preosteoblasts to mature osteoblasts, measured through ALP activity, as well as a positive effect on the balance of bone remodeling, since they allow the correct proliferation and activity of osteoblasts and reduce the resorptive activity of differentiated osteoclasts *in vitro*. The intracellular incorporation of nanoMBGs and nanoMBG-IPs in EPCs promotes the expression of VEGFR2, more pronounced after intracellular drug release, showing the potential of these nanospheres to induce the angiogenesis process. Regarding the immune response triggered by these nanospheres, it has been evaluated using RAW 264.7 macrophages and the AE103 and SR.D10 cell lines, representative of Th1 and Th2 lymphocytes, respectively. It has been demonstrated that these nanomaterials do not induce the polarization of macrophages to the proinflammatory phenotype M1 and also favor the anti-inflammatory/repairing phenotype M2, which is key in tissue repair processes. These nanospheres also do not modify the adaptive immune response, measured through the activation and production of proinflammatory cytokines in Th1 and Th2 lymphocytes.

The results obtained *in vivo* in osteopenic rabbits, which are currently under development, show that nanoMBG-IPs produce an increase in the thickness of the trabeculae and in their bone density. All these evidences lead to propose nanoMBG-IPs as an excellent nanomaterial for the treatment of osteoporosis by local administration in areas that begin to show bone density loss due to an imbalance in the bone remodeling process.

GRAPHICAL ABSTRACT



INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

1.Biomateriales

1.1. Concepto de biomaterial

Se define biomaterial como un material de origen natural o sintético, diseñado para entrar en contacto con un tejido vivo, solo o formando parte de un sistema, con el objetivo de reemplazar alguna de sus partes o generar una función determinada durante un tratamiento terapéutico o diagnóstico[1].

Para el diseño de cualquier biomaterial es necesario tener en cuenta aspectos fundamentales relacionados con sus propiedades mecánicas, físicas, químicas y biológicas. Entre estos aspectos cruciales destacan[1]:

- **Biocompatibilidad**: Un material es biocompatible si su implantación y presencia no producen una respuesta adversa en el organismo receptor, tanto de forma local como sistémica. El biomaterial, además de no ser citotóxico, debe generar una respuesta celular y tisular beneficiosa considerando la aplicación para la que ha sido diseñado[2-3].
- **Biofuncionalidad**: el biomaterial debe satisfacer los objetivos y funciones para los que ha sido ideado, teniendo en cuenta los tipos celulares con los que entrará en contacto al ser implantado[3].
- **Posibilidad de fabricación**: el biomaterial debe poder ser desarrollado a partir de su diseño, empleando las tecnologías existentes y asegurando su calidad[4].
- **Propiedades mecánicas**: en función de su aplicación, la resistencia a la tracción a la fatiga y a la corrosión, así como su elasticidad, el acabado de la superficie y la dureza pueden resultar críticos[4-5].
- **Propiedades físicoquímicas**: en la preparación y el diseño de biomateriales deben considerarse diversas características fisicoquímicas que afectan a la adhesión y proliferación celular como la humectabilidad, rugosidad y carga eléctrica de la superficie, así como el tamaño y la distribución de los poros en materiales porosos[6].
- **Propiedades biológicas**: La incorporación en la superficie del material de factores bioactivos como iones metálicos, factores de crecimiento, proteínas de la matriz extracelular o componentes con la secuencia RGD (Arg-Gly-Asp), implicada en la interacción de las proteínas de la matriz con las células, puede mejorar la adhesión celular, favoreciendo la integración de los biomateriales diseñados para regeneración tisular[6].

1.2. Evolución histórica de los biomateriales

El estudio de los biomateriales ha tenido un crecimiento exponencial a lo largo de los últimos 60 años en los que se ha producido una evolución progresiva, desde la utilización de materiales inertes como sustitutos de tejido vivo, hasta el diseño a la carta de biomateriales funcionalizados con propiedades bioactivas y biodegradables, que logren la reparación y la regeneración de dicho tejido.

El primer registro relacionado con la presencia de materiales en el cuerpo humano data de hace más de 9000 años según revelaron los restos arqueológicos del hombre de Kennewick, que vivió con la punta de una lanza clavada en la cadera y cuya herida curó, siendo asimilado el material por el organismo.

En el año 1500 a.C. en el antiguo Egipto, se utilizaban hilos de lino para hacer suturas y metales para hacer empastes, agujas y placas óseas.
En el año 600 a.C. los mayas utilizaban el nácar de conchas marinas como implantes dentales y posteriormente, en el año 200 a.C. en Francia se utilizaban los metales para preparar dientes[7].

Más tarde, en 1829 H.S. Levert realizó el primer estudio *in vivo* de biocompatibilidad de diversos materiales para implantes. Lo llevó a cabo en perros y empleó metales como el oro, la plata, el plomo o el platino, observando que éste último era el más tolerado por el organismo. En 1924, M.D. Zierold completó el estudio y observó cómo el hierro y el acero, con su corrosión, provocaban la resorción del hueso adyacente al implante, así como el cobre, el magnesio, el níquel y el zinc decoloraban el tejido de alrededor, mientras que el oro, la plata y el plomo eran bien tolerados, pero no se obtenían buenas respuestas mecánicas. Sin embargo, la estelita, aleación de cobalto, cromo y molibdeno, sí era tolerada y presentaba buena resistencia *in vivo*[7-8].

Gradualmente se fueron desarrollando biomateriales diseñados para aplicaciones muy específicas como hidrogeles como materiales blandos, hidrofílicos y elásticos idóneos para lentillas (1936), poliuretanos elásticos para válvulas cardíacas (Otto Bayer, 1937), polietilenglicol (PEG) para prolongar el tiempo de vida de enzimas en la industria biotecnológica (1944) y siliconas de baja toxicidad empleadas en membranas de diálisis (1950).

Los primeros avances en ingeniería ósea estuvieron centrados en la búsqueda de un sustituto estructural de cadera. En 1891 se realizó el primer trasplante con un injerto de marfil que no resultó exitoso. Unos años más tarde, en 1925, Smith-Petersen probó con un recubrimiento de vidrio sobre la cabeza del injerto que no resultó duradero. Entre 1930 y 1956 se probaron diferentes tipos de recubrimiento como el cromo, el acero inoxidable o las resinas acrílicas.

En 1958 John Charnely mejoró el diseño de prótesis de cadera recubriéndola con teflón, que resultó poco biocompatible debido al alto porcentaje de residuos liberados con el desgaste. Tres años después cambió el material de recubrimiento por polietileno de ultra alto peso molecular, obteniendo resultados más exitosos[7].

En 1929, la industria dental creó el Vitallium, una aleación de cobalto (65%), cromo (35%) y molibdeno (5%), que tuvo un gran éxito como sustituto y soporte dental[7]. En 1952, Branemark descubrió de manera fortuita que el titanio que había empleado para observar procesos de reparación de tejido tras una cirugía, permanecía meses después unido al hueso. Definió entonces el término de osteointegración y desarrolló la aplicación de titanio como sustituto óseo y dental[9].

En 1960 empezó a emplear el ácido poliláctico-glicolítico en fijaciones ortopédicas y suturas, así como en forma de andamios ("scaffolds") en ingeniería de tejido óseo, debido a su lenta degradación y a la posibilidad que ofrece de liberar de forma controlada fármacos y proteínas[9].

Unos años más tarde, en 1969, comienzó a utilizarse la hidroxiapatita como sustituto óseo en forma pulverizada y compacta. A su vez, Larry Hench desarrolló cerámicas con elevada concentración de iones de Ca y P con el objetivo de promover su unión al hueso y sintetizó el vidrio 45S (44,5 wt% SiO_2) o Bioglass[7,10]. En este contexto, se desarrollaron los vidrios bioactivos mesoporosos, biocerámicas para la reparación del tejido óseo debido a su capacidad de imitar los procesos de mineralización del hueso en contacto con fluidos biológicos, lo que les permite unirse al tejido óseo adyacente[11]. Además, la posibilidad de introducir fármacos en los poros de estos materiales mesoporosos, demostrada por la profesora María Vallet-Regí hace 20 años, y la capacidad de adaptar la estructura de los poros y las propiedades texturales a nanoescala, permite un control muy preciso de la capacidad de carga y liberación de diferentes productos farmacéuticos, como los fármacos antiosteoporóticos, antimicrobianos y agentes antitumorales[12-14].

En la actualidad, los retos en investigación en biomateriales están centradosprincipalmente en la producción de matrices para medicina regenerativa, capaces de promover la formación de tejido allí donde se aplican, en el diseño de sistemas de liberación controlada de fármacos para tratamiento de diferentes enfermedades, en la preparación de superficies bifuncionales modificadas para permitir albergar componentes biológicos, y en el estudio de nanomateriales con muy diversas aplicaciones biomédicas.

1.3. Tipos de biomateriales

Los biomateriales pueden clasificarse considerando diversos criterios, como son su composición y la respuesta que producen en el organismo.

a) Atendiendo a su composición, los biomateriales se pueden clasificar en[1,4,15]:

- **Metales**

  Los metales son excelentes materiales en cuanto a sus propiedades mecánicas. Poseen una elevada dureza y ductilidad, lo que les confiere alta resistencia de carga. Además, son conductores térmicos y eléctricos y las aleaciones que se emplean en la clínica presentan una elevada resistencia a la corrosión, biocompatibilidad y coste económico razonable. Son típicamente inertes y a nivel biomédico se pueden dividir en tres subcategorías: acero inoxidable, combinaciones de cobalto-cromo-molibdeno, y titanio y sus aleaciones. Las aplicaciones más frecuentes son las prótesis de cadera, los implantes dentales y las herramientas de sutura.

- **Cerámicas**

  Son materiales duros, rígidos, fuertes, frágiles, resistentes a la corrosión y al desgaste y tienen una baja densidad. Su empleo es interesante en lugares en los que van a sufrir fuerzas de compresión, pero no de tensión puesto que tienen un alto módulo de Young. En cuanto a la conducción de electricidad o temperatura, se consideran materiales aislantes. Según su composición, pueden ser inertes, activas o resorbibles. Estos materiales se utilizan principalmente para implantes dentales y ortopédicos.

- **Polímeros**

  Son los materiales más utilizados en aplicaciones biomédicas, debido a su elevada durabilidad, flexibilidad, resistencia bioquímica, ligereza, biocompatibilidad y facilidad de fabricación. Pueden ser inertes o resorbibles. Presentan una elevada durabilidad y facilidad de fabricación, sin embargo, pueden deformarse con el tiempo. Los polímeros son ampliamente utilizados para injertos vasculares, válvulas cardíacas, corazones artificiales, cementos óseos, reemplazos de articulaciones y marcapasos.

- **Materiales compuestos**

  Están formados por dos o más materiales metálicos, cerámicos o poliméricos y se componen del conjunto de una matriz y otro elemento con el que se rellena, con el objetivo de reforzarla aportando las propiedades necesarias para la función que va a desempeñar. La principal ventaja que presentan es que se producen a medida y presentan una elevada dureza, sin embargo, pueden resultar difíciles de fabricar. Los materiales compuestos se utilizan principalmente como cementos óseos y para la fabricación de lentillas y resinas dentales.

b) Atendiendo a la respuesta producida en el organismo, los biomateriales se pueden clasificar en[1,4]:

- **Bioinertes**

  Los biomateriales bioinertes mantienen su estructura y causan una respuesta mínima o nula en el organismo en que se introducen. Por otra parte, al no ser reconocidos por éste, pueden provocar la formación de una cápsula fibrosa (fundamentalmente de colágeno) a su alrededor que los aísla e impide el contacto directo con el organismo, generando así una barrera física con el mismo. Los materiales bioinertes se utilizan para la preparación de prótesis metálicas de cadera y prótesis dentales.

- **Bioactivos**

  En la década de los 80, se comienzan a desarrollar biomateriales funcionalizados capaces de comunicarse con el microentorno en el que se implantan, es decir, materiales que presentan bioactividad, promoviendo la unión con el tejido que lo rodea. Los más comunes son los fosfatos de calcio, como la hidroxiapatita, y los vidrios bioactivos,como el Bioglass®. En la actualidad se trabaja en el diseño

de biomateriales funcionalizados de tal modo que puedan inducir la adhesión, proliferación y diferenciación de células sobre su superficie, conduciendo a la regeneración tisular del área en que se implantan.

- **Biorresorbibles**

  Los biomateriales biorresorbibles o degradables van liberando gradualmente sus componentes a los tejidos de alrededor y se disuelven por completo con el paso del tiempo hasta verse reemplazados por el tejido biológico. Estos productos de degradación se incorporan a los procesos metabólicos del hospedador y quedan retenidos en el organismo o bien, se excretan. Un material bioactivo puede resultar biorresorbible disminuyendo su tamaño de partícula o incrementando su carácter hidrofílico[16]. Pertenecen a este grupo los copolímeros de ácido poliláctico-poliglicólico, los óxidos de calcio y los carbonatos de calcio.

1.4. Biocerámicas

El avance de la tecnología, el desarrollo de la sanidad y las mejoras en el estilo de vida de la población, han conducido a un aumento de la esperanza de vida, y con ello, a la aparición de patologías asociadas a la edad y al deterioro físico. En este sentido, se estima que en el año 2050 existirán más de mil millones de personas que superen los 60 años de edad en el mundo[17].

Entre las enfermedades relacionadas con la edad se encuentran la artrosis y la osteoporosis, producidas por la degradación que el esqueleto humano comienza a sufrir a partir de los 30 años[17].

En este contexto, frente a la posibilidad de utilizar sustitutos para reemplazar el tejido dañado, existe un interés creciente hacia aquellos materiales capaces de promover la regeneración y el crecimiento de dicho tejido. De esta forma, se evitan además los riesgos que presentan otras posibilidades como el trasplante autólogo (del propio individuo) o el xenotrasplante (tejido procede de otra especie, generalmente cerdo), limitados por su disponibilidad y por las complicaciones asociadas, como la incompatibilidad a nivel de sistema inmune, las posibles infecciones y los riesgos derivados de la propia cirugía. Actualmente, los nuevos materiales diseñados para regeneración tisular ósea, actúan como andamios o sustratos de las células que los van a colonizar, induciendo la síntesis de nueva matriz ósea[1].

Las biocerámicas han jugado un papel clave en el desarrollo de implantes óseos y dentales para reemplazar y/o reparar tejido dañado, por enfermedad o tras un traumatismo.

Son materiales inorgánicos con uniones iónicas y covalentes y, según su estructura iónica, se pueden encontrar biocerámicas cristalinas, no cristalinas y vidrios.
Cuanto más soluble o iónica es una cerámica, más facilitará la formación de nuevo hueso a su alrededor, proceso conocido como **osteoinducción**. Por el contrario, las cerámicas

más insolubles e inertes, pueden servir de andamio para la adhesión y el crecimiento de las células óseas, proceso conocido como **osteoconducción**[18].

Según su solubilidad y el formato en que se utilicen, las aplicaciones biomédicas de las biocerámicas pueden variar. En forma particulada son ampliamente empleadas en el relleno de pequeños defectos óseos, si son fosfatos de calcio solubles se pueden emplear en estructuras en crecimiento para promover la osteoinducción y si son andamios o cementos poco solubles, servirán como soporte para el crecimiento de células óseas sobre su superficie, promoviendo la osteoconducción.

Es importante destacar que el tamaño de los cristales que conforman la biocerámica viene condicionado por la temperatura de síntesis de la misma. Así, a elevadas temperaturas, mayores son los cristales y menor la reactividad de la cerámica. Por otro lado, se pueden producir estructuras más o menos compactas, de distinta porosidad y con un determinado tamaño de poro, lo que también condicionará su reactividad[16,18].

Con el fin de mimetizar la superficie ósea y conseguir propiedades concretas en las zonas del biomaterial expuestas al tejido óseo, se pueden utilizar diferentes estrategias. Entre ellas destaca el recubrimiento de diversos materiales con hidroxiapatita, proteínas de la matriz extracelular, fármacos, factores de crecimiento y péptidos relacionados con el proceso de adhesión celular[19].

Las biocerámicas se pueden clasificar atendiendo a su reactividad y a la respuesta que generan en el organismo en que se implantan, así como agruparse en distintas generaciones de acuerdo con sus características.

a) Clasificación de las biocerámicas atendiendo a su reactividad y a la respuesta que generan en el organismo en que se implantan[16,20]

- **Bioinertes**

  Alúmina (Al_2O_3)
  La alúmina u óxido de aluminio presenta elevada resistencia a la corrosión y al desgaste y una buena biocompatibilidad. Fue la primera cerámica en utilizarse ampliamente, primero en 1963 en prótesis articulares y espaciadores interespinosos[21] y después, en 1967, en implantes dentales[4,18].

  Zirconia (ZrO_2)
  Las biocerámicas compuestas de zirconia poseen mayor tenacidad ante una fractura, mayor resistencia a la tensión y un módulo de Young inferior al de las compuestas de alúmina. Sin embargo, no presentan un buen comportamiento frente a la fricción y el desgaste y en contacto con fluidos fisiológicos, su resistencia se ve reducida con el tiempo. Este material se empleó por primera vez en 1986 como una alternativa a la alúmina en la fabricación de cabezas femorales[22] y posteriormente, en 1993, en implantes dentales[23], en reemplazamientos de cadera, rodillas, dientes, tendones y ligamentos[24].

Carbón

La principal ventaja de este tipo de materiales es que no sufren fatiga, pero son frágiles y presentan baja resistencia a la tensión. Normalmente se realiza una deposición superficial o recubrimiento mediante gases convectivos en los que los productos orgánicos se queman o precipitan en el propio proceso y salen a través de un espray, o bien, se utiliza en forma de fibras de refuerzo en materiales compuestos. Entre sus usos se encuentran los recubrimientos de las válvulas cardíacas y los implantes dentales intraóseos[4].

- **Bioactivas**

Vidrio

En función de la proporción que tenga de SiO_2, Na_2O, CaO y P_2O_5, los vidrios presentan diferentes grados de bioactividad, pudiendo ser desde bioinertes hasta biodegradables[24]. En función de los agentes de nucleación empleados y la temperatura a la que tenga lugar el proceso, se formarán capas de cristales más o menos uniformes. Una vez implantado, se produce un intercambio iónico y la hidrólisis de las capas de vidrio de la superficie ricas en sílice, así como la disolución y difusión de iones de calcio (Ca^{2+}) y fosfato (PO_4^{3-}) que favorecen la formación de nuevas capas de fosfato cálcico amorfo en su superficie[25]. Se utiliza en implantes dentales, de oído medio, articulares, tornillos y clavos intramedulares.

Bioglass 45S5

Es un tipo de vidrio cerámico comúnmente empleado en odontología y en ingeniería de tejido óseo para rellenar pequeños defectos, ya que su porosidad favorece su resorción y su elevada bioactividad facilita su integración en el tejido óseo[24].

- **Biorresorbibles**

Fosfatos de calcio

Su principal característica es la porosidad que presentan, semejante a la del hueso esponjoso[26], permitiendo además la formación de una capa de hidroxiapatita sobre su superficie, por lo que es el tipo de biomaterial más empleado para regeneración ósea, ya que es tanto bioactivo como biorresorbible[27-30].

Dentro de este grupo de biocerámicas, la hidroxiapatita cálcica sintética ($Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$) es la cerámica de referencia en la reconstrucción ósea, ya que tiene una relación de Ca/P similar a la de los depósitos minerales del hueso, una estructura cristalina y una densidad similares a la ósea[31]. Es biocompatible, bioactiva y osteoconductiva, es decir, permite la adhesión celular sobre su superficie y el crecimiento de hueso nuevo[18]. Por todas estas características, es comúnmente utilizada en implantes dentales y ortopédicos, reconstrucciones de mandíbula, cirugía facial y reparaciones de oreja, nariz y garganta. Se pueden realizar sustituciones iónicas que mejoren algunas de sus propiedades,

modificando la estructura de su superficie y su carga eléctrica o bien, introduciendo iones que se liberen cuando se produzca la resorción del material y potencien propiedades como la adhesión y proliferación de células sobre su superficie, y con ello, la regeneración del hueso[18].

b) Clasificación de las biocerámicas por generaciones[16,20,32]

- **Biocerámicas de primera generación**

  Su estudio comienza en la década de los 60, cuando se pretendía producir materiales lo menos reactivos posible, estables, no tóxicos, biocompatibles y resistentes a la corrosión y al desgaste. Debido a su falta de reacción con el organismo vivo, suelen conllevarla formación de una cápsula fibrosa aislante a su alrededor, fundamentalmente de colágeno[33]. Los ejemplos más representativos son la alúmina y la zirconia[16].

- **Biocerámicas de segunda generación**

  Alrededor de los 80 se comenzó a trabajar en el desarrollo de materiales que reaccionaran con el organismo en el que se introducían, generando una respuesta bioactiva y/o su reabsorción. Los vidrios bioactivos y algunos fosfatos cálcicos son ejemplo de biocerámicas de segunda generación.

- **Biocerámicas de tercera generación**

  Es el grupo de biocerámicas más reciente, son capaces de promover la estimulación y regeneración del tejido óseo (osteoinducción) y no únicamente su reemplazo. Algunas de estas cerámicas se basan en biocerámicas de segunda generación de escala nanométrica, que actúan como andamios, a las que se les ha introducido un fármaco o metabolito en sus poros[16,34].

1.5. Nanomateriales

La tecnología de los biomateriales ha avanzado en el desarrollo de piezas cada vez más pequeñas optimizando sus propiedades físicoquímicas con el objetivo de conseguir mejores respuestas fisiológicas, mejorando la precisión en la administración de fármacos para la reducción de su dosis, o en diagnóstico clínico, permitiendo la reducción del tamaño de sensores y sondas[1].

En este contexto nacen los **nanomateriales**, de tamaño ideal igual o inferior a 100 nm, al menos en una dimensión. Entre los nanomateriales de aplicación biomédica se encuentran las nanopartículas de sílice diseñadas con mesoporos dealrededor de 2-3 nm de diámetro, lo que permite la carga de fármacos de aproximadamente 1 nm en su interior, sirviendo así de **nanovehículo**. Cada una de estasnanopartículas, de 100 nm de diámetro, presenta una superficie de 500-1500 m^2, que además se puede modificar para favorecer la adsorción de moléculas, lo que amplía considerablemente la cantidad de

fármaco que se puede cargar en su interior. La administración local e intracelular de estos nanomateriales permite suministrar al tejido altas dosis de manera dirigida, mejorando el perfil farmacológico y reduciendo los efectos secundarios que produce el fármaco no vehiculizado[35].

El uso de **nanopartículas de vidrio mesoporoso bioactivo** como vectores en el transporte de sustancias con un efecto terapéutico requiere que su composición sea biocompatible, que el fármaco incorporado se mantenga estable y bioactivo, y que la propia partícula sea estable a nivel físico, químico y microbiológico[36-37]. Esto hace posible el tratamiento de patologías de forma localizada, favoreciendo la regeneración del tejido en que se implantan. El primero en emplearlas como sistema liberador de fármacos fue el grupo de Xia y Chang cargándolas con gentamicina como antibiótico de amplio espectro[38]. Estos investigadores mostraron cómo se producían dos cinéticas de liberación del fármaco diferentes en función de dónde se realizara la carga, si en la superficie o en el interior de los poros. Esto abrió un nuevo campo de trabajo, pudiendo utilizar las nanopartículas en el tratamiento de diversas patologías[39-40]. Las nanopartículas de sílice mesoporosa muestran como principales ventajas con respecto a las demás biocerámicas su elevada estabilidad mecánica, térmica y química, así como su alta capacidad de adsorción y, por tanto, carga de fármacos en sus poros. Además de la facilidad de funcionalización, tanto de su interior como de su superficie, a través del elevado número de grupos silanol (Si-OH) que presentan, hace posible la unión de fármacos y factores de crecimiento mediante puentes de hidrógeno y fuerzas de Van de Waals[38,41].

Estos nanomateriales también se emplean en diagnosis de diversas patologías debido a la elevada sensibilidad, rapidez y precisión que presentan, en teranosis para visualizar y evaluar la eficacia de un tratamiento o en nanodispositivos como biosensores o nanorobots[37]. Su composición, estructura y reducido tamaño permiten añadir sobre su superficie ligandos de vectorización para guiar al nanosistema hacia el tejido diana (como anticuerpos o un polisacárido dirigidos a células tumorales), agentes silenciadores para que pasen desapercibidos hasta llegar a su lugar de acción (como PEG) o componentes sensibles a estímulos que permitan ajustar la farmacocinética de acuerdo a estímulos relacionados con la condición patológica (como especies reactivas de oxígeno)[42-43].

En cuanto a su eliminación, las nanopartículas de sílice mesoporosa son biodegradables y biocompatibles, ya que sus productos de degradación no son citotóxicos ni se produce acumulación en órganos y se excretan por vía normal a través de hígado y riñones[44-45].

Algunos de los objetivos futuros de estos nanomateriales son utilizarlos como vehículos de fármacos altamente tóxicos para reducir su dosis, vehículos de nuevos agentes como siRNA u otros ácidos nucleicos, utilizarlos en teranosis a tiempo real y para optimizar tratamientos de inmunoterapia y vacunación[46-48].

2. Tejido óseo

Los huesos son estructuras altamente resistentes y elásticas cuya función principal es ofrecer soporte estructural y protección a los órganos vitales. Además, los huesos participan en la regulación del pH sanguíneo y de los niveles de calcio y fósforo en el organismo. Por otra parte, la médula ósea es el lugar donde se produce la hematopoyesis o generación de las células sanguíneas[49].

El tejido óseo es un tipo de tejido conjuntivo en el que las células que lo forman están embebidas en una matriz mineralizada compuesta principalmente por hidroxiapatita, colágeno y agua (Fig. 1). Este tejido se caracteriza por presentar un exterior duro y compacto (hueso cortical) y una zona central esponjosa (trabécula)[50].

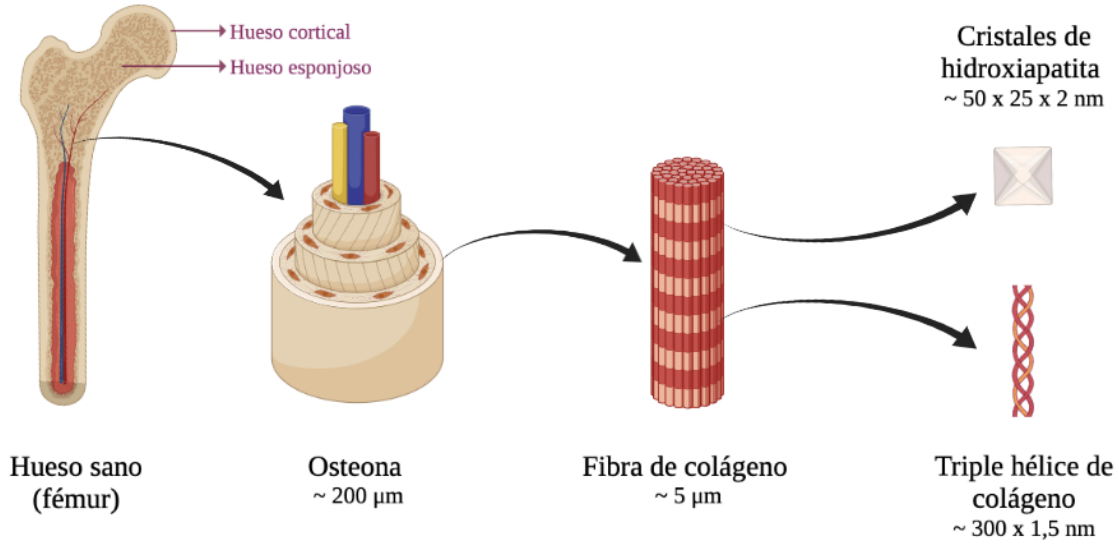


Figura 1. Componentes del hueso. Desde la dimensión macroscópica hasta la microscópica.

Cada hueso está rodeado por una membrana fibrosa o periostio, formada por tejido conjuntivo y repleta de vasos sanguíneos y terminaciones nerviosas. Por debajo de ella se encuentra el endostio o monocapa de tejido conjuntivo con función osteogénica que separa el tejido óseo compacto, robusto y con estructura laminar, del tejido esponjoso, más elástico y contenedor de la médula ósea.

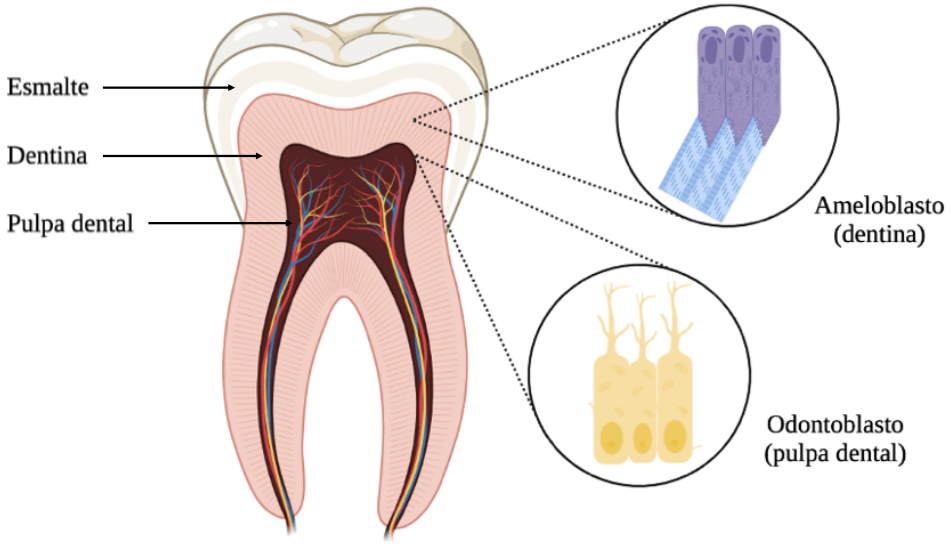


Figura 2. Componentes del diente. Principales células formadoras de cada capa.

El tejido óseo y los dientes están relacionados anatómica y funcionalmente[51]. La dentina, tejido que se encuentra en los dientes debajo del esmalte, tiene una composición similar a la matriz del hueso, ya que está compuesta por cristales de hidroxiapatita, fibras de colágeno y proteínas. En los dientes, las células se encuentran en la pulpa dental, tejido conjuntivo laxo en la parte interior del diente, presentando extensiones citoplasmáticas hacia la dentina, donde se encuentra el otro tipo celular característico de este tejido (Fig. 2). Los odontoblastos tienen capacidad de remodelar la dentina en respuesta a estímulos como el estrés mecánico[52].

2.1. Tipos de hueso

Los huesos pueden clasificarse considerando diversos criterios, como son su estructura macroscópica, estructura microscópica y su morfología[50,52].

a) Estructura macroscópica

En función de la disposición de las laminillas óseas, en el hueso se distinguen dos tipos de estructura macroscópica:

- **Tejido óseo compacto o cortical**: más denso, localizado en la periferia del hueso. Las laminillas óseas se organizan en unidades funcionales llamadas osteonas, de manera paralela y concéntrica, dejando en el centro una luz central o conducto de Havers, por el que circulan los vasos sanguíneos y los nervios. Cada lámina intersticial está formada por laminillas orientadas en direcciones opuestas, lo que le otorga mayor resistencia mecánica a la torsión y a la tensión. Las osteonas se comunican entre sí a través de los canalículos de Volkman.

- **Tejido óseo esponjoso o trabecular**: está formado por laminas óseas irregulares y cruzadas en forma de red porosa, delimitando cavidades areolares que albergan la médula ósea. Resistentes a la compresión y sensibles a ella: la tasa de remodelado

aumenta cuando se produce compresión en el hueso. Este tipo de estructura está más presente en las apófisis (protuberancia del hueso por la que se inserta a otro hueso o en la que se inserta un músculo) y epífisis (extremos) de los huesos largos y en los huesos cortos como las vértebras. Son especialmente susceptibles a enfermedades en las que disminuye la densidad ósea, como la osteoporosis.

b) Estructura microscópica

Dependiendo de la estructura microscópica e independientemente de la macroscópica, el tejido óseo se clasifica en:

- **Tejido óseo inmaduro, no laminar**: es el hueso primario e inmaduro. En él las células se distribuyen al azar, ya que las fibras de colágeno también están entrelazadas de forma aleatoria sin seguir ningún tipo de organización. Esto lo hace más flexible y deformable.

- **Tejido óseo maduro y laminar**: el tejido está dispuesto en láminas estructuradas y ordenadas. En este caso las fibras de colágeno se disponen en paralelo y a su vez con una orientación diferente a la de las fibras contiguas, otorgando resistencia al tejido.

c) Morfología

Atendiendo a su morfología, los huesos se clasifican en:

- **Huesos largos**: las epífisis o extremos están formadas por tejido esponjoso recubierto de cartílago hialino mientras que la diáfisis o zona central está formada por tejido óseo compacto y contiene la cavidad medular, con la médula ósea, rodeada de una pequeña capa de hueso esponjoso. Ej. fémur, húmero, tibia, peroné, radio y cúbito.
- **Huesos cortos**: no contienen médula ósea, tienen una fina capa de tejido óseo compacto exterior y un interior de hueso esponjoso. Ej. huesos de articulaciones móviles como los del carpo y del tarso.
- **Huesos planos**: contienen dos capas delgadas de tejido óseo cortical, entre las que está el tejido óseo esponjoso. Ej. escápula, hueso frontal, hueso parietal, hueso occipital, ilíaco y costillas.
- **Huesos sesamoideos**: están inmersos en ligamentos o tendones. Ej. rótula y hueso pisiforme.
- **Huesos neumatizados**: contienen espacios revestidos por mucosa y llenos de aire. Ej. hueso etmoides, hueso esfenoides, maxilar y hueso temporal.
- **Huesos accesorios**: no aparecen en todas las personas. Ej. fabela y hueso trígono.
- **Huesos irregulares**: son aquellos que no se adaptan a ninguna otra categoría, como las vértebras.

2.2. Componentes del tejido óseo

El tejido óseo lo componen diferentes **tipos celulares**, encargados de mantener la estructura y las funciones óseas, inmersos en una **matriz mineralizada**, con la dureza necesaria para realizar su función protectora y de sostén[52].

a) Matriz extracelular

La matriz extracelular presenta un elevado componente mineral (70% de la matriz) y un componente orgánico (30%) que se detallan a continuación:

- Componente inorgánico o mineral

Está formado por cristales de hidroxiapatita [$Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$], conteniendo fosfato cálcico (85%), carbonato cálcico (10%) y un 5% de otras sustituciones iónicas que aumentan su solubilidad (Mg^{2+}, K^+, Na^+, citratos y otros iones) y modifican sus propiedades físicas[53]. Estos cristales se disponen entre las fibras de colágeno y generan estructuras excepcionalmente fuertes, rígidas y robustas.

- Componente orgánico

Constituido en un 90% por fibras de colágeno tipo I y V, de aproximadamente 50 nm de calibre, entre las que se embeben los cristales de hidroxiapatita. Son las responsables de la elasticidad del hueso y de su resistencia a las fuerzas de tracción. Las fibras de colágeno se componen del conjunto de haces de fibrillas unidas, cada una de ellas formada a su vez por asociación de microfibrillas. El 10% restante son proteínas no estructurales con funciones de regulación, desarrollo y crecimiento. Contiene macromoléculas de proteoglicanos (proporcionan resistencia a los esfuerzos de compresión), glicoproteínas (median en la adhesión de las células óseas sobre las proteínas de la fase orgánica de la matriz), proteínas dependientes de vitamina K, citoquinas, sialoproteínas y factores de crecimiento (como las proteínas morfogenéticas, BMPs). Entre las proteínas más relevantes destacan la osteocalcina, con un papel clave en la homeostasis del calcio (favorece su captación desde el torrente sanguíneo y atrae a los osteoclastos), la osteonectina, glicoproteína que favorece la unión entre las fibras de colágeno y los cristales de hidroxiapatita, y la osteopontina, sialoproteína que favorece la adhesión de las células a la matriz ósea.

b) Células óseas

En el tejido óseo se encuentran diferentes tipos celulares con funciones específicas que se detallan a continuación.

- **Células osteoprogenitoras**

  Derivan de células madre mesenquimales de médula ósea y son las precursoras de los osteoblastos, encargados de la formación de hueso. Estas células se encuentran en la superficie externa (periostio) e interna del hueso (endostio) y en la microvasculatura que irriga el tejido óseo (pericitos perivasculares)[54].

- **Osteoblastos**

  Son células grandes y poliédricas, de aproximadamente 20-30 μm, con un aparato de Golgi y retículo endoplasmático rugoso de gran tamaño, típico de células encargadas de sintetizar grandes cantidades de proteínas. Se comunican con la matriz extracelular, y con los osteoblastos y los osteocitos de alrededor mediante proteínas transmembrana o integrinas.

Su principal función es la síntesis del componente orgánico de la matriz extracelular, constituido principalmente por colágeno tipo I, proteoglicanos, proteínas de adhesión, osteocalcina, y factores de crecimiento. Además, dirigen la disposición de las fibrillas de la matriz y participan en la mineralización del osteoide (principalmente formado por sulfato de condroitina y osteocalcina) por acción de la fosfatasa alcalina (ALP) a una razón de 2-3 μm diarios[55].

Existen marcadores para cada una de las fases de formación de nuevo tejido (síntesis de componente orgánico, organización de la matriz y mineralización de la misma), que coinciden con la expresión de los genes c-fos, c-jun, histona H4, colágeno I, fibronectina, factor transformante β, fosfatasa alcalina, sialoproteína ósea, osteopontina y osteocalcina.

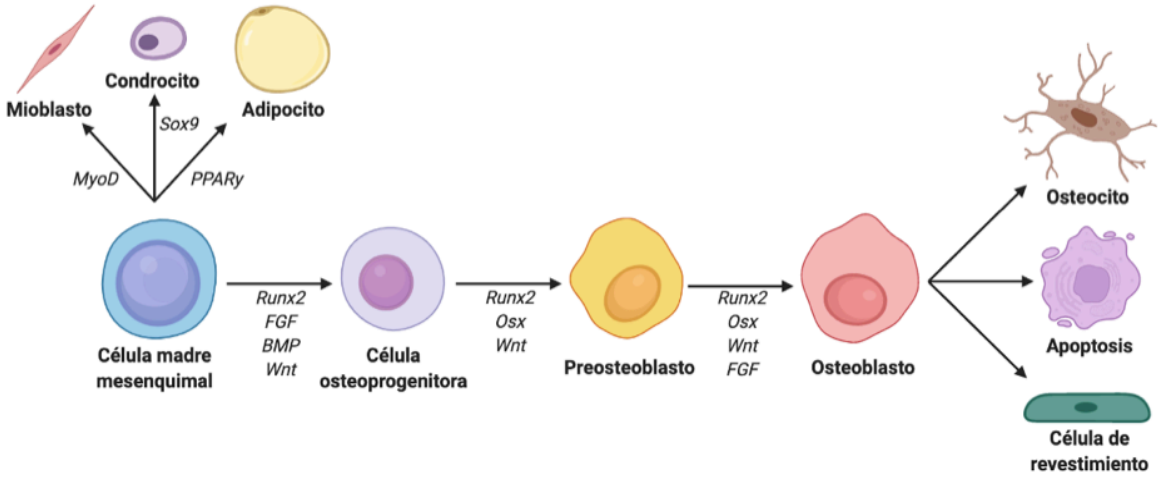


Figura 3. Diferenciación de los osteoblastos a partir de células madre mesenquimales.

El proceso de diferenciación de los osteoblastos se produce a partir de células madre mesenquimales (Fig. 3) que evolucionan a células osteoprogenitoras (Runx2 positivas), que dan lugar a preosteoblastos (Osx positivas), los cuales se diferencian finalmente a osteoblastos maduros. Este proceso está fundamentalmente dirigido por la acciónde l factor de transcripción 2 relacionado con Runt (Runx2/Cbfa1), el factor de transcripción Osterix (Osx) y las proteínas morfogenéticas óseas (BMPs)[56].

Por otro lado, la vía Wnt/betacatenina (canónica) ejerce un efecto potenciador de la diferenciación a osteoblastos al activar la transcripción de los genes Runx2 y Sox9[57] y la producción de osteoprotegerina (OPG), molécula producida por los osteoblastos, capaz de inhibir la diferenciación y actividad de los osteoclastos, células encargadas de la resorción ósea, como se indica más adelante[58-59]. En el proceso de diferenciación también participan otras moléculas a través de diferentes rutas de señalización. Los receptores Notch sufren la proteólisis de su dominio intracelular cuando se produce la unión de sus ligandos, translocándose al núcleo y actuando sobre la transcripción de genes relacionados con el mantenimiento de células progenitoras mesenquimales, para asegurar la disponibilidad de precursores para la diferenciación de osteoblastos[60].

La hormona paratiroidea (PTH) promueve la proliferación de los osteoblastos y de sus precursores a través de la estimulación de la producción de factor de crecimiento insulínico tipo I (IGF-I)[61]. El factor de crecimiento transformante β (TGF-β) y la proteína morfogenética ósea (BMP) activan factores de transcripción relacionados con la diferenciación y el mantenimiento de los osteoblastos y con la migración de sus precursores a las zonas en las que se está produciendo resorción ósea, asegurando la formación de nuevo hueso durante el proceso de remodelado, como se indica más adelante[62].

A medida que los osteoblastos se diferencian, secretan secuencialmente proteínas como la osteopontina (OPN) y la fosfatasa alcalina (ALP), en etapas tempranas de diferenciación, y la sialoproteína ósea (BSP) y la osteocalcina (OCN), cuando ya se ha iniciado la mineralización, siendo utilizadas como marcadores de etapas tardías de diferenciación osteoblástica.

Por otra parte, los osteoblastos producen el factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF) y el ligando del receptor activador de NF-κB (RANKL), moléculas implicadas en la diferenciación de los osteoclastos u osteoclastogénesis, proceso tratado más adelante.

Una vez termina su función (tienen una vida media de hasta 10 semanas), los osteoblastos pueden desaparecer por apoptosis[63], transformarse en células de revestimiento o diferenciarse a osteocitos (el 15%)[64].

- **Células de revestimiento**
  Proceden de los osteoblastos que permanecen formando parte de las capas que tapizan la parte interior (endostio) o exterior (periostio) del hueso. Son células planas y alargadas, presentan un núcleo en forma de huso y muy pocos orgánulos. Su citoplasma emite prolongaciones a través de las cuales contactan con los osteocitos (como se indica después) y tienen un papel relevante de comunicación en el proceso de remodelado óseo mediante la producción de interleuquinas 6 (IL6 e IL11) y en la regulación de la homeostasis del calcio y del fosfato establecida entre el hueso y la sangre[65-66].

- **Osteocitos**
  Proceden de la etapa final de los osteoblastos al ser embebidos en la matriz ósea calcificada, formando una laguna osteocitaria u osteoplasto. Adquieren una forma estrellada con extensas prolongaciones citoplasmáticas y componen el tipo celular más abundante y longevo (hasta 25 años de vida media) del tejido óseo. Los osteocitos se comunican entre sí y con los osteoblastos y las células endoteliales a través de los conductos calcóforos o pequeños canales transversales que contienen sus prolongaciones citoplasmáticas[67]. Esta comunicación tiene lugar mediante uniones GAP por las que fluyen iones inorgánicos y pequeñas moléculas de señalización como RANKL, OPG, PGE2, Dkk y esclerostina y óxido nítrico[68-69].

La función principal de los osteocitos es regular el mantenimiento de la matriz y del remodelado óseo, proceso que se explica más adelante. Estas células son capaces de detectar las variaciones mecánicas de carga y las microlesiones producidas en el hueso y traducirlas en una señal (mecanotransducción) para las células de revestimiento, que responden actuando sobre el remodelado óseo para mantener adecuadamente el tejido. Entre las proteínas secretadas por los osteocitos destaca la esclerostina, codificada por el gen SOST y que actúa como inhibidor de la diferenciación de osteoblastos mediante la inhibición de la vía Wnt canónica[70-71]. Cuando los osteocitos mueren por apoptosis, secretan RANKL, lo que produce la activación de los osteoclastos y la resorción del tejido óseo[72].

- **Osteoclastos**

  Derivan de células madre hematopoyéticas medulares precursoras de macrófagos y monocitos[73]. Son células grandes de alrededor de 100 μm, multinucleadas y con elevado número de mitocondrias y vacuolas. Presentan una membrana con borde en forma de cepillo, rica en integrinas en la zona por la que se adhieren a la superficie ósea para realizar la resorción del tejido.

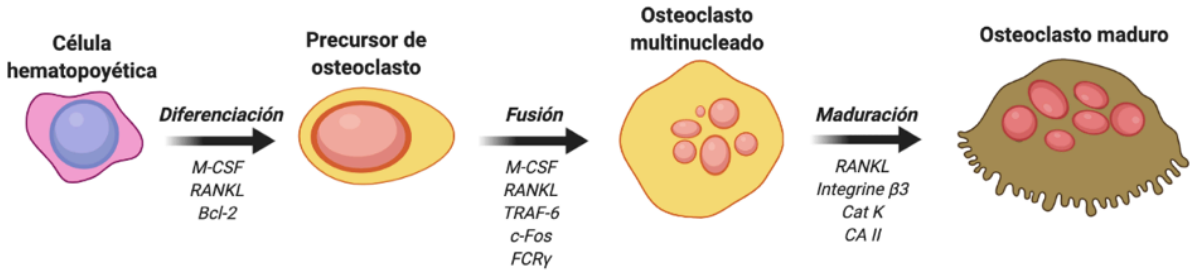


Figura 4. Diferenciación de los osteoclastos a partir de células hematopoyéticas.

La diferenciación de los osteoclastos a partir de las células precursoras está regulada en gran medida por los osteoblastos. Como ya se ha indicado, los osteoblastos producen M-CSF y RANKL, los cuales se unen a sus respectivos receptores c-fms y RANK, en la superficie de los precursores de los osteoclastos produciendo su fusión en células multinucleadas, lo que constituye los primeros pasos de la osteoclastogénesis[74]. En este punto, los osteoclastos comienzan a sintetizar fosfatasa ácida resistente a tartrato (TRAP) y receptores de calcitonina (CTR)[75]. Si el estímulo de RANKL continúa, los osteoclastos se activan y comienzan a desarrollar su actividad resortiva.

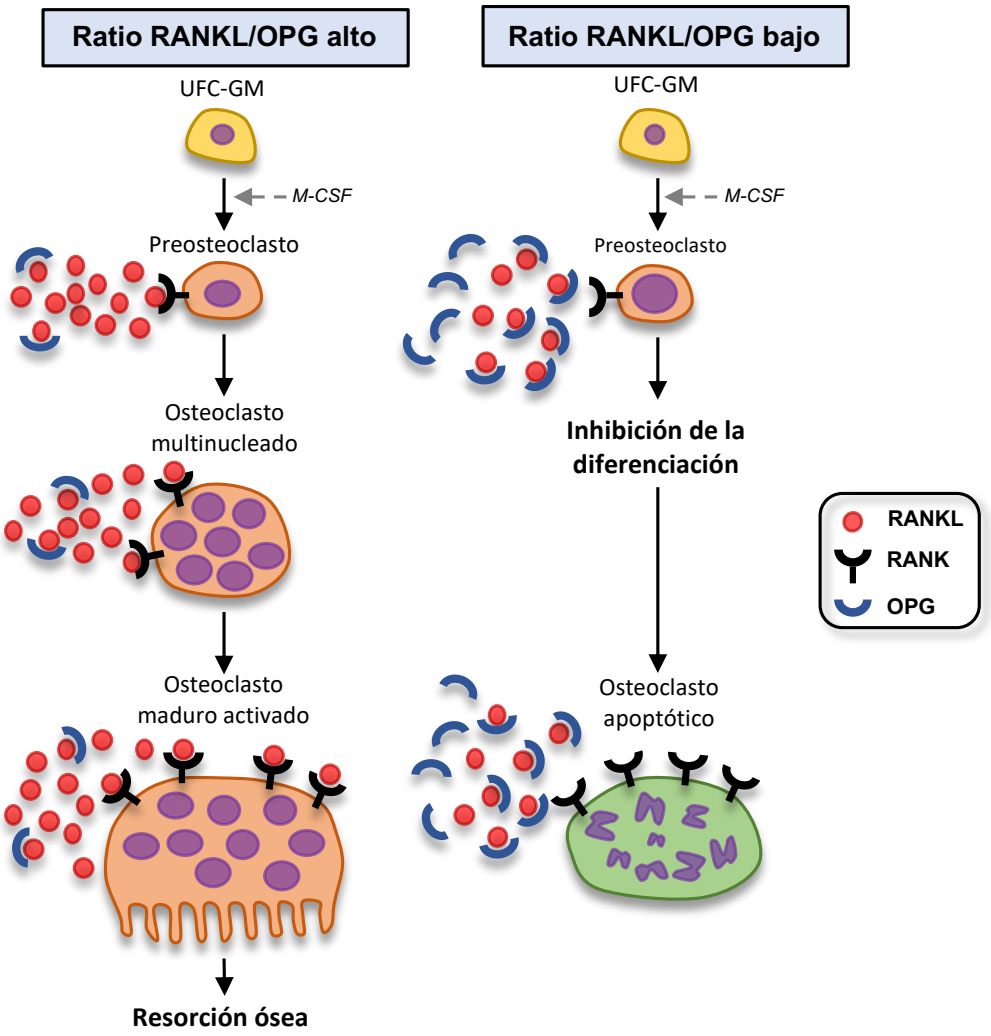


Figura 5. Efectos de RANKL y OPG en la diferenciación y actividad de los osteoclastos.

El mantenimiento del equilibrio entre la diferenciación de los osteoclastos y su actividad depende del balance entre las moléculas RANK, RANKL y OPG[76].

RANK, receptor para el ligando del factor NF-kβ, se localiza en la membrana de osteoclastos desde sus primeras etapas de diferenciación, mientras que su ligando, RANKL, es una citoquina transmembrana que se encuentra en la superficie de osteoblastos y preosteoblastos, pudiendo también ser secretada por dichas células. Cuando receptor y ligando se unen, se activa una cascada de señalización que comienza con la activación de la proteína TRAF6, que activa al complejo NF-κB, que activa la expresión de los genes implicados en la diferenciación y actividad de los osteoclastos[77-78].

El tercer componente, la OPG u osteoprotegenerina, proteína circulante perteneciente a la superfamilia de los receptores de TNF[79] y producida también por osteoblastos y preosteoblastos, se une al receptor RANK e inhibe los efectos de RANKL, actuando como antagonista[77]. Además, parece que, entre sus funciones, OPG tiene un papel relevante en el sistema circulatorio sanguíneo,

impidiendo la calcificación de las células de músculo liso formadoras de los vasos sanguíneos[80-81].

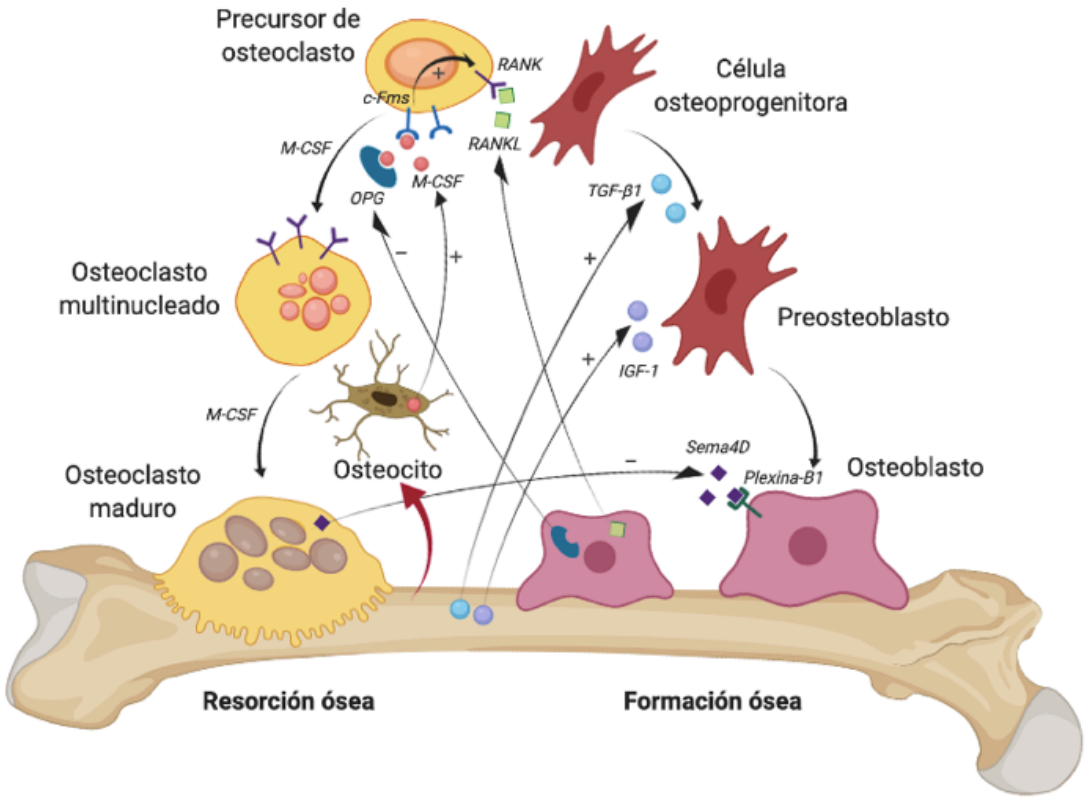


Figura 6. Comunicación de los distintos tipos celulares implicados en el remodelado óseo.

2.3. Proceso de osificación

Existen dos tipos de osificación (creación de nuevo hueso): directa o **intramembranosa** e indirecta o **endocondral**[82]. En ambos tipos de osificación, el proceso comienza con la diferenciación de los osteoblastos a partir de células osteoprogenitoras mesenquimales.

a) Intramembranosa (directa)
El tejido conjuntivo mesenquimal preexistente se osifica por acción de los osteoblastos, que sintetizan y secretan matriz extracelular formando el osteoide. A continuación, los osteoblastos producen la mineralización de esta matriz liberando Ca^{2+} y grupos fosfato, lo que finalmente conducirá a su propio atrapamiento y a su transformación en osteocitos[82].

b) Endocondral (indirecta)
En este proceso el tejido cartilaginoso hialino va creciendo progresivamente y transformándose poco a poco en tejido óseo, actuando como molde durante la

osificación. El cartílago se va viendo desplazado por el tejido óseo, comenzando por la zona central (diáfisis) y creando un núcleo de osificación primaria que se va a desplazar hacia ambos lados del hueso. También aparecen células destructoras de hueso (osteoclastos) para ir desarrollando la cavidad medular desde esta zona central, por la que penetran los capilares sanguíneos y que se va desplazando hacia las epífisis. Después del nacimiento se generan en los extremos los centros de osificación secundarios. El remanente cartilaginoso queda en la diáfisis y es necesario para el crecimiento longitudinal del hueso. En los extremos o epífisis se encuentran los osteoclastos y osteocitos, modelando la forma del hueso y formando parte del tejido óseo esponjoso. Cuando la capa de cartílago de la diáfisis desaparece, el hueso deja de crecer a lo largo[82-83].

2.4. Remodelado óseo

El remodelado óseo se produce mediante el acoplamiento de los procesos de resorción del hueso viejo por osteoclastos y formación de nuevo tejido por osteoblastos. Tiene lugar a lo largo de toda la vida del individuo y es imprescindible para mantener la integridad de la estructura ósea, evitando que se acumulen microfracturas debidas a fatiga y fragilidad, para permitir el correcto crecimiento del tejido y para asegurar el suministro de calcio y fosfato, a fin de mantener la homeostasis mineral del organismo. Cualquier alteración de este equilibrio de remodelación conducirá a la aparición de patologías, como la osteoporosis, en la que disminuye la densidad de masa ósea debido al predominio de la actividad resortiva de los osteoclastos sobre la actividad osteoblástica[84].

Durante el remodelado óseo, los osteoclastos diferenciados y activados llegan a la zona a resorber y se adhieren a ella a través de la región de su membrana en forma de cepillo. Esta región de la membrana se caracteriza por presentar múltiples repliegues, aumentando la superficie que va a entrar en contacto con la superficie ósea. La unión se produce a través de las integrinas $\alpha v\beta 3$ del borde festoneado, que reconocen las secuencias Arg-Gly-Asp (RGD) del colágeno y otras proteínas de la matriz[84]. Tras la adhesión, se produce el sellado de la zona mediante la reorganización de los microfilamentos del citoesqueleto que forman el denominado anillo de actina, con el fin de aislar la futura laguna de resorción (o laguna de Howship) del fluido extracelular, y así mantener el microambiente marcadamente ácido, necesario para la disolución de la matriz.

El osteoclasto comienza a liberar desde el citoplasma protones (H^+) generados por la anhidrasa carbónica II (CA II) (Fig. 7). Esta enzima disocia el ácido carbónico (H_2CO_3) en protones (H^+) y bicarbonato (HCO_3^-), que se intercambia a su vez por cloro (Cl^-) mediante un intercambiador Cl^-/HCO_3^- de membrana, que permite el mantenimiento del estado isoeléctrico intracelular.
Los protones salen a la superficie de la matriz ósea de la laguna de resorción a través de bombas de protones dependientes de ATP (ATPasa de tipo V). Entre las bombas de protones se encuentran intercambiadores de cloro Cl^- (CIC7) que intercambian 2 Cl^- por cada H^+. La formación de ácido clorhídrico (HCl) en la laguna de resorción produce su

acidificación y la disolución de los cristales de hidroxiapatita, generando iones calcio (Ca^{2+}) y fosfato (PO_4^{3-}). Además, los osteoclastos secretan enzimas lisosómicas proteolíticas como catepsina K (principal responsable de la degradación del colágeno de tipo I), metaloproteasas como MMP9, MMP13 o MMP14[84] y glucuronidasas, que van a provocar la disolución de la parte orgánica de la matriz.

Todos los productos de degradación son endocitados al interior del osteoclasto y transportados a la región basolateral de su membrana en vesículas ricas en fosfatasa ácida resistente a tatrato (TRAP), activada por la catepsina K, que estimula la síntesis de especies reactivas de oxígeno y promueve la degradación del colágeno de tipo I[85].
El contenido de estas vesículas se libera al exterior por exocitosis. Una vez que los osteoclastos han realizado el proceso de resorción en una zona del hueso, los osteoblastos reciben señales que determinan su migración hacia dicha región para la formación de hueso nuevo, produciendo el osteoide y llevando a cabo su mineralización. La interacción entre osteoblastos y osteoclastos es fundamental para el remodelado óseo[84] (Fig. 6).

Es interesante destacar que tanto el RANKL (molécula clave en la activación del osteoclasto), la OPG (antagonista de RANKL), la catepsina K (implicada en la degradación del colágeno como principal componente orgánico de la matriz extracelular), como el intercambiador de iones de cloro (CIC7) de la membrana festoneada del osteoclasto (relacionado con la formación de ácido clorhídrico en la laguna de resorción), constituyen dianas terapeúticas tanto para el tratamiento de la osteopetrosis, enfermedad producida por el exceso de mineralización de la matriz debido a la disminución de la actividad osteoclástica[86], como para el tratamiento de la osteoporosis, cuya causa es el exceso de la resorción realizada por los osteoclastos[87].

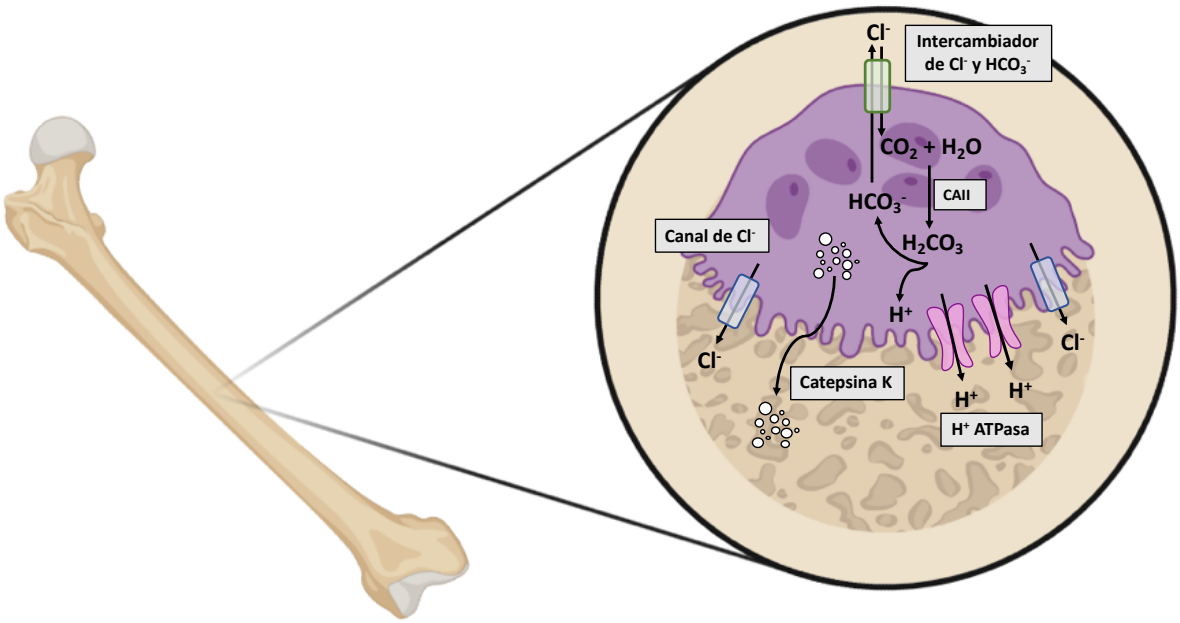


Figura 7. Actividad osteoclástica llevada a cabo en la resorción ósea.

Numerosos factores hormonales regulan los procesos de producción y destrucción del tejido óseo. Entre estos factores destacan los indicados a continuación[88-90]:

- Hormona paratiroidea (PTH), implicada en la resorción ósea
- Calcitonina, promueve la formación de hueso
- Hormona de crecimiento humana (somatotropa, STH), relacionada con la producción de cartílago
- Hormonas sexuales, implicadas en la osificación del cartílago
- Factor de crecimiento de fibroblastos 23 (FGF23), secretado por osteocitos, regula el contenido en fosfato

Por otra parte, algunos desequilibrios óseos radican en el déficit de hormonas durante el crecimiento, como la falta de somatotropina o STH, que produce enanismo hipofisiario. Su administración exógena puede lograr un desarrollo esquelético prácticamente normal.
La dieta también es una fuente importante de regulación del crecimiento óseo. Así, el aporte de fósforo, calcio y vitaminas A, C y D es esencial para conseguir un correcto desarrollo óseo.

2.5. Osteoporosis

La osteoporosis es una enfermedad metabólica ósea, progresiva y crónica, que puede afectar a toda la estructura ósea y predispone a un aumento de riesgo de fractura a quien la padece[90]. Es la enfermedad degenerativa con mayor incidencia en el mundo[91-92] y se calcula que el número de individuos que la padecerán se duplicará en los próximos 20 años debido al aumento de la esperanza de vida de la población, estimándose que 1 de cada 3 mujeres y 1 de cada 5 hombres sufrirá una fractura osteoporótica a lo largo de su vida, lo que implica un elevado coste económico[93-94] (Fig. 8).

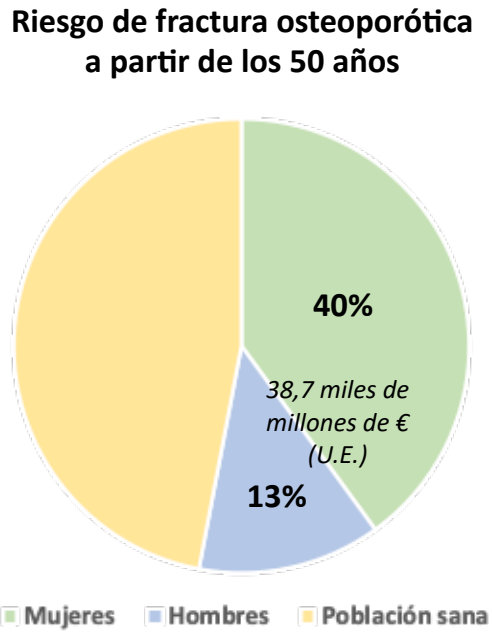


Figura 8. Representación del riesgo de fractura osteoporótica a partir de los 50 años en la población europea y coste económico medio que supone.

En Europa 22 millones de mujeres y 5,5 millones de hombres mayores de 50 años sufren esta enfermedad y en España son más de 3 millones de personas las que la padecen (Fig. 9) [Asociación Española con la Osteoporosis y la Artrosis].
Las complicaciones más importantes de esta enfermedad son las fracturas, principalmente de vértebras y cadera, debido a su elevada mortalidad, morbilidad e impacto económico y sociosanitario. En un año se registran una media de 610.000 fracturas de cadera en Europa y un número tres veces superior de fracturas vertebrales. Además, se registran una media anual de 42.000 muertes relacionadas con fracturas por fragilidad en toda la Unión Europea (Fig. 9) [Sociedad Española de Geriatría y Gerontología].

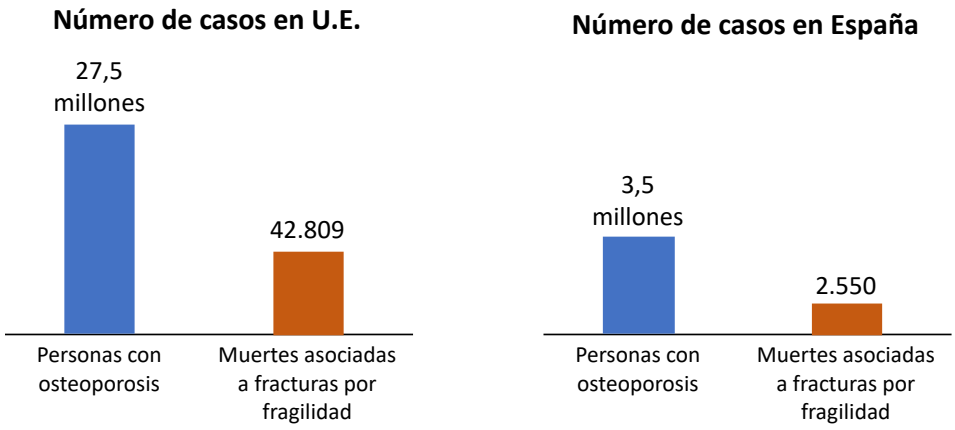


Figura 9. Prevalencia de la osteoporosis en la Unión Europea y España.

La osteoporosis involutiva primaria es aquella que no está relacionada con otras enfermedades, a diferencia de la osteoporosis secundaria. Es un síndrome degenerativo en el que los huesos sufren una descalcificación y atrofia progresiva, siendo cada vez más frágiles y susceptibles a fracturarse. Los huesos que más sufren este tipo de fracturas son los que más peso soportan como las vértebras, la cadera, el cuello del fémur y las muñecas[95-96].

Los principales factores de riesgo son la edad, la etapa de climaterio y la menopausia en las mujeres, la raza caucásica, la historia familiar y la del propio paciente[97-98]. El estilo de vida también juega un papel importante en el desarrollo de la enfermedad, así hábitos como el tabaquismo, el consumo de alcohol, la falta de ejercicio físico o las dietas bajas en vitamina D y calcio favorecen la aparición de la enfermedad y la agravan[99].

Dentro de la osteoporosis primaria se diferencian tres tipos:

a) Osteoporosis posmenopáusica
Se produce en las mujeres al alcanzar la etapa climatérica y menopáusica, debido a una disminución en la producción de estrógenos, implicados en la absorción del calcio a nivel intestinal. Esta disminución potencia además el efecto de la hormona paratiroidea (PTH) y la expresión de RANKL, lo que favorece la resorción ósea[100]. La pérdida de masa ósea que se produce es más acusada en los 5 primeros años tras la menopausia y afecta fundamentalmente al hueso trabecular, disminuyendo el grosor de las trabéculas y sus

interconexiones, lo que incrementa especialmente el riesgo de sufrir fracturas vertebrales[101-102]. El hombre pierde alrededor del 0,3 y 0,5 % de masa ósea cada año (osteoporosis senil o de tipo II) mientas que la mujer tras la menopausia puede llegar a perder entre el 3 y 5 % de la masa ósea anualmente (osteoporosis posclimatérica o de tipo I)[94]. Pasados los 65-70 años, los porcentajes de osteoporosis en mujeres descienden hasta establecerse próximos a los del hombre.

b) Osteoporosis senil

A partir de los 65-70 años de edad, la actividad resortiva de los osteoclastos se ve incrementada con respecto a la de síntesis de los osteoblastos, es decir, se degrada más tejido óseo del que se genera, con lo que la densidad de masa ósea (DMO) y la calidad ósea se reducen[103]. La DMO está determinada por la relación entre el pico de masa ósea y la cantidad de pérdida ósea, mientras que la calidad ósea se refiere a la arquitectura del tejido, en cuanto a la tasa de recambio, mineralización y microfracturas acumuladas[104]. Este tipo de osteoporosis se produce tanto en hombres como en mujeres, observándose una disminución en el número de osteocitos y un incremento en el de adipocitos, que liberan ácidos grasos y adipoquinas, con efecto negativo sobre el crecimiento de osteoblastos, dificultando la síntesis de nuevo tejido óseo[105].

c) Osteoporosis idiopática

Hace referencia a aquella en la que se producen fracturas asociadas a una pérdida de masa ósea antes de la menopausia en las mujeres y antes de los 65-70 años en los hombres, sin estar asociada a ninguna otra causa secundaria. Parece que la causa más probable de la aparición de este tipo de osteoporosis son los factores genéticos, asociados con alteraciones en la maduración ósea y en la correcta adquisición del pico de masa ósea[106].

2.6. Tratamientos actuales para la osteoporosis

Uno de los grandes problemas que presenta la osteoporosis es la falta de signos de alerta previos a un episodio de fractura ósea. Esto hace que pocos pacientes sean diagnosticados y tratados en etapas iniciales de la enfermedad, lo que implica un aumento de la morbimortalidad y una disminución en la calidad de vida de estos pacientes. Dentro de los tratamientos no farmacológicos de la osteoporosis se encuentran la actividad física y la dieta. Se ha comprobado que el ejercicio físico aeróbico evita la pérdida de DMO, e incluso el de alto impacto puede provocar su aumento[107], así como el consumo de calcio (1000-1200 mg/día, sobre todo a partir de los 50 años, la ingesta de vitamina D (800-1000 UI/día) y la exposición solar.
Pero la realidad es que los tratamientos no farmacológicos no suelen ser suficientes para frenar el avance de la enfermedad y evitar fracturas, por lo que es necesario recurrir a los fármacos.

En este contexto, el tratamiento farmacológico más empleado para tratar la osteoporosis consiste en el uso de **bifosfonatos** como potentes **antiresortivos** de uso oral. Algunos de los más empleados son el ácido zoledrónico, el risedronato sódico, el ibandronato o el alendronato. Estos fármacos son análogos del pirofosfato endógeno,

en el que la estructura P-O-P ha sido sustituida por una P-C-P (grupo fosfónico), con mayor resistencia a la hidrólisis[108-109]. Se unen con gran afinidad a la hidroxiapatita ósea e impiden la acción de los osteoclastos, mientras que permiten el crecimiento y la mineralización ósea llevada a cabo por los osteoblastos, consiguiendo el aumento de la DMO[110-111]. Estos compuestos producen una reducción del riesgo de fractura de cadera en un 50 % y de fractura vertebral en un 40-70 %[112]. Sin embargo, su uso prolongado ha provocado el desarrollo de efectos secundarios graves como osteonecrosis de los maxilares, fracturas atípicas, estomatitis (inflamación bucal y presencia de úlceras), irritación gastrointestinal, dolores musculoesqueléticos, insuficiencia renal y trastornos inflamatorios oculares[113-115]. Todos estos efectos adversos han conducido a la investigación y desarrollo de tratamientos alternativos más seguros.

Existe una **terapia biológica** aprobada para reducir la osteoporosis mediante la inhibición de la formación, función y proliferación de osteoclastos. Se trata de un **anticuerpo monoclonal humano (IgG2)**, denominado **denosumab**, que se une al receptor del ligando del factor nuclear κβ (RANKL), necesario para la diferenciación y activación de osteoclastos. Se aplica por vía subcutánea y está indicado para pacientes que no pueden usar la vía oral o tienen comprometido el sistema renal.
El estudio FREEDOM (Fracture Reduction Evaluation of Denosumab in Osteoporosis Every 6 Months) ha revelado que la aplicación subcutánea de 60 mg de denosumab cada 6 meses durante 36 meses redujo en un 68 % el riesgo de fractura vertebral y en un 20 % el riesgo de fracturas no vertebrales en mujeres con osteoporosis, así como el aumento de DMO[116]. Sin embargo, tampoco está exento de efectos secundarios, entre los que destacan las infecciones urinarias y respiratorias, las cataratas, las erupciones cutáneas, la artralgia (dolor en las articulaciones), el estreñimiento, la osteonecrosis mandibular y las fracturas atípicas, en porcentajes similares a los producidos con los bifosfonatos[117].

Por otro lado, se encuentran los **moduladores selectivos de los receptores de estrógenos (SERM)**, como el **raloxifeno** y el **bazedoxifeno**. Son moléculas con alta afinidad específica por los receptores de estrógenos y que pueden actuar como agonistas (en tejido óseo, cardiovascular o hepático) o antagonistas (en mama y endometrio) de los mismos, dependiendo del tejido en el que actúen. Ambos fármacos reducen, sobre todo, los riesgos de fractura vertebrales, pero no los de fractura de cadera[112]. Ambos se administran por vía oral, en diferentes dosis, 60 mg/día en el caso del raloxifeno y 20 mg/día el bazedoxifeno. Sus efectos secundarios están relacionados con la aparición de síntomas climatéricos, calambres en los miembros inferiores y aumento de riesgo de episodios tromboembólicos.

Existen otros estudios en los que se emplean **agentes con actividad anabólica** como la **teriparatida** o **PTH humana recombinante**, que estimula la síntesis de matriz en los osteoblastos y de forma indirecta, la absorción intestinal de calcio y su reabsorción a nivel tubular. Sin embargo, presentan efectos secundarios como náuseas, calambres en las extremidades inferiores, hipotensión, hipercalcemia y tienen asociado un aumento en el riesgo de osteosarcoma, lo que ha provocado una alarma con respecto a su uso[118].

Hay estudios que utilizan **proteínas morfogenéticas (BMPs)**, **ranelato de estroncio** o **anticuerpos neutralizantes de la esclerostina**, pero todos ellos tienen riesgos y efectos secundarios asociados[119-120].

La **ipriflavona (IP)** es una isoflavona sintética derivada de la semilla de soja. Se metaboliza en hígado y se excreta en orina. Se ha comprobado que los flavonoides tienen efecto antioxidante, antiinflamatorio, hepatoprotector y se han postulado como potenciales agentes quimioprotectores o quimioterapéuticos[121-122]. Su consumo en la dieta ha mostrado mejoras en enfermedades cardiovasculares, colesterolemia, síndrome premenstrual, menopausia y osteoporosis[123-124]. También son conocidos como fitoestrógenos, ya que pueden actuar como moduladores agonistas o antagonistas parciales de los receptores de estrógenos, aunque con una afinidad 5000 veces menor que los estrógenos[125-216].

Esta isoflavona ha demostrado tener un efecto dual en el tejido óseo: retrasa la resorción ósea pero también potencia la formación de nuevo tejido, teniendo efecto sobre osteoclastos y osteoblastos, respectivamente[127-128]. La ipriflavona y sus metabolitos inhiben la resorción mediada por la hormona paratiroidea (PTH), la vitamina D, la prostanglandina E2 (PGE2) y la interleuquina 1β (IL1β)[129-130].

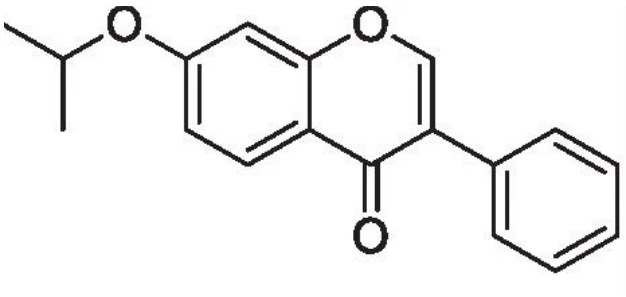


Figura 10. Fórmula química de la ipriflavona (IP).

Se ha comprobado *in vitro* que la ipriflavona inhibe la formación de los osteoclastos y su activación, actuando de forma similar a la vitamina K. Sin embargo, la ipriflavona posee además la capacidad de estimular la proliferación de osteoblastos y la actividad de la fosfatasa alcalina (ALP), lo que evidencia un aumento en su diferenciación[131-133].

También se ha demostrado que la ipriflavona promueve la formación de colágeno y la mineralización de la matriz[134-135]. Por otra parte, la ipriflavona inhibe el influjo de calcio al interior de los osteoblastos, de igual forma que la calcitonina y los estrógenos[136]. Como se ha indicado, gran parte del efecto de este compuesto radica en potenciar la actividad de los osteoblastos y regular de forma indirecta la de los osteoclastos[137].

Asimismo, potencia los efectos de los estrógenos, necesitando menores cantidades de éstos combinadas con ipriflavona para alcanzar los niveles de calcitonina deseados[138]. Además, parece que actúa de una forma tejido-específica, afectando solo al tejido óseo y no al tejido reproductor[139]. Por otro lado, se ha demostrado que la ipriflavona no

cambia la estructura cristalina del hueso, pues los cristales son del mismo tamaño que los generados sin tratamiento, pero se forman en mayor número, haciendo el hueso más denso.
Por el contrario, otros tratamientos, como el fluoruro de sodio, que también aumenta la densidad ósea, altera la estructura cristalina haciendo al hueso más frágil[140-141]. Son numerosos los estudios *in vivo* que demuestran que la ipriflavona tiene capacidad de prevenir la pérdida de masa ósea en ratas[142-143], gallinas[144] y humanos[145-146], lo que convierte a este fármaco en un potente candidato para el tratamiento y la prevención de la osteoporosis.

El conjunto de efectos secundarios que tienen los tratamientos mencionados y las contraindicaciones de su utilización, hacen necesario el desarrollo de nuevas alternativas para prevenir y tratar la osteoporosis. En este sentido, el gran desarrollo que se está produciendo en el área de biomateriales, supone una fuente de alternativas clínicas muy atractivas, desde su utilización libres de fármacos, consiguiendo los efectos deseados por su propia composición físico-química[147-149], hasta el diseño de nanopartículas como agentes de liberación de fármacos antiosteoporóticos[150-152].

2.7. Implantes óseos

Los defectos óseos derivados de un traumatismo, cirugía, patología o malformación congénita representan un problema de salud mundial significativo, siendo el hueso el segundo tejido más trasplantado después de la sangre[93]. La demanda de injertos óseos va en aumento: entre Estados Unidos y Europa se reparan defectos óseos a más de medio millón de pacientes al año con un coste estimado de más de 2 billones y medio de euros[153].

En la actualidad, cuando el hueso es incapaz de reparar el daño por sí solo (tras un traumatismo, infección, cáncer, osteoporosis, enfermedad congénita, etc.) la técnica empleada más habitualmente en patologías óseas es el trasplante autólogo[154-155], cuya principal ventaja es que no presenta problemas de histocompatibilidad ni tiene efectos inmunogénicos. Sin embargo, estos materiales son escasos y requieren una intervención quirúrgica secundaria en el paciente, con las complicaciones y el coste económico que esto conlleva[153,156]. En algunos casos el hueso donante es más pequeño de lo requerido y es necesario emplear gránulos de fosfato de calcio mezclados con la sangre del paciente, cargada de factores de crecimiento, para rellenar el defecto óseo junto con el autoinjerto[157].

Por otro lado, los implantes metálicos son ampliamente utilizados en la sustitución de grandes huesos o de huesos que soportan una elevada carga, como la cadera. Sin embargo, su uso genera problemas como los derivados de la gran diferencia de propiedades mecánicas entre el hueso y el implante, lo que impide la correcta distribución de cargas y puede ocasionar fracturas. Además, en ocasiones los iones liberados por el metal resultan tóxicos o dañinos para el organismo. Y por último, los sustitutos metálicos no tienen la capacidad de inducir la regeneración del tejido, a diferencia de las cerámicas bioactivas[158].

Las cerámicas bioactivas han mostrado ser uno de los biomateriales más prometedores para lograr la regeneración ósea y permitir la vascularización del tejido. Por ello actualmente se presentan como buenos candidatos para recubrimientos de prótesis metálicas de cadera o dentales, ya que se ha comprobado que actúan además como barrera reduciendo la emisión de iones del sustituto metálico. Sin embargo, la principal limitación de estos materiales es la elevada carga mecánica que deben soportar. En este sentido, su fabricación en forma de andamios, necesarios para las zonas que requieran un sustituto que equilibre el reparto de la carga con el resto del hueso, todavía está limitada por su propia composición físicoquímica[157].

El material ideal empleado como sustituto óseo debe presentar las siguientes propiedades[157,159]:

- Ser biocompatible, bioactivo y promover la osteogénesis
- Unirse con el hueso del huésped sin provocar la formación de cápsula fibrosa
- Presentar una estructura porosa que permita su vascularización, el flujo de fluidos y el crecimiento de células y del propio hueso a su través
- Su composición debe permitir ser preparado en la forma que sea apropiada para cada caso concreto
- Tener una tasa específica de degradación y poder ser degradado por los osteoclastos
- Compartir la carga mecánica con el hueso natural y mantener estas propiedades durante todo su ciclo de vida, incluyendo el remodelado que pueda sufrir y su degradación
- Ser sintetizado por un proceso económicamente sostenible y escalable
- Poder ser esterilizado y poseer los estándares necesarios para su aplicación clínica

El material ideal para regeneración ósea debe permitir los siguientes procesos:

- **Osteointegración**

  Es el proceso de unión química de un implante con el tejido óseo del organismo receptor sin la formación de una cápsula fibrosa a su alrededor, imposibilitando su separación sin generar fracturas[160].

  Esta fusión asegura la estabilidad del implante e impide que se generen desplazamientos entre el biomaterial y el tejido que lo rodea, lo que favorecería el desgaste del material y la liberación de componentes al medio[160,161].

  Uno de los principales factores condicionantes de la osteointegración es la topografía de la superficie del material. Cuanto mayor sea la adhesión y diferenciación de osteoblastos en su superficie, más efectiva y rápida será su colonización y por tanto, la generación de nuevo hueso a su alrededor.

  Además, la macro y micro-topografía y la composición físicoquímica de la superficie del biomaterial condicionan los procesos de remodelado óseo[162-164]. Estas propiedades no sólo afectan a la capacidad de adhesión de los osteoblastos, sino también a la de los osteoclastos o incluso a la de proteínas y otras biomoléculas a escala nanométrica[165].

- **Osteoinducción**

Es la capacidad que presenta un material para promover la diferenciación de células madre pluripotentes a osteoblastos, que formarán nuevo tejido óseo[166].

- **Osteoconducción**

Es la capacidad del material de promover el crecimiento de nuevo tejido óseo sobre su superficie, permitiendo la formación de vasos sanguíneos y la creación de los sistemas de Havers[166-167].

- **Osteogénesis**

Se refiere al proceso de síntesis de nuevo hueso, llevada a cabo por los osteoblastos presentes en el tejido óseo alrededor del implante o en el propio implante tras su colonización[166].

3. Respuesta inmune

El sistema inmune ha sido clásicamente considerado desde la perspectiva de la defensa contra las infecciones bacterianas o virales. Sin embargo, el desarrollo de los biomateriales y sus diversas aplicaciones (como dispositivos de liberación de fármacos, adyuvantes en vacunas o construcciones para ingeniería tisular, entre otros), hace imprescindible el estudio de la interacción del biomaterial con el sistema inmune, como punto crítico en el mantenimiento de la viabilidad y función del material[168].

3.1. Respuesta inmune innata

La respuesta inmune innata representa la primera línea de defensa frente a los potenciales patógenos externos. Estas defensas actúan de manera inespecífica frente a los organismos o toxinas que están invadiendo el cuerpo del hospedador.
Está conformado por componentes externos como piel, tubo digestivo, vías respiratorias y tracto genitourinario, e internos como células fagocíticas, interferones, proteínas del complemento, células asesinas naturales (NK) y mastocitos.

Las células del sistema inmune innato reconocen moléculas relacionadas con agentes patógenos (pathogen-associated molecular patterns, PAMP) así como moléculas endógenas relacionadas con el daño celular (damage associated molecular patterns, DAMP)[169-170]. Un ejemplo clásico de PAMP es el lipopolisacárido (LPS) de la membrana de las bacterias Gram- y del peptidoglicano de la pared bacteriana de las bacterias Gram+[171]. Los receptores que poseen las células del sistema inmune innato para reconocer las PAMP son de tipo toll[168,172].

Tras el reconocimiento antigénico por parte de las células dendríticas y los macrófagos, éstos comienzan a secretar citoquinas que van a atraer y activar a otras células de sistema inmune innato (células fagocíticas, células NK). Los macrófagos activados tras la fagocitosis generan una amplia variedad de citoquinas, incluyendo las quimioquinas, interleuquinas (IL), interferones (IFN) y factor de necrosis tumoral (TNF), los cuales

contribuyen a mantener la inflamación, promueven el desarrollo de células B y T, e inician la reparación tisular (producción de colágeno) y angiogénesis[169,170]. La respuesta inmunitaria frente a los biomateriales no es distinta a la que se produce frente a cualquier microorganismo o sustancia ajena al organismo que actúa como antígenos.

Las citoquinas secretadas por los macrófagos atraen a los neutrófilos hacia el lugar donde se está produciendo el daño (quimiotaxis) y posteriormente a los monocitos, que podrán diferenciarse a macrófagos en caso de ser necesario. Cuando la infección se extiende, los neutrófilos y monocitos de la sangre pueden extravasarse al exterior de los vasos sanguíneos mediante diapédesis para llegar al tejido afectado[168-169].

Durante este proceso se activa también la cascada del complemento, integrador de las respuestas inmune innata y adaptativa. Los productos de lisis de esta cascada (ej. C5a, C3b, iC3b) actúan como quimioquinas y opsoninas, facilitando la llegada y la fagocitosis de macrófagos en el foco inflamatorio[173].

Dentro de los macrófagos, se distinguen dos fenotipos en función de los estímulos que reciban, M1 (proinflamatorio) y M2 (reparador), que tienen su correspondencia con los fenotipos Th1 y Th2 de los linfocitos T helper[169]. Los macrófagos activados clásicamente (M1) se inducen por citoquinas como los lipopolisacáridos microbianos (LPS), el interferón gamma (IFN-γ) o TNFα. Son efectores proinflamatorios y tienen funciones microbicida y tumoricida. Este fenotipo expresa niveles elevados de IL-12 e IL- 23, pero bajos niveles de la interleuquina antiinflamatoria IL10, metaboliza arginina, expresa altos niveles de óxido nítrico sintasa inducible (iNOS), secreta intermediarios como especies reactivas de oxígeno (ROS), óxido nítrico (NO) y citoquinas inflamatorias como IL-1β, IL-6 y TNFα (Fig. 11)[169,174]. Los macrófagos M1 expresan en su superficie las glicoproteínas CD80, CD86 y CD16/32, que sirven como marcadores moleculares para su detección *in vitro*[175-176].

Por otra parte, los macrófagos de tipo 2 o antiinflamatorios están estimulados principalmente por IL-4, IL-13, IL-10, glucocorticoides y vitamina D3. Expresan bajos niveles de IL-12 e IL-23, expresión aumentada de IL-10 y sintetizan la enzima arginasa-1 (Arg-1). Expresan en su superficie celular el marcador CD206[174-176] (Fig. 11).

Los macrófagos de fenotipo M2 se subdividen en M2a, M2b, M2c y M2d. El fenotipo M2a se induce con las citoquinas IL-4 e IL-13, que promueven respuestas antiinflamatorias y de reparación del tejido. El fenotipo M2b, con función inmunoreguladora, se induce por la exposición al ligando agonista de IL-1R (IL-1RA) y del receptor Toll (TLR). El fenotipo M2c se estimula a través de IL-10, TGF-β y glucocorticoides y promueve el remodelado del tejido. En cuanto al fenotipo M2d, se induce mediante la exposición a IL-6 al ligando del receptor de adenosina A2A. Está implicado en procesos de angiogénesis y crecimiento de tumores[177-178] (Fig. 11).

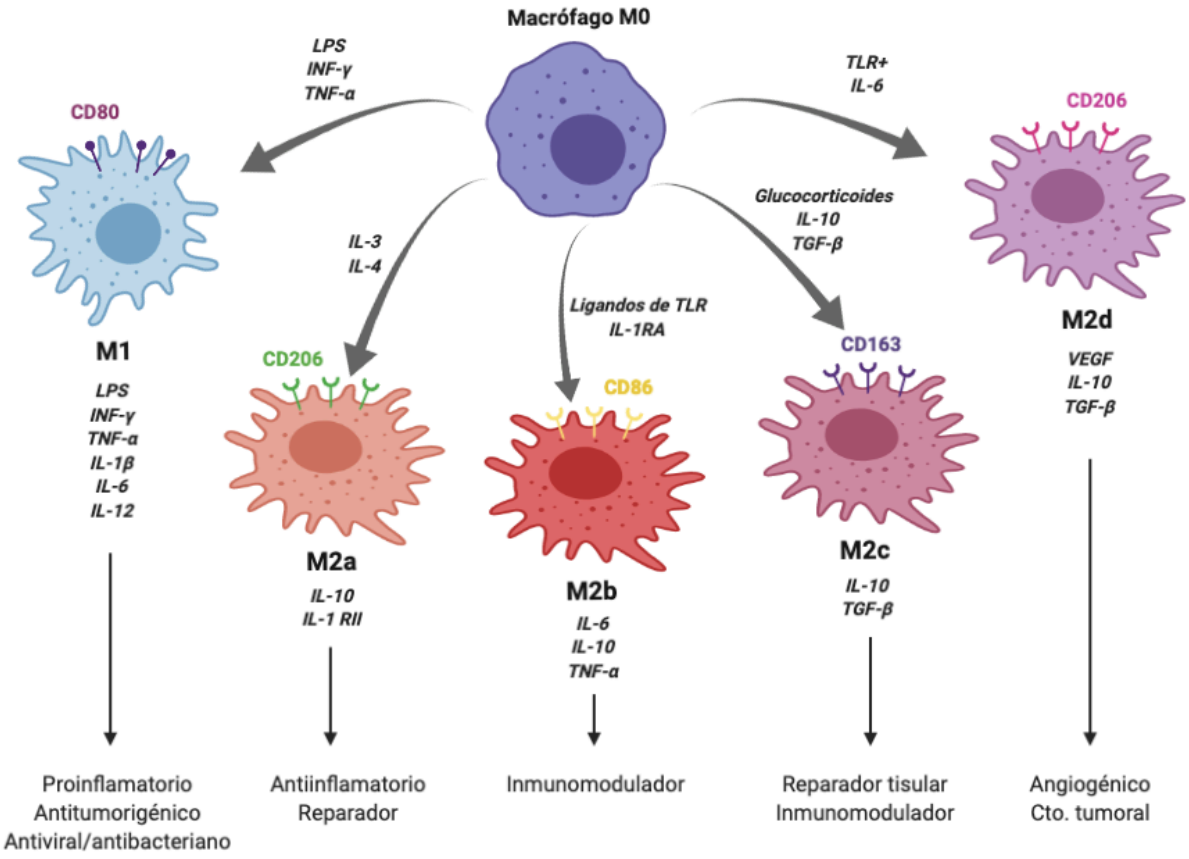


Figura 11. Polarización de macrófagos hacia fenotipos M1, M2a, M2b, M2c y M2d producida por estímulos específicos, citoquinas secretadas por cada fenotipo y funciones biológicas de cada uno de ellos.

Por lo tanto, los macrófagos, atendiendo a su fenotipo proinflamatorio (M1) o reparador (M2) y dependiendo del ambiente extracelular (mediado por citoquinas) pueden participar tanto en procesos inflamatorios como en la reparación tisular, siendo el equilibrio entre ambos fenotipos un factor que condicionará el éxito o el rechazo a cualquier biomaterial introducido en el organismo[179]. Los macrófagos, además de participar en la respuesta inmune innata secretando citoquinas, se mantienen activos de forma constante eliminando restos celulares en todos los tejidos[180-181].

3.2. Respuesta inmune adaptativa

En la respuesta inmune adaptativa intervienen los linfocitos y las proteínas que estos producen (anticuerpos y citoquinas), responsables de la respuesta específica a antígenos.

Los linfocitos B se procesan en la médula ósea, secretan anticuerpos a la sangre y a la linfa y se encargan de generar la inmunidad humoral. En el caso de los linfocitos T, se procesan en el timo y participan en la inmunidad celular. Se clasifican en linfocitos T $CD4^+$ (helper) y células T CD 8^+ o efectoras. Participando en los procesos de inmunidad adaptativa se encuentran las células *natural killer* (NK), que expresan los receptores de

las células T (TCR) en su superficie y generan memoria a largo plazo a través de los linfocitos B y T[169,182-183].

Las células presentadoras de antígenos, fundamentalmente macrófagos y células dendríticas, exponen sobre su superficie los antígenos procesados unidos a moléculas del complejo principal de histocompatibilidad (molecular histocompatibility complex, MHC). Los linfocitos B una vez estimulados expresan marcadores de activación sobre su superficie, aumenta el flujo de calcio y la producción de citoquinas (linfoquinas) como IL-2 e IFN-γ[185]. Además, producen anticuerpos específicos contra los antígenos invasores. Cuando estos anticuerpos reconocen a los antígenos y se unen a ellos se amplifica la respuesta inmune, se produce una mayor activación del complemento y la actividad fagocítica de neutrófilos, macrófagos y monocitos (opsonización)[169,184].

En el área afectada se produce la adhesión de los leucocitos a las células endoteliales del interior de los vasos. En primer lugar, actúan los neutrófilos que fagocitan y liberan proteasas para degradar los agentes patógenos, generando señales químicas que provocan el reclutamiento de monocitos, linfocitos y otras células inmunitarias hacia el sitio de la infección. Estas, a su vez mediarán en la diferenciación y proliferación de los linfocitos y en la activación de macrófagos, que fagocitarán los patógenos restantes, los fragmentos de la matriz extracelular y los neutrófilos remanentes[185].

Los mastocitos tisulares liberan histamina durante los procesos de inflamación y alergia, que produce vasodilatación, relajando el músculo liso de los vasos sanguíneos, aumentando la permeabilidad capilar y provocando constricción bronquiolar. Además, los mastocitos liberan prostaglandinas, leucotrienos inflamatorios y TNFα, que promueven la inflamación y reclutan neutrófilos hacia el sitio afectado[186-187].

Los linfocitos y los monocitos/macrófagos se activan los unos a los otros a través de mecanismos directos e indirectos. Los linfocitos T se activan por citoquinas como IFN-γ, IL-2, TNF-α, IL-6, IL-5 e IL-18[188]; y una vez activados producen citoquinas proinflamatorias como IL-1, TNF-α e IL-6[189-190].

Es importante destacar que existen distintas citoquinas atendiendo a su papel activador, así se subdividen en citoquinas de activación de macrófagos (IL-1β, IL-6, TNF-α), citoquinas importantes para la fusión de macrófagos (IL-4, IL-13), citoquinas activadoras de linfocitos T (IL-2), citoquinas antiinflamatorias (IL-10, TGF-β) y quimioquinas (GRO/KC, MCP-1). Se ha comprobado que la composición de los biomateriales poliméricos altera la producción de estas citoquinas, fundamentalmente IL-6, TNF-α, IL-4, IL-13, IL-10 y GRO/KC[185].

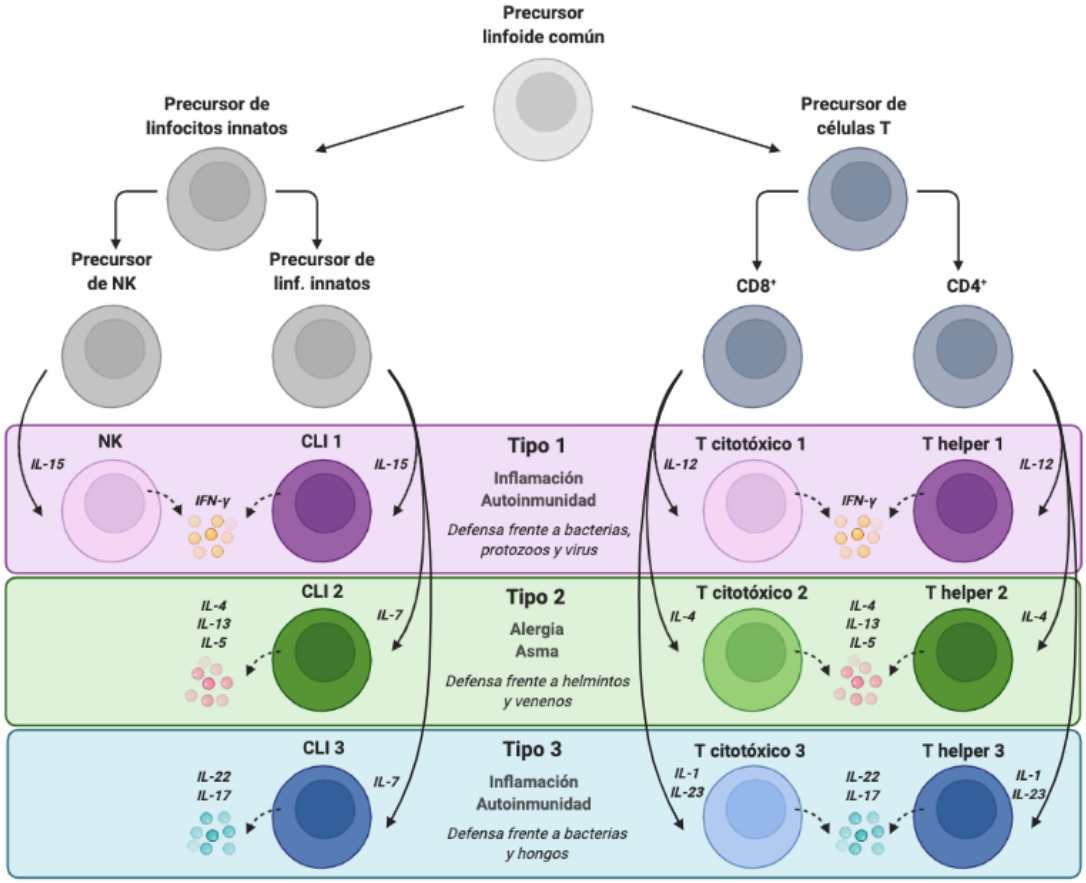


Figura 12. Principales tipos de inmunidad innata y adaptativa mediadas por células efectoras. La inmunidad de tipo 1 está compuesta por linfocitos Th1 y ILC1 productores de IFN-γ, y de células T citotóxicas 1 y NK. La inmunidad de tipo 2 está compuesta por células Th2, células T citotóxicas 2 e ILC2, que producen las citoquinas IL-4, IL-5 e IL-13. La inmunidad de tipo 3 está compuesta por células Th3, células T citotóxicas 3 e ILC3, que producen las citoquinas IL-17 e IL-22. (ILC: células linfoides innatas).

3.3. Osteoinmunomodulación

El sistema inmune y el tejido óseo están íntimamente relacionados a nivel molecular y celular. Las células que forman parte de los dos sistemas tienen orígenes comunes, los osteoclastos prodecen de células madre hematopoyéticas y comparten linaje con los monocitos y macrófagos, mientras que los osteoblastos procedentes de células madre mesenquimales tienen un papel clave en la diferenciación de las células madre hematopoyéticas en los nichos adyacentes a la superficie del endostio[191].

En la regulación del remodelado óseo intervienen la paratohormona (PTH), las proteínas morfogenéticas del hueso (BMPs) y la vía Wnt. Los linfocitos, las células dendríticas y los macrófagos actúan regulando el remodelado óseo, tanto alterando los procesos de osteoclastogénesis a través de la vía RANK/RANKL/OPG como alterando la osteogénesis a través de la vía Wnt[192] (Fig. 13).

La producción de linfocitos T de memoria es acumulativa con la exposición a diferentes antígenos, de manera que en individuos adultos el número de linfocitos T en la médula ósea es muy elevado. Estos expresan RANKL en su superficie y podrían ser parte causante de la actividad exacerbada de los osteoclastos con respecto a los osteoblastos en escenarios de osteoporosis asociada a la edad. Incluso se ha comprobado que su expresión en linfocitos T y B se triplica en mujeres que se encuentran en etapa menopáusica y en modelos murinos sometidos a ovariectomía[193].

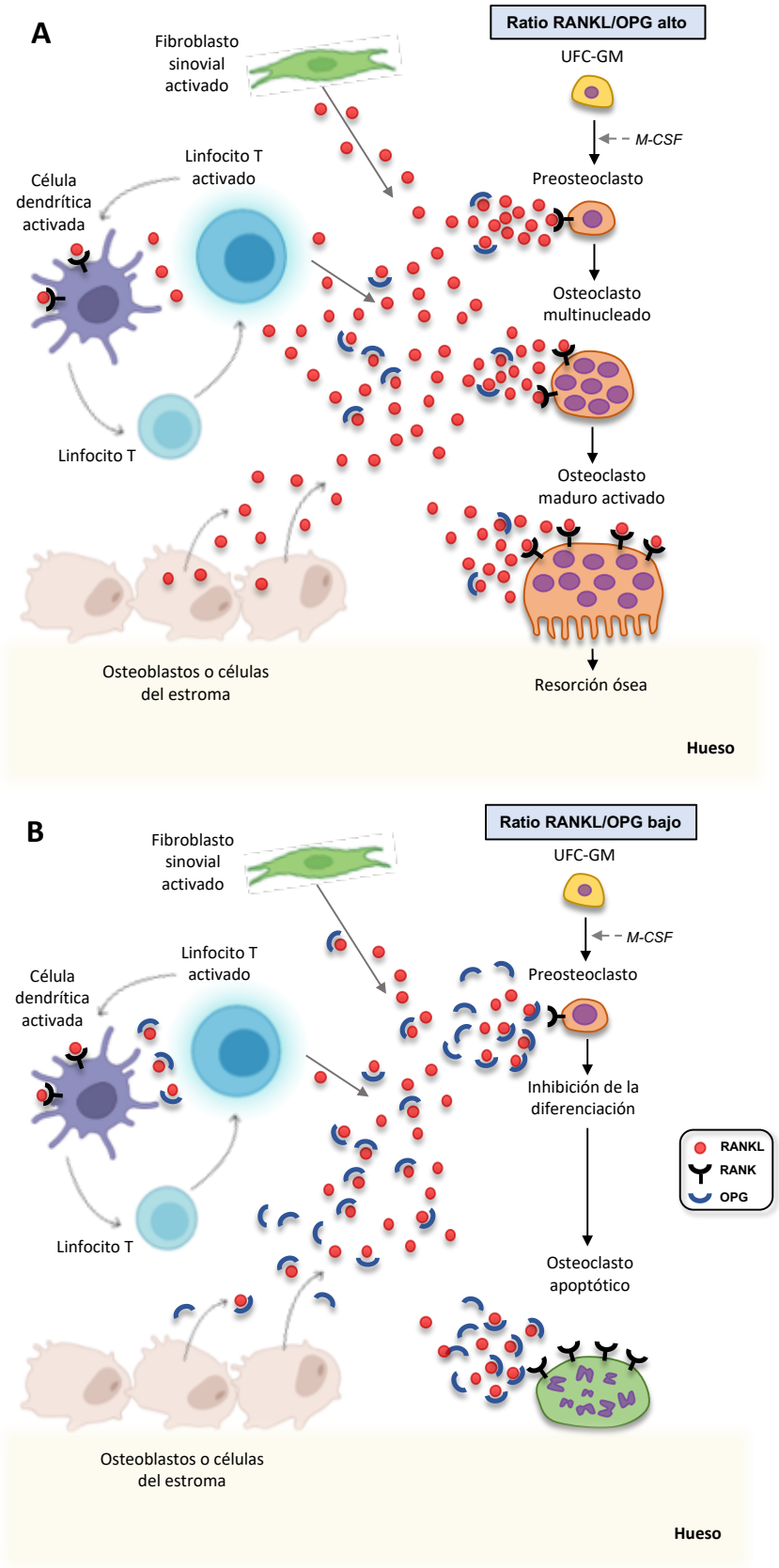


Figura 13. Factores que intervienen en el proceso de remodelado óseo. Relación entre las células implicadas en la respuesta inmune y las células del tejido óseo. A) Situación de ratio RANKL/OPG alto, propia de escenarios de resorción ósea y B) situación de ratio RANKL/OPG bajo, en la que los osteoclastos no son capaces de madurar y no tiene lugar la resorción ósea.

3.4. Respuesta inmune a biomateriales

En los primeros momentos tras la implantación de un biomaterial en un tejido se adsorben a la superficie de éstos diferentes proteínas de los fluidos fisiológicos y de la sangre, activando la cascada de coagulación, el sistema del complemento, las plaquetas y las células implicadas en el inicio de la respuesta inmunitaria, como las células de la respuesta innata (principalmente macrófagos, neutrófilos y mastocitos). Los linfocitos alcanzan su número máximo en la región afectada en el día 7 tras la implantación. Sin embargo, la migración de los linfocitos comienza en el mismo instante en que comienza la reparación del tejido[168,185].

A su vez se generan productos de degradación, con la consiguiente alteración de las propiedades físicoquímicas de la superficie del biomaterial. Ambos factores estimulan la activación de la respuesta inmune[194].

En función de las propiedades superficiales del biomaterial, se produce la interacción de diferentes sustancias constituyentes del plasma. Así, sobre su superficie se pueden adsorber iones, proteínas, lípidos o azúcares[195].

Tras el daño en la vasculatura local, las células endoteliales sufren una vasoconstricción, los gránulos α de las plaquetas vierten su contenido proteico y se forma un coágulo de fibrina[196], con una composición similar a la matriz extracelular que se forma de manera provisional en la parte externa del biomaterial implantado. Esta matriz provisional se compone principalmente de colágeno, plaquetas, trombina y fibronectina y sirve como andamio para los neutrófilos, monocitos, linfocitos, fibroblastos y células endoteliales[197].

La degranulación de las plaquetas conforman la señal para la quimiotaxis y activación de los leucocitos, iniciándose la migración de neutrófilos principalmente, que inducen una respuesta inflamatoria aguda[198]. Uno de los principales factores liberados implicados en la quimiotaxis de los linfocitos es el factor de crecimiento transformante β (TGF-β).
A su vez, otros estímulos como histaminas, prostaglandinas, prostaciclinas o tromboxanos contribuyen a la migración y extravasación de los leucocitos al causar vasodilatación, por lo que se pueden adherir al endotelio vascular[199,200].

A continuación, se produce la adsorción de proteínas sanguíneas, la llegada de las células inflamatorias propias de la respuesta aguda y crónica, la formación de tejido granular y la fibrosis o encapsulación fibrosa del mismo. Por un lado se procura activar los mecanismos del hospedador para neutralizar el cuerpo extraño y, por otra parte, se procura reparar los tejidos dañados mediante la formación de tejido fibroblástico. Está descrito en numerosos trabajos que la superficie del biomaterial a nivel químico y topográfico determina el grado de respuesta inmune que se produce en el hospedador[201-203].

En la **respuesta inflamatoria aguda y crónica a los biomateriales** se pueden distinguir diferentes fases:

- **Adsorción de proteínas**

Una de las primeras etapas tras la implantación de un biomaterial es la deposición sobre su superficie de proteínas de la sangre y los tejidos circundantes como la fibronectina, albúmina, vitronectina, fibrinógeno, proteína del complemento C3 y factores de crecimiento, así como la llegada y adhesión de leucocitos[204-205]. Las proteínas de pequeño tamaño se mueven más rápido y son las responsables de la adsorción primaria sobre la superficie del material, mientras que las de mayor tamaño muestran mayor afinidad sobre la superficie debido a que presentan mayor superficie de contacto[206-207].
Esto provoca la adhesión y activación de las plaquetas, que se agregan formando un coágulo temporal rico en fibrinógeno, que actúa como matriz para la adhesión de otras células que van a intervenir en el proceso[208] (Fig. 14).

- **Inflamación aguda**

Está determinada por la presencia de fundamentalmente, neutrófilos y monocitos, que se extravasan de los vasos sanguíneos. Migran hacia la zona afectada, proceso que según la gravedad y extensión del daño puede durar entre minutos y días[185,194]. Los neutrófilos son el primer tipo de células del sistema inmune innato que responde ante la implantación de un biomaterial. A su vez, las proteínas adsorbidas sobre el biomaterial, contienen sitios de reconocimiento específicos como los C y N terminales con regiones ricas en prolina-histidina-serina-arginina-asparagina (PHSRN) y arginina-glicina-aspártico (RGD), que actúan como sitios de reconocimiento para neutrófilos, monocitos, fibroblastos y células endoteliales[209-210].

Las regiones PHSRN y/o RGD de las proteínas adsorbidas a la superficie del biomaterial, los patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP) o los patrones moleculares asociados a daño (DAMP), formados por restos celulares muertos, estimulan los neutrófilos, que responden expresando citoquinas proinflamatorias[184,211]. Estos mediadores químicos estimulan la quimiotaxis de las células de la respuesta inmune innata inflamatoria y de células dendríticas, que finalmente provocarán la activación del sistema inmune adaptativo a cargo de los linfocitos B y T[212-213]. Los DAMP son moléculas endógenas que en condiciones fisiológicas se encuentran secuestradas a nivel intracelular y no son reconocidas por el sistema inmune innato. Sin embargo, bajo situaciones de estrés o daño, se liberan en el medio extracelular y desencadenan una cascada de señalización de inicio de la respuesta inflamatoria[214].

Por otro lado, los mastocitos, que se encuentran debajo de las superficies epiteliales en la mayoría de los tejidos del cuerpo, liberan histaminas de sus gránulos, potenciando la respuesta inflamatoria local[215].

Después de 24/48 horas, los neutrófilos activados mueren por apoptosis y liberan algunas vesículas y lípidos, como lipoxinas, con propiedades

antiinflamatorias. Así, los neutrófilos, a través de la unión a PAMPs y DAMPs y la iniciación de respuestas del NLRP3 inflamasoma, son esenciales para la activación de los macrófagos tipo 1 y la fase inflamatoria aguda. Los neutrófilos apoptóticos también son cruciales para estimular la polarización de los macrófagos de tipo 1 a tipo 2 y la posterior resolución de la respuesta inflamatoria[202].

La activación de los macrófagos de tipo 1 produce la liberación de citoquinas como el factor de necrosis tumoral (TNF-α), la interleuquina 6 (IL-6), el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), el factor estimulador de colonias granulocíticas (G-CSF) y el factor estimulador de colonias de macrófagos granulocíticas (GM-CSF), que provocarán la migración de más macrófagos al área afectada y su activación[216]. Los macrófagos responden ante las DAMP, PAMP, factores de crecimiento, citoquinas y otros mediadores experimentando cambios fenotípicos y funcionales. Son los encargados de regular la inflamación, la reparación del tejido y su regeneración. Una vez activados, expresan diferentes factores que pueden estimular a otras células como fibroblastos, células epiteliales, células endoteliales y células madre para promover la reparación del tejido dañado[217].

Tras estas primeras etapas se expresa un fenotipo de macrófagos tipo 2 o reparador, que trata de minimizar la respuesta proinflamatoria suprimiendo la respuesta inflamatoria dañina para el tejido. Si el proceso de reparación no fuera exitoso y la inflamación fuera persistente, podría causar una fibrosis destructiva del tejido[218-219] (Fig. 14).

Durante las etapas finales del proceso de reparación se forma la matriz provisional y tiene lugar la limpieza de la zona de la herida. Esto dura de media entre horas y una semana[205]. A continuación, los vasos sanguíneos empiezan a expandirse permitiendo la entrada de mayor flujo de sangre en el área dañada[185].

Algunos materiales producen la sobreexpresión de metaloproteasas de matriz (MMPs) durante la fase de inflamación, lo que puede resultar beneficioso en el caso de implantes que no ejerzan de andamio, como las articulaciones artificiales o los catéteres[220].

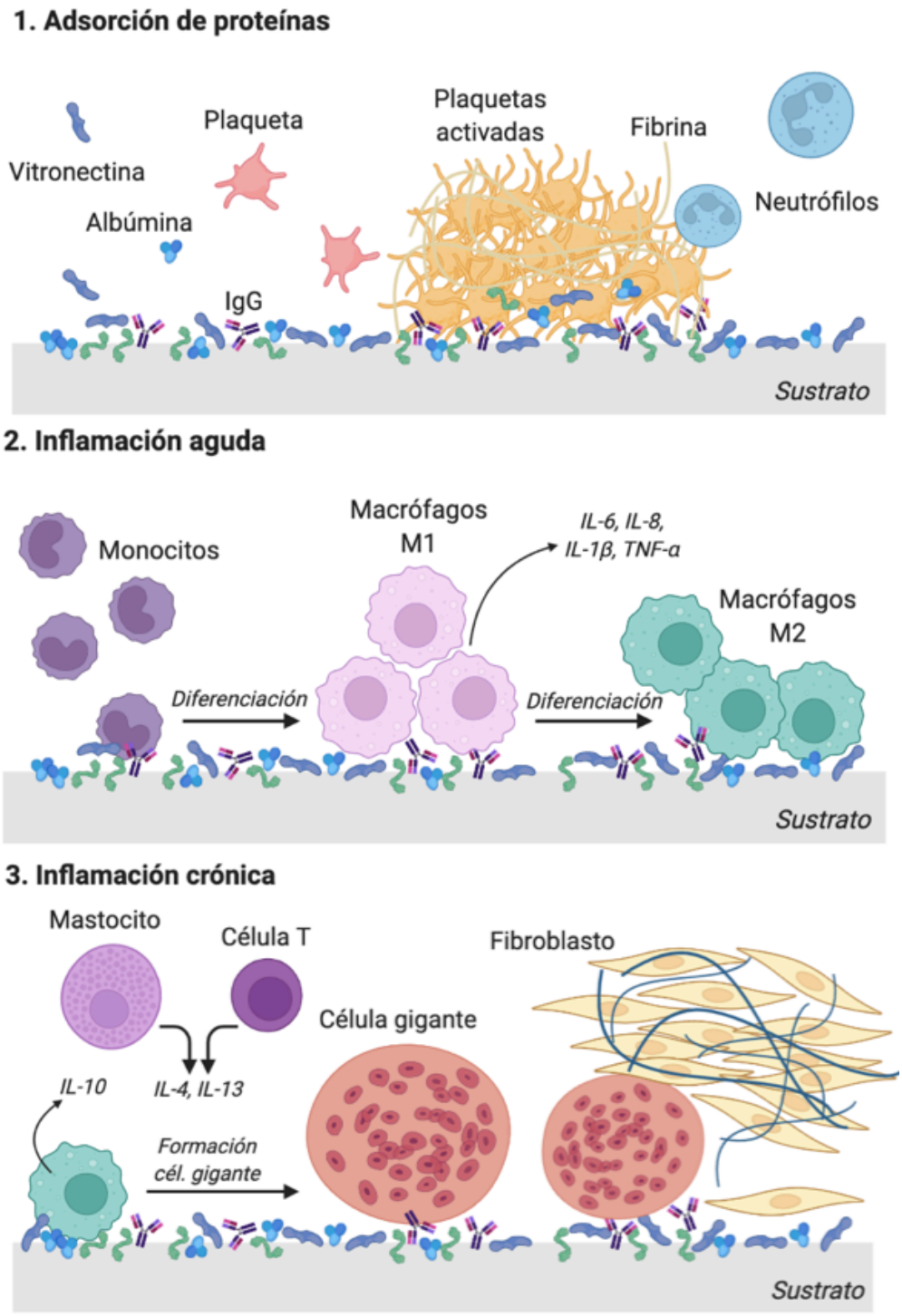


Figura 14. Etapas de la respuesta inmune a los biomateriales. Fase 1 de adsorción de proteínas, Fase 2 de inflamación aguda y Fase 3 de inflamación crónica.

- **Inflamación crónica**

Tras la inflamación aguda se identifica una inflamación crónica motivada por la presencia de células mononucleares como monocitos/macrófagos, linfocitos y células plasmáticas en el lugar del implante, que estimulan la neovascularización y el desarrollo del tejido conjuntivo[185]. Cuando el material es biocompatible, esta inflamación inicial desaparece en menos de dos semanas. La superficie del biomaterial determina la adhesión del macrófago sobre la misma y la producción

de diferentes citoquinas así como la polarización a un fenotipo u otro. Tras la resolución de la respuesta inflamatoria se puede identificar granulación tisular por la presencia de macrófagos, infiltración de fibroblastos y neovascularización en las zonas del implante. En caso de no resolverse la inflamación, el tejido granuloso es el precursor de la formación de la cápsula fibrosa (Fig. 14).

En relación con la RI adquirida, tras la activación de los macrófagos, los linfocitos T y B responden al antígeno de forma más específica que en la inmunidad innata. Las células T $CD4^+$ vírgenes (Th0) se pueden diferenciar en distintos linajes incluyendo Th1, Th2, Th17 y T reguladoras (Treg) (Fig. 15). El destino de las células Th depende del tipo de estímulos que estas reciben y de los subsecuentes patrones de expresión génica. Cada uno de estos linajes Th tiene funciones específicas en la homeostasis y en la respuesta inmune[221].

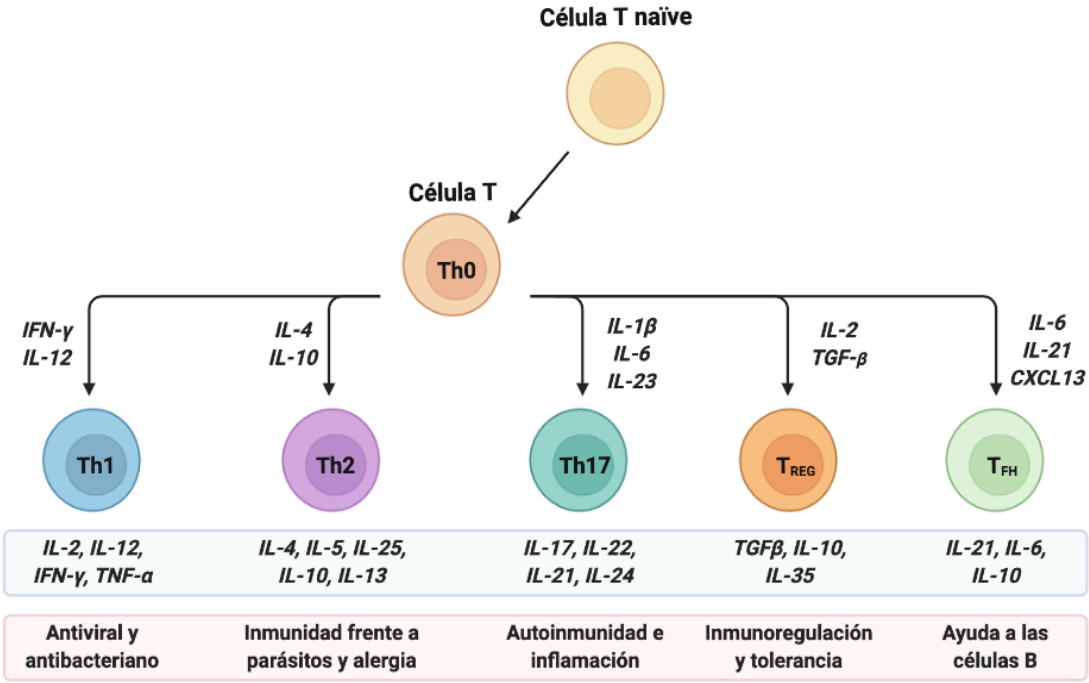


Figura 15. Diferenciación de los linfocitos T desde su progenitor (célula T naïve) hacia todas las estirpes (Th1, Th2, Th17, T_{REG} y T_{FH}). Receptores, citoquinas secretadas y principales funciones de cada tipo de célula T.

La diferenciación de los linfocitos hacia un fenotipo u otro depende de las señales que emitan los macrófagos adheridos a la superficie del biomaterial, que determina de forma indirecta la polarización de los linfocitos[222]. Al mismo tiempo, las distintas subpoblaciones linfocitarias juegan un papel importante en el proceso inflamatorio a través de la secreción de citoquinas que, en gran parte, afectan al comportamiento de los macrófagos.

En la fase inflamatoria crónica, los linfocitos T, principalmente los linfocitos Th2 helper, desempeñan un papel clave en el control de la expresión de mediadores pro y antiinflamatorios[223]. Los fenotipos de macrófagos, M1 (proinflamatorio) y M2 (reparador), tienen su correspondencia con los fenotipos Th1 y Th2 de los linfocitos T helper[224-225].

Las células Th1 son las responsables de la defensa contra patógenos intracelulares secretando IL-2, IFN-γ y TNF-β, que activan a los macrófagos y los diferencia hacia fenotipos proinflamatorios, pudiendo incrementar el contenido en óxido nítrico y otras especies reactivas de oxígeno, así como en citoquinas proinflamatorias como IL-1, IL-6 o TNF-α. Sin embargo, los linfocitos Th2 dirigen la defensa contra parásitos extracelulares y están implicados en procesos alérgicos, secretando IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13 y arginasa-1, que promueven la deposición de colágeno y la reparación del tejido. La IL-12 promueve la transformación en células Th1, la IL-4 promueve la transformación en células Th2 y altas concentraciones de IL-10 puede inhibir la proliferación celular y reducir los niveles de colágeno[222] (Fig. 15).

La presencia de TGF-β, IL-6 e IL-23 promueve el fenotipo Th17, que media la respuesta a bacterias extracelulares y a hongos. Esta subpoblación está presente en procesos inflamatorios y autoinmunes, secretando principalmente IL-17, IL-6 e IL-21[226-227]. Por último, el silenciamiento de la respuesta inmunitaria ocurre debido a la diferenciación hacia el fenotipo Treg mediada por TGF-β, cuya función es suprimir la respuesta de linfocitos T, evitando la activación de linfocitos autorreactivos. En este ambiente, los linfocitos B son los responsables de la producción de anticuerpos[228].

La inflamación tras la implantación de un biomaterial puede resultar determinante para su integración o rechazo. Una respuesta inmune exhacerbada o prolongada en el tiempo puede desencadenar el rechazo del biomaterial e incrementar el riesgo de infección[185].

Se considerará a continuación la formación del **tejido granular** de reparación, la **reacción a un cuerpo extraño** y la **fibrosis** como acontecimientos posibles producidos tras la implanteción de un biomatrerial.

El inicio de la reparación del tejido dañado tiene lugar con la llegada de fibroblastos y células endoteliales (Fig. 14). Ambos tipos celulares son reclutados por los macrófagos, encargados de la respuesta inflamatoria crónica, que estimulan su proliferación y la formación de un **tejido granular de reparación**. Este tipo tisular se forma en lugares en los que el proceso de reparación no puede restaurar el área afectada a su estado inicial, sirviendo como sustrato para la formación de cicatrices o fibrosis[229].
Los fibroblastos sintetizan proteínas de la matriz extracelular, inicialmente proteoglicanos y después colágeno, que formará la cápsula fibrosa. Esta cápsula actúa como barrera entre el implante y el tejido del hospedador[230].

Las células gigantes están formadas por la fusión de macrófagos y su presencia es típica en escenarios de inflamación crónica. Alrededor de la zona de implantación de un material, la aparición de células gigantes y/o macrófagos y los componentes del tejido granular se conoce como **reacción a un cuerpo extraño** (foreign body reaction, FBR)[231].

Las superficies lisas y planas de los biomateriales suelen mostrar una capa más fina de macrófagos comparada con los materiales más rugosos, porosos y particulados, que muestran un número mayor de macrófagos y células gigantes.
Estas células gigantes están relacionadas con la degradación del biomaterial debido a su actividad fagocítica y oxidativa, además de la producción de citoquinas[232].

En el proceso de reparación tisular tras la implantación de un biomaterial (fundamentalmente en los inertes) es habitual la **formación de una cápsula fibrosa** alrededor del mismo y, que este tejido fibroso sea la forma final del tejido reparado o de sustitución. Los fibroblastos proliferan generando abundante colágeno y proteoglicanos así como inducen la neovascularización de la zona, permitiendo la síntesis de tejido conectivo, que favorecerá los procesos de reparación[233]. La proliferación de fibroblastos y células del endotelio vascular provoca el cambio del coágulo de fibrina por un tejido de granulación extremadamente vascularizado, favoreciendo la formación de tejido fibroso que impide la correcta integración del biomaterial y además provoca que esté sujeto a micromovimientos, que pueden producir deformaciones en el tejido y dolor en el paciente[234].
Sin embargo, la respuesta ideal sería el restablecimiento de la arquitectura y de las funciones normales del tejido tras la cicatrización de la herida, lo que supone uno de los principales retos a conseguir con los biomateriales actuales.

Uno de los principales aspectos a optimizar para conseguir mejores respuestas inmunes es el estudio de la superficie del biomaterial. Puesto que además de determinar la adsorción de proteínas en las primeras etapas tras la implantación del biomaterial, mediante la modificación de las propiedades de la superficie se podría modificar la adhesión de los diferentes tipos celulares implicados en la respuesta inmune, pudiendo provocar efectos de inhibición o atenuación de la respuesta inmune[235-236].

Los mecanismos de adhesión de los macrófagos/monocitos sobre la superficie, la señalización para la adhesión que ejerza el material, la pérdida de adhesión (anoikis) y las cascadas de citoquinas/quimioquinas que se desencadenan son los principales mecanismos sobre los que se podría intervenir para modular la respuesta inmune aguda y crónica[185].

El diseño de **biomateriales con capacidad inmunomoduladora** permite regular las respuestas inflamatorias estimulando o induciendo la osteogénesis para favorecer así la osteointegración del implante en el hueso[237]. Con este objetivo, para biomateriales de grandes dimensiones que van a servir de andamio se han diseñado biomateriales con moléculas bioactivas adsorbidas o matrices extracelulares artificiales[153,238].
En el caso de nanopartículas, es bien conocida su internalización por parte de los macrófagos y la alteración que producen en la expresión y secreción de diferentes citoquinas y quimioquinas[239-240]. Sin embargo, la respuesta que producen puede modificarse alterando su porosidad[241], rugosidad[242] o nanotopografía[243].

4. Angiogénesis

Existen dos formas de crecimiento de los vasos sanguíneos, vasculogénesis y angiogénesis. La vasculogénesis es la formación *de novo* que se produce a partir de células progenitoras mesenquimales de la médula ósea y tiene lugar en etapas embrionarias[244]. La angiogénesis hace referencia al crecimiento de nuevos vasos sanguíneos a partir de la vasculatura existente[245]. Dado el potencial angiogénico de los materiales utilizados en este estudio, nos centraremos en el proceso de angiogénesis, cuyas características se detallan a continuación.

4.1. Características de la angiogénesis

La **angiogénesis** incluye la migración y proliferación de las células endoteliales para generar estructuras tubulares que se unirán en diferentes puntos, permitiendo la formación del lumen y su maduración hasta formarlos vasos sanguíneos, necesarios para suministrar oxígeno y nutrientes a los diferentes tejidos y retirar las sustancias de desecho. El proceso angiogénico es necesario para la regeneración de tejidos dañados y es especialmente importante en la regeneración ósea.

En la angiogénesis se produce una yema o brote en una zona de un vaso sanguíneo a partir de células endoteliales preexistentes, que prolifera y se elonga hasta producirse la fusión de las células de dos ápices. Se forma el lumen y posteriormente los pericitos y células del músculo liso lo recubren, generando un vaso perfundido y maduro[246].

Las células endoteliales formadoras de arterias son diferentes a las que forman capilares o venas. Las arterias deben tener una resistencia superior a la de las venas puesto que la presión sanguínea en su interior es muy elevada, mientras que en venas y capilares los gradientes de presión son notablemente inferiores. Así, las arterias están recubiertas de varias capas de células de músculo liso, que aportan resistencia y poseen una matriz propia, mientras que en las venas y capilares este tipo celular es mucho menos numeroso[247].

Estas diferencias estructurales entre las arterias y las venas están reflejadas a nivel molecular. Las arterias presentan una elevada expresión de los componentes de la vía Notch, superior a la de las venas. Incluso se ha comprobado que bloquear la vía Notch en células endoteliales de las arterias provoca una reducción de los marcadores arteriales y la expresión de genes específicos de venas, lo que sugiere una acción inhibitoria sobre la expresión de estos marcadores específicos de vena[248-249].

En la formación de un vaso sanguíneo por angiogénesis se diferencian dos tipos de células endoteliales: células del ápice y células de la yema. Las primeras emiten numerosos filopodios y dirigen el crecimiento, mientras que las segundan presentan muchos menos filopodios, son más proliferativas y forman el lumen vascular. Están unidas entre sí mediante uniones adherentes (VE-cadherina).

Se ha comprobado que Notch regula la especificación de las células endoteliales a células del ápice (bajos niveles de Notch) y células de la yema (altos niveles)[250-251]. Sin embargo, el ligando DLL4 del receptor Notch se expresa más en las células del ápice que en las de la yema, evidenciando la coregulación existente entre estos dos tipos de célula endotelial. El ligando JAG1 del receptor Notch1 se expresa más en las células de la yema y antagoniza la señal de DLL4, impidiendo que estas células se pudieran especificar en células del ápice[250].

Las células endoteliales comparten membrana basal con las células de músculo liso (células murales) que rodean los capilares sanguíneos por la parte externa, cubriéndolas. Para que pueda producirse la liberación de las células endoteliales para su migración, una parte de la membrana basal debe degradarse y las células de músculo liso deben separarse.
Las metaloproteasas (MMPs) de las células endoteliales que van a conformar el ápice del nuevo brote capilar son las principales proteasas encargadas de la digestión de la matriz extracelular, fundamentalmente MT-MMP1. Estas liberan a su vez factores de crecimiento proangiogénicos contenidos en la matriz y moléculas antiangiogénicas para prevenir la neovasculogénesis inapropiada y mantenerla bajo control[252]. La separación de las células de músculo liso está mediada por la angiopoyetina 2 (ANG2), factor de crecimiento proangiogénico que liberan las células endoteliales tras su estimulación, para provocar la separación rápida y local de las células de músculo liso que las recubren[253].

4.2. Factor de crecimiento de endotelio vascular (VEGF)

El **factor de crecimiento de endotelio vascular (VEGF)** comprende una amplia familia genética con implicación en el crecimiento y diferenciación de las células del endotelio vascular. Incluye a VEGF (ó VEGF-A), el factor de crecimiento placentario (PIGF), VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D y VEGF-E. VEGF-A es el mayor regulador de la angiogénesis y del desarrollo del sistema vascular y linfático, tanto que la inactivación de uno de sus alelos conlleva una incorrecta angiogénesis y es letal en la etapa embrionaria[254]. Es un potente mitógeno de las células endoteliales vasculares derivadas de arterias, venas y vasos linfáticos[255] y es necesario para su supervivencia, tanto *in vivo* como *in vitro*[256]. Además, regula la permeabilidad vascular a través de la modulación del intercambio iónico entre el plasma y los tejidos extravasculares[257].

El VEGF (VEGF-A), miembro principal de esta familia, es una glicoproteína homodimérica de 45 KDa[258] y se une tanto a VEGF-R1 como a VEGF-R2[259]. Hasta el momento se han descrito seis isoformas diferentes, resultado del procesamiento alternativo del mRNA con diferente masa molecular y propiedades biológicas: 121, 145, 165, 183, 189 y 206, siendo la 165 la más común y estudiada[258,260]. Esta isoforma es principalmente excretada, pero existe una fracción de ésta que se mantiene unida a la superficie celular y a la matriz extracelular.

La angiogénesis por tanto está regulada por VEGF y Notch/DLL4. VEGF estimula la inducción de las células del ápice y la formación de filopodios a través del receptor 2 de VEGF (VEGFR2) y del receptor 3 (VEGFR3).
El receptor 1 de VEGF (VEGFR1) predomina en las células de la yema y está implicado en el guiado y delimitación de la formación de las células del ápice[261].
VEGF/VEGFR2 potencia la expresión de DLL4 en las células del ápice, que activa Notch e inhibe la especificación a células del ápice disminuyendo la expresión de VEGFR2, VEGFR3 y NRP1 y aumentando la de VEGFR1[251,261].

Los receptores de VEGF (VEGF-R) son receptores de tipo tirosina quinasa (RTKs) localizados en la superficie de las células del endotelio vascular y de células derivadas de la médula ósea[258] y también en forma soluble[259,262-263]. Se distinguen tres receptores: VEGF-R1 ó Flt-1, VEGF-R2 ó KDR/Flk-1 y VEGF-R3 ó Flt-4[258-260], siendo VEGF-R2 el que presenta mayor capacidad de autofosforilación y transducción de la señal (10 veces más que VEGF-1). Sin embargo, las especies solubles de los mismos (sVEGF-R1, sVEGF-R2 y sVEGF-R3), que se forman por procesamiento alternativo del mRNA, parece que tienen un papel anti-angiogénico, secuestrando el VEGF circulante[259,262-263].

Cuando se une su ligando, los VEGF-R se dimerizan y se produce su trans-autofosforilación que desencadena una cascada de señalización que incluye la fosforilación de proteínas como la quinasa C (PKC), la fosfolipasa C-gamma (PLC-γ), la fosfatidilinositol 3 quinasa (PI3K), la óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS) y el blanco de rapamicina en mamíferos (mTOR)[263].

Las neuropilinas 1 y 2 (NRP-1 y NRP-2, respectivamente) son receptores glicoprotéicos sin actividad quinasa que se encuentran en la superficie celular a los que se unen semaforinas, PIGF-2, VEGF-A165, VEGF-B y VEGF-E[259,263]. Cuando VEGF-A165 se une a NRP-1 incrementa su afinidad por VEGF-R2 hasta 10 veces, favoreciendo la angiogénesis[262].

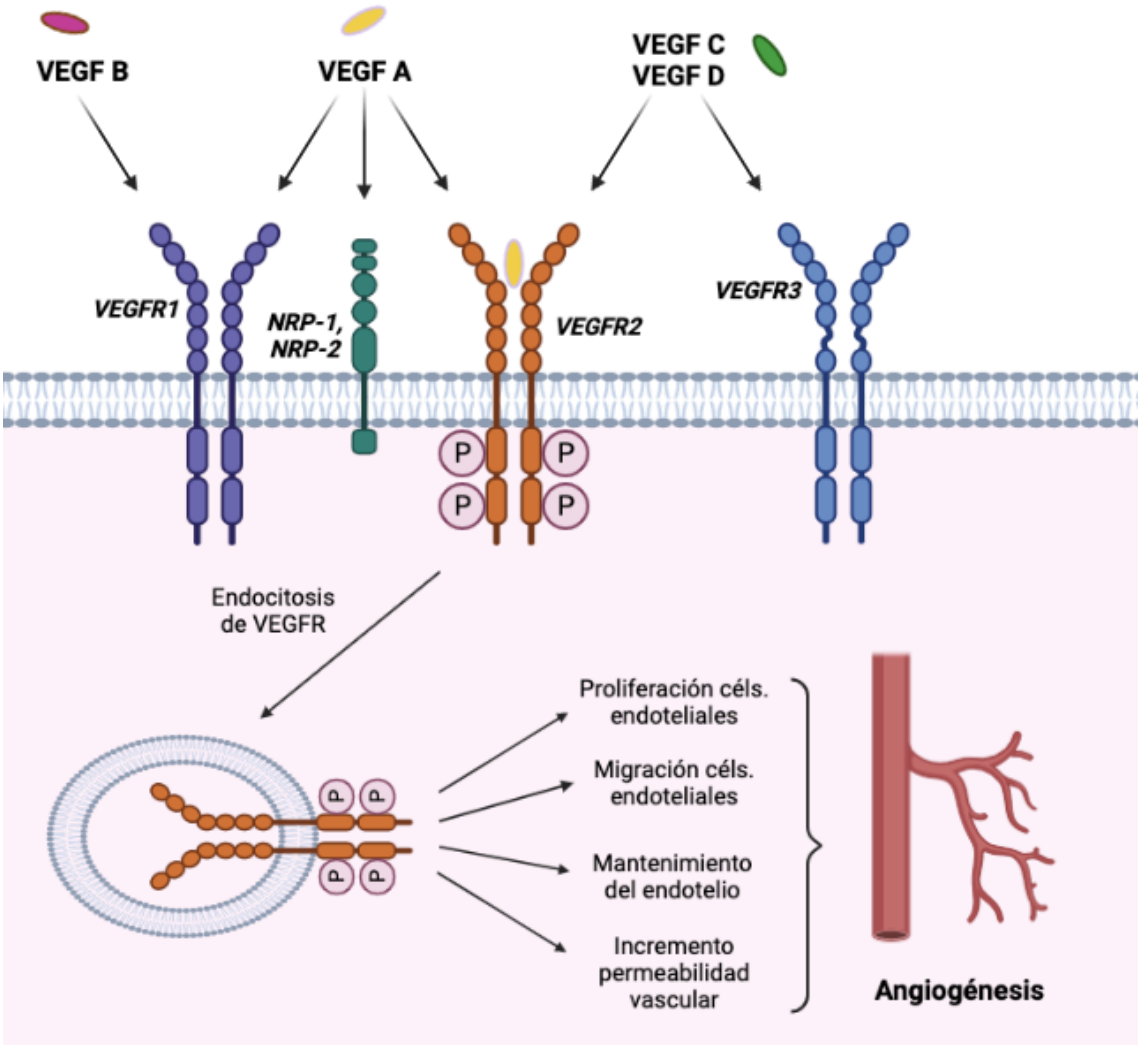


Figura 16. Receptores de VEGF (VEGFR1, VEGFR2 y VEGFR3), sus ligandos (VEGF A, B, C y D) y las neuropilinas (NRP-1 y 2) que intervienen en el proceso de unión de los mismos. Se representa el proceso de unión del ligando VEGF A al receptor VEGFR2, su fosforilación e internalización por endocitosis y las principales funciones que contibuyen al proceso de angiogénesis.

Como se ha indicado, la angiogénesis está regulada principalmente por el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF), pero también por la presencia de varios estímulos como factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), óxido nítrico (NO), factor de crecimiento transformante alfa y beta (TGF-α y TGF-β, respectivamente), factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), factor de necrosis tumoral alfa (TNF-α), factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), angiogenina, interleucina 8 (IL-8), angiopoyetinas 1 y 2 (Ang-1 y Ang-2)[264].

Es importante destacar que el factor de crecimiento de endotelio vascular (VEGF) es el principal promotor de la movilización de las células progenitoras endoteliales (EPCs), cuyas características se detallan más adelante. Se ha comprobado que tras una isquemia, los niveles de VEGF circulante aumentan como respuesta y producen la movilización de las EPCs[244].

La expresión de VEGF-A y su actividad están moduladas por diferentes mecanismos: hipoxia, factores de transcripción, mediadores de la inflamación o fuerzas mecánicas. Estos estímulos aumentan la proliferación de las células endoteliales derivadas de arterias, venas y vasos linfáticos[258]. Además, promueven la vasodilatación e incrementan la permeabilidad vascular a nivel local, activan a las células endoteliales de esa zona y producen la degradación de la membrana basal para favorecer su migración[265]. Los factores de crecimiento (como TGFα, TGFβ o PDGF) y citoquinas (IL-1α, IL-1β, IL6, TNFα o prostaglandina E2) estimulan la migración y proliferación de células endoteliales y la formación de nuevos vasos que permitan restaurar la perfusión sanguínea del tejido[266].

Uno de los principales estímulos de la neovascularización y los cambios en la forma y función de los vasos sanguíneos son los cambios en la demanda de oxígeno tisular. Los factores inducibles por hipoxia (HIFs) intervienen en las respuestas de las células endoteliales a los cambios en la tensión de oxígeno. Su actividad está regulada por el dominio sensible a oxígeno de las proteínas prolil-hidroxilasa (PHD1-3)[267]. En normoxia las PHDs usan oxígeno para hidroxilar los HIFs, lo que provoca su degradación proteosomal. Sin embargo, en condiciones de hipoxia estos HIFs no se hidroxilan y por tanto, constituyen una señal activa[268].

Los niveles bajos de oxígeno (O_2) inducen el crecimiento de nuevos vasos para restaurar su aporte a los tejidos isquémicos[269]. La isquemia o reducción de flujo sanguíneo en un tejido induce la liberación de citoquinas[270], la expresión de marcadores de superficie[271] y la proliferación y maduración de células endoteliales[272].

La hipoxia inicia una cascada celular que provoca la migración, extravasación y proliferación de EPCs derivadas de la médula ósea *in vitro* e *in vivo*. Una vez llegan al tejido diana y se exponen a la hipoxia, responden a la misma organizándose en clústeres, con la consiguiente producción de nuevos vasos sanguíneos que se unirán a la vasculatura preexistente[272].

4.3. Células progenitoras endoteliales (EPCs)

Las células progenitoras endoteliales (EPCs) son células madre localizadas en la médula ósea y en la sangre periférica. Derivan de hemiangioblastos procedentes del mesodermo embrionario. Originan el endotelio vascular que recubre el interior de todos los vasos del sistema circulatorio sanguíneo y linfático, actuando como barrera semipermeable entre la sangre y el resto del cuerpo. Además, modulan la coagulación sanguínea y la fibrinólisis, el tono vascular, la presión sanguínea y participan en la respuesta inmune adaptativa e innata[273-274].

La diferenciación de este tipo celular puede evaluarse analizando la expresión de marcadores celulares específicos como CD34 (marcador progenitor, de células inmaduras), VEGF-R2, CD31, factor de von Willerbrand (vWF) y óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS).

- CD34 es una glicoproteína de membrana utilizada como marcador de diferenciación temprana de células hematopoyéticas[275]
- VEGF-R2 es el principal y más abundante marcador de diferenciación endotelial, como se describe en el punto 4.2
- CD31 (ó PECAM-1, molécula 1 de adhesión de plaquetas del endotelio celular) es una inmunoglobulina que se expresa en células endoteliales, plaquetas y leucocitos[276]
- vWF es secretado de la membrana basal de las células endoteliales y depositado en la matriz extracelular, donde multimeriza y refuerza la unión de las células endoteliales a la pared vascular. A su vez, es un factor clave en la cascada de la coagulación, una vez liberado en el flujo sanguíneo interacciona con las plaquetas circulantes uniéndose a la glicoproteína GPIb y provocando su agregación[277]
- eNOS es la única de las tres sintasas de óxido nítrico (NO) constitutiva y presente en el endotelio vascular. Produce NOa partir de L-arginina activando la guanilato ciclasa y provocando la vasodilatación de los vasos sanguíneos[273]

Las EPCs participan en los procesos de neovascularización pero también están implicadas en la reparación de los tejidos tras el curso de patologías (vasculogénesis postnatal) como la isquemia de miocardio[278], el infarto cerebral[279], retinopatías[280] y crecimiento de tumores[281]. Por este motivo se plantea el transplante de EPCs a las zonas afectadas tras la aparición de una patología de estas características[282]. Tepper et al. han demostrado que se pueden observar clústeres de EPCs en tejido post-isquémico (7 días tras la isquemia) de ratón sin estar asociados con vasos sanguíneos preexistentes. También han observado que estos clústeres no se forman en zonas de incisiones, donde sí se observa presencia de EPCs, pero no de una forma especializada en grupo[244].

La hipoxia en el endotelio vascular estimula la migración de EPCs procedentes de la médula ósea hacia las zonas isquémicas, produciendo su extravasación y formación de grupos o clústeres, que se alinean en la dirección del gradiente isquémico o de hipoxia y forman cordones vasculares que se colocan de tal modo que permiten su perfusión y funcionalización 2 semanas después de producirse el daño[244].
Este efecto es tan directo y claro, que se están realizando estudios en los que se somete a hipoxia a las EPCs antes de su transplante con el objetivo de estimular su migración y proliferación en el tejido diana[283].
Hay estudios que postulan a las EPCs como marcadores celulares de disfunción vascular[284-285], para preveer posibles disfunciones u oclusiones vasculares.

4.4. Biomateriales angiogénicos

El gran reto de la ingeniería de tejidos y la medicina regenerativa es conseguir sintetizar biomateriales que puedan ser colonizados por las células propias del tejido en el que se implantan. Para ello, además de permitir la adhesión, crecimiento y diferenciación de estos tipos celulares, deben permitir el correcto desarrollo del tejido vascular, de tal modo que el implante y las células colindantes queden irrigadas y se pueda producir la inclusión de éste en el tejido[286]. Hung et al. han demostrado la importancia de que la

interacción entre las células del endotelio vascular y los biomateriales permita la modulación de la adhesión de este tipo celular, para minimizar los riesgos de coagulación y trombosis que puede implicar la superficie del biomaterial[287]. Existen ejemplos que incluyen hiperplasia anastomótica en implantes vasculares humanos, lo que produce alteración del flujo sanguíneo, trombosis o incluso la obstrucción del vaso (restenosis)[288].

La angiogénesis y la osteogénesis son procesos interrelacionados durante la regeneración ósea[289-290]. Está demostrado que la osificación endocondral que se produce tras una fractura ósea es dependiente del crecimiento capilar en la zona y de los factores de crecimiento que se transportan en la sangre[291].
Cuando se introduce un implante en el hueso se produce una pérdida de la red vascular al romper el tejido en la zona donde se implanta. Es necesario que el nuevo implante quede irrigado para que los nutrientes puedan llegar a las células que lo colonicen y se puedan excretar las sustancias de desecho. Por ello es especialmente importante el proceso de angiogénesis tras la implantación y es deseable que el biomaterial implantado estimule dicho proceso.

Se ha demostrado que las biocerámicas basadas en fosfato (P_2O_5) pueden inducir angiogénesis debido a los elevados niveles de iones fosfato de su estructura, mediante el incremento de la señal de Akt y la sobreexpresión de MMP2 y bFGF. Por otra parte, se ha comprobado que cargando estos biomateriales con factores de crecimiento proangiogénicos como VEGF-A o bGFG, se consiguen mejoras en la proliferación y supervivencia de las células endoteliales[292]. El VEGF-A además de ser el principal factor promotor de la angiogénesis, juega un papel clave en la osteogénesis. VEGF-A estimula los procesos de osteogénesis afectando a la maduración de osteoblastos, a los procesos de osificación y al recambio óseo[289,293].

Por otro lado, los vidrios bioactivos basados en silicatos (SiO_2) tienen capacidad de inducir la diferenciación de células madre mesenquimales a través de la regulación positiva de genes relacionados con la angiogénesis, como los que codifican para el factor de crecimiento de endotelio vascular (VEGF) o el factor de crecimiento de fibroblastos (bFGF), favoreciendo su síntesis y secreción[294]. Estos biomateriales también estimulan la migración de células endoteliales, necesaria para la formación de nuevos vasos[295].

Otra aproximación relativa a la promoción de la irrigación de los biomateriales para tejido óseo consiste en el dopado de los mismos con iones con capacidad angiogénica. Los biomateriales basados en silicato, borato, borosilicato y fosfato se han modificado con iones metálicos como Cu^{2+}, Ag^{2+}, Mg^{2+}, Zn^{2+}, F^{-}, Sr^{2+} ó Co^{2+}. Además de capacidad angiogénica, se ha comprobado que muchos de ellos poseen capacidad antibacteriana y osteogénica[292]. El Cu^{2+} y el Co^{2+} han mostrado efectos especialmente angiogénicos regulando factores como VEGF, fibronectina, angiogenina, colagenasa, prostanglandina E1, ceruloplasmina y FGF1/2, todos ellos con papeles clave en la iniciación, maduración y regulación de la formación de los vasos sanguíneos. Estudios *in vivo* han demostrado la capacidad de estos iones para estimular la migración de células endoteliales de cordón umbilical humanas (HUVECs), la formación de túbulos y la secreción de VEGF y expresión de genes angiogénicos[296-297].

OBJETIVOS GENERALES

OBJETIVOS GENERALES

Estos estudios se han realizado dentro del grupo 'Interacciones célula-biomaterial' del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular (Facultad de Ciencias Químicas) de la Universidad Complutensede Madrid, integrado en el Grupo UCM910576 (GIBI) y asociado al Instituto de Investigación Sanitaria del Hospital Clínico San Carlos (IdISSC). La Tesis Doctoral está enmarcada en dos Proyectos consecutivos del Ministerio de Economía y Competitividad (Proyectos de I+D+i, del programa estatal de investigación, desarrollo e innovación orientada a los Retos de la Sociedad) de los que son Investigadores Principales Daniel Arcos y María Teresa Portolés:
"Estructuras macroporosas asociadas con factores de crecimiento para la reconstrucción de defectos óseos y defectos del hueso osteoporótico" (MAT2013-43299-R) y "Nanomateriales regenerativos en escenarios de patología ósea: osteoporosis e infección" (MAT2016-75611-R).

La presente Tesis Doctoral se centra en el estudio de la **respuesta celular** a dos tipos de **biomateriales diseñados para tratamiento de hueso osteoporótico** mediante diferentes estrategias experimentales:

- **Andamios 3D preparados con hidroxiapatitas sustituidas con silicio y tratados con factor de crecimiento de endotelio vascular** (Capítulo 1)
- **Nanoesferas de sílice mesoporosa cargadas con ipriflavona como fármaco antiosteoporótico** (Capítulo 2)

Estos biomateriales han sido preparados y caracterizados en el Departamento de Química en Ciencias Farmacéuticas de la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid por el grupo de investigación de la Profesora María Vallet Regí.

La **respuesta *in vitro*** a estos biomateriales ha sido evaluada con células implicadas en los procesos de **remodelado óseo** (osteoblastos y osteoclastos), **osteogénesis** (preosteoblastos), **angiogénesis** (células progenitoras endoteliales) y **respuesta inmune** (macrófagos y linfocitos). La **evaluación de los biomateriales *in vivo*** se ha realizado en **ovejas y conejas osteoporóticas** como modelos animales de osteoporosis, gracias a la colaboración con el Centro de Cirugía de Mínima Invasión Jesús Usón (CCMIJU) de Cáceres y con el Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Clínico San Carlos de Madrid.

CAPÍTULO I

CAPÍTULO I: Respuesta celular a andamios 3D preparados con hidroxiapatitas sustituidas con silicio y tratados con factor de crecimiento de endotelio vascular

La hidroxiapatita sintética ($Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$) es la biocerámica más empleada para regeneración ósea ya que tiene una proporción de Ca/P similar a la de los depósitos minerales del hueso, y su estructura cristalina y densidad es similar a la ósea[26,31]. Es biocompatible, bioactiva y osteoconductiva, es decir, permite la adhesión, proliferación y diferenciación de los osteoblastos sobre su superficie y el crecimiento de nuevas capas de hidroxiapatita[298]. Es comúnmente utilizada en implantes dentales y ortopédicos, reconstrucciones de mandíbula, cirugía facial y reparaciones de oreja, nariz y garganta[18,27-30,299].

Sin embargo, este material presenta como desventaja su lenta degradación. Esto reduce la reactividad y la velocidad de formación de nuevas capas de apatita[300]. Con el objetivo de mejorar la respuesta de estas hidroxiapatitas sintéticas se realizan sustituciones de grupos fosfato (PO_4^{3-}) por grupos silicato (SiO_4^{4-}), generando un exceso de carga negativa en la superficie del material que provoca la liberación de grupos OH^- para equilibrar las cargas, lo que se traduce en un aumento de la reactividad del material[301].

El silicio, aunque se encuentra en el hueso biológico en forma de traza (menos del 1 %), es imprescindible en la síntesis de colágeno y en el desarrollo del tejido óseo y cartilaginoso[302]. Además, es esencial para el desarrollo de la red de glucosaminoglucano de la matriz extracelular[303] y juega un papel clave en la formación ósea de las etapas tempranas del desarrollo[304]. Se ha comprobado que su déficit durante esta fase puede ocasionar patologías y deformidades óseas[305]. Cuando se introduce silicato en cerámicas de fosfatos de calcio ($Ca_{10}(PO_4)_{5.75}(SiO_4)_{0.25}(OH)_{1.75x0.25}$ (donde x representa las vacantes en la posición hidroxilo), se produce una distorsión en la red cristalina. Los grupos silicato son de mayor tamaño y carga que los grupos fosfato, lo que desequilibra la estructura y provoca la liberación de los grupos OH^-. Esto desestabiliza la red y se produce un aumento de la solubilidad y reactividad del material con el medio, haciéndolo más biocompatible y bioactivo[306-307]. Los iones de calcio, silicio y fosfato se concentran en la zona entre el hueso y el implante, favoreciendo la síntesis de nuevas capas de hidroxiapatita y desarrollo de nuevo tejido[300,306].

Además, se ha demostrado que la sustitución con grupos silicato en estas hidroxiapatitas (SiHA) genera defectos en la superficie del material y produce una reducción del tamaño de cristal, incrementando su osteoconductividad mediante el aumento de la interacción de la superficie del material con proteínas como la fibronectina[301], que interaccionan con integrinas y activan rutas de señalización relacionadas con la adhesión, proliferación y diferenciación de osteoblastos. Por otra parte, aumenta la expresión de fosfatasa alcalina y osteocalcina, marcadores medio y tardío de la diferenciación de osteoblastos, respectivamente[298,307-308]. La presencia del silicio estimula a su vez la síntesis de colágeno y la formación de nueva matriz ósea por parte de los osteoblastos[309-310].

Se ha comprobado que esta sustitución con silicio permite que los osteoclastos se diferencien correctamente a partir de sus precursores mononucleares y que tenga lugar

la resorción ósea[301,310], procesos imprescindibles para que se produzca el remodelado óseo a lo largo de toda la vida del individuo. Sin embargo, existen estudios *in vitro* que demuestran que estos materiales producen una disminución de la osteoclastogénesis con efecto dosis-dependiente en las últimas etapas de diferenciación y una significativa reducción de su actividad resortiva[301,311]. También se ha comprobado que promueven la síntesis de factor de crecimiento de endotelio vascular (VEGF) en fibroblastos, potenciando la formación de vasos sanguíneos y la irrigación alrededor del material[312].

Por otra parte, para alcanzar mayores niveles de bioactividad, se han diseñado hidroxiapatitas sustituidas con silicio nanocristalinas (nanoSiHA). Estas nanoSiHAs se sintetizan a menores temperaturas (700 °C vs 1150 °C), presentan menor tamaño de cristal y mayor rugosidad y área de superficie, lo que provoca un incremento de su bioactividad[313]. El aumento en su rugosidad mejora la adhesión de los osteoblastos sobre su superficie y la osteoconducción[314], así como la adsorción de proteínas sobre su superficie[315]. Al ser más reactivas, su tiempo de degradación es inferior que el de las SiHA y la interacción que se produce con el tejido óseo y la síntesis de nuevas capas de apatita es mayor.

Son numerosos los estudios realizados con las nanoSiHA en tratamiento óseo y dental, tanto aplicadas como biomaterial principal[316] como en recubrimientos de biomateriales metálicos (como aleaciones de titanio), mejorando la osteogénesis y osteointegración del material[317].

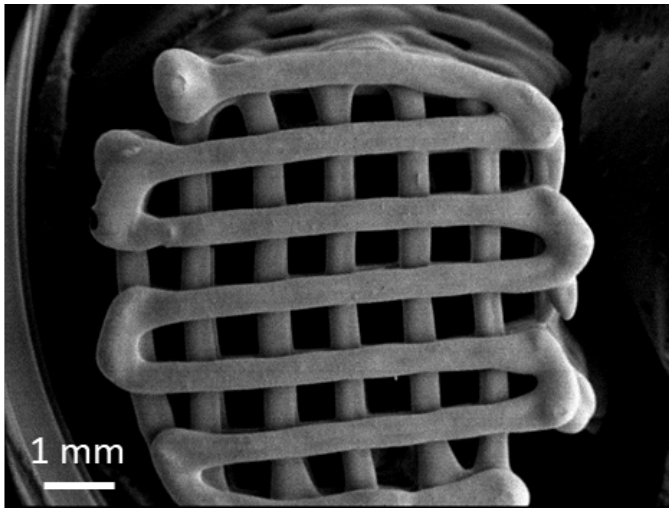


Figura 17. Micrografía tomada por microscopía electrónica de barrido (SEM) de un andamio de nanoSiHA. *Acta Biomaterialia 2020, 101: 544–553.*

Una de las principales ventajas de la elevada porosidad que presentan estas hidroxiapatitas es la posibilidad de adsorber sobre su superficie factores de crecimiento u otras proteínas que puedan tener interés en el curso del tratamiento. La diferencia entre aplicar estos factores inmovilizados sobre el material o libres es que su inmovilización permite reducir la dosis empleada y se produce un efecto local, minimizando la dispersión en el organismo[318].

Diversos estudios han demostradoque la unión de factor de crecimiento de fibroblastos (**FGF**), implicado en la proliferación y diferenciación de osteoblastos, mejora la adhesión y proliferación de osteoblastos Saos-2[319]. Además, esta estrategia experimental tiene un efecto positivo sobre la angiogénesis, imprescindible para la correcta regeneración tisular[320]. Por otro lado, se ha comprobado que el factor de crecimiento de hepatocitos (**HGF**) inmovilizado sobre andamios de hidroxiapatita promueve la angiogénesis y estimula la proliferación de osteoblastos y su diferenciación, provocando un incremento en la expresión de runx2, fosfatasa alcalina y osteocalcina[321].

Entre los factores de crecimiento con mayor efecto en la regeneración ósea se encuentra el factor de crecimiento del endotelio vascular (**VEGF**). El VEGF actúa con alta especificidad induciendo la migración de los progenitores de células endoteliales circulantes, potenciando su mitosis y diferenciación para formar vasos sanguíneos[322-254]. Se ha demostrado cómo el VEGF puede promover la angiogénesis de sustitutos vasculares y la neovascularización de tejidos implantados[323].

Pero también este factor actúa sobre osteoblastos promoviendo su migración, proliferación y diferenciación, por lo que su utilización adquiere un papel relevante en la regeneración del tejido óseo[322]. El grupo de Junlei Li demostró cómo el VEGF inmovilizado sobre un recubrimiento de hidroxiapatita deficiente en calcio realizado sobre un andamio de magnesio, unido mediante uniones covalentes, estimulaba la adhesión y proliferación de preosteoblastos MC3T3-E1 sobre el material[324].

Es importante optimizar correctamente la dosis de factor de crecimiento a emplear, ya que dosis elevadas pueden provocar la estimulación del crecimiento tumoral, una función vascular anómala o incluso hipotensión e hipervascularidad[325].

OBJETIVOS CAPÍTULO I

Objetivos

1. Adsorción de factor de crecimiento de endotelio vascular (VEGF) a los andamios de hidroxiapatita suistituida con silicio cristalina (SiHA) y nanocristalina (nanoSiHA).
2. Estudio *in vitro* de la respuesta de células progenitoras endoteliales (EPCs) como indicador de la capacidad de vascularización de los andamios de SiHA, nanoSiHA, SiHA/VEGF y nanoSiHA/VEGF.
3. Estudio *in vitro* de la respuesta de preosteoblastos (MC3T3-E1) como indicador de la capacidad osteogénica de los andamios de SiHA, nanoSiHA, SiHA/VEGF y nanoSiHA/VEGF.
4. Estudio *in vivo* de los efectos producidos por los andamios de SiHA, nanoSiHA, SiHA/VEGF y nanoSiHA/VEGF implantados en hueso de ovejas osteoporóticas.

METODOLOGÍA CAPÍTULO I

Metodología

1. **Síntesis y caracterización de los andamios de hidroxiapatita suistituida con silicio cristalina (SiHA) y nanocristalina (nanoSiHA)**

Las hidroxiapatitas sustituidas con silicio están basadas en la fórmula nominal $Ca_{10}(PO_4)_{5.75}(SiO_4)_{0.25}(OH)_{1.75x0.25}$, donde x representa los grupos libres en la posición hidroxilo. Fueron preparadas por precipitación acuosa haciendo reaccionar una solución de 1 M de $Ca(NO_3)_24H_2O$, 0,575 M de $(NH_4)_2HPO_4$ y otra de 0,025 M de $Si(CH_3CH_2O)_4$. La mezcla se agitó durante 12 horas a 80 °C y se mantuvo un pH de 9,5 mediante la adición de una solución de NH_3 durante la síntesis. Se obtuvo un precipitado que se secó y trató a 700 °C a presión atmosférica para eliminar los nitratos sin alterar significativamente la microestructura del material sintetizado, en formato polvo. Se resuspendió en etanol, se molió en un molinillo rotatorio y se tamizó, recogiendo 3 g de las fracciones inferiores a 32 μm, que se mezclaron con 0,5 g de alcohol de polivinilo (polivinil alcohol, PVA) y 2,8 ml de agua desionizada a 80 °C durante 2 horas. Mediante robocasting se prepararon andamios cilíndricos de 10 mm de altura y 10 mm de diámetro que se mantuvieron a 40°C durante toda la noche y después se calentaron a 150 °C durante 30 minutos para promover el entrecruzamiento inducido por calor del PVA, sin modificar la miroestructura de la cerámica, generando andamios de nanoSiHA. Para obtener andamios de SiHA cristalina se trataron estos andamios de nanoSiHA a 1150 °C durante 3 horas. Estos biomateriales fueron preparados y caracterizados en el Departamento de Química en Ciencias Farmacéuticas de la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid por el grupo de investigación de la Profesora María Vallet Regí.

2. **Adsorción del factor de crecimiento de endotelio vascular (VEGF) sobre los andamios de hidroxiapatita suistituida con silicio cristalina (SiHA) y nanocristalina (nanoSiHA)**

La adsorción del factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF)sobre la superficie de los andamios de SiHA (SiHA/VEGF) y nanoSiHA (nanoSiHA/VEGF), previamente esterilizados con luz ultravioleta (UV) durante 1 hora por cada cara, se realizó a través de uniones no covalentes. Para adsorber el VEGF, se incubó cada andamio con 5 μg/ml de VEGF-A (VEGF-121, 583204, Biolegend, San Diego, CA, USA) en tampón fosfato salino (PBS, Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) a 4 °C durante diferentes tiempos (10 min, 30 min y 24 h), con el objetivo de estudiar su cinética de adsorción. Tras el período de incubación con el VEGF se mantuvieron los andamios a 4 °C durante 24 horas antes de los estudios *in vitro* e *in vivo*.

Para calcular la concentración de VEGF unida a los andamios se midieron mediante enzimoinmunoanálisis (ELISA, Cloud-Clone Corp, USA) los niveles de VEGF presente en el PBS tras la incubación de cada tipo de andamio con dicho factor. Se realizó un cálculo indirecto restando a la concentración inicial de VEGF añadida, la cantidad de factor detectada en el medio tras los diferentes tiempos de incubación. Del mismo modo se cuantificó la desorción espontánea del VEGF que produce una vez adsorbido sobre la superficie de los andamios de SiHA y nanoSiHA, incubando ambos tipos de andamios con 500 μl de PBS durante diferentes tiempos (24, 60 y 96 horas) después de haber adsorbido el factor, evaluando mediante ELISA la concentración de VEGF libre en el medio.

3. Aislamiento, caracterización y cultivo de células progenitoras endoteliales (EPCs)

Las células progenitoras endoteliales (EPC) se aislaron de sangre periférica de cerdo Large White (35-45 kg) utilizando la solución Histopaque-1077 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), que crea un gradiente de densidad que permite aislar y seleccionar las células mononucleares (mononuclear cells, MNC). Estas se cultivaron en frascos de cultivo F-75 de poliestireno (Thermo Fisher Scientific, Dinamarca) a una densidad de 6 x 10^7 MNC/ml en 20 ml de Endothelial Growth Medium-2 (EGM-2), compuesto por Endothelial Basal Medium-2 (EBM-2) suplementado con 5% de suero bovino fetal (FBS), 0,04% de hidrocortisona, 0,4% factor de crecimiento fibroblástico humano (hFGF), 0,1% VEGF, 0,1% factor de crecimiento insulínico-R3 (R3-IGF), 0,1% ácido ascórbico, 0,1% factor de crecimiento epidérmico humano (hEGF) y 0,1% gentamicina sulfato-anfotericina b (GA-1000) (Lonza, Walkersville, MD). Tras dos semanas de cultivo en medio de diferenciación, las células adquirieron la morfología propia de células endoteliales maduras, y se caracterizaron mediante citometría de flujo y microscopía confocal.

Para realizar los ensayos de diferenciación de las EPC sobre los andamios de SiHA, SiHA/VEGF, nanoSiHA y nanoSiHA/VEGF, se sembraron 3x10^5 EPC/ml en la superficie de cada tipo de material y se mantuvieron en cultivo en medio EGM-2 durante 7 días a 37 °C y atmósfera de CO_2 al 5% renovando el medio cada 3 días. Posteriormente se cuantificó la expresión de diferentes marcadores de diferenciación de membrana e intracelulares. Como marcadores de membrana se utilizaron: CD31 (Anti-CD31, TLD-3A12, ab64543, Abcam, Cambridge, Reino Unido), CD34 (Anti-CD34, EP373Y, ab81289, Abcam, Cambridge, Reino Unido) y VEGFR2 (Anti-VEGF Receptor 2, ab2349, Abcam, Cambridge, Reino Unido). Como marcadores intracelulares se seleccionaron: eNOS (Anti-eNOS, M221, ab76198, Abcam, Cambridge, Reino Unido) y vWF (Anti- Factor Von Willebrand, ab6994, Abcam, Cambridge, Reino Unido), permeabilizando previamente con 1 ml de saponina 0,25% durante 10 minutos a 4 °C. Se añadieron 10 µg/ml de cada tipo de anticuerpo y se incubaron durante 30 minutos a temperatura ambiente en oscuridad, se lavó con PBS/BSA al 1% y se añadieron 10 µg/ml del anticuerpo secundario correspondiente incubándolo durante 30 minutos a temperatura ambiente en oscuridad. Las muestras se analizaron en un citómetro de flujo FACScalibur Becton Dickinson, excitando la fluorescencia de los anticuerpos secundarios conjugados con Alexa Fluor™ 488 (Anticuerpo producido en cabra anti-ratón IgG (H + L) Alexa Fluor® Plus 488, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) a 488 nm y registrándola a 519 nm, y la fluorescencia de los anticuerpos secundarios conjugados con DyLight™ 633 (Anticuerpo producido en cabra anti-conejo IgG (H + L) DyLight® 633, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) a 638 nm y registrándola a 658 nm.

La proliferación celular se evaluó de manera indirecta midiendo la actividad mitocondrial utilizando el reactivo Cell Counting Kit-8 (CCK-8, Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA), basado en una sal de tetrazolio altamente soluble en agua, la 2-(2-metoxi-4-nitrofenil)-3-(4-nitrofenil)-5-(2,4-disulfofenil)-2H-tetrazolio (WST-8). Cuando se produce intercambio electrónico en el medio en el que está presente la sal, ésta se reduce y produce formazán cromogénico que permite cuantificar mediante espectrofotometría la proliferación celular de la muestra. Las muestras se incubaron durante 3-4 horas a 37 °C bajo una atmófera al 5% de CO_2 y se tomaron muestras de 100 µl por triplicado en placas de cultivo de 96 pocillos (CULTEK S. L. U., Madrid, España), midiendo su absorbancia a 450 nm.

4. Diferenciación de preosteoblastos MC3T3-E1 y medida de la actividad fosfatasa alcalina

Para evaluar la capacidad de diferenciación de los preosteoblastos MC3T3-E1 murinos (subclon 4, CRL-2593, ATCC, Manassas, VA, USA) sobre los diferentes materiales de hidroxiapatita, se sembraron a una densidad de $3x10^5$ células/ml sobre la superficie de los andamios de SiHA, SiHA/VEFG, nanoSiHA y nanoSiHA/VEGF. Se cultivaron en placas de cultivo de 12 pocillos (CULTEK S.L.U., Madrid, Spain) en 20 ml de medio de cultivo de diferenciación alpha-Minimum Essential Medium (alpha-MEM, Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, USA) suplementado con 10% de de suero bovino fetal (FBS, Gibco, BRL), 1 mM de L-glutamina (BioWhittaker Europe, Bélgica), 1% de penicilina (200 µg/ml, BioWhittaker Europe, Bélgica), 1% de estreptomicina (200 µg/ml, BioWhittaker Europe, Belgium), 50 µg/ml de β-glicerolfosfato (Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, USA) y 10 mM de ácido L-ascórbico (Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, USA) durante 7/10 días a 37 °C bajo una atmósfera de CO_2 al 5%, renovando el medio cada 3 días. Trascurrido este tiempo se midió la actividad de la enzima fosfatasa alcalina (ALP), como marcador principal del fenotipo osteoblástico. Se empleó el kit de ALP (SpinReact S.A., España) que contiene el reactivo p-nitrofenilfosfato y el 2-amino-2-metil-1-propanol de modo que, si la enzima ALP está presente en el medio, cataliza la transferencia del grupo fosfato del primero al segundo, liberando p-nitrofenol, cuantificable mediante espectroscopía de absorción a 405 nm.

Para normalizar la cantidad de ALP con respecto a la cantidad total de proteínas de la muestra, se emplea el método de Bradford (SpinReact S.A., España) basado en el cambio en los máximos de absorción que presenta el colorante hidrofóbico azul de Coomassie cuando se encuentra unido a una proteína. Se utilizó como patrón la albúmina de suero bovino (BSA) y se midió la absorción a 540 nm en un espectrofotómetro (Helios Zeta UV-VIS).

La proliferación celular se evaluó de forma indirecta cuantificando la actividad mitocondrial con el reactivo Cell Counting Kit-8 (CCK-8, Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) como se describe anteriormente.

5. Estudios morfológicos mediante microscopía electrónica de barrido (SEM)

Para evaluar la morfología de los diferentes tipos celulares adheridos a los diversos andamios, las muestras se fijaron mediante la incubación con glutaraldehído 2,5% (Merck KGaA, Darmstadt, Alemania) durante 1 hora a 4 °C y se deshidrataron en diluciones seriadas de etanol, desde etanol al 30%, 50%, 70%, 80% hasta etanol al 100%, durante 10 minutos en cada una de ellas. Después se secaron a temperatura ambiente y se recubrieron con oro-paladio en vacío antes de observarlas con un microscopio JEOL JSM-6400 SEM (Centro Nacional de Microscopía Electrónica, Madrid).

6. Implantación de los andamios en ovejas osteoporóticas

Con el objetivo de reproducir las condiciones de osteoporosis que tienen lugar en los humanos, se seleccionó como modelo animal ovejas ovariectomizadas de raza Merina de 4 años de edad. Tras la ovariectomía bilateral, realizada por laparoscopia, y hasta el final del estudio se les administró una dieta baja en calcio y corticoesteroides durante seis meses. Después de este tiempo, se implantaron los diferentes tipos de andamios (SiHA, SiHA/VEGF, nanoSiHA y nanoSiHA/VEGF), bajo condiciones de asepsia y un tamaño de muestras de n = 6.

Para introducir los materiales se realizaron seis orificios cilíndricos de 10x13 mm perforando el hueso esponjoso de diferentes extremidades bajo continua irrigación salina estéril y fría. Se dejaron dos orificios vacíos como control. Una vez que los andamios se implantaron de forma aleatoria, se aproximaron los tejidos muscular y subcutáneo con suturas monofilamentadas reabsorbibles y la piel se aproximó con suturas trenzadas reabsorbibles. Tras el procedimiento quirúrgico y antes de la extracción de las muestras, se realizaron estudios de tomografía computarizada (computed tomography, CT). El desarrollo del modelo experimental de osteoporosis y la implantación de los biomateriales *in vivo* se llevaron a cabo en el Centro de Cirugía de Mínima Invasión Jesús Usón (CCMIJU) de Cáceres y los estudios realizados fueron aprobados por el Comité de Ética Institucional siguiendo las directrices de la normativa vigente en ese momento (Directiva 2010/63/EU del Parlamento Europeo y del Consejo del 22 de Septiembre de 2010, relativa a la protección de animales utilizados para fines científicos).

7. Análisis histológicode las muestras de hueso de oveja

Los segmentos óseos que contenían los materiales implantados y los orificios control se diseccionaron transcurridas 12 semanas desde la implantación y se fijaron por inmersión en etanol al 96%. Se tiñeron con Hematoxilina-Eosina (H&E combinada con Dako CoverStainer, Agilent, USA&Canada), se observaron con un microscopio Leica DMD1008 y un microscopio Olympus BX40 y se analizaron con el programa ImageJ 1.x para calcular las áreas de crecimiento óseo, el grosor de las trabéculas y el número de vasos sanguíneos. Para evaluar el grado de vascularización se tomó una escala cualitativa de 4 niveles: ausente/media/moderada/marcada, calificada del 0 al 3, respectivamente.
Para evaluar la presencia de componentes inflamatorios y de osteoblastos y osteoclastos, se tomó una escala de 5 grados cualitativa basada en la densidad y distribución de los mismos: ausencia/medio/moderado/marcado/muy marcado, calificada del 0 al 4, respectivamente. Los osteoclastos se identificaron como células multinucleadas situadas en las lagunas de resorción y los osteoblastos como células ovaladas con abundante citoplasma azul grisáceo, con espacio perinuclear de aclaramiento y situadas en los bordes del tejido óseo en formación. Estos estudios se realizaron en el Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Clínico San Carlos de Madrid.

8. Análisis de datos y estadística

Todos los resultados obtenidos por las diferentes técnicas se expresaron como medias $\pm$ desviaciones estándar de cada grupo de experimentos realizados por triplicado. Los análisis estadísticos se llevaron a cabo con el programa Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) versión 22, utilizando las comparaciones de T de Student para analizar las diferencias entre dos grupos y el análisis de la varianza (ANOVA) para analizar las diferencias entre más de dos grupos. La homogeneidad de las varianzas se evaluó con el test de Levene y las diferencias entre grupos con los test de Scheffé o Games-Howell, en función de la diferencia de varianzas obtenidas, empleando Scheffé en caso de varianzas no homogéneas y Games-Howell en el caso contrario. En todos los casos se consideraron los valores $p<0,05$ como estadísticamente signficativos, diferenciando varios niveles de significancia: $p<0,005$ como extremadamente significativo (***), $p<0,01$ como elevadamente significativo (**) y $p<0,05$ como significativo (*).

RESULTADOS CAPÍTULO I

RESULTADOS

Artículo 1: Acta Biomaterialia 2020, 101: 544–553

"Silicon substituted hydroxyapatite/VEGF scaffolds stimulate bone regeneration in osteoporotic sheep" L. Casarrubios, N. Gómez-Cerezo, S. Sánchez-Salcedo, M.J. Feito, M.C. Serrano, M. Saiz- Pardo, L. Ortega, D. de Pablo, I. Díaz-Güemes, B. Fernández-Tomé, S. Enciso, F.M. Sánchez-Margallo, M.T. Portolés, D. Arcos, M. Vallet-Regí

En este trabajo se han preparado andamios macroporosos de hidroxiapatita sustituida con silicio (SiHA) mediante robocasting. Para optimizar sus propiedades y con el fin de estimular la regeneración ósea, los andamios se prepararon con dos tipos de microestructuras: nanocristalina y cristalina. Además, su superficie se decoró con factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) para evaluar el posible acoplamiento entre la vascularización y la regeneración ósea. Los ensayos realizados *in vitro* con preosteoblastos y con células progenitoras endoteliales demostraron que los andamios de SiHA nanocristalina dificultan la proliferación de preosteoblastos, mientras que la presencia de VEGF potencia las funciones biológicas tanto de las células endoteliales como de los preosteoblastos. Para evaluar la capacidad de regeneración ósea *in vivo*, se utilizó un modelo de oveja osteoporótica. Las observaciones obtenidas *in vivo* se correlacionan adecuadamente con los resultados obtenidos con cultivos celulares *in vitro*. Los andamios fabricados con SiHA nanocristalina fueron colonizados por tejido fibroso, promovieron una respuesta inflamatoria y fomentaron el reclutamiento de osteoclastos. Estos resultados descartan que los andamios preparados con SiHA nanocristalina sean adecuados para inducir la regeneración ósea. Por el contrario, los andamios fabricados con SiHA cristalina y tratados con VEGF estimularon la regeneración ósea, observándose un alto grado de osificación, trabéculas más gruesas y mayor presencia de osteoblastos y vasos sanguíneos. Los resultados de este trabajo han permitido demostrar que los andamios macroporosos preparados con SiHA cristalina y decorados con VEGF promueven la regeneración del tejido óseo, incluso en escenarios patológicos adversos como la osteoporosis.

Acta Biomaterialia 101 (2020) 544–553

Contents lists available at ScienceDirect

Acta Biomaterialia

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

Full length article

Silicon substituted hydroxyapatite/VEGF scaffolds stimulate bone regeneration in osteoporotic sheep

L. Casarrubios[a], N. Gómez-Cerezo[b,c], S. Sánchez-Salcedo[b,c], M.J. Feito[a], M.C. Serrano[d], M. Saiz-Pardo[e], L. Ortega[e], D. de Pablo[e], I. Díaz-Güemes[f], B. Fernández-Tomé[f], S. Enciso[f], F.M. Sánchez-Margallo[f], M.T. Portolés[a,*], D. Arcos[b,c,**], M. Vallet-Regí[b,c,**]

[a] Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Complutense de Madrid, Instituto de Investigación Sanitaria del Hospital Clínico San Carlos (IdISSC), Ciudad Universitaria, Madrid 28040, Spain
[b] Departamento de Química en Ciencias Farmacéuticas, Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid, Instituto de Investigación Sanitaria del Hospital 12 de Octubre i+12, Plaza Ramón y Cajal s/n, Madrid 28040, Spain
[c] CIBER de Bioingeniería Biomateriales y Nanomedicina (CIBER-BBN), Spain
[d] Instituto de Ciencia de Materiales de Madrid (ICMM), Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), Madrid 28049, Spain
[e] Servicio de Anatomía Patológica, Hospital Clínico San Carlos, Facultad de Medicina, Universidad Complutense de Madrid, Instituto de Investigación Sanitaria del Hospital Clínico San Carlos (IdISSC), Madrid 28040, Spain
[f] Centro de Cirugía de Mínima Invasión Jesús Usón, Cáceres, Spain

article info

Article history:
Received 15 July 2019
Revised 18 October 2019
Accepted 23 October 2019
Available online 31 October 2019

Keywords:
Silicon substituted hydroxyapatite
Macroporous scaffold
VEGF
Osteoporosis
In vivo test

abstract

Silicon-substituted hydroxyapatite (SiHA) macroporous scaffolds have been prepared by robocasting. In order to optimize their bone regeneration properties, we have manufactured these scaffolds presenting different microstructures: nanocrystalline and crystalline. Moreover, their surfaces have been decorated with vascular endothelial growth factor (VEGF) to evaluate the potential coupling between vascularization and bone regeneration. *In vitro* cell culture tests evidence that nanocrystalline SiHA hinders pre-osteoblast proliferation, whereas the presence of VEGF enhances the biological functions of both endothelial cells and pre-osteoblasts. The bone regeneration capability has been evaluated using an osteoporotic sheep model. *In vivo* observations strongly correlate with *in vitro* cell culture tests. Those scaffolds made of nanocrystalline SiHA were colonized by fibrous tissue, promoted inflammatory response and fostered osteoclast recruitment. These observations discard nanocrystalline SiHA as a suitable material for bone regeneration purposes. On the contrary, those scaffolds made of crystalline SiHA and decorated with VEGF exhibited bone regeneration properties, with high ossification degree, thicker trabeculae and higher presence of osteoblasts and blood vessels. Considering these results, macroporous scaffolds made of SiHA and decorated with VEGF are suitable bone grafts for regeneration purposes, even in adverse pathological scenarios such as osteoporosis.

Statement of significance

For the first time, the *in vivo* behavior of scaffolds made of silicon substituted hydroxyapatites (SiHA) has been evaluated under osteoporosis conditions. In order to optimize the bone regeneration properties of these bioceramics, 3D macroporous scaffolds have been manufactured by robocasting and implanted in osteoporotic sheep. Our experimental design shed light on the important issue of the biological response of nano-sized bioceramics vs highly crystalline bioceramics, as well as on the importance of coupling vascularization and bone growth processes by decorating SiHA scaffolds with vascular endothelial growth factor.

© 2019 Acta Materialia Inc. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.

* Corresponding author at: Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Complutense de Madrid, Instituto de Investigación Sanitaria del Hospital Clínico San Carlos (IdISSC), Ciudad Universitaria, Madrid 28040, Spain.
** Corresponding authors at: Departamento de Química en Ciencias Farmacéuticas, Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid, Instituto de Investigación Sanitaria del Hospital 12 de Octubre i+12, Plaza Ramón y Cajal s/n, Madrid 28040, Spain.
E-mail address: portoles@quim.ucm.es (M.T. Portolés).

https://doi.org/10.1016/j.actbio.2019.10.033
1742-7061/© 2019 Acta Materialia Inc. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Since Ruys proposed in 1993 the incorporation of silicon within the hydroxyapatite structure [1], silicon substituted hydroxyapatites (SiHA) have been one of the most investigated bioceramics in the field of dental and orthopedic applications. Based on the positive effects of silicon on bone [2] and the osteoregenerative properties of silica based bioactive glasses [3], the interest for the characterization and biological evaluation of these compounds has encouraged many researchers for preparing different silicon substituted calcium phosphates [4–6]. In SiHA, silicon substitutes phosphorous in the hydroxyapatite crystal lattice. This substitution leads to crystallo-chemical disorders in the apatite unit cell [7–10], surface charge modifications [11] and microstructural changes that enhance the solubility and bioactive behavior of these bioceramics [12–14], although this point has caused some controversy [15].

SiHA has been conventionally prepared by a controlled precipitation method and subsequent sintering, which allows for solid state reaction completion and enhancement of mechanical properties [16,17]. However, several authors have addressed the preparation of HA and SiHA using low temperature routes for obtaining bioceramics with small grain sizes or even nanoparticles [18–20]. Grain size reduction increases the bioceramic solubility [21], thus releasing calcium cations and soluble silica species that could enhance osteoblast function. Webster et al. investigated the potential use of nanostructured bioceramics for orthopedic and dental applications and demonstrated that nanophase alumina, titania and hydroxypatite [22,23] enhance osteoblast adhesion compared to the same compounds with larger grain size. Previous *in vitro* results have evidenced that nanocrystalline SiHA (NanoSiHA) delays osteoclast differentiation and resorptive activity [24] and promotes macrophage polarization towards a more reparative M2 phenotype [25]. However, most of these studies have been carried out under *in vitro* conditions and only a few *in vivo* studies involving nanosized SiHAs have been reported [26–28].

Additive manufacturing processes allow the control of the implant morphology and internal architecture of the scaffolds [29]. In this context, SiHAs have been manufactured as macroporous scaffolds through techniques such as stereolithography and robocasting, evidencing that these techniques allow the optimization of biological processes such as vascularization and cell migration and proliferation among others, through the control of the size, volume and connectivity of the pores [30–36].

Finally, decoration of scaffolds with growth factors is an effective strategy for modifying the biological behavior of bone implants. Considering the importance of vascularization during bone regeneration processes [37], the adhesion of vascular endothelial growth factor (VEGF) has become one of the most useful alternatives to improve the scaffolds performance [38–41]. Recently, VEGF has been adsorbed on NanoSiHA disks improving the adhesion and proliferation of endothelial progenitor cells (EPC) [42]. Since VEGF is involved in both angiogenesis and osteoblast maturation, in the present study 3D macroporous NanoSiHA and SiHA scaffolds with high interconnectivity and adsorbed VEGF were prepared and characterized in order to evaluate *in vitro* their ability to support endothelial cell colonization and MC3T3-E1 preosteoblast proliferation and differentiation. Then, *in vivo* studies were carried out by implanting these scaffolds into a cavitary defect of osteoporotic sheep and evaluating the new bone and blood vessels formation. The effects of the SiHA crystallite size, i.e. micro or nanometric scales, have been also evaluated. Our hypothesis is that 3D printed macroporous SiHA based scaffolds decorated with VEGF could improve bone regeneration in a scenario of osteoporosis, whereas the microstructure of the bioceramics could significantly modify the *in vivo* behavior of the scaffolds due to their different cell-surface interactions.

2. Materials and methods

21. Synthesis of materials

SiHAs with nominal formula $Ca_{10}(PO_4)_{5.75}(SiO_4)_{0.25}(OH)_{1.75}Q_{0.25}$ (being Q vacancies at the hydroxyl sites) were prepared by aqueous precipitation reaction of $Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$, $(NH_4)_2HPO_4$ and $Si(CH_3CH_2O)_4$ solutions as described elsewhere [43] (see supplementary data for further information). The obtained precipitate was dried and subsequently treated at 700 °C under air atmosphere to remove the nitrates without introducing significant changes in the microstructure of the precipitated powder. The SiHA grains were suspended in ethanol, milled in a rotatory mill and finally sieved, collecting the powder fraction below 32 µm.

22. Fabrication of NanoSiHA and SiHA scaffolds

Cylindrical scaffolds with 10 mm in height and 10 mm in diameter were prepared by robocasting. For this purpose, 0.5 g of polyvinyl alcohol (PVA) were dissolved in 2.8 mL of D.I. water at 80 °C for 2 h. PVA is a biocompatible and biodegradable polymer, which has been used in different bio-applications as drug release, tissue engineering and enzyme immobilization [44–47]. Subsequently 3 g of SiHA particles were incorporated in this solution. Scaffolds were designed as a computer assisted design (CAD) file and prepared as a lattice of rods stacked with tetragonal symmetry and constructed via polymerization of this mixture using a robotic deposition apparatus 3-D Bioplotter™. The scaffolds were kept at 40 °C overnight and subsequently heated at 150 °C for 30 min to induce heat-activated cross-linking of PVA, without modifying the microstructure of the ceramic component. These scaffolds have a weight of about 305 mg and are referred as NanoSiHA. In order to obtain highly crystalline SiHA scaffolds, NanoSiHA scaffolds were thermally treated at 1150 °C for 3 h. These specimens have a weight of about 260 mg and are referred as SiHA scaffolds. (see supporting information for complete details).

23. Preparation of VEGF-decorated scaffolds

NanoSiHA and SiHA scaffolds were introduced into 24 well culture plates (CULTEK S. L. U., Madrid, Spain) and sterilized under ultraviolet light during 1 h for each side in a sterile environment. Adsorption of VEGF on scaffold surfaces was carried out through non-covalent binding by incubation of each scaffold with 5 µg/mL of VEGF-A (VEGF-121, 583204, Biolegend, San Diego, CA, USA) in phosphate buffered saline (PBS, Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) at 4 °C for different times. The samples were stored at 4 °C for 24 h before the *in vitro* and *in vivo* studies. After 0 min, 10 min, 30 min and 24 h of incubation, the concentration of free VEGF in the supernatants was analyzed by using an enzyme linked immunosorbent assay (ELISA, Cloud-Clone Corp, USA). The adsorbed VEGF amount was indirectly calculated as the difference between the free VEGF levels at the initial time and after each incubation time. Scaffolds decorated with VEGF are referred as NanoSiHA/VEGF and SiHA/VEGF.

24. Characterization techniques

X-ray diffraction experiments were carried out in a X'pert Philips diffractometer using the KαCu radiation (λ =1,5418 Å) with a step size of 0.03 2θ ° and 3 s of counting time. Crystallite size was calculated as an averaged value of several diffraction maxima using the Scherrer formula: Crystallite size (average) = Kλ/($B_{struct.}$ cos θ), where K is the shape constant (in our case 0.9), θ the diffraction angle and B_{struct} describes the structural broadening,

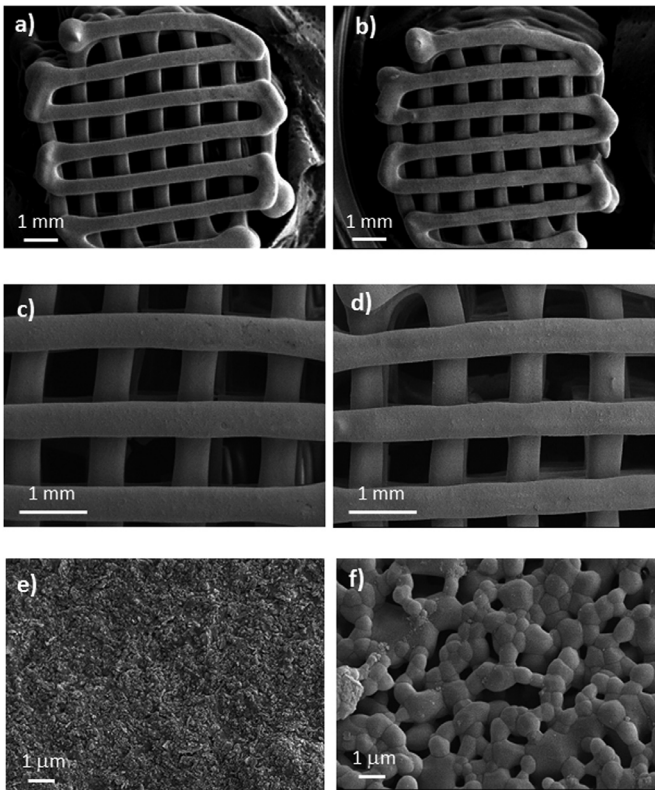


Fig. 1. SEM micrographs of NanoSiHA (a,c,e) and SiHA (b,d,f) at different magnifications.

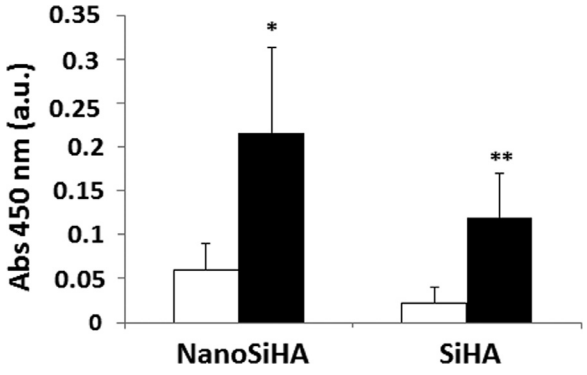


Fig. 2. Proliferation of EC_2 endothelial cells on NanoSiHA and SiHA scaffolds without (white) and with (black) adsorbed VEGF after 7 days of culture. Cell proliferation was analyzed by measuring absorbance at 450 nm by CCK-8 protocol. *For each material, comparisons between conditions without and with VEGF. Statistical significance: $*p < 0.05$; $**p < 0.01$.

which is the difference in integral profile width between a standard and the sample to be analyzed. The standard used was a well crystallized sample of LaB_6. Fourier Transform Infrared (FTIR) spectroscopy was carried out by using a Nicolet Nexus instrument (Thermo Fisher Scientific) equipped with an attenuated total reflectance device (Thermo Electron Scientific Instruments LLC, Madison, WI USA). The textural properties of the scaffolds were determined by nitrogen adsorption with a Micromeritics ASAP 2020 equipment (Micromeritics Co., Norcross, USA). To perform the N_2 adsorption measurements, the samples were previously degassed under vacuum for 24 h, at 45 °C. These experiments were carried out in triplicate. Scanning electron microscopy (SEM) was performed with a JEOL F-6335 microscope, operating at 20 kV.

2.5. Determination of the in vitro VEGF desorption from NanoSiHA and SiHA

To measure the VEGF spontaneous desorption from NanoSiHA and SiHA (previously incubated for 24 h into 24 well culture plates with 5µg/ml of this factor), the samples were incubated with 500 µl of PBS for 24, 60 and 96 h and the free VEGF in the medium was analyzed by ELISA.

2.6. Culture of endothelial cells

Mature endothelial cells EC_2, obtained from porcine peripheral blood as previously described [48], were seeded on NanoSiHA and SiHA scaffolds at a density of $3x10^5$ cells/mL in EGM-2 (Lonza, Walkersville, MD, USA). In order to evaluate the effects of the VEGF immobilized on the scaffold surface, EGM-2 without VEGF was used for the culture of EC_2 on these scaffolds. All the samples were incubated under 5% CO_2 atmosphere at 37 °C for 7 days.

2.7. Culture of MC3T3-E1 pre-osteoblasts

In order to evaluate the proliferation of murine pre-osteoblastic MC3T3-E1 cells (subclone 4, CRL-2593, ATCC, Manassas, VA, USA) on the scaffolds, $3x10^5$ cells/mL were seeded in alpha-Minimum Essential Medium (alpha-MEM, Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, USA) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS, Gibco, BRL), 1 mM L-glutamine (BioWhittaker Europe, Belgium), penicillin (200 µg/mL, BioWhittaker Europe, Belgium), and streptomycin (200 µg/mL, BioWhittaker Europe, Belgium). In order to evaluate the differentiation of MC3T3-E1 pre-osteoblasts on the scaffolds, $3x10^5$ cells/mL were seeded in differentiation culture medium (alpha-MEM supplemented with 10% FBS, 50 µg/mL β-glycerolphosphate, 10 mM L-ascorbic acid, 1 mM L-glutamine, penicillin and streptomycin). All the samples were incubated under 5% CO_2 atmosphere at 37 °C for 7 days.

2.8. Cell proliferation assay (CCK-8)

Proliferation of both endothelial cells (EC_2) and MC3T3 pre-osteoblasts was measured using the Cell Counting Kit-8 (CCK-8) protocol (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA). After incubation for 3-4 h under 5% CO_2 atmosphere at 37 °C, samples of 100 µL were collected into 96 well culture plates (Nunc Brand, Rochester, NY, USA) and absorbance was measured at 450 nm.

2.9. Alkaline phosphatase (ALP) activity

The ALP activity was used as the key differentiation marker in assessing the osteoblast phenotype. ALP activity was measured with a commercial kit (SpinReact S.A., Spain) and normalized to the cell protein content, as determined by the Bradford's method using bovine serum albumin as a standard.

2.10. Morphological studies by SEM

Cells attached to the scaffolds were fixed by incubation with 2.5% glutaraldehyde (Merck KGaA, Darmstadt, Germany) for 1 h at 4 °C. Then, successive dehydration steps were carried out by slow water replacement, using a series of ethanol solutions (30%, 50%, 70%, 80% and 90%) for 10 min and a final dehydration in absolute ethanol for 10 min, allowing the samples to dry at room temperature. Afterwards, the pieces were mounted on stubs and coated in vacuum with gold–palladium. Samples were then examined with a JEOL JSM-6400 SEM (Centro Nacional de Microscopía Electrónica, Madrid, Spain).

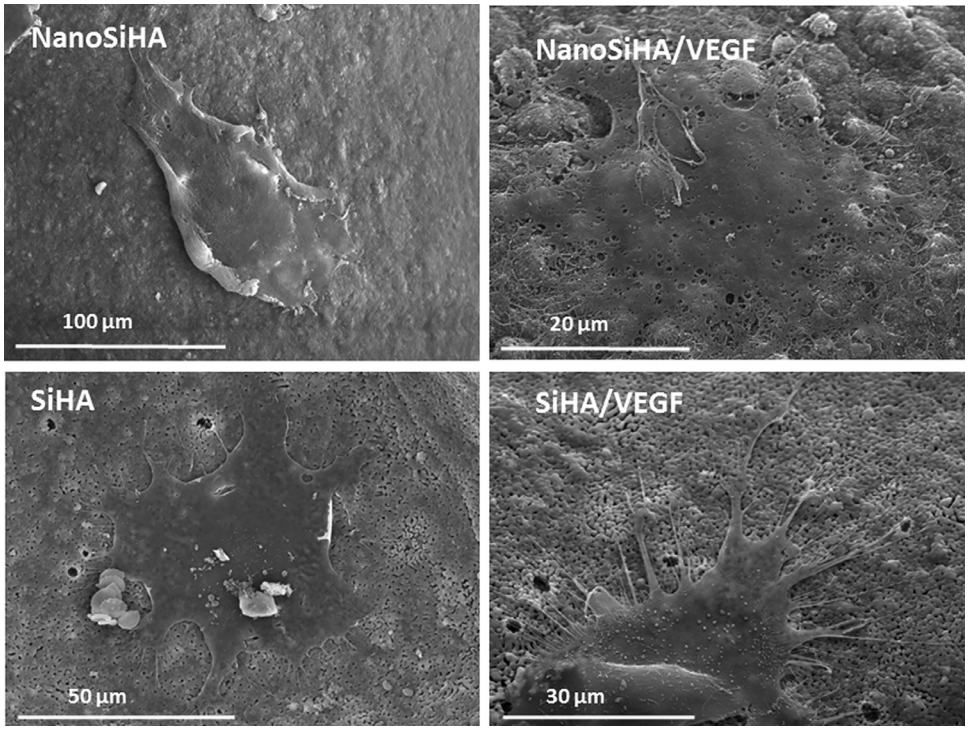


Fig. 3. Morphology evaluation by SEM of EC_2 endothelial cells on NanoSiHA and SiHA scaffolds without and with adsorbed VEGF after 7 days of culture.

2.11. In vivo *studies in an osteoporotic sheep model*

This study was approved by our Institutional Ethical Committee following the guidelines of the current normative (Directive 2010/63/EU of the European Parliament and the Council of September 22, 2010, on the protection of animals used for scientific purposes). To reproduce conditions similar to osteoporosis in humans, laparoscopic bilateral ovariectomy was performed in six 4-year-old female Merino sheep following the same protocol described elsewhere [28]. A low-calcium diet and corticosteroids were administered until the end of the study (see supporting information for further details).

Six months after the ovariectomy, the biomaterials were blindly implanted in the sheep under aseptic conditions and following the same anesthetic protocol previously described [28]. Six cylindrical defects (10x13 mm) were created in each sheep by drilling the cancellous bone at different limbs locations, under continuous irrigation with cold sterile saline. Two defects in each sheep were left empty as control. Once the biomaterials were randomly implanted, the muscular and subcutaneous tissue was approximated with absorbable monofilament suture and the skin with absorbable braided suture. Immediately after the surgical procedure and before the sample removal, a computed tomography (CT) scan was performed (Fig. S5 in supporting information). The sample size for each type of scaffold was $n = 6$.

2.12. *Histological processing*

After 12 weeks of implantation, the bone segments containing the defect were dissected out and fixed by immersion in 96% ethanol. Bone segments were processed as described elsewhere [49] and histological sections were stained with Hematoxylin-Eosin (Agilent Dako Coverstainer for H&E) (see supplementary data for further information). Images were obtained with a Leica DMD1008 and an Olympus BX40 microscopes and analyzed with ImageJ 1.x to calculate bone ingrowth area, trabeculae thickness and number of blood vessels. For the evaluation of the inflammatory component and osteoblast/osteoclast presence, we used a five graded scale based on the density and distribution (absent/mild/moderate/marked/ very marked, scored 0 to 4). Multinucleated cells sited in a resorption lacuna were identified as osteoclasts and oval cells with abundant blue-grey cytoplasm and perinuclear hofs, rimming the forming bone were identified as osteoblasts. In the case of vascularization, we used a four graded scale based on the density of blood vessels (absent/mild/moderate/marked/, scored 0 to 3) (see Table S1 in supporting information)

2.13. *Statistics*

In vitro cell culture data are expressed as means ± standard deviations of a representative of three experiments carried out in triplicate. Statistical analysis was performed using the Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) version 19 software. Statistical comparisons for both *in vitro* and *in vivo* data were made by analysis of variance (ANOVA), with the assumption of data normality. Homoscedasticity was evaluated by Levene test. Either Scheffé or Games-Howell tests were used for *post hoc* evaluations of differences between groups depending on the homogeneity of the variance. In all the statistical evaluations, $p < 0.05$ was considered as statistically significant.

3. Results

3.1. *Characterization of NanoSiHA and SiHA scaffolds*

XRD patterns of NanoSiHA and SiHA samples showed a unique apatite-like phase (Fig. S1 in supporting information). All the diffraction maxima can be assigned to a hexagonal spatial group P63/m. XRD patterns evidence significant differences from a microstructural point of view. NanoSiHA shows diffraction maxima with larger Full Width at Half Maximum (FWHM) compared to SiHA (Fig. S1.b in supporting information). This fact indicates that NanoSiHA exhibits smaller average crystallite size. The crystallite

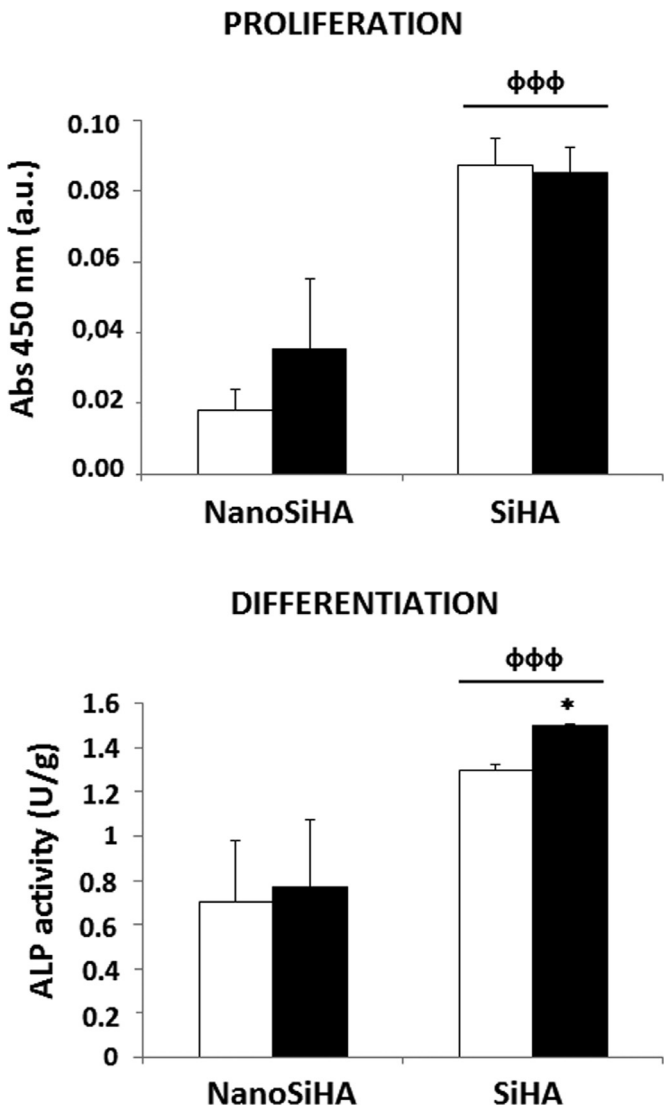


Fig. 4. Proliferation and differentiation of MC3T3 pre-osteoblasts on NanoSiHA and SiHA scaffolds without (white) and with (black) adsorbed VEGF after 7 days of culture. Cell proliferation was analyzed by measuring absorbance at 450 nm by CCK-8 protocol. Cell differentiation was evaluated by measuring ALP activity which was normalized to the cell protein content. *For each material, comparisons between conditions without and with VEGF. $^{\phi}$Comparison between NanoSiHA and SiHA. Statistical significance: $*p < 0.05$, $^{\phi\phi\phi}p < 0.005$.

sizes calculated by the Scherrer formula from ten different diffraction maxima of each pattern were 30.5 ± 1.2 and 96.2 ± 2.8 nm for NanoSiHA and SiHA, respectively.

FTIR spectra of NanoSiHA and SiHA (Fig. S2 in supporting information) show absorption bands corresponding to the bending vibration mode of O-P-O bonds, the stretching mode of P-O and the librational and stretching modes of O-H in HA. In addition, NanoSiHA also shows absorption bands corresponding to the functional groups of PVA and bands corresponding to CO_3^{2-} groups at 1550-1630 cm^{-1} commonly included in apatites thermally treated below the sintering temperature.

Fig. 1 shows the SEM micrographs corresponding to NanoSiHA and SiHA scaffolds. Low magnification micrographs show an almost identical macro-architecture in both samples, with orthogonal macroporores of 500 µm. However, higher magnification images evidence significant differences in the microstructure of the samples. NanoSiHA scaffold is formed by very small particles of a few nanometers that keep together by means of a continuous phase of PVA. On the contrary, the microstructure of SiHA

Table 1
Surface area, pore volume and pore size measured by nitrogen absorption. Standard deviations are indicated in brackets.

Sample	S_{BET} ($m^2 \cdot g^{-1}$)	Pore volume ($cm^3 \cdot g^{-1}$)	Pore size (nm)
NanoSiHA	14.43 (±1.1)	0.086 (±0.002)	20.0 (±1.2)
SiHA	< 1	< 0.001	-

scaffolds is described by the presence of larger polyhedral crystals (around 2-3 micrometers in size) and with some porosity at the macropore range. Due to the burning out of PVA during the thermal treatment, SiHA scaffolds showed a loss of weight about 15%, in agreement with the thermogravimetric analysis carried out on NanoSiHA (see Fig. S3 in supporting information) and a size reduction of less than 5% in both diameter and height.

Nitrogen adsorption indicates that NanoSiHA scaffolds show surface areas, porosities and pore sizes at the mesopore range (Table 1) in the range of hydroxyapatites treated at low temperatures [50]. However, no porosity at the mesopore level could be observed by for SiHA scaffolds.

3.2. *Determination of VEGF adsorption and release*

VEGF adsorption on NanoSiHA and SiHA scaffolds reached over 94% after 10 min in both cases and maintained after 24 h (Fig. S4.a in supporting information). No significant differences were observed in the amount of VEGF adsorbed between NanoSiHA and SiHA scaffolds. Since NanoSiHA and SiHA scaffolds have a weight of 305 mg and 260 mg respectively, the VEGF/scaffold weight ratios were determined as $1{,}63 \cdot 10^{-5}$ and $1{,}92 \cdot 10^{-5}$ for NanoSiHA and SiHA, respectively. Desorbed VEGF detected in the medium of NanoSiHA and SiHA during the release test (Fig. S4.b) reached levels of less than 2 ng/ml after 96 hours in all the cases. This VEGF desorption meant 0.002wt % and 0.02 wt% respect to the VEGF adsorbed on NanoSiHA and SiHA, respectively, thus indicating the effective immobilization of VEGF.

3.3. In vitro *response of endothelial cells*

Fig. 2 shows the proliferation of EC_2 endothelial cells on NanoSiHA and SiHA scaffolds without (white) and with (black) adsorbed VEGF after 7 days of culture. The EC_2 growth on NanoSiHA/VEGF and SiHA/VEGF scaffolds was significantly higher than on the scaffolds without VEGF ($*p < 0.05$ and $**p < 0.01$, respectively), evidencing the importance of the adsorption of this growth factor in order to improve the endothelial cell proliferation and survival. There were no statistically significant differences between NanoSiHA and SiHA scaffolds in each situation (without or with VEGF). SEM observations in Fig. 3 evidence that endothelial cells adhered and proliferated on the surface of all these scaffolds after 7 days of culture. However, better EC_2 cell adhesion and growth were observed on NanoSiHA/VEGF and SiHA/VEGF scaffolds compared to NanoSiHA and SiHA, respectively.

3.4. In vitro *response of MC3T3 pre-osteoblasts*

The response of MC3T3 pre-osteoblasts cultured on NanoSiHA and SiHA scaffolds without and with adsorbed VEGF was evaluated after 7 days by measuring cell proliferation and the ALP activity. Fig. 4 shows that SiHA scaffolds exhibited a significant increase of pre-osteoblasts proliferation ($^{\phi\phi\phi}p < 0.005$) and differentiation ($^{\phi\phi\phi}p < 0.005$) on their surface in comparison with NanoSiHA samples. The presence of VEGF adsorbed on these two types of scaffolds did not improve the pre-osteoblast proliferation but induced a significant increase of pre-osteoblast differentiation on SiHA/VEGF scaffolds ($*p < 0.05$), as it is indicated by the measurement of ALP activity.

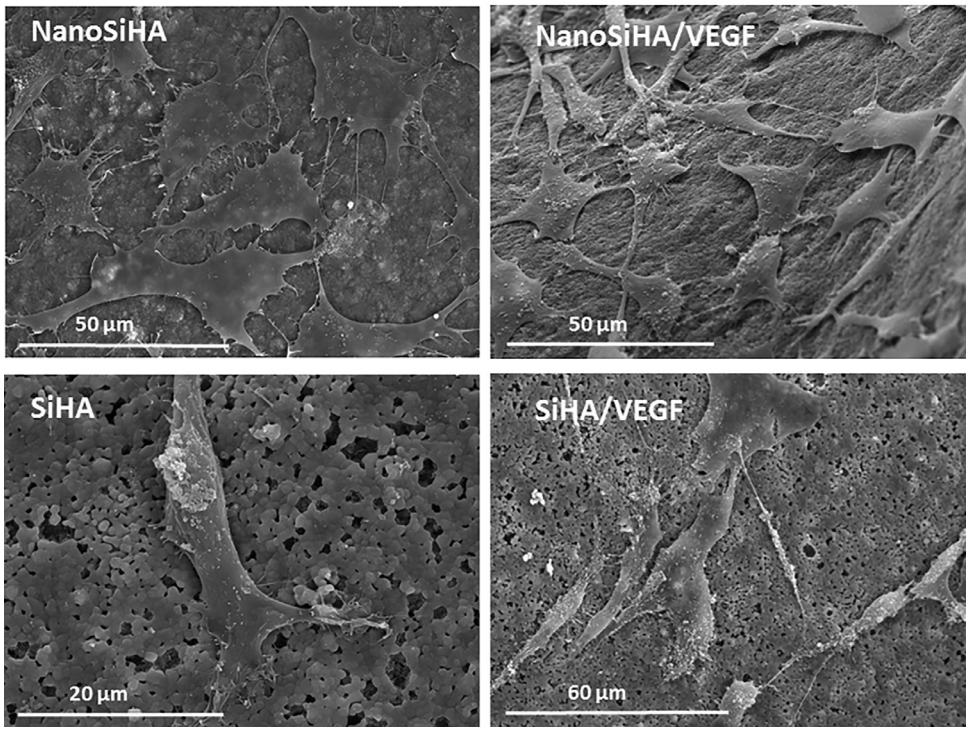


Fig. 5. Morphology evaluation by SEM of MC3T3 pre-osteoblasts on NanoSiHA and SiHA scaffolds without and with adsorbed VEGF after 7 days of culture.

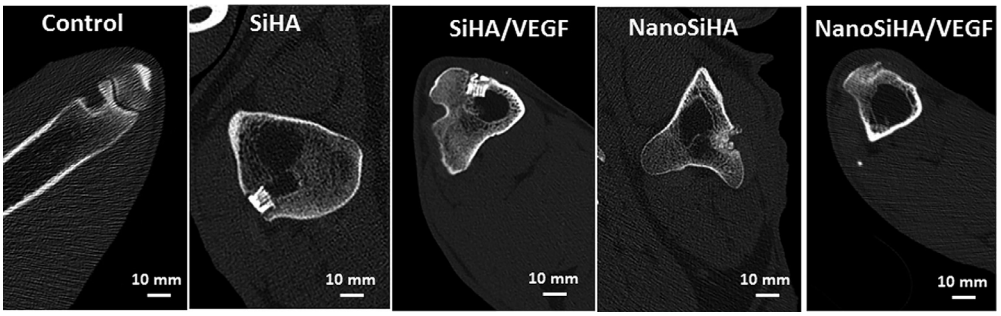


Fig. 6. CT scan images obtained after 12 weeks of implantation.

SEM studies were also carried out with MC3T3 pre-osteoblasts cultured on NanoSiHA and SiHA scaffolds with and without adsorbed VEGF. Fig. 5 evidences that pre-osteoblasts adhered and spread on all these materials after 7 days of culture showing their typical morphology.

3.5. CT scanning from implanted osteoporotic sheep

CT scan images after 12 weeks after implantation are shown in Fig. 6. The control defect remains unhealed, pointing out that the defect model chosen does not allow for bone self-healing under this osteoporosis scenario. Scaffolds treated at high temperature (SiHA and SiHA/VEGF) keep most of their initial architecture, being well integrated within bone. No scaffold protrusion was observed in any sheep. On the contrary, scaffolds made of nanocrystalline SiHA (NanoSiHA and NanoSiHA/VEGF) appear as highly degraded implants after 12 weeks of implantation, with some particles migrating out of the bone defect area.

3.6. Histological evaluation and histomorphometric quantification

Histological images of SiHA scaffolds (Fig. 7a) show reparative peripheral bone surrounding the scaffolds and new bone formation within the macropores in several inner regions. A higher magnification image (Fig. 7b) shows that the newly formed bone is in intimate contact with SiHA bioceramics as well as the presence of an osteoblast border around the newly formed trabeculae. SiHA/VEGF scaffolds (Fig. 7c) evidence a much higher bone growth at both peripheral regions and inner macropores of the implant. In fact, most of the scaffold is filled with new bone tissue, formed by thick trabeculae that are surrounded by osteoblasts (Fig. 7d). Moreover, a high presence of blood vessels is observed in this tissue (see Fig. S6 in supporting information). The histological image for NanoSiHA scaffolds (Fig. 7e) shows a small amount of reparative mineralized bone at the peripheral site whereas the inner porosity is colonized only by fibrous tissue. A higher magnification image (Fig. 7f) shows a significant number of multinucleated cells, which can be identified as osteoclasts, near to the implanted material. In addition, some areas of the scaffolds showed the presence of inflammatory components (Fig. 7f, inset). NanoSiHA/VEGF scaffolds showed a very similar behavior to NanoSiHA, although a higher amount of reparative peripheral bone (Fig. 7g) and more blood vessels (Fig. 7h) could be observed.

The volume of the scaffolds colonized by newly formed bone is shown in Fig. 8a. It can be observed that SiHA/VEGF scaffolds induce a significantly higher bone regeneration than SiHA (taken as

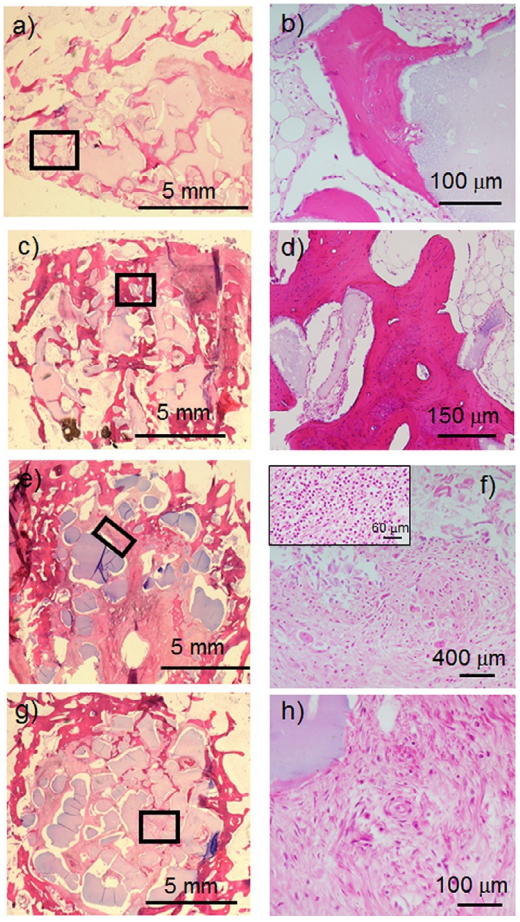


Fig. 7. Histological images after 12 weeks of implantation of SiHA (a and b), SiHA/VEGF (c and d), NanoSiHA (e and f) and NanoSiHA/VEGF (g and h). The highlighted regions in low magnification images correspond to the ones with high magnification. The inset in Fig. 7f shows inflammatory components found in this sample.

positive control). On the contrary, NanoSiHA and NanoSiHA/VEGF showed ossification percentages much lower than SiHA. These data closely correlate with the thickness of trabeculae (Fig. 8b). The newly formed bone in SiHA/VEGF exhibits significantly thicker trabeculae compared to SiHA, whereas NanoSiHA and NanoSiHA/VEGF show trabeculae significantly thinner than SiHA.

The four series of scaffolds were scored regarding the number of osteoblasts (Fig. 8c), osteoclasts (Fig. 8d), inflammatory component (Fig. 8e) and blood vessels formation (Fig. 8f). Fig. 8 only represents the average values calculated from our semi-quantitative scoring. The complete scores obtained on the six animals can be seen in Table S2 in supporting information. The presence of osteoblasts is significantly higher in SiHA/VEGF scaffolds respect to the other samples. On the contrary NanoSiHA and NanoSiHA/VEGF scaffolds evidenced a lower presence of bone forming cells within their macropores compared to SiHA. Regarding the presence of bone resorbing cells, NanoSiHA and NanoSiHA/VEGF exhibited a higher presence of osteoclasts compared to SiHA and SiHA/VEGF, respectively, pointing out that nanosized bioceramics stimulate the osteoclast recruitment. Regarding inflammation, the scaffolds made of nanocrystalline SiHA show a higher trend for eliciting inflammatory response. In this sense, although Fig. 8e does not show statistically significant differences, nanocrystalline scaffolds were scored with higher averaged values for inflammatory components. In addition, inflammatory components were absent in three animals out of six in SiHA and SiHA/VEGF scaffolds, whereas only one sheep out of six did not develop inflammatory response in NanoSiHA and NanoSiHA/VEGF. Finally, scaffolds containing VEGF induced a higher vascularization degree respect to those scaffolds without the factor (Fig. 8f).

4. Discussion

Silicon substituted hydroxyapatites have demonstrated enhanced bioactive behavior compared to non-substituted hydroxyapatites under *in vivo* conditions [11,51]. Several studies have been carried out on the properties of silicon substituted HA as a function of the silicon content and regarding the sintering temperature at which these compounds are treated during the final stage of their processing [10,11,16,17,31,52]. In this work, the scaffolds made of silicon substituted hydroxyapatite and treated at high temperature (SiHA scaffolds) have a chemical composition and microstructure very similar to that already evaluated by other authors [11,51]. Therefore, SiHA scaffolds have been considered as positive control in order to evaluate the effect of decreasing the crystallite size (NanoSiHA), functionalizing with VEGF (SiHA/VEGF scaffolds) and both modifications simultaneously (NanoSiHA/VEGF scaffolds).

The results of our experiments indicate that we can manufacture macroporous scaffolds made of SiHA by the robocasting method, which show almost identical morphology and macroporous architecture but having very different microstructures and crystallite sizes. XRD experiments evidence that both SiHA and NanoSiHA are made of a unique apatite-like phase. However, the coherent diffraction domain (commonly referred as crystallite size) of SiHA is three times larger than that in NanoSiHA and the differences in grain size observed by SEM are even larger. The potential interest of nanosized SiHA arises from the positive results demonstrated by other authors with different nanosized bioceramics [18-20,22-27], as well as by the assumption that the higher surface area of nanosized bioceramics could facilitate the release of osteogenic species (such as calcium cations and soluble silica species) and also foster scaffold degradation. Our results demonstrate that NanoSiHA scaffolds exhibit higher surface area and porosity and are degraded in higher extent than SiHA after 12 weeks of implantation. On the other hand, our results also show that VEGF can be associated to the scaffolds in a stable manner by using a simple solution and impregnation method. Both SiHA and NanoSiHA required no more than 10 min to adsorb almost 100% of the solved VEGF in a non-covalent way.

In vitro cell culture tests evidence that microstructure and functionalization with VEGF influence endothelial and pre-osteoblast cells in a different manner. Specifically, EC_2 endothelial cells proliferation is not affected by the grain size of the bioceramics. EC_2 cells attach, spread and proliferate similarly on both SiHA and NanoSiHA scaffolds. However, EC_2 proliferation is fostered by the presence of VEGF on the scaffolds surface, evidencing the biological activity of this factor and indicating that the non-covalent immobilization procedure did not alter the activity of VEGF as previously observed by other authors [53-55]

On the contrary, MC3T3-E1 pre-osteoblasts are very sensitive to the microstructural parameters. Pre-osteoblasts cannot proliferate on the scaffolds made of nanocrystalline SiHA despite of the similar initial attachment and spreading observed by SEM. Previous studies demonstrated the non-cytotoxicity of NanoSiHA [24], suggesting that the poor proliferative behavior of osteoblasts could be due to anoikis, i.e. apoptosis driven by cell detachment from weakly consolidated surfaces as that presented by NanoSiHA. The presence of VEGF favors the biological activity of pre-osteoblasts by enhancing the differentiation process, although this effect only occurs on highly crystalline SiHA/VEGF. In this sense, our results agree with other authors who reported on the increase of ALP activity and highlighted that VEGF promotes the differentiation of

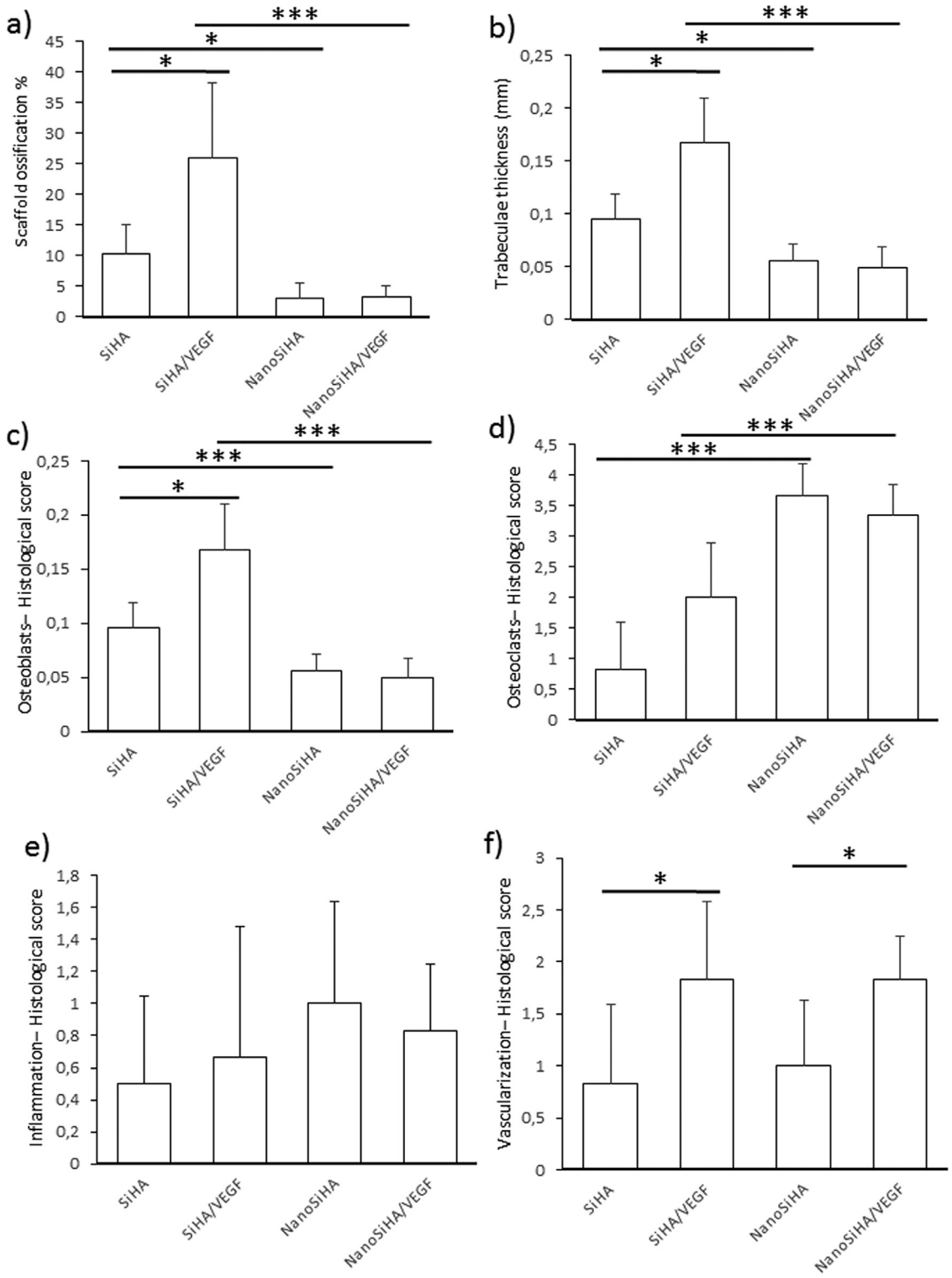


Fig. 8. Histomorphometrical studies for the different scaffolds implanted in osteoporotic sheep. (a) Ossification volume, (b) trabeculae thickness, (c) presence of osteoblasts, (d) presence of osteoclasts, (e) amount of inflammatory component and (f) vascularization degree. Statistical significance: $*p < 0.05$, $**p < 0.01$ and $***p < 0.005$.

osteoblasts [37,39], thus opening the possibility of using VEGF to promote a healing in bone defects, but only in those cases where previous pre-osteoblast proliferation can occur.

Concerning the release kinetics of the VEGF from these scaffolds, *in vitro* test demonstrates that, after 96 h, VEGF is still retained almost completely, since less than 0.02% could be detected by ELISA, in agreement with previous studies carried out on silicon substituted hydroxyapatites [42]. Previous works involving VEGF adsorbed in calcium phosphate scaffolds have evidenced the strong affinity of VEGF by these bioceramics [40]. The lack of release in our experiment would indicate that VEGF remains active immobilized on the implants surface as proposed by Hu et al. [55].

In vivo studies in an osteoporotic sheep model strongly correlate with the *in vitro* results. The functionalization of crystalline

SiHA scaffolds with VEGF leads to a significant improvement in the osteogenic properties of these bioceramics. As evidenced *in vitro*, the presence of VEGF must stimulate endothelial cell proliferation and pre-osteoblast differentiation, thus resulting in enhanced vascularization and new bone formation observed *in vivo* with thicker trabeculae and higher presence of osteoblasts. Silicon substituted hydroxyapatites have previously demonstrated a better bioactive behavior than non-substituted hydroxyapatites. The use of 3D printing for preparing macroporous scaffolds together with the functionalization with VEGF seem to be a significant advance for bone regeneration purposes even under an adverse scenario such as osteoporosis. Our experiments indicate that local administration of VEGF from macroporous SiHA scaffolds couples vascularization with new bone formation. However, the presence of silicon within the apatite structure and the immobilization of VEGF on the scaffolds surface is not enough to guarantee bone defect healing. Pre-osteoblasts require consolidated surfaces to proliferate. Certainly, those scaffolds made of nanocrystalline SiHA degrade faster and should be a source of Ca^{2+}, phosphate and silicon species at the defect local environment. Although the ionic release and scaffold degradation could be desirable for total bone regeneration, pre-osteoblasts cannot proliferate on these nanocrystalline and poorly consolidate surfaces. Therefore, fibrous tissue colonizes the scaffolds avoiding bone ingrowth. Moreover, particle release seems to promote osteoclast recruitment and an increase in the number of animals showing infiltration of inflammatory components. This *in vivo* response discards the use of NanoSiHA for bone regeneration purposes.

5. Conclusions

Macroporous scaffolds made of SiHA have been prepared with two different microstructures: nanocrystalline and crystalline. These scaffolds can be easily functionalized with VEGF by means of a simple impregnation method.

The presence of this factor on the scaffolds surface enhances the proliferation of endothelial cells, whereas highly crystalline microstructure favors pre-osteoblast proliferation and differentiation under *in vitro* conditions.

Scaffolds prepared with nanocrystalline SiHA evidence a deleterious response for the treatment of bone defects *in vivo*. Nanocrystalline microstructure leads to decreased bone ingrowth, thinner trabeculae, less presence of osteoblasts and higher presence of osteoclasts.

On the contrary, the association of VEGF with scaffolds made of highly crystalline SiHA exhibits better results in terms of volume of newly formed bone, trabeculae thickness and implant vascularization. These results evidence that the association of VEGF with macroporous scaffolds made of highly crystalline SiHA is a very promising alternative for the treatment of bone defects under osteoporosis conditions.

Declaration of Competing Interests

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.

Acknowledgments

This study was supported by research grants from the Ministerio de Economía y Competitividad (project MAT2016-75611-R AEI/ FEDER, UE). M.V.-R. acknowledges funding from the European Research Council (Advanced Grant VERDI; ERC-2015-AdG Proposal 694160.

Supplementary materials

Supplementary material associated with this article can be found, in the online version, at doi:10.1016/j.actbio.2019.10.033.

References

[1] A.J. Ruys, Silicon-doped hydroxyapatite, J. Aust. Ceram Soc. 29 (1993) 71–80.
[2] E.M. Carlisle, Silicon: a possible factor in bone calcification, Science 167 (1970) 279–280.
[3] L.L. Hench, J.W. Hench, D.C. Greenspan, Bioglass: a short history and bibliography, J. Aust. Ceram Soc. 40 (2004) 1–42.
[4] I.R. Gibson, S.M. Best, W. Bonfield, Chemical characterization of silicon-substituted hydroxyapatite, J. Biomed. Mater Res. 44 (1999) 422–428.
[5] S. Langstaff, M. Sayer, Tj. Smith, S.M. Pugh, S.A. Hesp, W.T. Thompson, Resorbable bioceramics based on stabilized calcium phosphates. Part I: rational design, sample preparation and material characterization, Biomaterials 20 (1999) 1727–1741.
[6] F. Balas, J. Perez-Pariente, M. Vallet-Regí, *In vitro* bioactivity of silicon-substituted hydroxyapatites, J. Biomed. Mater Res. A 66 (2003) 364–375.
[7] T. Leventouri, C.E. Bunaciu, V. Perdikatsis, Neutron powder diffraction studies of silicon-substituted hydroxyapatite, Biomaterials 24 (2003) 4205–4211.
[8] D. Arcos, J. Rodríguez-Carvajal, M. Vallet-Regí, The effect of the silicon incorporation on the hydroxylapatite structure, Neutron Diffract. Study. Solid State Sci. 6 (2004) 987–994.
[9] S. Gomes, J-M. Nedelec, E. Jallot, D. Sheptyakov, G. Renaudin, Silicon location in silicate-substituted calcium phosphate ceramics determined by neutron diffraction, Cryst. Growth. Des. 11 (2011) 4017–4026.
[10] D. Marchat, M. Zymelka, C. Coelho, L. Gremillard, L. Joly-pottuz, F. Babonneau, C. Esnouf, J. Chevalier, D. Bernache-assollant, Accurate characterization of pure silicon-substituted hydroxyapatite powders synthesized by a new precipitation route, Acta Biomater 9 (2013) 6992–7004.
[11] K.A. Hing, P.A. Revell, N. Smith, T. Buckland, Effect of silicon level on rate, quality and progression of bone healing within silicate-substituted porous hydroxyapatite scaffolds, Biomaterials 27 (2006) 5014–5026.
[12] A.E. Porter, N. Patel, J.N. Skepper, S.M. Best, W. Bonfield, Comparison of *in vivo* dissolution processes in hydroxyapatite and silicon-substituted hydroxyapatite bioceramics, Biomaterials 24 (2003) 4609–4620.
[13] A.E. Porter, S.M. Best, W. Bonfield, Ultrastructural comparison of hydroxyapatite and silicon-substituted hydroxyapatite for biomedical applications, J. Biomed. Mater Res. A 68 (2004) 133–141.
[14] M. Vallet-Regí, D. Arcos, Silicon substituted hydroxyapatites. A method to upgrade calcium phosphate based implants, J. Mater Chem. 15 (2005) 1509–1516.
[15] M. Bohner, Silicon-substituted calcium phosphates – A critical view, Biomaterials 30 (2009) 6403–6406.
[16] M. Palard, J. Combes, E. Champion, S. Foucaud, A. Rattner, D. Bernache-Assollant, Effect of silicon content on the sintering and biological behavior of $Ca_{10}(PO_4)_{6-x}(SiO_4)_x(OH)_{2-x}$ ceramics, Acta Biomater 5 (2009) 1223–1232.
[17] L.T Bang, K. Ishikawa, R. Othman, Effect of silicon and heat-treatment temperature on the morphology and mechanical properties of silicon-substituted hydroxyapatite, Ceram. Int. 37 (2011) 3637–3642.
[18] S. Okada, H. Ito, A. Nagai, J. Komotori, H. Imai, Adhesion of osteoblast-like cells on nanostructured hydroxyapatite, Acta Biomater 6 (2010) 591–597.
[19] V.Y. Chakrapani, T.S. Sampath Kumar, D.K. Raj, T.V. Kumary, Osteogenic apatite particles by sol-gel assisted electrospraying, J. Biome. Mater Res. Part B 106 (2018) 1941–1954.
[20] S. Hayakawa, T. Kanaya, K. Tsuru, Y. Shirosaki, E.Fujii A.Osaka, K. Kawabata, G. Gasqueres, C. Bonhomme, F. Babonneau, C. Jäger, H-J. Kleebe, Heterogeneous structure and in vitro degradation behavior of wet-chemically derived nanocrystalline silicon-containing hydroxyapatite particles, Acta Biomater. 9 (2013) 4856–4867.
[21] W. Wu, G.H. Nancollas, The dissolution and growth of sparingly soluble inorganic salts: a kinetics and surface energy approach, Pure Appl. Chem. 70 (1998) 1867–1872.
[22] T.J. Webster, R.W. Siegel, R. Bizios, Osteoblast adhesion on nanophase ceramics, Biomaterials 20 (1999) 1222–1227.
[23] T.J. Webster, C. Ergun, R.H. Doremus, R.W. Siegel, R. Bizios, Enhanced functions of osteoblasts on nanophase ceramics, Biomaterials 21 (2000) 1803–1810.
[24] L. Casarrubios, M.C. Matesanz, S. Sánchez-Salcedo, D. Arcos, M. Vallet-Regí, M.T. Portolés, Nanocrystallinity effects on osteoblast and osteoclast response to silicon substituted hydroxyapatite, J. Colloid Interf. Sci. 482 (2016) 112–120.
[25] J. Linares, A.B. Fernández, M.J. Feito, M.C. Matesanz, S. Sánchez-Salcedo, D. Arcos, M. Vallet-Regí, J.M. Rojo, M.T. Portolés, Effects of nanocrystalline hydroxyapatites on macrophage polarization, J. Mater Chem. B 4 (2016) 1951–1959.
[26] E. Zhang, C. Zou, Porous titanium and silicon-substituted hydroxyapatite biomodification prepared by a biomimetic process: Characterization and *in vivo* evaluation, Acta Biomater (2009) 1732–1741.
[27] L. Xia, N. Zhang, X. Wang, Y. Zhou, L. Mao, J. Liu, X. Jiang, Z. Zhang, J. Chang, K. Lin, B. Fan, The synergetic effect of nano-structures and silicon-substitution on the properties of hydroxyapatite scaffolds for bone regeneration, J. Mater. Chem. B 4 (2016) 3313–3323.
[28] I. Izquierdo-Barba, L. Santos-Ruiz, J. Becerra, M.J. Feito, D. Fernández-Villa, M.C. Serrano, I. Díaz-Güemes, B. Fernández-Tomé, S. Enciso, F.M. Sánchez-Margallo, D. Monopoli, H. Afonso, M.T. Portolés, D. Arcos, M. Vallet-Regí, Synergistic effect of Si-hydroxyapatite coating and VEGF adsorption on Ti6Al4V-ELI

scaffolds for bone regeneration in an osteoporotic bone environment, Acta Biomater 83 (2019) 456–466.
[29] L. Zhang, G. Yang, B.N. Johnson, X. Jia, Three-dimensional (3D) printed scaffold and material selection for bone repair, Acta Biomater 84 (2019) 16–33.
[30] M. Manzano, D. Lozano, D. Arcos, S. Portal-Núñez, C. Lopez la Orden, P. Esbrit, M. Vallet-Regí, Comparison of the osteoblastic activity conferred on Si–doped hydroxyapatite scaffolds by different osteostatin coatings, Acta Biomater 7 (2011) 3555–3562.
[31] M. Lasgorceix, E. Champion, T. Chartier, Shaping by microstereolithography and sintering of macro-micro-porous silicon substituted hydroxyapatite, J. Eur. Ceram. Soc. 36 (2016) 1091–1101.
[32] A. Magnaudeix, J. Usseglio, M. Lasgorceix, F. Lalloue, C. Damia, J. Brie, P. Pascaud-Mathieu, E. Champion, Quantitative analysis of vascular colonization and angio-conduction in porous silicon-substituted hydroxyapatite with various pore shapes in a chick chorioallantoic membrane (CAM) model, Acta Biomater 38 (2016) 179–189.
[33] M. Vila, A. García, A. Girotti, M. Alonso, J.C. Rodríguez-Cabello, A. González-Vázquez, J.A. Planell, E. Engel, J. Bujan, N. García-Honduvilla, M. Vallet-Regí, 3D silicon doped hydroxyapatite scaffolds decorated with elastin-like recombinamers for bone regenerative medicine, Acta Biomater 45 (2016) 349–356.
[34] F.J. Martínez-Vázquez, M.V. Cabañas, J.L. Paris, D. Lozano, M. Vallet-Regí, Fabrication of novel Si-doped hydroxyapatite/gelatine scaffolds by rapid prototyping for drug delivery and bone regeneration, Acta Biomater 15 (2015) 200–209.
[35] L. Meseguer-Olmo, V. Vicente-Ortega, M. Alcaraz-Baños, J.L. Calvo-Guirado, M. Vallet-Regí, D. Arcos, A. Baeza, In-vivo behavior of Si-hydroxyapatite/polycaprolactone/DMB scaffolds fabricated by 3D printing, J. Biomed. Mater Res. 101 (2013) 2038–2048.
[36] M.J. Feito, R.M. Lozano, M. Alcaide, C. Ramírez-Santillán, D. Arcos, M. Val- let-Regí, M.T. Portolés, Immobilization and bioactivity evaluation of FGF-1 and FGF-2 on powdered silicon-doped hydroxyapatite and their scaffolds for bone tissue engineering, J. Mater Sci. Mater Med. 22 (2011) 405–411.
[37] J. Street, M. Bao, L. deGuzman, S. Bunting, F.V. Peale, N. Ferrara, H. Steinmetz, J. Hoeffel, J.L. Cleland, A. Daughery, N. van Bruggen, H.P. Redmond, R.A.D. Carano, E.H. Filvaroff, Vascular endothelial growth factor stimulates bone repair by promoting angiogenesis and bone turnover, PNAS 99 (2002) 9656–9661.
[38] X. Bao, L. Zhu, X. Huang, D. Tang, D. He, J. Shi, G. Xu, 3D biomimetic artificial bone scaffolds with dual-cytokines spatiotemporal delivery for large weight-bearing bone defect repair, Scient. Rep. 7 (2017) 7814.
[39] F. Fahimipour, M. Rasoulianboroujeni, E. Dashtimoghadam, K. Khoshroo, M. Tahriri, F. Bastami, D. Lobner, L. Tayebi, 3D printed TCP-based scaffold incorporating VEGF-loaded PLGA microspheres for craniofacial tissue engineering, Dental Mater 33 (2017) 1205–1216.
[40] A.R. Akkineni, Y. Luo, M. Schumacher, B. Nies, A. Lode, M. Gelinsky, 3D plotting of growth factor loaded calcium phosphate cement scaffold, Acta Biomater 27 (2015) 264–274.
[41] M.T. Poldervaart, H. Gremmels, K. van Deventer, J.O. Fledderus, F.C. Öner, M.C. Verhaar, W.J.A. Dhert, J. Alblas, Prolonged presence of VEGF promotes vascularization in 3D bioprinted scaffolds with defined architecture, J. Control Rel. 184 (2014) 58–66.
[42] M.J. Feito, M.C. Serrano, M. Oñaderra, M.C. Matesanz, S. Sánchez-Salcedo, D. Arcos, M. Vallet-Regí, M.T. Portolés, Effects of immobilized VEGF on endothelial progenitor cells cultured on silicon substituted and nanocrystalline hydroxyapatites, RSC Adv. 6 (2016) 92586–92595.
[43] D. Arcos, J. Rodríguez-Carvajal, M. Vallet-Regí, Silicon incorporation in hydroxylapatite obtained by controlled crystallization, Chem. Mater 16 (2004) 2300–2308.
[44] N. Alexandre, J. Ribeiro, A. Gartner, T. Pereira, I. Amorim, J. Fragoso, A. Lopes, J. Fernandes, E. Costa, A. Santos-Silva, M. Rodrigues, JD. Santos, AC. Mauricio, AL. Luis, Biocompatibility and Hemocompatibility of Polyvinyl Alcohol Hydrogel Used for Vascular Grafting–In Vitro and In Vivo Studies, J. Biomed. Mater. Res. A 102 (2014) 4262–4275.
[45] ER Kenawy, GL Bowlin, K Mansfield, J Layman, DG Simpson, EH Sanders, GE Wnek, Release of Tetracycline Hydrochloride from Electrospun Poly(ethylene-co-vinylacetate), Poly(lactic acid), and a Blend, J. Control. Release 81 (2002) 57–64.
[46] L Yao, TW Haas, A Guiseppi-Elie, GL Bowlin, DG Simpson, GE Wnek, Electrospinning and Stabilization of Fully Hydrolyzed Poly(vinyl alcohol) Fibers, Chem. Mater. 15 (2003) 1860–1864.
[47] L Wu, X Yuan, J Sheng, Immobilization of Cellulase in Nanofibrous PVA Membranes by Electrospinning, J. Membr. Sci. 250 (2005) 167–173.
[48] M.C. Serrano, R. Pagani, G.A. Ameer, M. Vallet-Regí, M.T. Portolés, Endothelial cells derived from circulating progenitors as an effective source to functional endothelialization of NaOH-treated poly(epsilon-caprolactone) films, J. Biomed. Mater. Res. A 87 (2008) 964–971.
[49] N. Gómez-Cerezo, L. Casarrubios, M. Saiz-Pardo, L. Ortega, D. de Pablo, I. Díaz-Güemes, B. Fernández-Tomé, S. Enciso, F.M. Sánchez–Margallo, M.T. Portolés, D. Arcos, M. Vallet-Regí, Mesoporous bioactive glass/ϵ-polycaprolactone scaffolds promote boné regeneration in osteoporotic sheep, Acta Biomater 90 (2019) 393–402.
[50] D. Arcos, S. Sánchez-Salcedo, I. Izquierdo-Barba, L. Ruiz, J. González-Calbet, M. Vallet-Regí, Crystallochemistry, textural properties and *in vitro* biocompatibility of different silicon doped calcium phosphates, J. Biomed Mater Res 78A (2006) 762–771.
[51] N. Patel, S.M. Best, W. Bonfield, I.R. Gibson, K.A. Hing, E. Damien, P.A. Revell, A comparative study on the in vivo behavior of hydroxyapatite and silicon substituted hydroxyapatite granules, J. Mater Sci. Mater Med. 13 (2002) 1199–1206.
[52] M. Honda, K. Kikushima, Y. Kawanobe, T. Konishi, M. Mizumoto, M. Aizawa, Enhanced early osteogenic differentiation by silicon-substituted hydroxyapatite ceramics fabricated via ultrasonic spray pyrolysis route, J. Mater Sci. Mater Med. 23 (2012) 2923–2932.
[53] A. Lode, C. Wolf-Brandstetter, A. Reinstorf, A. Bernhardt, U. König, W. Pompe, M. Gelinsky, Calcium phosphate bone cements functionalized with VEGF: release kinetics and biological activity, J. Biomed. Mater Res. 81A (2007) 474–483.
[54] T. Ahlfeld, F.P. Schuster, Y. Förster, M. Quade, A.R. Akkineni, C. Rentsch, S. Rammelt, M. Gelinsky, A. Lode, 3D plotted biphasic bone scaffolds for growth factor delivery: biological characterization in vitro and in vivo, Adv. Healthcare Mater 8 (2019) 1801512.
[55] X. Hu, K.G. Neoh, J. Zhang, E-T. Kang, W. Wang, Immobilization strategy for optimizing VEGF's concurrent bioactivity towards endothelial cells and osteoblasts on implant surfaces, Biomaterials 33 (2012) 8082–8093.

CAPÍTULO II

CAPÍTULO II: Respuesta celular a nanoesferas de sílice mesoporosa cargadas con ipriflavona como fármaco antiosteoporótico

En 1969 el profesor Larry L. Hench descubrió el potencial de los vidrios bioactivos experimentando en conejo tras observar cómo quedaban íntimamente unidos al tejido óseo formando una capa de hidroxiapatita capaz de interactuar con fibras de colágeno[326], y sin inducir la formación de cápsula fibrosa. Patentó entonces el Bioglass45S5® produciéndose un salto de los materiales de primera generación empleados hasta la fecha a los de segunda y tercera generación, que promueven la fusión con el tejido óseo y activan diferentes rutas metabólicas[326-327].

Estos primeros vidrios se sintetizaban por fusión y enfriamiento rápido (*melt-quenching*) de una mezcla de SiO_2 (46,1 mol%), P_2O_5 (2,6 mol%), CaO (26,9 mol%) y Na_2O (24,4 mol%), donde los dos primeros componentes actúan como base formadora del vidrio y los dos últimos reducen la temperatura de fusión del mismo e introducen defectos en la red vítrea, aumentando la reactividad química del conjunto[159,328]. P_2O_5 se une con el calcio formando fosfatos de calcio y desempeña un papel clave en el aumento de la bioactividad del material[16]. Este óxido puede sustituirse por otros como el CeO_2, Ga_2O_3, ZnO, CuO, CoO ó Ag_2O, en función de las propiedades que se quieran obtener[292,329].

Los vidrios bioactivos se unen rápidamente al hueso generando una capa de hidroxicarbonato apatita (HCA) y además favorecen la formación de la matriz ósea mineralizada ya que tienen la capacidad de promover la diferenciación de células madre a fenotipo osteoblástico, su proliferación y mineralización[330-332]. Además, estos vidrios presentan una elevada cantidad de grupos silanol (Si-OH) en su superficie, lo que favorece su funcionalización e interacción con el medio[16].

Tras la disolución del biomaterial y la consiguiente liberación de iones, el proceso de formación de la capa de HCA se lleva a cabo en 5 etapas[157]:

1. Intercambio de cationes Na^+ y Ca^+ del vidrio con H^+ del fluido corporal y formación de uniones Si-OH en la superficie del vidrio, con el consiguiente aumento de pH.
2. Los iones OH^- provocan la ruptura de los enlaces Si-O-Si y se libera $Si(OH)_4$ al medio. Se forman más uniones Si-OH en la superficie del vidrio
3. El silicio de la superficie del vidrio polimeriza formando una capa de gel de sílice hidratado
4. Nucleación: los iones Ca^{2+} y PO_4^{3-} liberados del vidrio y del fluido migran y forman depósitos de $CaO\text{-}P_2O_5$ en la capa de silicio que está polimerizando en la superficie
5. Cristalización: continúa la deposición de iones OH^- y CO_3^{2-} del fluido sobre la capa de $CaO\text{-}P_2O_5$, que cristaliza y forma la capa de HCA sobre el vidrio bioactivo

Sobre esta nueva capa de HCA debe producirse una correcta respuesta biológica. Es necesario que las proteínas circundantes presenten una correcta adsorción sobre la interfaz SiO_2-HCA, los macrófagos puedan generar una respuesta inmune apropiada y el

resto de tipos celulares propios del tejido óseo puedan adherirse, diferenciarse y formar nuevo tejido óseo y matriz ósea mineralizada[333].

Existen numerosos estudios *in vitro* que han permitido evaluar la correcta respuesta del material en cada uno de los procesos mencionados. Desde la adsorción de proteínas utilizando soluciones biológicas simuladas, como el fluido corporal simulado (SBF)[334], hasta la diferenciación de osteoblastos y formación de matriz ósea mineralizada[335]. Está ampliamente comercializado y utilizado en la clínica, principalmente en la regeneración de tejidos calcificados como el hueso o la dentina, tanto en cirugía ortopédica como dental[328].

A partir de los años 90 el Bioglass45S5® se comienza a fabricar en forma de gránulos y partículas fácilmente manejables en la clínica para aplicaciones como rellenos óseos o dentales en los que se requiere el empleo de masillas o pastas que contengan este material, generalmente mezclándolo con la sangre del propio paciente para inyectar después esta combinación. Así, se comercializa el MEP® en 1996 para la reparación del hueso del oído medio, el PerioGlas® en 1993 aplicado a la regeneración maxilofacial o el NovaBone® en 1999 y el BonAlive® en 2006 como rellenos de pequeños defectos óseos en aplicaciones ortopédicas y el NovaMin® en 2004 como aditivo en pastas de dientes para la regeneración de la dentina en pacientes con hipersensibilidad[157,336]. La gran ventaja del empleo de estos biomateriales es la drástica reducción de infecciones (2% vs. 5%) y fallos mecánicos (2% vs. 7,5%) y la reducción en la agresividad del procedimiento debido a la disminución del número de cirugías necesario con respecto a los trasplantes autólogos, donde se sustituye un defecto óseo de un paciente por tejido procedente del propio paciente[159].

Estas partículas de vidrio bioactivo se pueden desarrollar mediante dos técnicas: fusión y enfriamiento rápido (*melt-quenching*, alrededor de 1300°C) y química sol-gel.

Con el método de síntesis sol-gel se parte de una solución con los precursores del vidrio y un disolvente. La primera etapa es una hidrólisis en la que los precursores polimerizan a temperatura ambiente generando una red tipo sol. A continuación, se puede emplear esta mezcla para depositar una capa de cerámica sobre otro material (spin-coating o dip-coating) o se puede continuar la condensación de la mezcla obteniendo un gel (xerogel) tras la evaporación del disolvente, que se somete a una etapa de calcinación que provoca la cristalización del gel en estructuras cerámicas compactas[337]. Una de las grandes ventajas del proceso sol-gel es que permite generar vidrio bioactivo poroso (Mesoporous Bioactive Glass, MBG) en diferentes formatos: monolitos, micropartículas o nanopartículas simplemente alterando el pH del proceso[159] y controlar mejor su morfología y composición química[337]. Así se obtienen materiales con diferente estructura atómica y física. Los producidos por fusión y enfriamiento son más densos que los producidos por química sol-gel, que tendrán poros de forma natural y por tanto mayor área de superficie, bioactividad y tasa de degradación, más cantidad de poros y de mayor tamaño, que permitan la carga de moléculas más grandes[159]. Aunque la técnica de fusión y enfriamiento rápido es más sostenible económicamente y por tanto escalable, genera partículas con formas y tamaños más irregulares. Mientras que

aquellas sintetizadas mediante química sol-gel mantienen una distribución de tamaño de partícula constante y una forma y tamaño controlables[337].

Es en 2004 cuando el grupo del profesor Zhao comienza a producir vidrios mesoporosos bioactivos en el sistema SiO_2-CaO-P_2O_5 combinando la estrategia de síntesis sol-gel con la adición de un surfactante[338]. Una solución que contiene los precursores de la composición final del vidrio, un surfactante y un disolvente volátil autoensambla a temperaturas suaves (25-40 °C) formando un gel a medida que se evapora el disolvente (autoensamblaje inducido por evaporación, EISA). Se forman redes de sílice con uniones covalentes que tienen unidas las moléculas de surfactante por interacciones no covalentes, generando mesofases ordenadas[339]. Posteriormente se retira el surfactante (o molde) por extracción o calcinación (600 °C), que habrá generado poros en la estructura del vidrio[340]. Con este procedimiento se pueden generar partículas de sílice de alrededor de 100 nm de diámetro, con mesoporos de 2-10 nm de diámetro y en torno a 1 cm^3/g de volumen ordenados a lo largo de su estructura, lo que le confiere mayor área de superficie (500-1500 m^2/g) y mayor bioactividad. El tamaño y la densidad de estos poros se pueden diseñar en función del pH, de la composición iónica del vidrio y de los reactivos utilizados. Esto permite generar estructuras mesoporosas de tamaño y porosidad uniformes[341] que permitan nuevas aplicaciones como la carga de fármacos o factores de crecimiento para el tratamiento de diferentes patologías[159,337-338].

En el contexto del tejido óseo, la osteoporosis es la patología más prevalente entre la población. Actualmente, tiene un tratamiento farmacológico basado principalmente en el uso de antirresortivos como los bifosfonatos (ácido zoledrónico, risedronato y alendronato, entre otros), antagonistas de los receptores de estrógenos (Raloxifeno), inhibidores de la liberación de RANKL (Denosumab) y fármacos con actividad anabólica (Ranelato y BMPs, entre otros). Para promover la osteogénesis se han testado fármacos como la dexametasona (DEX) con potencial osteogénico[342-343] o la dimetiloxaloglicina (DMOG) como inhibidora del factor inducible por hipoxia prolilhidroxilasa (HIF-PH)[12].

En cuanto a la vehiculización de estos agentes en nanopartículas de vidrio mesoporoso bioactivo, son pocos los estudios realizados hasta la fecha. Se han descrito sistemas de liberación de **alendronato**[344-345] y de **ipriflavona** (IP)[346-349]. Se ha comprobado que cuando cuando el MBG tiene incorporado ipriflavona en sus mesoporos, ésta se libera en un 18 % en las primeras 10 horas, seguido de un 6 % tras 7 días en medio isopropanol:agua, permitiendo así que se produzca una liberación local prolongada y a largo plazo. El tratamiento actual de la osteoporosis requiere una liberación prolongada de alrededor de 120 mg del fármaco en sangre al día, cuando se administra de forma oral sólo un 20 % del mismo se encuentra biodisponible en plasma, mientras que cargando las nanopartículas de MBG con 13-18 % de ipriflavona es suficiente para conseguir retrasar la actividad resortiva de los osteoclastos de forma local, evitando la vía oral y las desventajas que ésta conlleva[347].

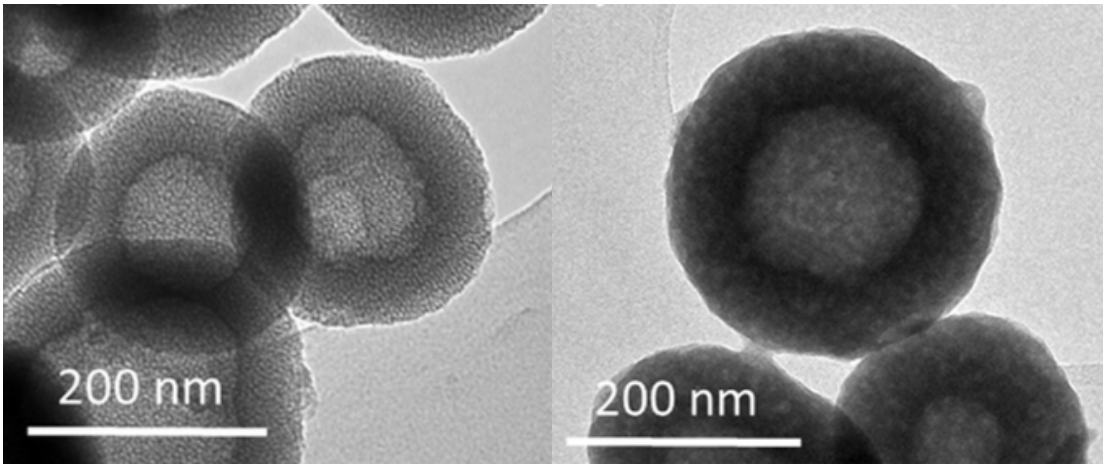


Figura 18. Micrografías tomadas por microscopía electrónica de barrido (SEM) de nanoMBGs (izquierda) y nanoMBG-IPs (derecha). *Nanomaterials 2021, 11: 1102.*

Los MBGs también se están empleando como vehículos de RNA de silenciamiento (siRNA) en terapia génica, ya que esto permite aumentar la vida media del **siRNA** y su capacidad de penetración, como demuestra P. Mora silenciando el gen Sost que codifica para la esclerostina, proteína que regula negativamente la ruta Wnt/β-catenina y que está sobreexpresada en la osteoporosis, favoreciendo el normal desarrollo de la ruta Wnt/β-catenina y estimulando así la formación del tejido óseo[148].

Dado que promover la vascularización del tejido en regeneración es uno de los principales objetivos en ingeniería tisular, es habitual la aplicación del factor de crecimiento de endotelio vascular (**VEGF**) en estas regiones. Se ha comprobado que cargando las nanopartículas con VEGF se mantiene su actividad biológica y se mejora la viabilidad de las células endoteliales[41,343]. Otros factores como la proteína morfogenética ósea 2 recombinante (**rhBMP-2**) introducida en andamios de vidrio mesoporoso bioactivo mejora la reparación del tejido óseo en fémur de conejo, presentando una buena biocompatibilidad y tasa de disolución[350], el factor de crecimiento de fibroblastos (**bFGF**), potenciador de la multiplicación y supervivencia celular, cargado en microesferas de vidrio mesoporoso bioactivo mejora la proliferación celular[351] y la **osteostatina** como sustancia osteoinductora, presenta incluso mejores resultados que la BMP-2[353].

Otros usos de los MBG consisten en doparlos con iones metálicos que generen diferentes respuestas manteniendo las propiedades osteogénicas, angiogénicas y antibacterianas. Se ha comprobado que el Li^+ modula la ruta canónica de Wnt[353], aumenta la diferenciación osteogénica y disminuye la autofagia de los condrocitos[12]. Por otra parte, la adición de Ag^+ a la estructura química de estos MBGs le otorga propiedades bactericidas[354].

Por otro lado, la adición de Sr^{2+} a la composición del MBG tiene efectos osteogénicos, favoreciendo la diferenciación de osteoblastos, y además reduce la diferenciación de osteoclastos, lo cual lo hace un atractivo candidato para aplicaciones osteoporóticas[355-356].

Asimismo, se ha demostrado que la incorporación de iones de Co^{2+} o Cu^{2+} produce un efecto similar al que produce la hipoxia: se activa el factor alfa-1 inductor de hipoxia (HIF-1α) que activa la expresión de genes encargados de promover la reparación del tejido y regeneración ósea[357-358] así como la secreción de factor de crecimiento de endotelio vascular (VEGF), producido por las células del estroma óseo[358]. En cuanto a los iones trivalentes, el Fe^{3+} estimula la actividad mitocondrial en células del estroma y la expresión de genes osteogénicos[359]. Los tetravalentes como el Zr^{4+} refuerzan las propiedades mecánicas de los andamios generados con esta composición, haciéndolos más resistentes[360].

Además, estudios recientes demuestran el potencial de aplicación de estos MBGs en la reparación de otros tejidos[328], promoción de angiogénesis, regeneración de nervios y reparación de cartílago y hueso subcondral[361-362].

Uno de los dos grandes retos a lograr con las nanopartículas de sílice mesoporosa es optimizar al máximo su especificidad de tejido/celular, mediante la unión de ligandos para receptores específicos, como los acoplados a proteínas G (GPCRs), que constituyen la familia de receptores más grande del genoma humano y que tienen elevada especificidad tisular[363]. Y, por otro lado, poder utilizarlas para preparar andamios aptos para su aplicación en ingeniería de tejido óseo. La arquitectura macroporosa todavía falla, ya que en estos andamios los macroporos se producen al azar y tienen poca interconectividad. Estos biomateriales se han fabricado en laboratorio diseñando previamente su macroporosidad mediante CAD[364] o técnicas de prototipado rápido[365], pero todavía es necesario optimizar los procesos para poder hacerlos escalables y confirmar que las cerámicas producidas mantienen la estructura mesoporosa y bioactividad requerida[366].

En cuanto a su eliminación *in vivo*, son factores importantes la porosidad y la composición de la nanopartícula, así como el pH y la fuerza iónica del medio en el que se encuentren. Así, se ha comprobado que las nanopartículas tienen dos vías principales de excreción: a través de las vías fisiológicas habituales, como la orina[367], las heces y la eliminación hepatobiliar; y por otro lado, los elementos o moléculas que puedan ser reconocidos e incorporados a nivel celular, entrarán en el metabolismo de las células que los utilicen y se eliminarán como el resto de productos de desecho[368].

OBJETIVOS CAPÍTULO II

Objetivos

1. Estudio de la respuesta de células implicadas en los procesos de remodelado óseo (osteoblastos y osteoclastos), osteogénesis (preosteoblastos), angiogénesis (células progenitoras endoteliales) y respuesta inmune (macrófagos y linfocitos) a nanoesferas de sílice mesoporosa cargadas y sin cargar con ipriflavona
2. Puesta a punto del cocultivo de osteoblastos/osteoclastos y de células progenitoras endoteliales/macrófagos como modelos experimentales
3. Análisis de los mecanismos de incorporación de las nanoesferas en los diferentes tipos celulares
4. Estudio *in vivo* de los efectos producidos por las nanoesferas de sílice mesoporosa cargadas y sin cargar con ipriflavona implantadas en hueso de conejas osteoporóticas.

METODOLOGÍA CAPÍTULO II

Metodología

1. **Síntesis, caracterización y carga de nanoesferas de vidrio mesoporosas (nanoMBGs). Carga con ipriflavona (nanoMBG-IPs) y marcaje con FITC (nanoMBG-FITCs)**

Las nanoesferas de sílice mesoporosa (nanoMBGs) de composición química nominal $75SiO_2/20CaO/5P_2O_5$ (mol%) se prepararon a partir de una mezcla con sus precursores: ácido poliacrílico-b-poliestireno (poly(styrene)-block-poly(acrylic acid), PS-b-PAA, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), 160 mg de bromuro hexadecil trimetil amonio (hexadecyl trimethyl ammonium bromide, CTAB, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), fosfato de trietilo (triethyl phosphate, TEP, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), $Ca(NO_3)4H_2O$ y tetraetoxisilano (tetraethoxysilane, TEOS, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) en 1,6 ml de etanol. Tras agitar la mezcla durante 24 horas, centrifugar a 10.000 rpm (16,466 g) durante 10 minutos y lavar con una mezcla de etanol y agua (50:50), el producto se secó a 30 °C y el molde orgánico se eliminó por calcinación a 550 °C durante 4 horas. Se caracterizaron mediante microscopía electrónica de barrido (SEM) y microscopía de transmisión electrónica (transmission electron microscopy, TEM).

Las nanopartículas cargadas con ipriflavona (nanoMBG-IPs) se prepararon añadiendo 100 mg de las nanopartículas previamente deshidratadas a 100 °C durante 24 horas a una disolución de 250 mg de ipriflavona (7-Isopropoxy-3-phenyl-4H-1-benzopyran-4-one, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) en 3 ml de acetona. Se agitaron a 100 rpm durante 12 horas a 37 °C para permitir la incorporación del fármaco en los poros de las nanopartículas. Después las nanopartículas se recogieron por filtración en vacío utilizando un filtro de poliamida y se lavaron con agua y acetona para eliminar la ipriflavona adsorbida sobre la superficie de las nanoesferas. Para estudiar la liberación de la ipriflavona cargada en las nanoesferas mesoporososas se añadieron 4 mg de nanoMBG-IPs en insertos de 0,4 μm de poro en pocillos de placas de cultivo de 24 pocillos (Corning, USA) y se cubrieron con 1,5 ml de 2-propanol:agua (60:40 v/v). El cálculo de la concentración de IP libre se realizó mediante espectrofotometría a 299 nm.

Para la síntesis de nanoesferas marcadas con isotiocianato de fluorescesceína (FITC, nanoMBG-FITC) para los estudios de incorporación del material y microscopía confocal, se desgasificaron 50 mg de nanoMBGs a 80 °C durante 24 horas y se resuspendieron en 4 ml de tolueno. En paralelo se disolvieron 44,3 μl de aminopropil trietoxisiliano (aminopropyl triethoxysiliane, APTES) en 0,5 ml de etanol y se incorporaron 0,6 mg de isotiocianato de fluorescesceína, dejándolo reaccionar durante 5 horas. Esta solución se añadió gota a gota a la suspensión de 50 mg de nanoMBGs en tolueno y se dejó reaccionar a 80 °C durante 12 horas bajo atmósfera de nitrógeno. Por último, las nanoMBG-FITCs se lavaron y centrifugaron varias veces a 10.000 rpm (16,466 g) durante 10 minutos para eliminar el exceso de sonda adsorbido al material por uniones no covalentes.

Estos biomateriales fueron preparados y caracterizados en el Departamento de Química en Ciencias Farmacéuticas de la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid por el grupo de investigación de la Profesora María Vallet Regí.

2. Diferenciación de osteoclastos a partir de macrófagos RAW 264.7 en presencia de nanoMBGs y nanoMBG-IPs

Los macrófagos RAW 264.7 (American Type Culture Collection, ATCC) se sembraron a una densidad de $2x10^4$ células/ml en la base de los pocillos de placas de cultivo de 6 pocillos en medio de cultivo completo (DMEM sin rojo fenol, suplementado con 10% de FBS, 1 mM L-glutamina, 1% de penicilina y 1% de estreptomicina). La diferenciación *in vitro* de los macrófagos a osteoclastos se llevó a cabo mediante la adición de 40 ng/ml de la proteína ligando recombinante de RANK murina (TRANCE/RANKL, ligando del receptor activador del factor nuclear kappa-B, carrier-free, BioLegend, San Diego) y 25 ng/ml del factor estimulante de colonias de macrófagos recombinante humano (M-CSF, Millipore, Temecula) al medio de cultivo. Tras las primeras 24 horas, se añadieron a los pocillos 50 µg/ml de nanoMBGsy 50 µg/ml de nanoMBG-IPs y se mantuvieron en incubación durante 7 días a 37 °C en una atmósfera de CO_2 al 5%.

3. Evaluación de la diferenciación de osteoclastos mediante microscopía confocal

La diferenciación de los osteoclastos se evaluó mediante microscopía confocal, observando la morfología de las células adheridas sobre cubreobjetos de vidrio situados en la base de los pocillos. Se fijaron con paraformaldehído (Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, MO, USA) al 3,7% en PBS durante 10 minutos, se permeabilizaron con Triton X-100 (Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, MO, USA) al 0,1% durante 3 minutos y se incubaron con PBS/BSA (Bovine Serum Albumine, albúmina de suero bovino; Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, MO, USA) al 1% durante 30 minutos para evitar las uniones inespecíficas. Después se incubaron con faloidina rodamina (1:40, v/v Molecular Probes Inc., Eugene, OR, USA) durante 20 minutos para teñir los filamentos de F-actina del citoesqueleto, se lavaron con PBS y tiñeron los núcleos con DAPI 3 µM (4'-6-diamidino-2'-phenylindole, 4'-6-diamidino-2'-fenilindol; Molecular Probes Inc., Eugene, OR, USA) durante 5 minutos y montaron sobre portaobjetos de vidrio con Prolong Gold (Thermo Fisher Scientific). Las células se observaron utilizando un microscopio confocal láser Leica SP2 excitando la fluorescencia de la rodamina a 540 nm y la del DAPI a 405 nm y midiéndolas a 565 y 420-480 nm, respectivamente (Centro de Citometría y Microscopía de Fluorescencia, Universidad Complutense de Madrid).

4. Análisis de las cavidades de resorción ósea generadas por los osteoclastos mediante microscopía electrónica de barrido (SEM)

Para estudiar las cavidades de resorción que producen los osteoclastos sobre la superficie de los discos de SiHA y nanoSiHA tras 7 días de cultivo en las condiciones detalladas en el Apartado 3 de este Capítulo, las células se despegaron de su superficie con ayuda de un raspador de células (Sarstedt, Fisher Scientific, Nuevo Hampshire, USA) y los discos se fijaron glutaraldehído 2,5% durante 1 hora a 4 °C y se deshidrataron en diluciones seriadas de etanol (desde 30% hasta 100%) durante 10 minutos en cada una de ellas. Por útimo se recubrieron con oro-paladio y se observaron con un microscopio JEOL JSM-6400 SEM (Centro Nacional de Microscopía Electrónica, Madrid).

5. Cultivo de macrófagos RAW 264.7 y J774A.1 con nanoMBGs y nanoMBG-IPs

Los macrófagos murinos de las líneas RAW 264.7 y J774A.1 (American Type Culture Collection, ATCC) se sembraron a una densidad de 10^5 células/ml en placas de cultivo de 6 pocillos (Corning, USA) añadiendo 2 ml/pocillo de medio de cultivo completo (DMEM

suplementado con 10% de suero bovino fetal (FBS), 1 mM de L-glutamina, 1% penicilina y 1% estreptomicina) a 37 °C bajo una atmósfera del 5% de CO_2 durante 24 horas para permitir su adhesión. Pasado ese tiempo se añadieron 50 µg/ml de nanoMBGs y 50 µg/ml de nanoMBG-IPs, según la condición. Se mantuvieron en incubación a 37 °C bajo una atmósfera del 5% de CO_2 durante 24/48 horas. En paralelo se realizaron cultivos control sin materiales.

6. Polarización y caracterización de macrófagos RAW 264.7 y J774.A1 hacia fenotipo proinflamatorio M1 y reparador M2 en presencia de nanoMBGs y nanoMBG-IPs

Para estudiar los efectos de las nanoesferas sin cargar y cargadas con ipriflavona en la polarización de los macrófagos RAW 264.7 y J774A.1 hacia fenotipo proinflamatorio M1 o reparador M2, éstos se cultivaron en las condiciones que se detallan en el Apartado 5 de este Capítulo II, añadiendo a cada pocillo lipopolisacárido de *E. coli* (lipopolysaccharide, LPS, 250 ng/ml, Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, MO, USA) o interleuquina-4 (interleukin 4, IL-4, 20 ng/ml, Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, MO, USA) para favorecer la polarización hacia el fenotipo M1 proinflamatorio o M2 reparador, respectivamente. Tras 24 horas en incubación, se incubaron con tampón de tinción (staining buffer, SB: PBS, 2,5 % FBS y 0,1% de azida sódica, Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, MO, USA) y suero normal de ratón inactivado (normal mouse serum inactivated, iNMS) durante 15 minutos a 4 °C para bloquear los receptores Fc de la membrana de los macrófagos, y así prevenir las uniones inespecíficas que se pudieran producir tras la adición de los anticuerpos primarios. El número de células polarizadas hacia cada fenotipo y el grado de polarización se cuantificó por citometría de flujo utilizando el anticuerpo anti-CD80 (2,5 µg/ml, BioLegend, San Diego, California) conjugado con ficoeritrina (phycoerythrin, PE) para detectar la expresión de CD80 como marcador de M1 y los anticuerpos anti-CD206 (2,5 µg/ml, BioLegend, San Diego, California) conjugado con FITC y anti-CD163 (2,5 µg/ml, BioLegend, San Diego, California) conjugado con Alexa Fluor 488 para detectar la expresión de CD206 y CD163 como marcadores de M2. Se incubaron las muestras durante 30 minutos a 4 °C en oscuridad. Transcurrido ese tiempo se analizaron en un citómetro de flujo FACSCalibur, excitando la fluorescencia de los fluorocromos a 488 nm y midiendo la emitida por la PE a 585/42 nm y la del FITC y A488 con un filtro de paso de banda a 490/525 nm (Centro de Citometría y Microscopía de Fluorescencia, Universidad Complutense de Madrid).

7. Estudios de expresión de genes pro- y antiinflamatorios por qPCR

En la Unidad de Genómica de la Universidad Complutense de Madrid se evaluó la expresión de ocho genes pro- y antiinflamatorios mediante qPCR, en macrófagos RAW 264.7 tratados *in vitro* con los diferentes tipos de nanoesferas en las condiciones descritas en el punto 5 de este Capítulo II.

Se diseñaron primers específicos para qPCR, a usar en combinación con sondas "Universal Probe Library" (Roche Diagnostics). El diseño se hizo con el software "ProbeFinder Assay Design Software" (Roche Life Science) en el sitio https://lifescience.roche.com/en_es/brands/universal-probe-library.html#assay-design-center a partir de las secuencias de los genes de *Mus musculus*.

Los oligonucleótidos fueron sintetizados por Metabion International AG. Los primers y las sondas UPL (Universal Probe Library) utilizados en el ensayo se muestran en la siguiente tabla:

Gen	Primers	Sonda UPL
Nfkb1	Nfkb1-69-F: CAGGTCCACTGTCTGCCTCT	69
	Nfkb1-69-R: CCCGGAGTTCATCTATGTGC	
IL6	IL6-78-F: TCCTACCCCAATTTCCAATG	78
	IL6-78-R: GAATTGGATGGTCTTGGTCCT	
TNF	TNFa-23-F: TGAAGGGAATGGGTGTTCAT	23
	TNFa-23-R: GGGTCAGAGTAAAGGGGTCAG	
P38	P38-45-F: ACAGGCTACGTGGCTACCAG	45
	P38-45-R: CGGTTATAGTGCATCCAATTCA	
IL1B	IL1B-78-F: TGTAATGAAAGACGGCACACC	78
	IL1B-78-R: TCTTCTTTGGGTATTGCTTGG	
Nos2	Nos2-2-F: GCTCATGACATCGACCAGAA	2
	Nos2-2-R: TCCTCCTGCCCACTGAGTT	
IL10	IL10-30-F: TGAATTCCCTGGGTGAGAAG	30
	IL10-30-R: AGGGGAGAAATCGATGACAG	
IL12	IL12-7-F: ACTCTGCGCCAGAAACCTC	7
	IL12-7-R: AAGGCGTGAAGCAGGATG	
GAPDH	GAPDH-80-F: GTTCCTACCCCCAATGTATCC	80
	GAPDH-80-R: CTGCTTCACCACCTTCTTGA	

Tabla 1. Genes seleccionados para la qPCR, número de sonda y secuencia de los primers empleados, directo (F) y reverso (R).

La Síntesis de cDNA se llevó a cabo con el kit "High Capacity RNA to CDNA kit" (Applied Biosystems) y 1 µg de RNA total en 20 µl Vf, siguiendo instrucciones del fabricante (1 h, 25 °C, 5 min, 95 °C). Para los ensayos de PCR cuantitativa en tiempo real se utilizó el kit "TaqMan Gene Expression Master Mix" (Applied Biosystems) siguiendo instrucciones del fabricante, con 2.5 µl de muestra en 10 µl por ensayo, en placas para PCR de 384 pocillos, y haciendo ensayos por duplicado. Los ensayos se realizaron en un equipo "QuantStudio™ 12K Flex" (Applied Biosystems), con condiciones térmicas estándar: 95 °C, 10 min, 40 x (95 °C, 15s, 60 °C, 1'). Se prepararon curvas estándar con diluciones seriadas de una de las muestras para verificar el funcionamiento de los primers. Los ensayos para el análisis de todas las muestras se realizaron con diluciones 1/10 de cDNA. Se llevó a cabo el análisis de datos y cuantificación relativa, basada en el algoritmo DDCt, con "QuantStudio™ 12K Flex Software".

8. Análisis de la polarización de macrófagos RAW 264.7 y J774.A1 mediante microscopía confocal

La polarización de los macrófagos RAW 264.7 y J774.A1 se evaluó mediante citometría de flujo y microscopía confocal (Centro de Citometría y Microscopía de Fluorescencia, Universidad Complutense de Madrid). Para los estudios de microscopía se preincubaron las muestras con PBS-BSA 1% (Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, MO, USA) durante

30 minutos para prevenir las uniones inespecíficas y se cultivaron con 1 ml de SB con CD80 conjugado con PE o con CD206 conjugado con FITC durante 30 minutos a 4 °C en oscuridad. Los núcleos celulares se tiñeron con DAPI 3 µM (4'-6-diamidino-2'-phenylindole, Molecular Probes Inc., Eugene, OR, USA) durante 5 minutos. Las muestras se analizaron en un microscopio láser confocal Leica SP2. La fluorescencia de la PE se excitó a 488 nm y midió a 575-675 nm, la del FITC se excitó a 488 nm y midió a 491-586 nm y la del DAPI se excitó a 405 nm y midió a 420-480 nm.

9. Cultivo de osteoblastos Saos-2 y preosteoblastos MC3T3-E1 con nanoMBGs y nanoMBG-IPs

La evaluación de la biocompatibilidad de las nanoesferas sin cargar (nanoMBGs) y cargadas con ipriflavona (nanoMBG-IPs) con el principal tipo celular encargado de la osteogénesis (osteoblastos) y su precursor (preosteoblastos) es determinante para evaluar la viabilidad del material para tratamientos óseos. Para ello se cultivaron 10^5 osteoblastos Saos-2/ml y 10^5 preosteoblastos MC3T3-E1/ml, de manera independiente, en placas de cultivo de 6 pocillos. El medio de cultivo empleado fuemedio DMEM suplementado con 10% de FBS, 1 mM L-glutamina, 1% de penicilina y 1% de estreptomicina para los osteoblastos y alpha-MEM suplementado con 10% de FBS, 1 mM L-glutamina, 1% de penicilina y 1% de estreptomicina para el cultivo de los preosteoblastos.

Tras 24 horas de cultivo a 37 °C y atmósfera de CO_2 al 5% para permitir la adhesión de ambos tipos celulares sobre la superficie de los pocillos, se incorporaron 50 µg/ml de nanoMBGs y 50 µg/ml de nanoMBG-IPs, según la condición. Se incubaron durante 24/48 horas y se analizaron los diferentes parámetros celulares por citometría de flujo (Centro de Citometría y Microscopía de Fluorescencia, Universidad Complutense de Madrid).

10. Cocultivo de osteoblastos Saos-2 y osteoclastos diferenciados a partir de macrófagos RAW 264.7 en presencia de nanoMBGs y nanoMBG-IPs

Con el objetivo de estudiar la interacción y modulación de los principales tipos celulares encargados del remodelado óseo en presencia de las nanoesferas de vidrio mesoporoso bioactivo, se cultivaron $2x10^4$ macrófagos RAW 264.7 en la base de los pocillos de placas de cultivo de 6 pocillos (Corning, USA) y $2x10^4$ osteoblastos Saos-2 en la base de insertos de membrana de 0,4 µm de tamaño de poro (Corning, USA) dentro del mismo pocillo. Se cubrieron con medio de cultivo completo (DMEM suplementado con FBS al 10%, 1 mM L-glutamina, penicilina y estreptomicina 200 µg/ml al 1%) al que se adicionaron 40 ng/ml de RANKL y 25 ng/ml de M-CSF para estimular la diferenciación de los macrófagos a osteoclastos. Tras 24 horas de incubación para permitir la adhesión celular, se añadieron 50 µg/ml de nanoMBGs y 50 µg/ml de nanoMBG-IPs y se mantuvieron en cultivo durante 7 días a 37 °C bajo una atmósfera al 5% de CO_2, cambiando el medio de cultivo cada 3 días. Se llevaron a cabo controles monocultivo de cada uno de los dos tipos celulares con y sin materiales, manteniendo la misma composición del medio de cultivo en todos los casos para poder comparar los efectos. Tras el tiempo de cultivo, se llevaron a cabo estudios de proliferación, viabilidad y morfología celular con los osteoblastos y de actividad resortiva y morfología celular con los osteoclastos.

Para los estudios de microscopía confocal, los osteoblastos Saos-2 y los macrófagos RAW 264.7 se trataron siguiendo el protocolo descrito en el Apartado 7 de materiales y

métodos de este Capítulo II de la presente Tesis Doctoral (Centro de Citometría y Microscopía de Fluorescencia, Universidad Complutense de Madrid).

11. Diferenciación de preosteoblastos MC3T3-E1 a fenotipo osteoblástico en presencia de nanoMBGs y nanoMBG-IPs

Para estudiar el efecto de las nanopartículas de vidrio sobre la diferenciación de los preosteoblastos MC3T3 a fenotipo osteoblástico, se cultivaron $2x10^5$ células/ml en placas de cultivo de 6 pocillos con 2 ml de medio de cultivo de diferenciación (alpha-MEM suplementado con 10% de FBS, 50 µg/ml de β-glicerolfosfato, 10 mM de ácido L-ascórbico, 1 mM de L-glutamina, 1% de penicilina y estreptomicina). Tras 24 horas de incubación se introdujeron 50 µg/ml de nanoMBGs y 50 µg/ml de nanoMBG-IPs. El tiempo de cultivo para evaluar la diferenciación celular fue de 7/10 días, bajo una atmósfera al 5% de CO_2 y 37 °C, renovando el medio cada 3 días.

La evaluación del grado de diferenciación de los preosteoblastos se realizó mediante la medida de la actividad fosfatasa alcalina (ALP), como se detalla en los materiales y métodos del Apartado 4 del Capítulo 1, y mediante la cuantificación de los depósitos minerales producidos. Para ello se fijaron las células con glutaraldehído al 10% durante 1 hora y se añadió Alizarin Red 40 mM (pH 4,2) durante 45 minutos, lo que provoca la tinción de los depósitos de calcio generados por los preosteoblastos, que se disolvieron con cloruro de cetilpiridinio al 10% (cetylpyridinium chloride, pH 7) para cuantificar el grado de mineralización producido a través de la medida de la absorbancia de los sobrenadantes a 620 nm.

12. Estudios de citometría de flujo

Mediante citometría de flujo se analizaron los diferentes parámetros indicados a continuación, en el Centro de Citometría y Microscopía de Fluorescencia de la Universidad Complutense de Madrid. Todas las adquisiciones de datos y sus análisis se realizaron con el programa CellQuest de Becton Dickinson utilizando controles positivos y negativos y analizando un mínimo de 10.000 células en cada muestra.

a. Análisis del ciclo celular y detección de apoptosis

Las suspensiones celulares se incubaron en etanol al 70% durante 4 horas a 4 °C y después en una solución de Triton X-100 al 0,1%, 20 mg/ml de yoduro de propidio (propidium iodide, IP; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) y 0,2 mg/ml de RNAsa (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) durante 30 minutos a 37 °C. La fluorescencia del PI se excitó a 488 nm con un láser de 15 mW y la absorbancia emitida se registró con un filtro de paso de banda a 585/42 nm en un citómetro de flujo FACScalibur Becton Dickinson. Se calculó el porcentaje de células en cada fase del ciclo celular: G0/G1 o latencia/crecimiento, S o síntesis y G2/M o duplicación del material genético/mitosis con el programa CellQuest de Becton Dickinson. La fracción SubG1 se utilizó como indicativa de apoptosis.

b. Análisis del contenido intracelular de especies reactivas de oxígeno (ROS)

El estrés oxidativo celular se midió cuantificando el contenido en especies reactivas de oxígeno (ROS) de manera directa. Las suspensiones celulares se incubaron con 100 µM de diacetato de 2',7'-diclorofluoresceína (DCFH/DA, Serva, Heidelberg/Germany) durante 30 minutos a 37 °C. La sonda DCFH/DA tiene una naturaleza apolar que le permite difundir al interior celular atravesando la membrana plasmática y es en el

interior celular donde las esterasas del citosol la desacetilan dejando libre la sonda DCFH no fluorescente, que se oxidará a DCF fluorescente por acción de las ROS. La fluorescencia del DCF se excitó a 488 nm con un láser de 15 mW y la emitida se registró con un filtro de paso de banda a 530/30 nm en un citómetro de flujo FACScalibur Becton Dickinson.

c. Análisis del contenido en calcio intracelular

El contenido en calcio intracelular de los preosteoblastos MC3T3-E1 y las células progenitoras endoteliales cultivados en presencia de 50 µg/ml de nanoesferas (nanoMBGs), 50 µg/ml de nanoesferas cargadas con ipriflavona (nanoMBG-IPs) podría verse alterado como consecuencia de la liberación de iones de estos nanomateriales, lo que podría desencadenar alteraciones en los mecanismos de regulación de los niveles de calcio intracelular de estos tipos celulares.

Las suspensiones celulares procedentes de cada pocillo se incubaron con la sonda Fluo4-AM (5 µM, Thermo Fisher Scientific, Madrid, España) durante 30 minutos en oscuridad, que penetra en las células, generando Fluo4 libre, cuya fluorescencia, dependiente de la concentración de Ca^{2+}. Dicha fluorescencia se excita a 488 nm y se detecta con un filtro de un ancho de banda de 530/30 nm en un citómetro de flujo FACScan Becton Dickinson. Como control positivo se adicionó el ionóforo A-23187 (5 µM, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), que provocará la salida masiva del Ca^{2+} intracelular. Se analizaron 10^4 células en cada muestra para asegurar la significancia estadística.

d. Análisis de la viabilidad celular

La viabilidad celular se cuantificó a través de la exclusión de yoduro de propidio (PI), añadiendo 20 mg/ml de la sonda a cada suspensión celular. La fluorescencia del PI fue excitada a 488 nm con un láser de 15 mW, detectando la fluorescencia emitida con un filtro de paso de banda a 530/30 nm en un citómetro de flujo FACScalibur Becton Dickinson. Las células con la membrana dañada incorporan la sonda, que se intercala en su ADN emitiendo una intensa fluorescencia roja.

e. Análisis del tamaño y la complejidad celular

Mediante la dispersión frontal (Forward Scatter FSC) y lateral (Side Scatter, SSC) de la luz que se produce con el paso de cada célula individualizada, se estudiaron el tamaño (volumen) y la complejidad celular (estructura y contenido intracelular), respectivamente, en un citómetro FACScalibur Becton Dickinson.

13. Estudios morfológicos mediante microscopía confocal

Para analizar la morfología celular de los diferentes tipos celulares en contacto con las nanoMBGs, nanoMBG-IPs y nanoMBG-FITCs por microscopía confocal, se cultivó cada tipo celular sobre cubreobjetos de vidrio dentro de placas de cultivo de 6 pocillos y se mantuvieron en las condiciones de cultivo óptimas de cada tipo celular. Tras los tiempos de cultivo se fijaron con 3,7% de paraformaldehído en PBS durante 10 minutos, se permeabilizaron con Triton X-100 al 0,1% durante 3 minutos y se preincubaron con PBS-BSA al 1% durante 30 minutos. Después se cultivaron con faloidina-rodamina (1:40, v/v Molecular Probes Inc., Eugene, OR, USA) durante 20 minutos en oscuridad para marcar los filamentos de F-actina del citoesqueleto y se lavaron con PBS. Para observar el núcleo celular se añadieron 3 µM de DAPI durante 5 minutos, se montaron con ProlongGold sobre portaobjetos y se estudiaron con un microscopio confocal láser Leica SP2 (Centro de Citometría y Microscopía de Fluorescencia, Universidad Complutense de Madrid). La

fluorescencia de la rodamina se excitó a 540 nm y se registró a 565 nm y la del DAPI se excitó a 405 nm y registró a 420-480 nm.

14. Cultivo de preosteoblastos MC3T3-E1 en presencia de nanoMBGs, nanoMBG-IPs, e IP para realizar estudios de metabolómica

Se sembraron preosteoblastos MC3T3-E1 a una concentración de 10^6 células/botellín en 5 frascos de cultivo F-75 de poliestireno (Thermo Fisher Scientific, Dinamarca) para cada condición: control, 50 μg/ml nanoMBGs, 50 μg/ml, nanoMBG-IPs y 50 μg/ml IP. Se mantuvieron en cultivo durante 7 días en medio alpha-MEM completo (suplementado con 10% de FBS, 1 mM de L-glutamina, 1% de penicilina y estreptomicina). Tras 24 horas de incubación se introdujeron los diferentes materiales en los correspondientes frascos y se mantuvieron en cultivo durante 3 y 7 días bajo una atmósfera al 5% de CO2 y 37 °C. A los 3 días de cultivo con los materiales se renovó el medio tras recoger los sobrenadantes, para analizar por resonancia magnética nuclear (RMN) el contenido extracelular. A los 3 y 7 días en contacto con los materiales se recogieron los sobrenadantes y las células de cada frasco de cultivo, como muestras del contenido metabólico extracelular e intracelular, respectivamente.
Se mantuvieron en las mismas condiciones 5 frascos de medio de cultivo completo, en ausencia de células, y se tomaron muestras de los mismos a los 3 y 7 días como referencia del contenido en metabolitos.

15. Procesamiento de muestras de medios extracelulares para realizar estudios de metabolómica por RMN

Para analizar el contenido metabólico del medio de cultivo celular, resultado de los nutrientes incorporados por las células y los productos de desecho excretados por las mismas, se procesaron las muestras de sobrenadantes correspondientes a 3 y 7 días de cultivo con los diferentes materiales, tal y como se detalla en el apartado anterior. En un tubo de microcentrífuga se mezclaron 300 μl de cada muestra de medio con 600 μl de metanol a -80 °C, se agitaron manualmente y se congelaron durante 30 min a -20 °C. Se centrifugaron durante 20 min a 13.000 g y los sobrenadantes se mantuvieron en vacío durante 6-8 h hasta evaporarse y quedar un sedimento seco. Para procesar las muestras por RMN, se reconstituyeron en 600 μl de tampón fosfato deuterado (100 mM, pH 7,4) con 0,1 mM TSP y se transfirieron 550 μl a tubos de RMN (NOR508UP7 Norell® Standard Series™ 5 mm NMR tubes frequency 500 MHz, Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, MO, USA).

16. Procesamiento de muestras celulares para realizar estudios de metabolómica por RMN

Para extraer los metabolitos intracelulares, los cultivos celulares se lavaron varias veces con PBS, se recogieron y se centrifugaron, resuspendiendo después el sedimento con las células en 800 μl de metanol a -80 °C. El contenido se transfirió a un tubo de microcentrífuga con 150 mg de bolas de vidrio de 0,5 mm y se agitaron en un vortex durante 2 min a 2.850 rpm. Se añadieron 320 μl de cloroformo a -80 °C y se agitaron de nuevo en las mismas condiciones. Después se añadieron 320 μl de cloroformo y 288 μl de agua destilada y se mantuvieron 10 min en hielo. Se centrifugaron durante 15 min a 2.000 g y durante 1 min a 10.000 g y se obtuvieron las diferentes fases separadas: acuosa, lipofílica y proteica (Fig.19).



Figura 19. Fases obtenidas tras la extracción de las muestras celulares para analizar los metabolitos intracelulares por RMN.

La fase acuosa se secó aplicando vacío durante 2-3 horas, la fase lipofílica se secó aplicando flujo de nitrógeno para reemplazar el oxígeno y evitar la oxidación de las muestras y la fase proteica se congeló directamente a -80 °C. Cada una de las fases se reconstituyó en 600 µl de tampón fosfato deuterado (100 mM, pH 7,4) con 0,1 mM TSP y se transfirieron 550 µl a tubos de RMN.

17. Adquisición de datos de RMN y procesamiento

Los espectros de ^{1}H-RMN de las muestras se adquirieron con un espectrómetro Bruker Avance III HD 500 NMR (Universidad de Aveiro, Red portuguesa de RMN) a 500,13 MHz para las observaciones ^{1}H usando una sonda TXI de 5 mm. Los espectros patrón a 1D se grabaron con un ancho de espectro de 7002,8 Hz, 32.000 puntos de medida, un tiempo de relajación de 2 segundos y 512 escaneos. El procesamiento de los espectros incluyó el ajuste manual de fase, la corrección de la línea base y la calibración de la señal del TSP a 0 ppm. Con el objetivo de asegurar la asignación de cada señal registrada con un metabolito, se registraron espectros 2D: correlación ^{1}H-^{1}H (TOCSY), correlación cuántica simple heteronuclear ^{1}H-^{13}C (HSQC) y espectros J-resueltos. Los metabolitos se identificaron con las bases de datos de los espectros de BBIOREFCODE-2-0-0 (Bruker Biospin, Rheinstetten, Alemania) y con el programa Chenomix NMR suite 8.6 (Chenomx Inc. Edmonton, Canada).

18. Análisis multivariante e integración de los espectros de RMN

Los espectros se normalizaron con el área espectral total para compensar las diferencias en el número de células entre las muestras y se escalaron a la varianza unitaria para obtener varianzas similares para todas las variables. Las señales seleccionadas se integraron utilizando el programa AmixViewer 3.9.15 (Bruker BioSpin, Rheinstetten, Alemania) y los análisis PCA y PLS-DA se realizaron a través del programa de acceso libre MetaboAnalyst 5.0 (Genome Canada, NIH NSERC CRC, Canadá). Los análisis estadísticos se realizaron mediante pruebas ANOVA, con un nivel de confianza del 95%.

19. Cultivo de EPCs en presencia de nanoesferas de vidrio mesoporoso bioactivo (nanoMBGs y nanoMBG-IPs)

Las células progenitoras endoteliales (EPC) se extrajeron de sangre periférica de cerdo Large White (35-45 kg), se seleccionaron y diferenciaron durante dos semanas en medio EGM-2 como se detalla en el Apartado 3 del Capítulo I de la presente Tesis Doctoral.

Para estudiar la diferenciación de las EPCs en presencia de las nanoesferas devidrio mesoporoso bioactivo se sembraron $1{,}5x10^4$ EPCs en placas de cultivo de 6 pocillos con medio de cultivo EGM-2 y, tras 24 horas de incubación para permitir la adhesión celular, se incorporaron 50 µg/ml de nanoMBGs y 50 µg/ml de nanoMBG-IPs de manera independiente. Se mantuvieron en cultivo durante 10 días a 37 °C y atmósfera de CO_2 al 5%, renovando el medio de cultivo cada 3 días.

20. Cultivo de EPCs con medios condicionados de macrófagos RAW 264.7 y cocultivo de EPCs y macrófagos RAW 264.7

Con el objetivo de estudiar la posible modulación de la diferenciación de las EPCs ejercida por los macrófagos polarizados hacia fenotipo proinflamatorio (M1) o reparador (M2) y el efecto de la presencia de las mismas y los metabolitos que liberan en la polarización de los macrófagos, se realizaron cultivos condicionados de las EPCs con medio de cultivo procedente de cultivos de macrófagos RAW 264.7 en presencia de nanoMBGs y nanoMBG-IPs y cocultivos directos de EPCs y macrófagos RAW 264.7 en presencia de ambos tipos de nanomateriales.

Los cultivos con medio condicionado se llevaron a cabo con 10^5 macrófagos RAW 264.7 en placas de cultivo de 6 pocillos con 2 ml de medio de cultivo completo (DMEM suplementado con FBS al 10%, 1 mM L-glutamina, penicilina y estreptomicina 200 µg/ml al 1%) bajo una atmósfera de CO_2 al 5% y 37 °C. Tras 24 horas de incubación se añadieron las nanoesferas de vidrio mesoporoso bioactivo: nanoMBG (50 µg/ml) y nanoMBG-IP (50 µg/ml), según la condición, además de los estímulos para inducir la polarización a ambos fenotipos: lipopolisacárido procedente de *E. coli* (LPS, 250 ng/ml, Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, MO, USA) para provocar la polarización a fenotipo proinflamatorio o M1 e interleuquina-10 (IL-10, 40 ng/ml, BioLegend, San Diego, CA, USA) para polarizar los macrófagos RAW 264.7 hacia el fenotipo reparador o M2. Tras 24 horas de cultivo se recogieron los sobrenadantes y se añadieron diluidos con EGM-2 (50:50) a un cultivo de células progenitoras endoteliales a una densidad de $1{,}5x10^4$ células/pocillo. Se cultivaron durante 10 días, renovando el medio cada 3 días.

Los cocultivos se llevaron a cabo sembrando $1{,}5x10^4$ células progenitoras endoteliales (EPCs) en la base de los pocillos de placas de cultivo de 6 pocillos y $1{,}5x10^4$ macrófagos RAW 264.7 en la base de los insertos de membrana de 0,4 µm de tamaño de porointroducidos en los mismos pocillos. Se añadieron 3 ml del medio de cultivo DMEM:EGM-2 (50:50), ya que son los medios óptimos para los macrófagos y las EPCs, respectivamente. Después de 24 horas de incubación se añadieron las nanoesferas de vidrio mesoporoso bioactivo: nanoMBG (50 µg/ml) y nanoMBG-IP (50 µg/ml), según la condición y se cultivaron durante 7 días a 37 °C bajo una atmósfera al 5% de CO_2, refrescando el medio de cultivo cada 3 días.

Se cuantificó la expresión del receptor 2 del factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGFR2) en las EPCs y la de CD206 en los macrófagos RAW 264.7 mediante citometría de flujo, tal y como se detalla en los Apartados 15 y 6 de este Capítulo II, respectivamente. Los resultados obtenidos en los cocultivos y monocultivos se

compararon con los resultados obtenidos con un control positivo basado en el cocultivo de EPC con macrófagos angiogénicos M2d estimulados con 5'-*N*-etil-carboxamido-adenosina (5'-*N*-ethyl-carboxamido-adenosine, NECA, 1 µM, MedChemExpress, Monmouth Junction, NJ, USA)/*E. coli* LPS (100 ng/ml, Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, MO, USA), caracterizados por su elevada producción de VEGF.

21. Análisis de la expresión de VEGFR2 en EPCs tras el cultivo con nanoMBGs y nanoMBG-IPs

La diferenciación de las células progenitoras endoteliales (EPC) en cultivo en presencia de 50 µg/ml de nanoesferas (nanoMBGs) y 50 µg/ml de nanoesferas cargadas con ipriflavona (nanoMBG-IPs) se evaluó mediante citometría de flujo, cuantificando la expresión del receptor 2 del factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGFR2), seleccionado como principal marcador de diferenciación debido a la facilidad de su detección y variabilidad entre condiciones. Se siguió el protocolo descrito en el Apartado 3 del Capítulo I de la presente Tesis Doctoral.

22. Cultivo de líneas de linfocitos de ratón SR.D10 (Th2) y AE103 (Th1)

Se han utilizado dos líneas de células T de ratón $CD4^{+,}$ la línea SR.D10 es una variante clonal aparecida espontáneamente en cultivos de la línea celular de ratón Th2 $CD4^{+}$D10.G4.1[369] específica para el fragmento 134-146 con albúmina (ovotransferrina) de clara de huevo de gallina en contexto de antígenos de histocompatibilidad $I\text{-}A^{k}$ clase II. Se mantuvo y expandió en medio de Click, suplementado con 10% de FCSi que contenía 5 U/ml mrIL-2 de ratón recombinante, 10 U/ml de mrIL-4 y 25 pg/ml de mrIL-1. Después de 4 días, se recogieron las células cultivadas, se lavaron exhaustivamente para eliminar las interleuquinas añadidas y se usaron para ensayos *in vitro*.

La línea AE103 presenta un fenotipo Th1 y responde específicamente en un contexto de antígenos de histocompatibilidad $I\text{-}A^{k}$ clase I. Se mantuvieron en el mismo medio de cultivo Click citado anteriormente conteniendo 10 U/ml de IL-2[370].

23. Ensayos de activación y tratamiento de linfocitos SR.D10 con nanoMBG-FITCs y nanoMBG-IPs

Se sembraron linfocitos SR.D10 en placas de cultivo de 96 pocillos a una densidad de $2{,}5x10^{4}$ células/pocillo, en 200 µL de medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) suplementado con suero fetal bovino fetal al 10% (FBS, Gibco, BRL), l -glutamina 1 mM (BioWhittaker Europe, Verviers, Bélgica), penicilina (200 µg/ml, BioWhittaker Europe, Bélgica) y estreptomicina (200 µg/ ml, BioWhittaker Europe, Bélgica) en presencia interleuquinas a 37 °C bajo una atmósfera de 5% CO_2. Para realizar los ensayos de activación, las células se mantuvieron durante 2 horas en el mismo medio de cultivo en ausencia de ILs, posteriormente se trataron durante 24 horas en ausencia o en presencia de 50 µg/ml de nanoesferas nanoMBGs o nanoMBG-IPs, en condiciones basales o estimuladas. La activación celular *in vitro* se realizó añadiendo a los cultivos celulares los siguientes anticuerpos monoclonales purificados por cromatrografía de afinidad de forma soluble, a una concentración final de 5 µg/ml, Y-CD3-1 (anti-CD3ε), GK1.5 (anti-CD4), y combinación de los dos anticuerpos durante 24 horas. Después de estos tratamientos, los sobrenadantes de los medios se recogieron y se mantuvieron a -20 °C hasta su uso.

24. Detección de interleuquinas 4 (IL-4), 6 (IL-6), 10 (IL-10) y factor de necrosis tumoral alfa (TNFα)

La detección de citoquinas (IL-4, IL-6, IL-10, TNFα) se realizó en los sobrenadantes procedentes de la incubación de los diferentes tipos celulares analizados en monocultivo o cocultivo y en contacto directo o indirecto, según el experimento, con 50 µg/ml de nanoesferas (nanoMBGs) y 50 µg/ml de nanoesferas cargadas con ipriflavona (nanoMBG-IPs).

Todos los ensayos de detección de citoquinas consistieron en ensayos ELISA tipo sándwich, con las placas de cultivo previamente incubadas con anticuerpos altamente específicos para cada una de las citoquinas a detectar. Se utilizaron anticuerpos biotinilados y estreptavidina peroxidasa para detectar la presencia de citoquinas y se reveló con TMB (3,3',5,5'-Tetrametilbenzidina). Se leyó la absorbancia en un lector de placas a la longitud de onda correspondiente, con una sensibilidad de 2 pg/ml y un coeficiente de variación entre ensayos menor del 5%. Se realizaron controles en paralelo y se prepararon curvas patrón por duplicado con citoquinas recombinantes.

25. Mecanismos de incorporación de las nanoMBG-FITCs por los principales tipos celulares estudiados

Para estudiar el número de células que incorporan nanoesferas de vidrio mesoporoso y la cantidad de material que éstas son capaces de incorporar, se añadieron 50 µg/ml de nanoesferas marcadas con FITC (nanoMBG-FITCs) a osteoblastos Saos-2, preosteoblastos MC3T3-E1, macrófagos RAW 264.7, osteoclastos procedentes de macrófagos RAW 264.7, EPCs, linfocitos SR.D10 y AE103 y se mantuvieron en cultivo o en cocultivo durante 24 horas a 37 °C bajo una atmósfera de CO_2 al 5%. Con el objetivo de caracterizar y optimizar la dosis y los tiempos de incorporación del material, se añadieron diferentes concentraciones de nanoMBG-FITCs: 10, 30 y 50 µg/ml y se mantuvieron durante diferentes tiempos en incubación: 30, 60 y 90 minutos.

Para identificar los mecanismos por los que los diferentes tipos celulares incorporan las nanopartículas, se añadieron a los medios de cultivo los seis inhibidores específicos de diferentes procesos endocíticos, como se muestra en la siguiente tabla (Tabla 2), y se dejaron actuar durante 90 minutos antes de la adición de las nanoesferas.

Inhibidor	Concentración	Mecanismo bloqueado	Casa comercial
Citocalasina B	20 µM	Macropinocitosis	MP Biomedicals, Eschwege, Alemania
Citocalasina D	4 µM	Macropinocitosis	MP Biomedicals, Eschwege, Alemania
Clorpromacina	30 µM	Endocitosis dependiente de clatrina	Enzo Life Sciences, Barcelona, España
Genisteína	3,7 µM	Endocitosis independiente de clatrina	Enzo Life Sciences, Barcelona, España
Óxido de fenilarsina (PAO)	3,7 µM	Endocitosis dependiente de clatrina	Enzo Life Sciences, Barcelona, España
Wortmanina	23 µM	Fagocitosis	Sigma–Aldrich Corporation, St. Louis, USA

Tabla 2. Inhibidores de la endocitosis utilizados, concentración a la que se utilizaron, mecanismos moleculares que bloquean y casa comercial de cada uno de ellos.

Despuésdel tratamiento con cada inhibidor, se añadieron 50 µg/ml de nanoMBG-FITCs durante 30 minutos (sin retirar el inhibidor) y se incubaron en una atmósfera de CO_2 al 5% y 37 °C. Las suspensiones celulares procedentes de cada cultivo se analizaron por citometría de flujo en un citómetro FACScalibur Becton Dickinson. La fluorescencia del FITC se excitó con un láser de 15 mW a 488 nm y se midió con un filtro de paso de banda a 530/30 nm.

26. Implantación de las nanoMBGs y nanoMBG-IPs en conejas osteoporóticas y análisis histológico

Muy recientemente se ha llevado a cabo la implantación de estos nanomateriales *in vivo* en un modelo de coneja osteoporótica, en doce hembras adultas a las que se les realizó una ovariectomía bilateral por laparoscopia y se las trató con succinato de sodio de metilprednisolona durante 4 semanas para reproducir las condiciones de osteoporosis humanas. Las nanoMBGs y nanoMBG-IPs se suspendieron en ácido hialurónico y se inyectaron en los correspondientes huesos. La implantación de los biomateriales *in vivo* se realizó enel Centro de Cirugía de Mínima Invasión Jesús Usón (CCMIJU) de Cáceres y los estudios realizados fueron aprobados por el Comité de Ética Institucional siguiendo las directrices de la normativa vigente en ese momento (Directiva 2010/63/EU del Parlamento Europeo y del Consejo del 22 de Septiembre de 2010, relativa a la protección de animales utilizados para fines científicos).
Tras 12 semanas de implantación se diseccionaron los segmentos óseos que contenían los defectos y, actualmente, se están realizando los análisis histológicos de las muestras óseas en el Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Clínico San Carlos de Madrid.

27. Análisis de datos y estadística

Se realizaron como se detalla en el Apartado 13 del Capítulo I de la presente Tesis Doctoral.

RESULTADOS CAPÍTULO II

Artículo 2: European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics 2018, 133: 258–268

"Incorporation and effects of mesoporous bioactive glass nanospheres loaded with ipriflavone on osteoblast/osteoclast cocultures" L. Casarrubios, N. Gómez-Cerezo, M. J. Feito, M. Vallet-Regí, D. Arcos, M. T. Portolés

En este trabajo se prepararon y caracterizaron nanoesferas mesoporosas marcadas con FITC (FITC-NanoMBGs) y cargadas con ipriflavona (NanoMBG-IPs) para evaluar su incorporación y sus efectos sobre los osteoblastos y los osteoclastos simultáneamente, manteniendo la comunicación entre ambos tipos celulares en cocultivo. Asimismo, se evaluó la influencia de estas nanoesferas en la polarización de los macrófagos hacia los fenotipos proinflamatorio M1 o reparador M2, en condiciones basales y estimuladas, analizando la expresión de CD80 (como marcador M1) y de CD206 (como marcador M2) mediante citometría de flujo y microscopía confocal. Las NanoMBGs no indujeron la polarización de los macrófagos hacia el fenotipo proinflamatorio M1, favoreciendo el fenotipo reparador M2 y aumentando la capacidad de respuesta de los macrófagos frente a estímulos como el LPS y la IL-4. Por otra parte, las NanoMBG-IPs indujeron una disminución significativa de la proliferación y la actividad resortiva de los osteoclastos después de 7 días en cocultivo con los osteoblastos, sin afectar a la proliferación y a la viabilidad de los osteoblastos. Respecto a los ensayos de liberación de ipriflavona, se observó que sólo una fracción de la carga útil se libera por difusión, mientras que el resto del fármaco permanece dentro del núcleo de las nanoesferas después de 7 días, asegurando así el tratamiento farmacológico a largo plazo. Todos estos resultados garantizan una adecuada respuesta inmunitaria a estas nanoesferas y la posible aplicación de las NanoMBG-IP como sistema de administración local de fármacos en pacientes osteoporóticos.

European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics 133 (2018) 258–268

Contents lists available at ScienceDirect

European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics

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

Incorporation and effects of mesoporous SiO_2-CaO nanospheres loaded with ipriflavone on osteoblast/osteoclast cocultures

Laura Casarrubios[a], Natividad Gómez-Cerezo[b,c], María José Feito[a], María Vallet-Regí[b,c,*], Daniel Arcos[b,c,*], María Teresa Portolés[a,*]

[a] Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Complutense de Madrid, Instituto de Investigación Sanitaria del Hospital Clínico San Carlos (IdISSC), 28040 Madrid, Spain

[b] Departamento de Química en Ciencias Farmacéuticas, Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid, Instituto de Investigación Sanitaria Hospital 12 de Octubre i+12, Plaza Ramón y Cajal s/n, 28040 Madrid, Spain

[c] CIBER de Bioingeniería, Biomateriales y Nanomedicina, CIBER-BBN, Madrid, Spain

ARTICLE INFO

Keywords:
Mesoporous bioactive glasses
Nanospheres
Osteoblasts
Osteoclasts
Ipriflavone

ABSTRACT

Mesoporous nanospheres in the system SiO_2-CaO (NanoMBGs) with a hollow core surrounded by a radial arrangement of mesopores were characterized, labeled with FITC (FITC-NanoMBGs) and loaded with ipriflavone (NanoMBG-IPs) in order to evaluate their incorporation and their effects on both osteoblasts and osteoclasts simultaneously and maintaining the communication with each other in coculture. The influence of these nanospheres on macrophage polarization towards pro-inflammatory M1 or reparative M2 phenotypes was also evaluated in basal and stimulated conditions through the expression of CD80 (as M1 marker) and CD206 (as M2 marker) by flow cytometry and confocal microscopy. NanoMBGs did not induce the macrophage polarization towards the M1 pro-inflammatory phenotype, favoring the M2 reparative phenotype and increasing the macrophage response capability against stimuli as LPS and IL-4. NanoMBG-IPs induced a significant decrease of osteoclast proliferation and resorption activity after 7 days in coculture with osteoblasts, without affecting osteoblast proliferation and viability. Drug release test demonstrated that only a fraction of the payload is released by diffusion, whereas the rest of the drug remains within the hollow core after 7 days, thus ensuring the local long-term pharmacological treatment beyond the initial fast IP release. All these data ensure an appropriate immune response to these nanospheres and the potential application of NanoMBG-IPs as local drug delivery system in osteoporotic patients.

1. Introduction

Throughout life, bone tissue undergoes continuous remodeling that requires the concerted action of bone-forming osteoblasts and bone-resorbing osteoclasts [1]. Osteoblasts are mononuclear cells that differentiate from bone-specific mesenchymal stem cells and carry out three important roles: the synthesis and secretion of most proteins of the bone extracellular matrix (ECM), the induction of ECM mineralization and the regulation of osteoclast differentiation for bone resorption [2–4]. On the other hand, osteoclasts are multinucleated giant cells that differentiate from hematopoietic stem cells and perform the bone resorption by the attachment to the bone surface and the secretion of hydrogen ions and lysosomal enzymes that degrade the bone ECM producing irregular cavities [5–7]. Osteoblasts and osteoclasts can communicate with each other through mechanisms that involve direct cell-cell contact, ECM interactions and the release of different cytokines [8]. In this context, osteoblasts express *M-Csf* and *Rankl* genes, which are the two main genes required for osteoclast differentiation. Therefore, it is possible to obtain osteoclast-like cells *in vitro* by culturing osteoclast progenitor cells in the presence of the proteins encoded by these genes: the macrophage/monocyte-colony forming factor (M-CSF) and the receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand (RANKL), respectively [9,10]. Osteoblasts also produce osteoprotegerin (OPG), a soluble receptor that acts as a decoy receptor for RANKL and negatively regulates osteoclast differentiation [11]. The continuous stimulation of mononuclear pre-osteoclasts with M-CSF and RANKL induces the

* Corresponding authors at: Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Complutense de Madrid, Instituto de Investigación Sanitaria del Hospital Clínico San Carlos, IdISSC, 28040 Madrid, Spain (M.T. Portolés) and Departamento de Química en Ciencias Farmacéuticas, Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid, Instituto de Investigación Sanitaria Hospital 12 de Octubre i+12, Plaza Ramón y Cajal s/n, 28040 Madrid, Spain (M. Vallet-Regí and D. Arcos).

E-mail addresses: vallet@ucm.es (M. Vallet-Regí), arcosd@ucm.es (D. Arcos), portoles@quim.ucm.es (M.T. Portolés).

https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2018.10.019
Received 30 May 2018; Received in revised form 12 July 2018; Accepted 28 October 2018

osteoclastogenesis by promoting the fusion of these cells into multinucleated osteoclasts and the formation of "ruffled membrane", critical for bone resorption [12,13]. During resorption process, the attachment of osteoclasts to the bone surface involves the creation of the "sealing zone", rich in F-actin, which forms a ring to isolate the resorptive space (resorption lacuna) from the surrounding bone [14,15]. Matrix-degrading enzymes (cathepsin K), hydrogen ions and chloride ions are released into the resorption lacunae by the ruffled membrane, formed by fusion of secretory vesicles into the plasma membrane within the sealing zone, producing acidification [6,7,16], the dissolution of the bone mineral component and the enzymatic degradation of the bone organic matrix [17,18]. The equilibrium between bone resorption by osteoclasts and bone formation by osteoblasts is necessary to maintain the structural skeleton integrity and mineral homeostasis [19]. The alterations of bone remodeling, that is influenced by mechanical, genetic, vascular, nutritional, hormonal and local factors, are involved in the pathogenesis of different skeletal diseases, including osteoporosis [20]. Antiresorptive and anabolic therapies, with different drugs and biomaterials, have been designed for the treatment of osteoporosis with the aim of activating bone formation or/and inhibiting osteoclast function and survival [21,22]. The *in vitro* evaluation of these potential treatments before their *in vivo* application, requires the design of experimental models, closer to physiological conditions, which allow osteoclasts and osteoblasts communicate with each other in the presence of drugs or/and biomaterials.

In the present study, monocultures and cocultures of osteoblasts and osteoclast-like cells were carried out to investigate *in vitro* the incorporation and the effects of mesoporous SiO_2-CaO nanospheres (NanoMBGs) loaded with ipriflavone (IP). NanoMBG nanospheres are intended for osteoporosis treatment by intraosseous administration, so that they would be in direct contact with bone cells. Besides, binary SiO_2-CaO compositions have widely demonstrated their bioactive be- havior when tested with biological significant solutions [23]. IP is a synthetic isoflavone that inhibits bone resorption, maintains bone density and prevents osteoporosis [24]. Oral administration of 1200 mg/day of IP in patients with primary hyperparathyroidism showed that ipriflavone is also indicated in the treatment of metabolic bone diseases characterized by a high bone turnover [25]. IP is metabolized by first pass metabolism, which leads to the low bioavailability and variation in blood concentration. For this reason, the administration of IP loaded into nanoparticles for intracellular release is a very interesting alternative, since the amount of IP required to affect the bone cells function would be much lower.

2. Materials and methods

2.1. Preparation and characterization of mesoporous SiO_2-CaO nanospheres (NanoMBGs) and fluorescein isothiocyanate labeled nanospheres (FITC-NanoMBGs)

The synthesis of hollow mesoporous SiO_2-CaO nanospheres (NanoMBGs) was carried out by the method described by Li et al. [26]. 80 mg of poly(styrene)-block-poly(acrylic acid) PS-b-PAA were dissolved in 16 ml of tetrahydrofurane (THF) at room temperature. This solution was subsequently poured in a hexadecyl trimethyl ammonium bromide (CTAB) solution, previously prepared by dissolving 160 mg of CTAB in 74 ml of deionized water and 2.4 ml of ammonia (28% w/v) and gently stirred in an incubator at 37 °C. The mixture was magnetically stirred for 20 min and a solution of 25 ml of TEP in 1.6 ml of ethanol was added drop by drop and stirred for another 20 min. Thereafter, a solution of 125 mg of $Ca(NO_3)\cdot 4H_2O$ in 1.6 ml of water was also added and stirred for 10 min and finally, the silica source was incorporated as a solution of 0.52 ml of TEOS in 1.6 ml of ethanol. After stirring for 24 h, the product was collected by centrifugation at 10,000 rpm (g = 16.466) for 10 min and washed three times with a mixture of ethanol-water (50:50). The product was dried at 30 °C under vacuum conditions and the organic template was removed by calcination at 550 °C for 4 h with a heating rate of 1 °C min^{-1}. All reactants were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA).

For fluorescein isothiocyanate (FITC) labeling of NanoMBGs, 50 mg of nanospheres were degasified at 80 °C for 24 h and resuspended in 4 ml of toluene. Besides, 44.3 μl of aminopropyl triethoxysiliane (APTES) were dissolved in 0.5 ml of ethanol and reacted with 0.6 mg of fluorescein isothiocyanate for 5 h. This solution was added dropwise on the NanoMBG suspension and reacted at 80 °C for 12 h under nitrogen atmosphere. Finally, fluorescein labelled NanoMBGs (FITC-NanoMBGs) were thoroughly washed and centrifuged several times at 10,000 rpm (g = 16.466) for 10 min to remove the excess of fluorescein non-covalently adsorbed to the nanospheres.

NanoMBGs were characterized by scanning electron microscopy (SEM) using a JEOL F-6335 microscope (JEOL Ltd., Tokyo, Japan), operating at 20 kV and equipped with an energy dispersive X-ray spectrometer (EDS). Previously, the samples were mounted on stubs and gold coated in vacuum using a sputter coater (Balzers SCD 004, Wiesbaden-Nordenstadt, Germany).

Transmission electron microscopy (TEM) was carried out using a JEOL-1400 microscope, operating at 300 kV (Cs 0.6 mm, resolution 1.7 Å). Images were recorded using a CCD camera (model Keen view, SIS analyses size 1024 × 1024, pixel size 23.5 mm × 23.5 mm) at 60000× magnification using a low-dose condition.

Nitrogen adsorption/desorption isotherms were obtained with an ASAP 2020 porosimeter. NanoMBGs were previously degassed under vacuum for 15 h, at 150 °C. The surface area was determined using the Brunauer-Emmett-Teller (BET) method. The pore size distribution between 0.5 and 40 nm was determined from the adsorption branch of the isotherm by means of the Barret-Joyner-Halenda (BJH) method.

Fourier-transform infrared spectroscopy was carried out with a Nicolet Magma IR 550 spectrometer using the attenuated total reflectance (ATR) sampling technique with a Golden Gate accessory.

Thermogravimetric analysis (TGA) was carried out using a TG/DTA Seiko SSC/5200 thermobalance (Seiko Instruments, Chiva, Japan) between 50 °C and 600 °C at a heating rate of 1 °C min^{-1}, using aluminium crucibles and α-Al_2O_3 as reference.

2.2. Ipriflavone loading into NanoMBs (NanoMBG-IPs)

Drug loading was carried out by dissolving 300 mg of IP (7-Isopropoxy-3-phenyl-4H-1-benzopyran-4-one, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) in 6 ml of acetone. Thereafter 80 mg of NanoMBGs were suspended in this mixture and stirred for 24 h to allow IP incorporation. Thereafter the NanoMBG-IP nanospheres were filtered under vacuum using a polyamide filter and thoroughly washed with water to remove the IP physiosorbed on nanosphere surface.

2.3. Ipriflavone release from NanoMBG-IPs

IP release test were carried out by placing 4 mg of NanoMBG-IPs in transwell inserts (0.4 μm pore size, Corning, USA) in 24 well culture plates. Due to the almost complete water insolubility of ipriflavone, a mixture of 2-propanol:water (60:40 v/v), already used in previous ipriflavone delivery assays [27–29] was chosen as release medium. Therefore, 1.5 ml of this mixture were added to the wells of the same plates in order to evaluate the drug release. UV–VIS spectrophotometry was employed for measurements of the drug concentration (Unicam UV – 500 UV–Visible1100 spectrophotometer) at 299 nm in quintuplicate.

2.4. Culture of human Saos-2 osteoblasts

Human Saos-2 osteoblasts (American Type Culture Collection, ATCC) were seeded in 6 well culture plates (Corning, USA), at a density of 10^5 cells/ml, in 2 ml of Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS, Gibco, BRL), 1 mM L-

glutamine (BioWhittaker Europe, Belgium), penicillin (200 μg/ml, BioWhittaker Europe, Belgium), and streptomycin (200 μg/ml, BioWhittaker Europe, Belgium) at 37 °C under a CO_2 (5%) atmosphere. After 24 h of culture in the presence or the absence of 50 μg/ml of NanoMBGs, the osteoblasts were washed with phosphate buffered saline (PBS), harvested using 0.25% trypsin-EDTA solution and counted with a Neubauer hemocytometer for the analysis of cell proliferation. Then, cells were centrifuged at 310*g* for 10 min and resuspended in PBS for the analysis of cell cycle and apoptosis by flow cytometry as described below.

2.5. Cell-cycle analysis and apoptosis detection by flow cytometry

Cells were resuspended in PBS (0.5 ml) and incubated with 4.5 ml of ethanol 70% during 4 h at 4 °C. Then, cells were centrifuged at 310*g* for 10 min, washed with PBS and resuspended in 0.5 ml of PBS with 0.1% Triton X-100, 20 μg/ml of propidium iodide (IP) and 0.2 mg/ml of RNAsa (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). After incubation at 37 °C for 30 min, the fluorescence of PI was excited by a 15 mW laser tuning to 488 nm and the emitted fluorescence was measured with a 585/42 band pass filter in a FACScan Becton Dickinson flow cytometer. The cell percentage in each cycle phase: G_0/G_1, S and G_2/M was calculated with the CellQuest Program of Becton Dickinson and the $SubG_1$ fraction was used as indicative of apoptosis. The conditions for data acquisition and analysis were established using negative and positive controls with the CellQuest Program of Becton Dickinson. These conditions were maintained during all the experiments. At least 10,000 cells were analyzed in each sample.

2.6. Culture of RAW-264.7 macrophages

RAW-264.7 cells (American Type Culture Collection, ATCC) were seeded in 6 well culture plates (Corning, USA), at a density of 10^5 cells/ml, in 2 ml of Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS, Gibco, BRL), 1 mM L-glutamine (BioWhittaker Europe, Belgium), penicillin (200 μg/ml, BioWhittaker Europe, Belgium), and streptomycin (200 μg/ml, BioWhittaker Europe, Belgium) at 37 °C under a CO_2 (5%) atmosphere. After 24 h of culture in the presence or the absence of 50 μg/ml of NanoMBGs, the attached RAW-264.7 cells were washed with phosphate buffered saline (PBS), harvested using cell scrapers and counted with a Neubauer hemocytometer for the analysis of cell proliferation. Then, cells were centrifuged at 310*g* for 10 min, resuspended in fresh medium for the analysis of viability, cell size and complexity by flow cytometry as described below.

2.7. Cell viability, size and complexity analysis by flow cytometry

Cell viability was evaluated by exclusion of propidium iodide (PI; 0.005% wt/vol in PBS, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). PI was added to the cell suspensions in order to stain the DNA of dead cells. The fluorescence of PI was excited by a 15 mW laser tuning to 488 nm and the emitted fluorescence was measured with a 530/30 band pass filter in a FACScalibur Becton Dickinson flow cytometer.

Forward angle (FSC) and side angle (SSC) scatters were evaluated as indicative of cell size and complexity, respectively, using a FACScalibur Becton Dickinson flow cytometer. The conditions for the data acquisition and analysis were established with the CellQuest Program of Becton Dickinson.

2.8. Polarization of RAW-264.7 macrophages towards pro-inflammatory M1 and reparative M2 phenotypes. Flow cytometry and confocal microscopy studies

To study the effect of NanoMBGs on macrophage polarization towards pro-inflammatory M1 and reparative M2 phenotypes, RAW-264.7 macrophages were cultured with 50 μg/ml of these nanospheres for 24 h in the presence of either *E. coli* lipopolysaccharide (LPS, 250 ng/ml, Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, MO, USA) or interleukin 4 (IL-4, 20 ng/ml, Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, MO, USA) as pro-inflammatory and reparative stimuli, respectively [30]. Controls without nanospheres and in the absence of stimuli were carried out in parallel. The expression of either CD80 as M1 marker [31] or CD206 as M2 marker [30] was quantified by flow cytometry after treatment with specific antibodies. With this objective, after detachment and centrifugation, cells were incubated in 45 μl of staining buffer (PBS, 2.5% FBS Gibco, BRL and 0.1% sodium azide, Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, MO, USA) with 5 μl of normal mouse serum inactivated for 15 min at 4 °C in order to block the Fc receptors on the macrophage plasma membrane, before adding the primary antibody, and to prevent non-specific binding. Then, to quantify the CD80 and CD206 expression by flow cytometry, cells were incubated with either phycoerythrin (PE) conjugated anti-mouse CD80 antibody (2.5 μg/ml, BioLegend, San Diego, California) or fluorescein isothiocyanate (FITC) conjugated anti-mouse CD206 (2.5 μg/ml, BioLegend, San Diego, California) for 30 min in the dark. Labelled cells were analyzed using a FACSCalibur flow cytometer. PE fluorescence was excited at 488 nm and measured at 585/42 nm. FITC fluorescence was excited at 488 nm and measured with a 530/30 band pass filter. For confocal microscopy studies, macrophages cultured on glass coverslips were fixed with 3.7% paraformaldehyde (Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, MO, USA) in PBS for 10 min, washed with PBS and permeabilized with 0.1% Triton X-100 (Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, MO, USA) for 3 min. The samples were then washed with PBS and preincubated with PBS containing 1% BSA (Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, MO, USA) for 30 min to prevent non-specific binding. Samples were incubated in 1 ml of staining buffer with either phycoerythrin (PE) conjugated anti-mouse CD80 antibody (2.5 μg/ml, BioLegend, San Diego, California) or fluorescein isothiocyanate (FITC) conjugated anti-mouse CD206 (2.5 μg/ml, BioLegend, San Diego, California) for 30 min at 4 °C in the dark. Samples were then washed with PBS and the cell nuclei were stained with 3 μM DAPI (4′-6-diamidino-2′-phenylindole, Molecular Probes) for 5 min. Samples were examined using a Leica SP2 Confocal Laser Scanning Microscope. PE fluorescence was excited at 488 nm and measured at 575–675 nm. FITC fluorescence was excited at 488 nm and measured at 491–586 nm. DAPI fluorescence was excited at 405 nm and measured at 420–480 nm.

2.9. Osteoclast differentiation from murine RAW 264.7 macrophages. Confocal microscopy studies

Murine RAW-264.7 macrophages (2×10^4 cells/ml) were seeded on glass coverslips and cultured in the presence of 50 μg/ml of NanoMBGs in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS, Gibco, BRL), 1 mM L-glutamine (BioWhittaker Europe, Belgium), penicillin (200 μg/ml, BioWhittaker Europe, Belgium), and streptomycin (200 μg/ml, BioWhittaker Europe, Belgium). To stimulate osteoclast differentiation, 40 ng/ml of mouse RANK Ligand recombinant protein (TRANCE/RANKL, carrier-free, BioLegend, San Diego) and 25 ng/mlof recombinant human macrophage-colony stimulating factor (M-CSF, Milipore, Temecula) were added to the culture medium. It has been demonstrated that M-CSF modulates multiple steps of human osteoclastogenesis and osteoclast-resorbing activity, but is not required for osteoclast survival [32]. Osteoclast precursors recognize RANKL through cell-to-cell interactions with osteoblasts and differentiate into osteoclasts in the presence of M-CSF. RANKL also stimulates the survival and bone-resorbing activity of osteoclasts [33]. In our experimental conditions, we have previously shown that M-CSF and RANKL induce the differentiation from RAW-264.7 macrophages into osteoclasts by stimulating their fusion as precursor cells and their osteoclast-resorbing activity [9,10]. Cells were cultured under a 5% CO_2 atmosphere and at 37 °C for 7 days. Controls

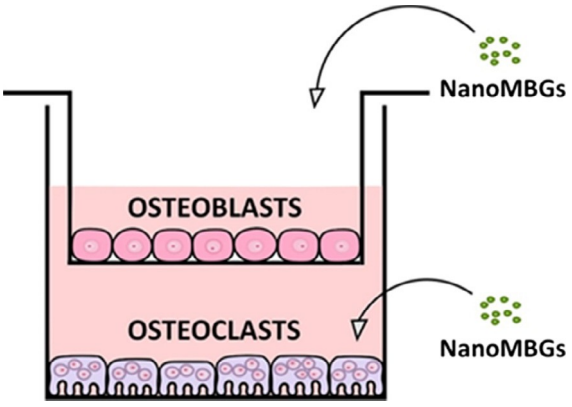
in the absence of nanospheres were carried out in parallel. For confocal microscopy studies, cells were washed with PBS, fixed with 3.7% paraformaldehyde in PBS for 10 min, permeabilizated with 0.1% Triton X-100 for 3 min and preincubated with PBS containing 1% BSA for 30 min. Then, cells were incubated with rhodamine phalloidin (1:40, v/v Molecular Probes) for 20 min to stain F-actin filaments. Samples were then washed with PBS and cell nuclei were stained with 3 μM DAPI (4′- 6-diamidino-2′-phenylindole; Molecular Probes) for 5 min. After mounting with Prolong Gold reagent (Thermo Fisher Scientific), cells were examined using a Leica SP2 Confocal Laser Scanning Microscope. Rhodamine fluorescence was excited at 540 nm and measured at 565 nm. DAPI fluorescence was excited at 405 nm and measured at 420–480 nm.

2.10. Osteoclast resorption activity. Scanning electron microscopy studies

To evaluate the resorption activity of osteoclasts, RAW-264.7 macrophages were seeded on the surface of nanocrystalline hydroxyapatite (nano-HA) disks and differentiate into osteoclasts in the presence of 50 μg/ml of NanoMBGs as it is described above. Nano-HA disks were prepared by controlled precipitation of calcium and phosphate salts and subsequently heated at temperatures below the sintering point, as previously described by our research group [9]. Controls in the absence of nanospheres were carried out in parallel. After 7 days of differentiation, cells were detached using cell scrapers and disks were dehydrated, coated with gold-palladium and examined with a JEOL JSM-6400 scanning electron microscope in order to observe the geometry of resorption cavities produced by osteoclasts on the surface of nano-HA disks.

2.11. Osteoblast/osteoclast coculture

RAW-264.7 cells (American Type Culture Collection, ATCC) were seeded in 6 well culture plates (Corning, USA), at a density of 2×10^4 cells/ml, in 2.3 ml of Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS, Gibco, BRL), 1 mM L-glutamine (BioWhittaker Europe, Belgium), penicillin (200 μg/ml, BioWhittaker Europe, Belgium), and streptomycin (200 μg/ml, BioWhittaker Europe, Belgium). In order to stimulate osteoclast-like cell differentiation, 40 ng/ml of mouse RANK Ligand recombinant protein (TRANCE/RANKL, carrier-free, BioLegend, San Diego) and 25 ng/ml recombinant human macrophage-colony stimulating factor (M-CSF, Millipore, Temecula) were added to the culture medium. Simultaneously, Saos-2 osteoblasts were seeded at a density of 2×10^4 cells/ml in transwell inserts (0.4 μm pore size, Corning, USA) in 1.3 ml of the same culture medium and placed into the 6 well culture plates containing seeded RAW-264.7 cells (Scheme 1). This cocultures were carried out in the presence or the absence of 50 μg/ml of NanoMBGs without or with ipriflavone (NanoMBG-IPs) for 7 days at 37 °C under a CO_2 (5%) atmosphere. Separately, RAW-264.7 macrophages and Saos-2 osteoblasts were cultured alone in wells and transwell inserts, respectively as controls, to compare the results obtained with NanoMBGs and NanoMBG-IPs on these two cell types in coculture and separately without cell communication. For this reason we maintained RANKL at the same dose for monoculture and coculture. After co-culturing, osteoblasts and osteoclast were washed with phosphate buffered saline (PBS), harvested using 0.25% trypsin-EDTA solution and cell scrapers respectively, and counted with a Neubauer hemocytometer for the analysis of cell number. Then, cells were centrifuged at 310*g* for 10 min and resuspended in PBS for the analysis of cell cycle and viability by flow cytometry as described above. For confocal microscopy studies of cocultured osteoblasts and osteoclasts, Saos-2 osteoblasts and RAW-264.7 cells were seeded on glass coverslips into transwell inserts and wells respectively, and cocultured as described above. After 7 days of coculture, cells were washed with PBS, fixed with 3.7% paraformaldehyde in PBS for 10 min, permeabilizated with 0.1% Triton X-100 for 3 min and preincubated with PBS containing 1% BSA for 30 min. Then, cells were incubated with rhodamine phalloidin (1:40, v/v Molecular Probes) for 20 min to stain F-actin filaments. Samples were then washed with PBS and cell nuclei were stained with 3 μM DAPI (4′- 6-diamidino-2′-phenylindole; Molecular Probes) for 5 min. After mounting with Prolong Gold reagent (Thermo Fisher Scientific), cells were examined using a Leica SP2 Confocal Laser Scanning Microscope. Rhodamine fluorescence was excited at 540 nm and measured at 565 nm. DAPI fluorescence was excited at 405 nm and measured at 420–480 nm.

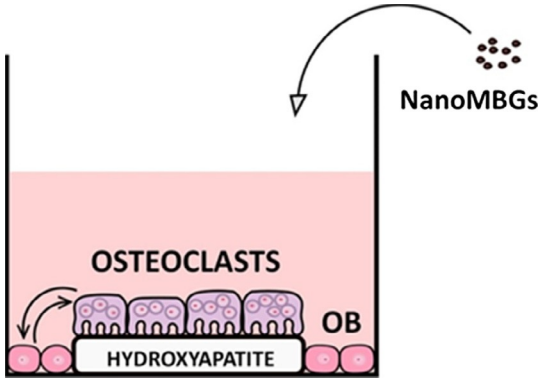


Scheme 1. Cocultures of human Saos-2 osteoblasts and osteoclast-like cells differentiated from RAW-264.7 macrophages in the presence of RANKL and M-CSF were carried to evaluate the incorporation and effects of 50 μg/ml of NanoMBG nanospheres with or without ipriflavone.

To evaluate the resorption activity of osteoclasts in coculture, RAW-264.7 macrophages were seeded on the surface of nano-HA disks into 6 well culture plates with differentiation medium (with RANKL and M-CSF) and cocultured with Saos-2 osteoblasts previously seeded in the same well around nano-HA disks (Scheme 2).

2.12. Incorporation of FITC-NanoMBGs by osteoblasts and osteoclasts

The incorporation of FITC-NanoMBGs by osteoblasts and osteoclasts was quantified by flow cytometry after 3 days and 7 days of monoculture and coculture of these cells with 50 μg/ml of FITC-NanoMBGs under the conditions described above. Osteoblasts and osteoclast were washed with phosphate buffered saline (PBS), harvested using 0.25% trypsin-EDTA solution and cell scrapers respectively, centrifuged at 310*g* for 10 min and resuspended in PBS for the analysis of FITC-NanoMBG incorporation by flow cytometry. FITC fluorescence was



Scheme 2. Cocultures of human Saos-2 osteoblasts (OB) and osteoclast-like cells differentiated from RAW-264.7 macrophages in the presence of RANKL and M-CSF on nanocrystalline hydroxyapatite disks were carried to evaluate the effects of 50 μg/ml of NanoMBG nanospheres with or without ipriflavone on the resorption activity of osteoclasts.

excited by a 15 mW laser tuning to 488 nm and measured with a 530/30 band pass filter in a FACScalibur Becton Dickinson Flow Cytometer. For confocal microscopy studies, cells were seeded on glass coverslips and cultured under the conditions described above. After 7 days of culture, cells were washed with PBS, fixed with 3.7% paraformaldehyde in PBS for 10 min, permeabilizated with 0.1% Triton X-100 for 3 min and preincubated with PBS containing 1% BSA for 30 min. Then, cells were incubated with rhodamine phalloidin (1:40, v/v Molecular Probes) for 20 min to stain F-actin filaments. Samples were then washed with PBS and cell nuclei were stained with 3 μM DAPI (4′-6-diamidino-2′-phenylindole; Molecular Probes) for 5 min. After mounting with Prolong Gold reagent (Thermo Fisher Scientific), cells were examined using a Leica SP2 Confocal Laser Scanning Microscope. Rhodamine fluorescence was excited at 540 nm and measured at 565 nm. FITC fluorescence was excited at 488 nm and measured at 491–586 nm. DAPI fluorescence was excited at 405 nm and measured at 420–480 nm.

2.13. Statistics

Data are expressed as means + standard deviations of a representative of three repetitive experiments carried out in triplicate. Statistical analysis was performed by using the Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) version 22 software. Statistical comparisons were made by analysis of variance (ANOVA). Scheffé test was used for *post hoc* evaluations of differences among groups. In all statistical evaluations, $p < 0.05$ was considered as statistically significant.

3. Results and discussion

3.1. Characterization of NanoMBGs and ipriflavone release test

NanoMBGs were morphologically characterized by SEM and TEM. SEM micrographs (Fig. 1a) show that the NanoMBG material consists on monodisperse spherical nanoparticles of around 250 nm in diameter, although some nanoparticles have certain degree of polyhedral morphology. This fact would be a consequence of the use of CTAB as secondary template, as this surfactant is placed at the external location of the particles and often leads to hexagonal polyhedral morphologies [34]. TEM images show that NanoMBGs exhibit a hollow core-shell structure due to the double-template method used in this work (Fig. 1b). Higher magnification (Fig. 1c) reveals that the shell is organized into a radial mesoporous structure from the hollow core towards the external surface.

Nitrogen adsorption/desorption isotherms (Fig. 1d) agree with this dual mesoporous structure. The adsorption curve corresponds to a type IV isotherm characteristic of mesoporous materials and the pore size is a monodispersed distribution centered at 2.3 nm, which would correspond to the mesopores of the outer shell. The size of the hollow core (about 200 nm) is too large to be measured by nitrogen adsorption and the pore size distribution could not be obtained. However, the H2 type hysteresis loop obtained with the desorption isotherm reveals a second kind of porosity with ink bottle morphology, which would indicate that the smaller pores of the shell are connected to the larger central pore of NanoMBGs.

Ipriflavone (IP) was loaded into NanoMBGs obtaining values of 13% in weight determined by thermogravimetric analysis. The chemical compositions of both NanoMBG and NanoMBG-IP nanospheres were determined by EDX spectroscopy during TEM observations and are also shown in Table 1. Despite of the incorporation of a phosphorous precursor as TEP during the synthesis, this element could not be detected by EDX, whereas silicon and calcium contents are very similar respect to the theoretical values. However, we decided to maintain the addition of TEP as we could observe that the presence of this reactive increased the content of Ca in NanoMBGs. In the absence of TEP, the calcium content in our nanoparticles could not overcome the 12% value. Interestingly, NanoMBG-IPs keep the calcium content after the drug

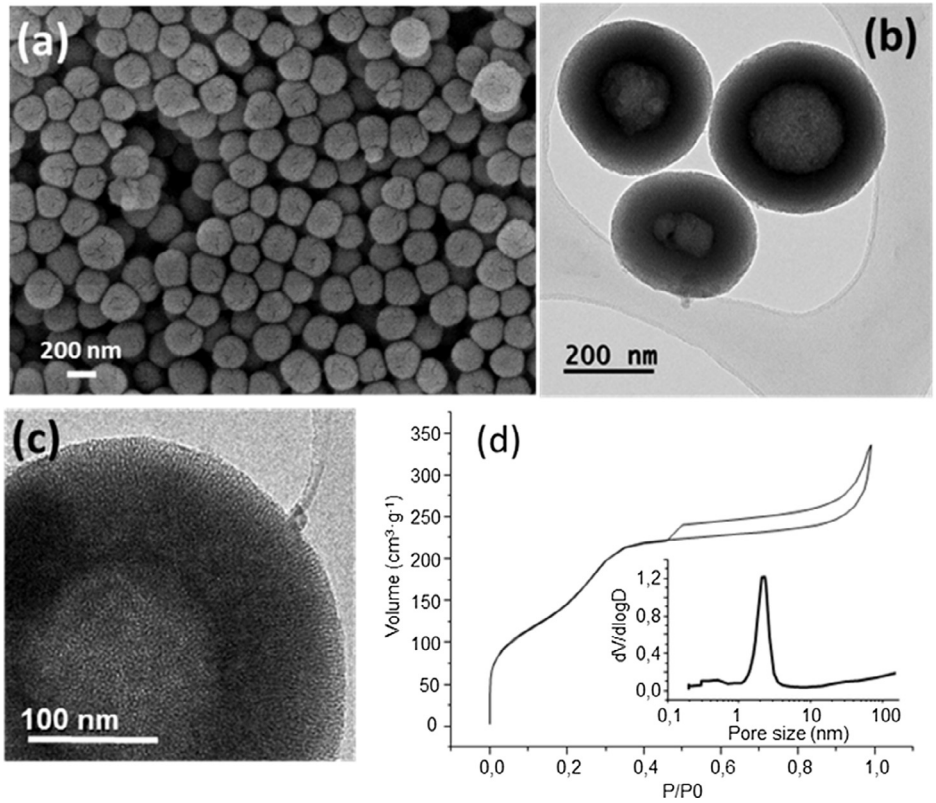


Fig. 1. Scanning electron micrograph of NanoMBG nanospheres (a), high resolution transmission electron microscopy image of NanoMBG nanospheres (b and c), adsorption-desorption isotherms and pore size distribution (d).

Table 1
Chemical composition and textural properties of NanoMBG nanospheres before and after loading with ipriflavone. Values in brackets correspond to the theoretical chemical composition.

Sample	Si (% atom)	Ca (% atom)	P (% atom)	Surface area ($m^2 \cdot g^{-1}$)	Porosity ($cm^3\,g^{-1}$)	Pore size (nm)
NanoMBG	81.44 (79.4)	18.56 (18.1)	– (2.5)	543.6	0.435	2.2
NanoMBG-IP	83.36	16.63	-	14.2	0.057	NA

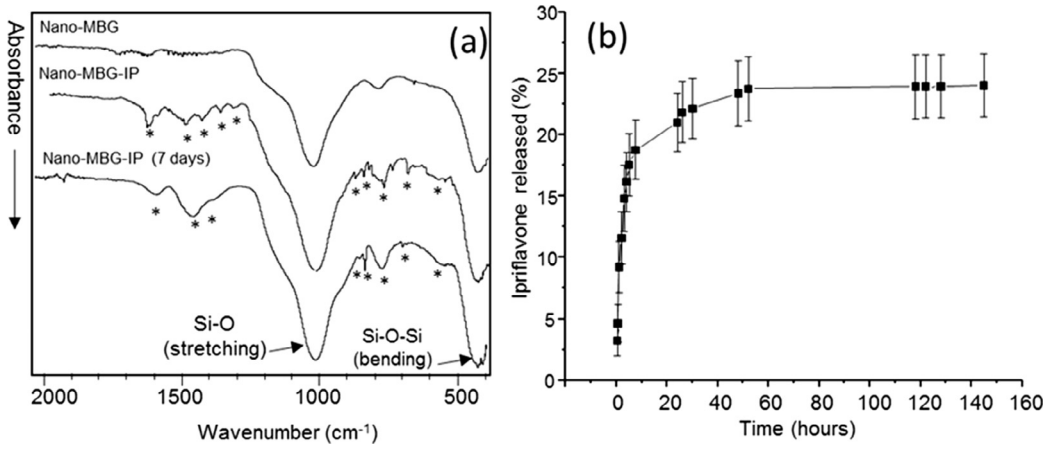


Fig. 2. FTIR spectra of NanoMBG and NanoMBG-IP nanospheres before and after seven days of drug release test. *points absorption bands corresponding to the different functional groups of ipriflavone (a). Ipriflavone released as a function of soaking time (b).

loading, which is a condition required for maintaining the bioactive behavior of mesoporous bioactive glasses [35,36]. This is possible due to the non-polar character of acetone used for the IP loading, which would avoid the calcium release commonly occurred when MBGs are soaked in aqueous mediums.

Finally, the textural parameters obtained by N_2 adsorption are shown in Table 1 and evidence that the high surface area and porosity NanoMBGs are dramatically decreased after IP incorporation.

Fig. 2a shows the FTIR spectra of NanoMBGs before and after loaded with IP (NanoMBG-IP), evidencing the incorporation of the drug with the appearance of the absorption bands corresponding to IP chemical groups. The drug delivery test (Fig. 2b) shows a fast release of the 18% of the IP during the first 10 h, followed by a slower release of an additional 6% of drug before reaching an asymptotic behavior. The test was followed for 7 days without observing further IP release to the medium. Since the release test was carried out in isopropanol:water media, these results cannot be extrapolated to physiological conditions, where IP is almost insoluble. Therefore, it should be considered just as a proof of the capability of nanoMBG for loading and release IP in a medium of low polarity. It must be pointed that, even using a release media that facilitates IP release, most of IP is still retained within the core of NanoMBG nanospheres after 7 days, as could be confirmed by FTIR spectroscopy carried out on the particles collected after the drug release test (see Fig. 2a, NanoMBG-IP, 7 days). This behavior indicates that NanoMBG-IPs release a minor fraction of their payload by diffusion through the radial porosity of the shell, whereas most of the drug would be retained within the hollow core. In this sense, the total release of IP would be conditioned to nanoparticles degradation, thus ensuring the local long-term pharmacological treatment beyond the initial fast IP release. The degradation of MBGs has been widely studied and is initialized by an intense ionic exchange with the surrounding fluids [35,36]. In fact, this ionic exchange is the basis for their bone regenerative properties. It can be described as a sequence of reactions involving:

(a) Ca^{2+} by H^+ ionic exchange between the material and the surrounding media.
(b) Release of soluble SiO_2 oligomers from the material to the surrounding fluid.
(c) In the case of solutions with high calcium and phosphorous content (like the human plasma or cell culture media), a calcium phosphate phase very similar to the mineral component of the bone nucleates on the materials surface, thus ensuring the osteointegration of the MBGs with the hosting bone tissue.

3.2. Effects of NanoMBGs on human Saos-2 osteoblasts

Fig. 3 shows the effects of NanoMBGs on proliferation (a), cell cycle profile (b) and cell cycle phases (c) of human Saos-2 osteoblasts cultured in the absence (white) or in the presence (grey) of 50 μg/ml of nanospheres for 24 h. Saos-2 cells is an osteosarcoma cell line commonly used for *in vitro* evaluation of biomaterials designed for bone tissue due to its osteoblastic properties as production of mineralized matrix, high alkaline phosphatase levels, PTH receptors and osteonectin presence [37]. The analysis of the cell cycle by flow cytometry allows us to detect the percentage of cells in the progressive stages: G_0/G_1 phase (Quiescence/Gap1), S phase (Synthesis) and finally G_2/M phase (Gap2 and Mitosis). This analysis also indicates the percentage of apoptotic cells with fragmented DNA corresponding to the $SubG_1$ fraction.

The treatment with these nanospheres produced a significant S phase increase ($p < 0.005$) and a significant G_2/M phase decrease ($p < 0.05$) after 24 h of treatment (Fig. 3c) that could be related to the observed, but no significant decrease detected in osteoblast number (proliferation, Fig. 3a) and G_0/G_1 phase (Fig. 3c). On the other hand, although this nanomaterial induced a significant increase of $SubG_1$ fraction ($p < 0.005$, Fig. 3c), very low levels of apoptosis were detected either in the absence or in the presence of these nanospheres.

3.3. Effects of NanoMBGs on RAW-264.7 macrophages

In order to know the effects of NanoMBG nanospheres on proliferation, viability, cell size and complexity of RAW-264.7 macrophages, these cells were cultured in the absence or in the presence of 50 μg/ml of nanospheres for 24 h. Fig. 4 shows that these nanoparticles did not induced significant alterations on cell proliferation, cell size and viability. However, a significant increase ($p < 0.005$) of cell

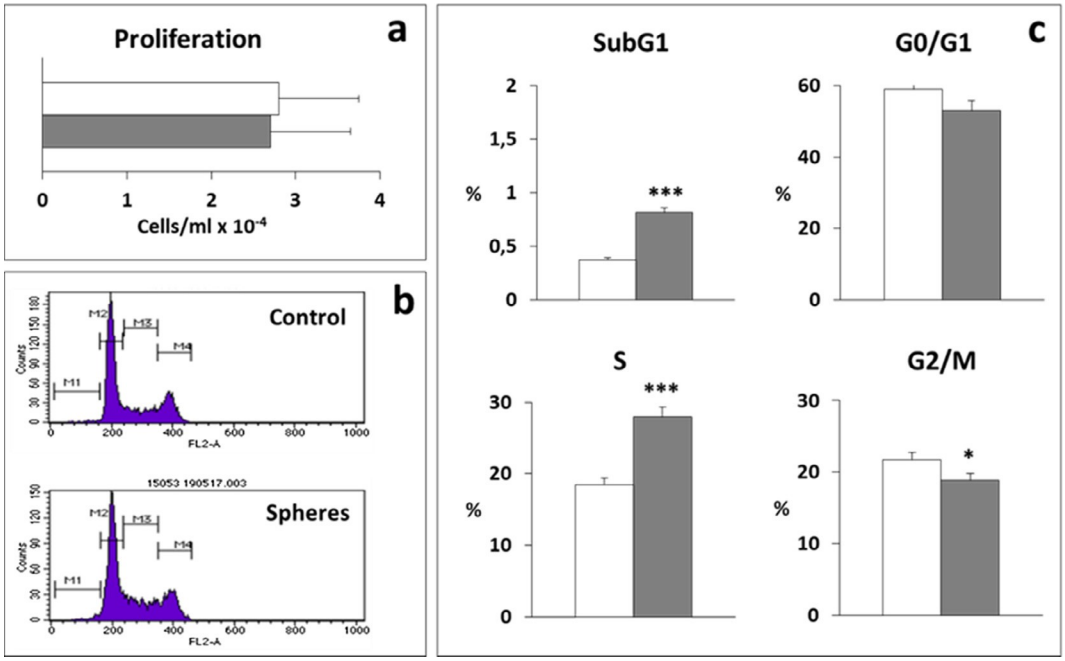


Fig. 3. Effects of NanoMBG nanospheres on proliferation and cell cycle of human Saos-2 osteoblasts: (a) proliferation, (b) cell cycle profiles and (c) cell cycle phases of cells cultured in the absence (white) or in the presence (grey) of 50 μg/ml of nanospheres for 24 h. Statistical significance: $^{*}p < 0.05$; $^{***}p < 0.005$.

complexity evaluated through the side angle scatter (SSC) was detected after the treatment with this nanomaterial. SSC is a special parameter of flow cytometry which can reflect the physical properties of a cell examined by the flow cytometer. It is a part of deflected laser light by the cell. The extent to which light scatters depends on the physical properties of a cell as its size and internal complexity. Factors that affect light scattering are the plasma membrane, cytoplasm, nucleus, mitochondria, pinocytic vesicles, lysosomes, and any granular material inside the cell. Cell shape and surface topography also contribute to the total light scattering [38,39]. Thus, the changes observed on SSC in Fig. 4 could be due to the nanospheres uptake by macrophages.

The expression of either CD80 as M1 marker [31] or CD206 as M2 marker [30] after treatment with PE conjugated anti-mouse CD80 antibody or FITC conjugated anti-mouse CD206 antibody is shown in Fig. 5a–g and observed by confocal microscopy (Fig. 5e and h).

As it can be observed in Fig. 5a and b, the treatment with NanoMBGs in basal conditions (without stimulus) did not induce significant changes of M1 percentage and CD80 expression (M1 fluorescence intensity) but produced a significant increase of M2 percentage ($p < 0.05$) accompanied by a significant decrease of CD206 fluorescence intensity (M2, $p < 0.01$). This M2 fluorescence intensity corresponds to the mean fluorescence of the $CD206^{+}$ population (M2). This M2 population presented a slight but significant increase of cell number after treatment with nanospheres but, probably due to this fact, the mean fluorescence of this population shifts to a lower value. When macrophages were treated with LPS as inflammatory stimulus (Fig. 5c and d), these nanospheres did not modify M1 percentage but increased CD80 fluorescence intensity (M1, $p < 0.005$), evidencing a higher

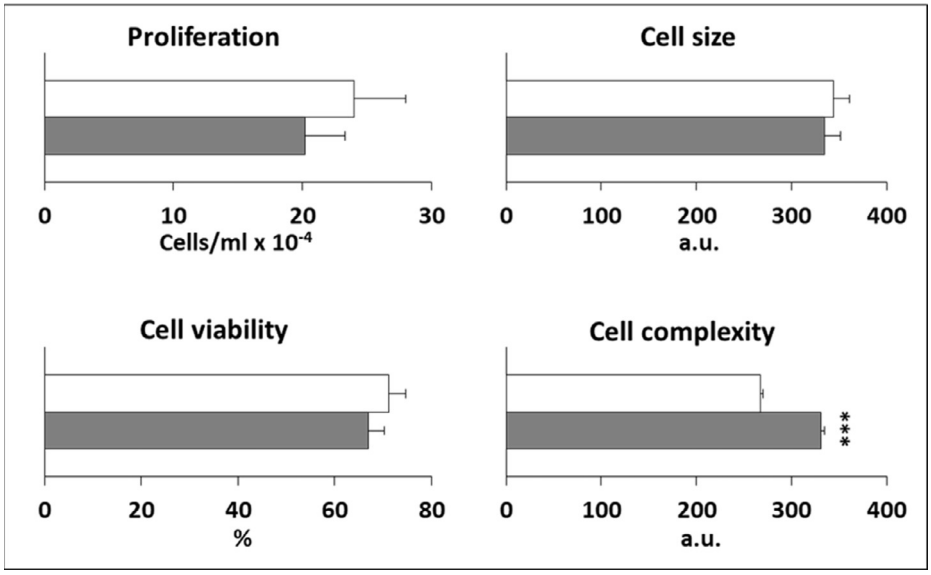


Fig. 4. Effects of NanoMBG nanospheres on proliferation, cell viability, size and complexity of RAW-264.7 macrophages cultured in the absence (white) or in the presence (grey) of 50 μg/ml of nanospheres for 24 h. Statistical significance: $^{***}p < 0.005$.

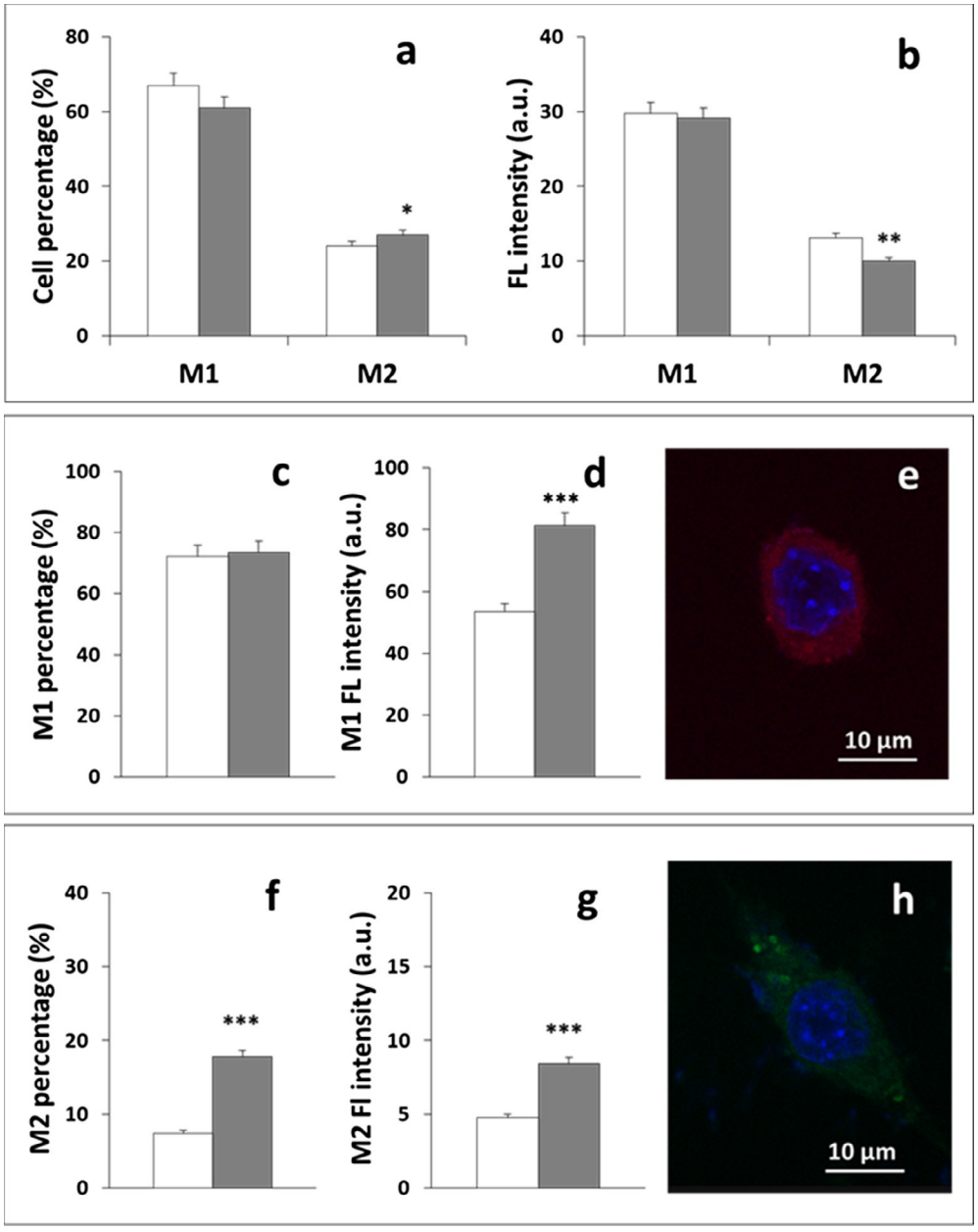


Fig. 5. Effects of NanoMBG nanospheres on pro-inflammatory M1 and reparative M2 phenotypes of RAW-264.7 macrophages after 24 h of treatment without stimulus (a and b) or with *E. coli* lipopolysaccharide (LPS) (c–e) as inflammatory stimulus or with interleukin 4 (IL-4) (f–h) as reparative stimulus. Cells were cultured in the absence (white) or in the presence (grey) of 50 µg/ml of nanospheres for 24 h. Statistical significance: $^{*}p < 0.05$, $^{**}p < 0.01$, $^{***}p < 0.005$. Confocal images show the CD80 (e) and CD206 (h) expression of M1 and M2 RAW-264.7 macrophages after treatment with LPS or IL-4 respectively, and in the presence of 50 µg/ml of nanospheres for 24 h. CD80 (red) was detected with PE conjugated anti-mouse CD80 antibody, CD206 (green) was detected with FITC conjugated anti-mouse CD206 antibody, nuclei were stained with DAPI (blue). (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

response capability against the LPS stimulus in the presence of material. On the other hand, when macrophages were treated with IL-4 as reparative stimulus (Fig. 5f and g), NanoMBGs induced significant increases of both M2 percentage and CD206 expression (M2 fluorescence intensity, $p < 0.005$). These results evidence that NanoMBGs did not induce the macrophage polarization towards the M1 pro-inflammatory phenotype in basal conditions, promoting the control of the M1/M2 balance with a slight shift towards M2 reparative phenotype and increasing the response capability against both stimuli LPS and IL-4. All these data ensure an appropriate immune response to these nanospheres. On the other hand, the macrophage phenotype polarization has been related to changes in cell shape [40] that were also observed in the present study when macrophages were stimulated with either LPS or IL-4 as pro-inflammatory and reparative stimulus, respectively. Thus, macrophages polarized towards the M1 ($CD80^{+}$) phenotype with LPS showed more spherical shape (Fig. 5e) than cells polarized towards the M2 ($CD206^{+}$) phenotype with IL-4 showing an elongated shape (Fig. 5h), in agreement with other authors [40] and previous studies [41].

3.4. Incorporation of FITC-NanoMBGs by osteoclasts and osteoblasts in monoculture and in coculture with each other

Fig. 6 shows the incorporation of NanoMBGs labelled with FITC by osteoclasts and osteoblasts in monoculture (OC and OB) and in coculture (OC-co and OB-co) with each other. The percentage of cells with intracellular FITC-NanoMBGs and the fluorescence intensity of these cells were quantified by flow cytometry after 3 days (Fig. 6a) and 7 days (Fig. 6b). Confocal microscopy studies were carried out to observe these nanospheres incorporated by osteoclasts (Fig. 6d) and osteoblasts (Fig. 6f) in coculture after 7 days. Control cocultures of osteoclasts (Fig. 6c) with osteoblasts (Fig. 6e) in the absence of nanospheres were carried out in parallel.

As it can be observed in Fig. 6b, the percentage of cells with FITC-NanoMBGs and the fluorescence intensity of these cells were significantly higher in monocultured and cocultured osteoblasts than in monocultured and cocultured osteoclasts after 7 days of treatment ($p < 0.005$). Confocal microscopy studies evidenced that after FITC-NanoMBG incorporation, osteoclasts and osteoblasts maintained their

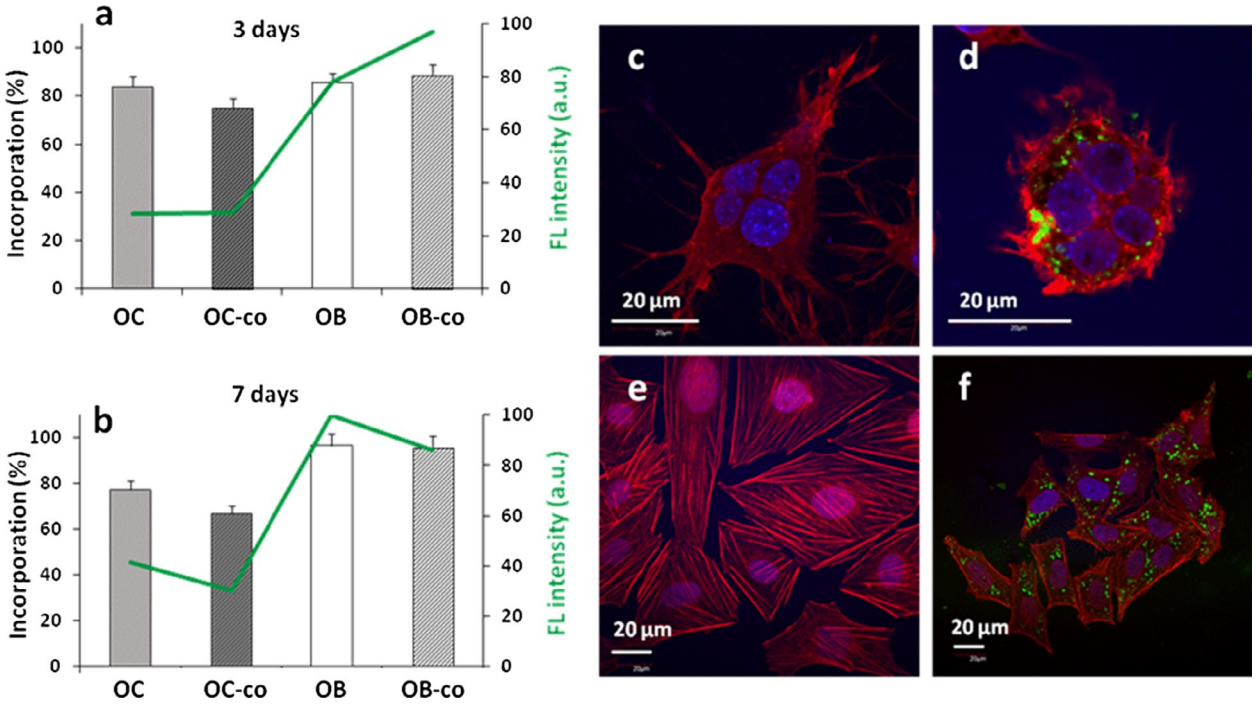


Fig. 6. Incorporation of NanoMBG nanospheres labelled with FITC by osteoclasts and osteoblasts in monoculture (OC, OB) and in coculture with each other (OC-co, OB-co). (a) and (b) show the flow cytometric analysis of intracellular incorporation of FITC-NanoMBG nanospheres (percentage of green fluorescent cells) and the fluorescence intensity (green line, arbitrary units) after 3 days (a) and 7 days (b). Confocal microscopy images of FITC-NanoMBG nanospheres incorporated by osteoclasts (d) and osteoblasts (f) in coculture with each other after 7 days. In the absence of nanospheres, control cocultures of osteoclasts (c) with osteoblasts (e) were carried out in parallel. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

characteristic morphology in both monocultures (data not shown) and cocultures (Fig. 6d and f, respectively) in comparison with control monocultures (data not shown) and cocultures (Fig. 6c and e, respectively). These results evidenced that FITC-NanoMBG incorporation did not induced alterations in osteoclast and osteoblast morphology, allowing the osteoclastogenesis process that was confirmed by the observation of multinucleated cells with the F-actin ring (Fig. 6d), that allows creation of the "sealing zone", critical for bone resorption [14,15].

Fig. 7 shows the cell number (7a) and cell viability (7b) of osteoclasts (OC) and osteoblasts (OB) in coculture with each other after 7 days of treatment with 50 µg/ml of either NanoMBG (OC-co and OB-co) or NanoMBG-IP (Oc-co/IP and OB-co/IP) nanospheres. As it can be observed, the presence of ipriflavone induced a significant decrease of osteoclast number ($p < 0.005$) without affecting the viability of this cell type. On the other hand, ipriflavone did not induce changes on

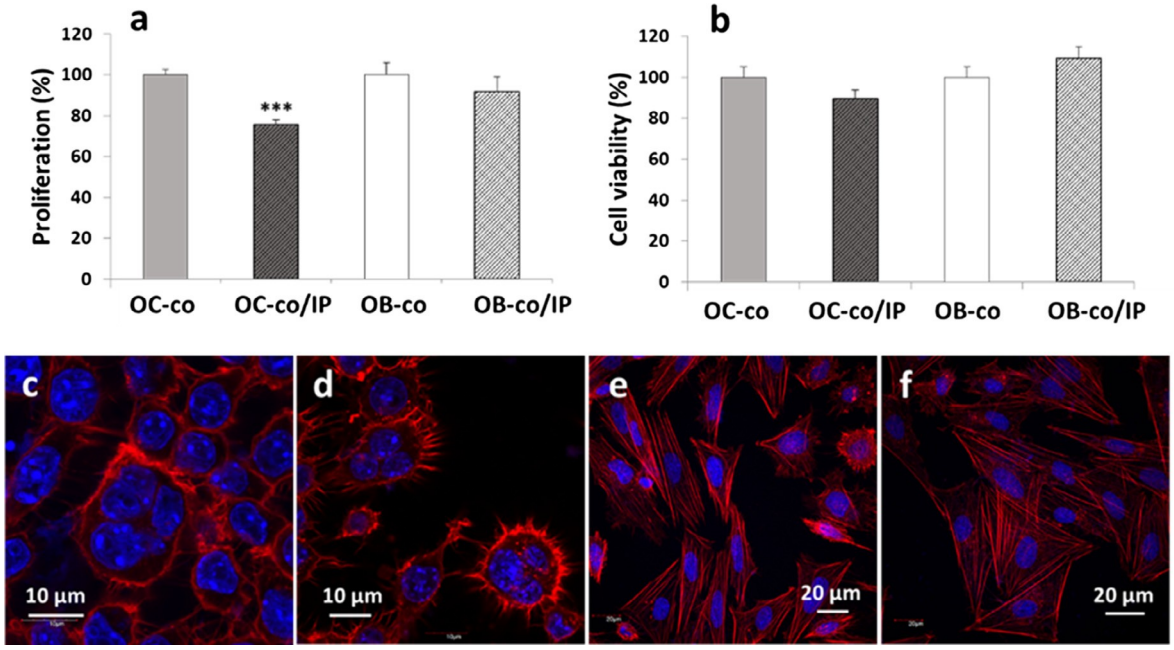


Fig. 7. Cell number (a) and cell viability (b) of osteoclasts (OC) and osteoblasts (OB) in coculture with each other after 7 days with 50 µg/ml of either NanoMBG (OC-co and OB-co) or ipriflavone (IP)-loaded NanoMBG (Oc-co/IP and OB-co/IP) nanospheres. Cell morphology of OC-co (c), OC-co/IP (d), OB-co (e) and OB-co/IP (f).

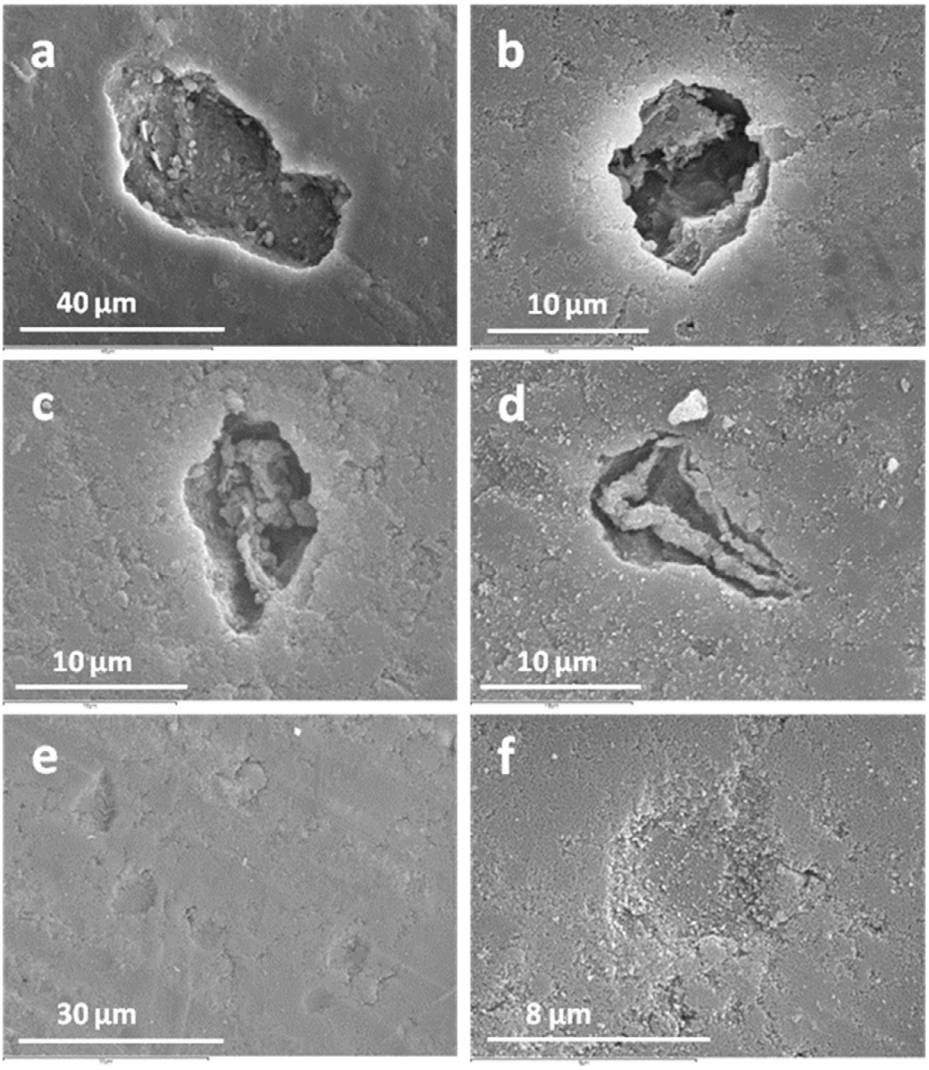


Fig. 8. Scanning electron microscopy images of the resorption cavities left by osteoclasts after 7 days in monoculture (a), in coculture with osteoblasts (b), in coculture with osteoblasts in the presence of 50 µg/ml of NanoMBG nanospheres (c and d) and in coculture with osteoblasts in the presence of 50 µg/ml of NanoMBG-IP nanospheres (e and f).

osteoblast proliferation and viability. The cell morphology of osteoclasts and osteoblasts in coculture in the presence of nanospheres without IP (7c and 7e, respectively) or with IP (7d and 7f, respectively) did not show alterations.

Fig. 8 shows the resorption cavities left by osteoclasts on nanocrystalline hydroxyapatite disks after 7 days of differentiation in monoculture (a), in coculture with osteoblasts (b), in coculture with osteoblasts in the presence of 50 µg/ml of NanoMBGs (c and d) and in coculture with osteoblasts in the presence of 50 µg/ml of NanoMBG-IPs (e and f). As it can be observed, the dimensions of these cavities significantly decreased when osteoclasts are cocultured with osteoblasts (Fig. 8b) in comparison with the cavities left by osteoclasts in monoculture (Fig. 8a), evidencing that the presence of osteoblasts modulates the resorption activity of osteoclasts. These results could be due to the osteoblast production of osteoprotegerin (OPG), a soluble receptor that acts as a decoy receptor for RANKL and negatively regulates osteoclast differentiation [11]. The cavities left by osteoclasts in coculture and in the presence of NanoMBGs without ipriflavone (IP) (Fig. 8c and d) were similar to those obtained in the absence of spheres (Fig. 8b). However, in the presence of IP-loaded NanoMBGs, osteoclasts in coculture exhibited a lower resorptive activity and superficial erosion marks were observed (Fig. 8e and f), probably due to the IP action in agreement with the mechanisms of this agent [42]. Different authors have demonstrated that the bone-resorbing activity of osteoclasts is regulated by Ca^{2+} levels and that high concentrations of this cation produce osteoclast retraction and dissipation of sealing zone, decreasing the bone resorption process [43,44]. Concerning IP mechanism, it has been described that IP inhibits the fusion of osteoclast precursor cells, bone resorption and tartrate-resistant acid phosphatase activity. These effects are mediated by specific IP receptors that induce a rapid increase in intracellular $[Ca^{2+}]$ followed by a sustained elevation of this cation in osteoclasts and their precursor cells [42]. It must be highlighted that only a minor fraction of IP is released after 7 days from NanoMBG-IPs when soaked in isopropanol: water solution, in which IP is highly soluble. In cell culture media, the supposedly smaller amount of IP released seems to be enough to decrease the resorptive activity of osteoclasts. We envision that this behavior could be beneficial for the local delivery treatment of osteoporotic bone. Osteoporosis requires prolonged periods of drug administration. In the case of IP, the bioactive dosage strongly varies depending on the administration way. For instance, IP biodisponibility in plasma after oral administration is only 20% and around 120 mg per day of ipriflavone is required in plasma. The loading rate of IP in NanoMBGs is 13% and the *in vitro* release test suggests that only a minor fraction of the payload by diffusion through the radial pores of the shell. However, in contact with bone cells, this payload seems to be enough to initially decrease the resorptive activity

of osteoclasts.

4. Conclusions

Mesoporous bioactive nanospheres in the system SiO_2-CaO (NanoMBGs) have been prepared via dual template method. NanoMBGs exhibit a hollow core and a radial mesoporous arrangement at the shell. The porous structure of these nanospheres allowed the loading of ipriflavone obtaining NanoMBG-IPs. However, ipriflavone is a highly insoluble compound in aqueous environment like culture media or human plasma. Even in low-polar conditions, where IP is highly soluble, most of the drug remains retained within the nanoparticles core. This fact would suggest that, under less favorable hydric physiological conditions, IP would be kept for longer periods, and it would enable the local long term pharmacological treatment.

NanoMBGs did not induce the macrophage polarization towards the M1 pro-inflammatory phenotype in basal conditions, promoting the control of the M1/M2 balance with a slight shift towards M2 reparative phenotype, increasing the response capability against stimuli (LPS and IL-4) and ensuring an appropriate immune response. The intracellular incorporation of FITC-NanoMBG after 7 days, detected in monocultures and cocultures of osteoblasts and osteoclasts, was significantly higher in osteoblasts. NanoMBG-IPs induced a significant decrease of osteoclast cell number and resorption activity in coculture with osteoblasts without affecting osteoblast proliferation and viability. All these data ensure an appropriate immune response to these nanospheres and the potential application of NanoMBG-IPs as local drug delivery system in osteoporotic patients. Further studies will be performed with *in vivo* models in order to determine the advantages of these NanoMBG-IPs to other anti-osteoporotic treatments and these results will be included in a future manuscript.

Acknowledgements

This study was supported by research grants from Spanish MINECO (MAT2015-64831-R, MAT2016-75611-R AEI/FEDER, UE). MVR acknowledges funding from the European Research Council (Advanced Grant VERDI; ERC-2015-AdG Proposal No.694160). LC acknowledges the financial support from Comunidad de Madrid (Spain, CT4/17/CT5/17/PEJD-2016/BMD-2749). NGC is greatly indebted to Ministerio de Ciencia e Innovación for her predoctoral fellowship. The authors wish to thank the ICTS Centro Nacional de Microscopia Electrónica (Spain), CAI X-ray Diffraction, CAI NMR, CAI Flow Cytometry and Fluorescence Microscopy of the Universidad Complutense de Madrid (Spain) for their technical assistance.

References

[1] A.M. Parfitt, Targeted and nontargeted bone remodeling: relationship to basic multicellular unit origination and progression, Bone 30 (2002) 5–7.
[2] S. Harada, G.A. Rodan, Control of osteoblast function and regulation of bone mass, Nature 423 (2003) 349–355.
[3] E.J. Mackie, Osteoblasts: novel roles in orchestration of skeletal architecture, Int. J. Biochem. Cell Biol. 35 (2003) 1301–1305.
[4] G. Karsenty, E.F. Wagner, Reaching a genetic and molecular understanding of skeletal development, Dev. Cell. 2 (2002) 389–406.
[5] W.J. Boyle, W.S. Simonet, D.L. Lacey, Osteoclast differentiation and activation, Nature 423 (2003) 337–342.
[6] A. Qin, T.S. Cheng, N.J. Pavlos, Z. Lin, K.R. Dai, M.H. Zheng, V-ATPases in osteoclasts: structure, function and potential inhibitors of bone resorption, Int. J. Biochem. Cell Biol. 44 (2012) 1422–1435.
[7] H.K. Väänänen, Y.K. Liu, P. Lehenkari, T. Uemara, How do osteoclasts resorb bone? Mater. Sci. Eng. C6 (1998) 205–209.
[8] X. Chen, Z. Wang, N. Duan, G. Zhu, E.M. Schwarz, C. Xie, Osteoblast–osteoclast interactions, Connect Tissue Res. 8 (2017) 1–9.
[9] M.C. Matesanz, J. Linares, L. Lilue, S. Sánchez-Salcedo, M.J. Feito, D. Arcos, M. Vallet-Regí, M.T. Portolés, Nanocrystalline silicon substituted hydroxyapatite effects on osteoclast differentiation and resorptive activity, J. Mater. Chem. B 2 (2014) 2910–2919.
[10] L. Casarrubios, M.C. Matesanz, S. Sánchez-Salcedo, D. Arcos, M. Vallet-Regí, M.T. Portolés, Nanocrystallinity effects on osteoblast and osteoclast response to silicon substituted hydroxyapatite, J. Colloid Interf. Sci. 482 (2016) 112–120.
[11] D.A. Glass II, P. Bialek, J.D. Ahn, M. Starbuck, M.S. Patel, H. Clevers, M.M. Taketo, F. Long, A.P. McMahon, R.A. Lang, G. Karsenty, Canonical Wnt signaling in differentiated osteoblasts controls osteoclast differentiation, Dev. Cell. 8 (2005) 751–764.
[12] T. Suda, N. Takahashi, N. Udagawa, E. Jimi, M.T. Gillespie, T.J. Martin, Modulation of osteoclast differentiation and function by the new members of the tumor necrosis factor receptor and ligand families, Endocr. Rev. 20 (1999) 345–357.
[13] S. Wang, W.S. El-Deiry, TRAIL and apoptosis induction by TNF-family death receptors, Oncogene 22 (2003) 8628–8633.
[14] J.E. Aubin, Perspectives: osteoclast adhesion and resorption: the role of podosomes, J. Bone Miner. Res. 7 (1992) 365–368.
[15] R. Detsch, D. Hagmeyer, M. Neumann, S. Schaefer, A. Vortkamp, M. Wuelling, G. Ziegler, M.T. Epple, The resorption of nanocrystalline calcium phosphates by osteoclast-like cells, Acta Biomater. 6 (2010) 3223–3233.
[16] H.C. Blair, S.L. Teitelbaum, R. Ghiselli, S. Gluck, Osteoclastic bone resorption by a polarized vacuolar proton pump, Science 245 (1989) 855–857.
[17] H.C. Blair, N.A. Athanasou, Recent advances in osteoclast biology and pathological bone resorption, Histol. Histopathol. 19 (2004) 189–199.
[18] S.L. Teitelbaum, Bone resorption by osteoclasts, Science 289 (2000) 1504–1508.
[19] L.J. Raggatt, N.C. Partridge, Cellular and molecular mechanisms of bone remodeling, J. Biol. Chem. 285 (2010) 25103–25108.
[20] X. Feng, J.M. McDonald, Disorders of bone remodeling, Annu. Rev. Pathol. 6 (2011) 121–145.
[21] S. Portal-Núñez, A. Mediero, P. Esbrit, O. Sánchez-Pernaute, R. Largo, G. Herrero-Beaumont, Unexpected bone formation produced by RANKL blockade, Trends Endocrin. Met. 28 (2017) 695–758.
[22] T. Luhmann, O. Germershaus, J. Groll, L. Meinel, Bone targeting for the treatment of osteoporosis, J. Contr. Release 161 (2012) 198–213.
[23] M. Vallet-Regí, D. Arcos, Sol-gel silica based biomaterials and bone tissue regeneration, Acta Biomater. 6 (2010) 2874–2888.
[24] J.Y.L. Reginster, Ipriflavone: pharmacological properties and usefulness in postmenopausal osteoporosis, Bone Min. 23 (1993) 223–232.
[25] G. Mazzuoli, E. Romagnoli, V. Carnevale, A. Scarda, L. Scarnecchia, M.T. Pacitti, R. Rosso, S. Minisola, Effects of ipriflavone on bone remodeling in primary hyperparathyroidism, Bone Min. 19 (Suppl. 1) (1992) S27–S33.
[26] Y. Li, B.P. Bastakoti, Y. Yamauchi, Smart Soft-Templating Synthesis of Hollow mesoporous bioactive glass spheres, Chem. Eur. J. 21 (2015) 8038–8042.
[27] P. Perugini, I. Genta, B. Conti, T. Modena, F. Pavanetto, Periodontal delivery of ipriflavone: new chitosan/PLGA film delivery system for a lipophilic drug, Int. J. Pharm. 252 (2003) 1–9.
[28] P.A. Tarantili, H. Koumoulos, Sustained release of guaifenesin and ipriflavone from biodegradable coatings, Eur. Polym. J. 44 (2008) 444–452.
[29] A. López-Noriega, D. Arcos, M. Vallet-Regí, Functionalizing mesoporous bioglasses for long-term anti-osteoporotic drug delivery, Chemistry 16 (2010) 10879–10886.
[30] D.M. Mosser, J.P. Edwards, Exploring the full spectrum of macrophage activation, Nat. Rev. Immunol. 8 (2008) 958–969.
[31] S.E. Burastero, Z. Magnani, C. Confetti, L. Abbruzzese, S. Oddera, P. Balbo, G.A. Rossi, E. Crimi, Increased expression of the CD80 accessory molecule by alveolar macrophages in asthmatic subjects and its functional involvement in allergen presentation to autologous TH2 lymphocytes, J. Allergy Clin. Immunol. 103 (1999) 1136–1142.
[32] J.M. Hodge, M.A. Kirkland, G.C. Nicholson, Multiple roles of M-CSF in human osteoclastogenesis, J. Cell. Biochem. 102 (2007) 759–768.
[33] N. Takahashi, K. Maeda, A. Ishihara, S. Uehara, Y. Kobayashi, Regulatory mechanism of osteoclastogenesis by RANKL and Wnt signals, Front. Biosci. 16 (2011).
[34] S. Huh, J.W. Wiench, J.-C. Yoo, M. Pruski, V.S.-Y. Lin, Organic functionalization and morphology control of mesoporous silicas via a co-condensation synthesis method, Chem. Mater. 15 (2003) 4247–4256.
[35] R. Mathew, P.N. Gunawidjaja, I. Izquierdo-Barba, K. Jansson, A. García, D. Arcos, M. Vallet-Regí, M. Edén, Solid-state 31P and 1H NMR investigations of amorphous and crystalline calcium phosphates grown biomimetically from a mesoporous bioactive glass, J. Phys. Chem. C 115 (2011) 20572–20582.
[36] N. Gómez-Cerezo, I. Izquierdo-Barba, D. Arcos, M. Vallet-Regí, Tailoring the biological response of mesoporous bioactive materials, J. Mater. Chem. B 3 (2015) 3810–3819.
[37] S.B. Rodan, Y. Imai, M.A. Thiede, G. Wesolowski, D. Thompson, Z. Bar-Shavit, S. Shull, K. Mann, G.A. Rodan, Characterization of a human osteosarcoma cell line (Saos-2) with osteoblastic properties, Cancer Res. 47 (1987) 4961–4966.
[38] X. Liu, Side-scattered light (SSC), in: W. Dubitzky, O. Wolkenhauer, K.H. Cho, H. Yokota (Eds.), Encyclopedia of Systems Biology, Springer, New York, NY, 2013.
[39] J.M. Udall, R.A. Moscicki, F.I. Preffer, P.D. Ariniello, E.A. Carter, A.K. Bhan, K.J. Bloch, Flow cytometry: a new approach to the isolation and characterization of Kupffer cells, Adv. Exp. Med. Biol. 216 (1987) 821–827.
[40] F.Y. McWhorter, T. Wang, P. Nguyen, T. Chung, W.F. Liu, Modulation of macrophage phenotype by cell shape, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 110 (2013)17253–172538.
[41] J. Linares, A.B. Fernández, M.J. Feito, M.C. Matesanz, S. Sánchez-Salcedo, D. Arcos, M. Vallet-Regí, J.M. Rojo, M.T. Portolés, Effects of nanocrystalline hydroxyapatites on macrophage polarization, J. Mater. Chem. B 4 (2016) 1951–1959.
[42] A. Miyauchi, K. Notoya, S. Taketomi, Y. Takagi, Y. Fujii, K. Jinnai, K. Takahashi, K. Chihara, T. Fujita, Novel ipriflavone receptors coupled to calcium influx regulate osteoclast differentiation and function, Endocrinology 137 (1996) 3544–3550.
[43] Z. Li, K. Kong, W. Qi, Osteoclast and its roles in calcium metabolism and bone development and remodeling, abbreviation, Biochem. Biophys. Res. Commun. 343 (2006) 345–350.
[44] S.Y. Hwang, J.W. Putney, Calcium signaling in osteoclasts, Biochim. Biophys. Acta 2011 (1813) 979–983.

Artículo 3: Nanomaterials 2020, 10: 2573

"Ipriflavone-loaded mesoporous nanospheres with potential applications for periodontal treatment" L.Casarrubios, N.Gómez-Cerezo, M.J.Feito, M.Vallet-Regí, D.Arcos, M.T.Portolés

En este trabajo se evaluó la incorporación de nanoesferas mesoporosas marcadas con FITC (nanoMBGs-FITCs) y los efectos de estas nanopartículas cargadas con ipriflavona (nanoMBG-IPs) en preosteoblastos MC3T3-E1, como modelo experimental de osteogénesis *in vitro*. Para identificar los mecanismos endocíticos por los que estas nanoesferas se incorporan dentro de los preosteoblastos, las células se trataron con cinco inhibidores específicos de diferentes procesos de endocitosis (citocalasina B, citocalasina D, clorpromazina, genisteína y wortmannina) antes de la adición de estas nanopartículas marcadas con isotiocianato de fluoresceína (nanoMBG-FITCs). Los resultados indicaron que estas nanoesferas se incorporan en los preosteoblastos principalmente a través de mecanismos dependientes de clatrina y en menor proporción por macropinocitosis. La incorporación activa de nanoMBG-IPs por parte de las células osteoprogenitoras MC3T3-E1 estimuló su diferenciación hacia el fenotipo de osteoblastos maduros, presentando una mayor actividad de la fosfatasa alcalina como marcador específico de osteogénesis. El objetivo final de este estudio fue demostrar la biocompatibilidad y el comportamiento osteogénico de las nanopartículas bioactivas cargadas con IP para su posible utilización en el tratamiento de hueso osteoporótico y defectos periodontales.

nanomaterials

MDPI

Article

Ipriflavone-Loaded Mesoporous Nanospheres with Potential Applications for Periodontal Treatment

Laura Casarrubios [1], Natividad Gómez-Cerezo [2,3], María José Feito [1], María Vallet-Regí [2,3,*], Daniel Arcos [2,3,*] and María Teresa Portolés [1,3,*]

[1] Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Complutense de Madrid, Instituto de Investigación Sanitaria del Hospital Clínico San Carlos (IdISSC), 28040 Madrid, Spain; laura.casarrubios.molina@gmail.com (L.C.); mjfeito@ucm.es (M.J.F.)

[2] Departamento de Química en Ciencias Farmacéuticas, Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid, Instituto de Investigación Sanitaria Hospital 12 de Octubre i+12, Plaza Ramón y Cajal s/n, 28040 Madrid, Spain; magome21@ucm.es

[3] CIBER de Bioingeniería, Biomateriales y Nanomedicina, CIBER-BBN, 28040 Madrid, Spain

* Correspondence: vallet@ucm.es (M.V.-R.); arcosd@ucm.es (D.A.); portoles@quim.ucm.es (M.T.P.)

Received: 3 December 2020; Accepted: 18 December 2020; Published: 21 December 2020



Abstract: The incorporation and effects of hollow mesoporous nanospheres in the system SiO_2–CaO (nanoMBGs) containing ipriflavone (IP), a synthetic isoflavone that prevents osteoporosis, were evaluated. Due to their superior porosity and capability to host drugs, these nanoparticles are designed as a potential alternative to conventional bioactive glasses for the treatment of periodontal defects. To identify the endocytic mechanisms by which these nanospheres are incorporated within the MC3T3-E1 cells, five inhibitors (cytochalasin B, cytochalasin D, chlorpromazine, genistein and wortmannin) were used before the addition of these nanoparticles labeled with fluorescein isothiocyanate (FITC–nanoMBGs). The results indicate that nanoMBGs enter the pre-osteoblasts mainly through clathrin-dependent mechanisms and in a lower proportion by macropinocytosis. The present study evidences the active incorporation of nanoMBG–IPs by MC3T3-E1 osteoprogenitor cells that stimulate their differentiation into mature osteoblast phenotype with increased alkaline phosphatase activity. The final aim of this study is to demonstrate the biocompatibility and osteogenic behavior of IP-loaded bioactive nanoparticles to be used for periodontal augmentation purposes and to shed light on internalization mechanisms that determine the incorporation of these nanoparticles into the cells.

Keywords: endocytosis; ipriflavone; mesoporous nanospheres; nanoparticles; oxidative stress; pre-osteoblasts

1. Introduction

Bioactive glasses are a group of bioceramics that exhibit bone regeneration properties. Since their discovery in 1971, over 1.5 million patients have been treated with Bioglass 45S5, the original four-component Bioglass composition (45 wt % SiO_2, 24.5 wt % CaO, 24.5 wt % Na_2O, 6 wt % P_2O_5). In addition to orthopedic surgery as bone graft substitutes, bioactive glasses applications in dentistry involve their use as dental restorative materials, mineralizing agents, coating material for dental implants, pulp capping and root canal treatment [1]. The first particulate form of Bioglass, trademark PerioGlass®, in 1993, is still sold for the treatment of periodontal defects and has become a standard for the treatment of these types of clinical defects [2].

The research developed during the subsequent decades has resulted in new materials that significantly differs from the original melt-derived Bioglass 45S5. The use of the sol–gel process in the

1990s [3,4], the preparation of bioactive star gels [5] and the development of mesoporous bioactive glasses (MBG) revealed new potential applications in the field of bone tissue regeneration and drug delivery platforms [6–8]. Compared to conventional bioactive glasses, MBGs exhibit higher surface area and porosity, which give them excellent drug-loading ability and superior bone-forming capacity [9–11]. These characteristics make MBGs very attractive as bone-graft material to be used in the regeneration of periodontal bone defects since they can augment the height and bone volume of the alveolar ridge for the insertion of dental implants, whereas they can deliver antibiotic or antiosteoporotic drugs to prevent infection or promote bone healing in the case of patients with diminished bone-forming capability, respectively.

The advances in nanomedicine have opened new research lines involving the synthesis and development of nanoparticles, including carbon-based nanomaterials, hydroxyapatite, iron oxide, zirconia, silica, silver or titania, among others [12]. Thus, nanodentistry is a consequence of the progress in nanomaterials, tissue engineering and nanomedicine, being very beneficial for diagnostic procedures, treatment and prevention of oral and dental diseases. Currently, the use of nanoparticles in dentistry comprises dental filling, reinforcement of dental implants, polishing of enamel surface, prevention of caries, teeth whitening and anti-sensitivity agents [13]. In this sense, recent advances have been made with gold nanoparticles as a biomaterial in dentistry due to their antifungal and antibacterial activity, mechanical properties and availability of different sizes and concentrations [14]. However, the studies focused on the use of bioactive nanoparticles for periodontal bone augmentation are very scarce, and most of them have been carried out with hydroxyapatite nanoparticles [15,16]. In this context, the recent developments in the preparation of mesoporous bioactive glass nanoparticles could provide a very interesting alternative for this purpose [17–20]. On the other hand, the coupling of osteogenesis and angiogenesis is crucial in periodontal tissue regeneration and biomaterials loaded with different agents that act synergistically on both processes are very recently being designed to achieve periodontal regeneration [21].

One of the most interesting strategies to promote bone regeneration under osteoporotic conditions consists of loading bioactive materials with different drugs to treat osteoporotic bone by either promoting the osteogenesis process or inhibiting the activity of osteoclasts, or both [22,23]. Among the drugs used for this purpose, it has been shown that ipriflavone (IP) prevents osteoporosis by inhibiting bone resorption [24]. On the other side, oral administration of IP (1200 mg daily) to subjects diagnosed of primary hyperparathyroidism indicated that this drug has great potential in the therapy of metabolic bone pathologies in which there is high bone turnover [25]. As a nanotherapeutic strategy, different inorganic nanoparticles have been designed for drug incorporation and intraosseous administration in osteoporosis and regenerative therapies for bone diseases [26,27]. This type of administration, with nanoparticles loaded with drugs that will be released inside the bone cells, allows significantly reducing the quantity of drug required to carry out the desired effect.

In the present work, we have evaluated the effects of mesoporous bioactive nanospheres (nanoMBGs) loaded with IP on MC3T3-E1 osteoprogenitor cells, the most relevant model of *in vitro* osteogenesis [28], as a nanotherapeutic strategy to promote bone regeneration. The rationale behind this selection is the osteogenic potential and drug delivery capabilities of nanoMBGs, which could provide an excellent strategy as a bone graft for periodontal defects and also for the treatment of infections and inflammatory processes such as those that occur in periodontitis. These nanospheres are synthesized in the ternary system SiO_2–CaO–P_2O_5 and have shown excellent *in vitro* bioactive behavior in previous studies [29]. Since the effectiveness of treatment with nanoparticles designed for intracellular drug release depends on their efficient incorporation into cells, we have investigated the mechanisms of incorporation of these nanospheres into pre-osteoblasts. Thus, to identify the endocytic mechanisms by which these nanoMBGs are incorporated within the MC3T3-E1 cells, five inhibitors (cytochalasin B, cytochalasin D, chlorpromazine, genistein and wortmannin) were used before the addition of these nanoparticles labeled with fluorescein isothiocyanate (FITC–nanoMBGs). On the other hand, to assess the intracellular action of the drug, the effects of unloaded and IP-loaded nanospheres

(nanoMBG–IPs) on MC3T3-E1 pre-osteoblasts were evaluated in a comparative study by analyzing the following cellular parameters: cell viability, apoptosis, cell cycle, intracellular content of reactive oxygen species, intracellular content of Ca^{2+}, production of interleukin 6, alkaline phosphatase activity and matrix mineralization. The study of all these parameters is focused on testing the absence of cytotoxicity of nanoMBG–IPs and their potential as a nanotherapeutic strategy for the intracellular delivery of ipriflavone to promote osteogenesis in the periodontal defects. The final aim of this study is to demonstrate the biocompatibility and osteogenic behavior of nanoMBG–IP and to shed light on the mechanisms that rule the incorporation of these nanoparticles into the cells.

2. Materials and Methods

2.1. Preparation, Characterization and Labeling of Mesoporous SiO_2–CaO Nanospheres

Mesoporous SiO_2–CaO–P_2O_5 nanospheres (nanoMBGs) were synthesized following the method described in previous work [30]. This method consists of the preparation of an O/W emulsion where two different templates are dissolved. Briefly, poly(styrene)-block-poly(acrylic acid) (PS-b-PAA) with average Mw = 38,000, was dissolved in tetrahydrofuran (THF) and poured on a hexadecyltrimethylammonium bromide (CTAB) water solution. Then, the appropriated amounts of $Ca(NO_3)_2{\cdot}4H_2O$, triethyl phosphate (TEP) and tetraethyl orthosilicate (TEOS) were added dropwise dissolved in water and ethanol, respectively. After 24 h stirring, the product was collected by centrifugation, dried and calcined at 550 °C to remove the organic templates (see Supplementary Materials for a detailed description of the synthesis).

Scanning electron microscopy (SEM) and transmission electron microscopy (TEM) images were collected with a JEOL F-6335 microscope and a JEOL-1400 microscope (JEOL, Tokyo, Japan), respectively.

Textural properties were studied by means of nitrogen adsorption analysis using an ASAP 2020 equipment (Micromeritics, Norcross, GA, USA). For this aim, nanoMBGs were degassed at 150 °C for 15 h. Fourier-transform infrared spectroscopy (FT-IR) was carried out using a Nicolet Magma IR 550 spectrometer (Nicolet Instruments, Madison, WI, USA). In order to collect more information from the surface of the nanoparticles, the spectra were collected by means of the attenuated total reflectance (ATR) sampling technique. Thermogravimetric analysis (TGA) was performed using a TG/DTA Seiko SSC/5200 thermobalance (SEIKO instruments, Chiba, Japan). The samples were heated from 50 to 600 °C at a heating rate of 1 °C min^{-1}, using α-Al_2O_3 as reference.

For fluorescein isothiocyanate (FITC)-labeling, aminopropyl triethoxysilane (APTES) was dissolved in ethanol. Subsequently, 0.6 mg of fluorescein isothiocyanate was added and stirred for 5 h. This solution was added dropwise on the nanoMBG particle suspension, and the labeled particles were washed and collected by centrifugation (see Supplementary Materials for a detailed description of the labeling).

2.2. Antiosteoporotic Drug Loading

Ipriflavone (IP) was chosen as an antiosteoporotic drug for this study. For this aim, 300 mg of IP (7-isopropoxy-3-phenyl-4H-1-benzopyran-4-one) were dissolved in 6 mL of acetone as previously reported [31]. Subsequently, 80 mg of nanoMBGs were poured on this solution and stirred in a rotatory incubator at 100 rpm for 24 h. Ipriflafone-loaded nanoparticles (nanoMBG–IP) were filtered and washed with acetone and water, thus removing the excess of IP physically adsorbed on the external surface.

2.3. Cell Culture of MC3T3-E1 Pre-Osteoblasts for FITC–NanoMBG Incorporation. Evaluation of the Endocytic Mechanisms for FITC-NanoMBG Cell Entry

Since MC3T3-E1 osteoprogenitor cells are the most relevant model of in vitro osteogenesis [28], this cell line was chosen to investigate the entry mechanisms of these mesoporous bioactive nanospheres labeled with FITC in undifferentiated osteoblasts. This cell line was kindly provided by Dr. B.T. Pérez-Maceda (CIB, CSIC, Madrid, Spain). On the other hand, in this study, we have analyzed the

effects of these nanospheres loaded with ipriflavone on the differentiation of pre-osteoblasts into mature osteoblasts, as explained below. For FITC–nanoMBG incorporation studies, MC3T3-E1 pre-osteoblasts (10^5 cells/mL) were seeded in 24 well culture plates with Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, USA) with fetal bovine serum (FBS, Gibco, BRL, 10% *vol*/*vol*), 1 mM L-glutamine (BioWhittaker Europe, Verviers, Belgium) and antibiotics (200 µg penicillin and 200 µg streptomycin per mL, BioWhittaker Europe, Verviers, Belgium). Cells were cultured for 24 h in a 5% CO_2 incubator at 37 °C, and different doses of FITC–nanoMBGs (10, 30 and 50 µg/mL) were added afterward into the culture medium and maintained several times. Cells were harvested with trypsin-EDTA (0.25%), and FITC–nanoMBG incorporation was quantified through flow cytometry. The FITC–nanoMBG fluorescence was detected in a FACScalibur Becton Dickinson flow cytometer with a 530/30 filter, exciting the sample at 488 nm. The data acquisition and flow cytometric analysis conditions were set through negative and positive controls using the CellQuest Program of Becton Dickinson and maintained for all measurements. A total of 10^4 cells were analyzed in each sample in order to ensure a correct statistical significance.

To identify the endocytic mechanisms by which these FITC–nanoMBG nanospheres are incorporated within the MC3T3-E1 cells, the inclusion in the culture medium of several specific endocytosis inhibitors was carried out before adding the nanoparticles, maintaining the cells 2 h under these conditions. The endocytosis inhibitors were: 20 µM cytochalasin B (MP Biomedicals, Eschwege, Germany), 4 µM cytochalasin D (MP Biomedicals, Eschwege, Germany), 30 µM chlorpromazine (Enzo Life Sciences, Barcelona, Spain), 3.7 µM genistein (Enzo Life Sciences, Barcelona, Spain), and 23 µM wortmannin (Enzo Life Sciences, Barcelona, Spain). Then, the culture medium was changed by a fresh medium containing 50 µg/mL FITC–nanoMBGs and cells were maintained for 2 h at 37 °C in a 5% CO_2 incubator. Finally, cells were collected with trypsin-EDTA (0.25%) and the FITC–nanoMBG incorporation in each case was quantified by flow cytometry as stated above. All the analyses were compared with their respective controls without inhibitors.

2.4. Cell Size and Complexity Analysis

To study the cell size and complexity, forward angle (FSC) and side angle (SSC) scatters were detected, respectively, in a FACScalibur Becton Dickinson flow cytometer. A total of 10^4 cells were analyzed in each sample in order to ensure a correct statistical significance.

2.5. Cell Viability Studies

Cell viability was measured by adding 0.005% (wt/vol) propidium iodide (PI) in PBS (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) into the samples to stain the dead cells. The PI exclusion indicates the plasma membrane integrity. PI fluorescence was detected in a FACScalibur Becton Dickinson flow cytometer (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA) with a 530/30 filter, exciting the sample at 488 nm. A total of 10^4 cells were analyzed in each sample in order to ensure a correct statistical significance.

2.6. Cell-Cycle Analysis and Apoptosis Detection by Flow Cytometry

Cells in 0.5 mL of PBS were mixed with 4.5 mL of ethanol 70% and maintained overnight at 4 °C. Cell suspensions were then centrifuged for 10 min at 310× *g* and resuspended in 0.5 mL of RNAsa solution containing 0.1% Triton X-100, 20 µg/mL of IP and 0.2 mg/mL of RNAsa (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). After 30 min of incubation at 37 °C, PI fluorescence was detected in a FACScan Becton Dickinson flow cytometer with a 585/42 filter, exciting the sample at 488 nm. The CellQuest Program of Becton Dickinson was used to calculate the percentage of cells in each cycle phase: G_0/G_1 (growth), S (DNA synthesis) and G_2/M (growth and mitosis). To quantify the cell apoptosis, the $SubG_1$ fraction (cells with fragmented DNA) was evaluated. A total of 10^4 cells were analyzed in each sample in order to ensure a correct statistical significance.

2.7. Intracellular Reactive Oxygen Species (ROS) Content

Cell suspensions were incubated for 30 min at 37 °C with 100 μM of 2′,7′-dichlorofluorescein diacetate (DCFH/DA, Serva, Heidelberg, Germany). DCFH/DA can penetrate the cells and can be hydrolyzed by cytosolic esterases, producing DCFH, which is instantly oxidized by ROS to DCF, highly fluorescent and whose fluorescence intensity depends directly on the intracellular content of reactive oxygen species (ROS). DCF fluorescence was measured in a FACScalibur Becton Dickinson flow cytometer with a 530/30 filter, exciting the sample at 488 nm. A total of 10^4 cells were analyzed in each sample in order to ensure a correct statistical significance.

2.8. Confocal Microscopy Studies

Cells were cultured on circular glass coverslips with 50 μg/mL FITC–nanoMBGs in the culture medium for 24 h. Afterward, cells were fixed with p-formaldehyde (3.7%) and permeated, adding 500 μL of Triton-X100 (0.1% in PBS). After 20 min of incubation with BSA (1% in PBS), samples were stained with 100 μL of rhodamine-phalloidin 1:40, washed with PBS and stained with 100 μL of 4′,6-diamidino-2-phenylindole (3×10^{-6} M in PBS, DAPI, Molecular Probes, Inc., Eugene, OR, USA). Finally, samples were observed through a Leica SP2 confocal laser scanning microscope. The fluorescence of rhodamine and DAPI were excited at 540 and 405 nm, respectively, and detected at 565 and 420/586 nm, respectively.

2.9. Intracellular Calcium Content

After incubation of cell suspensions for 30 min with the probe Fluo4-AM (5 μM, Thermo Fisher Scientific, Madrid, Spain), which can penetrate the cells and be hydrolyzed by cytosolic esterases, Fluo4 fluorescence was measured in a FACScan Becton Dickinson flow cytometer with a 530/30 filter, exciting the sample at 488 nm. Finally, to check the assay sensitivity, A-23,187 ionophore (5 μM, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) was added to each sample. A total of 10^4 cells were analyzed in each sample in order to ensure a correct statistical significance.

2.10. Alkaline Phosphatase Activity

A total of 2×10^4 cells/mL were cultured in 24 well plates and maintained for 24 h in a 5% CO_2 incubator at 37 °C, with 1 mL/well of culture medium (DMEM with 10% FBS, 1 mM L-glutamine 1 mM and antibiotics), supplemented with 10 mM L-ascorbic acid and 50 μg/mL β-glycerolphosphate in order to promote cell differentiation. To evaluate the nanomaterial effects on alkaline phosphatase (ALP) activity, as a key indicator of osteoblast phenotype expression, 50 μg/mL of nanoMBGs with or without ipriflavone were added into the wells and cells were maintained for 11 days in a 5% CO_2 incubator at 37 °C, refreshing the culture medium every 4 days. ALP activity was detected using Reddi and Huggins´ method (Reddi and Huggins, 1972, SpinReact S.A., Girona, Spain), and the obtained values were normalized with respect to total cell protein content, measured using Bradford's method with bovine serum album (BSA) as standard.

2.11. Mineralization Assay

A total of 2×10^4 cells/mL were seeded in 12 well plates and maintained for 24 h in a 5% CO_2 incubator at 37 °C, with 1.5 mL/well of culture medium (DMEM with 10% FBS, 1 mM L-glutamine 1 mM and antibiotics), supplemented with 10 mM L-ascorbic acid and 50 μg/mL β-glycerophosphate in order to promote cell differentiation. Then, 50 μg/mL of nanoMBGs with or without ipriflavone were added into the wells and cells were maintained for 11 days in a 5% CO_2 incubator at 37 °C, refreshing the culture medium every 4 days. Afterward, the culture medium was removed, and the cell cultures were treated with glutaraldehyde (10%) as a fixer for 1 h. Then, cells were stained with 40 mM Alizarin Red at pH 4.2 for 45 min in order to analyze the matrix mineralization. Finally, the stained

extracellular deposits were dissolved with cetylpyridinium chloride (10% at pH 7), and the absorbance of the supernatants was measured at 620 nm.

2.12. Interleukin 6 (IL-6) Detection

The concentration of IL-6 secreted to the culture medium by 2×10^4 cells/mL, after treatment with 50 μg/mL of nanoMBGs with or without ipriflavone, was measured using an ELISA IL-6 kit (Gen-Probe, Diaclone). This method is based on a sandwich ELISA where plates are pre-coated with a capture antibody highly specific for IL-6 and, after the incubation with the samples, a biotinylated secondary antibody is added, and the correct unions are revealed with streptavidin-avidin conjugated with horseradish peroxidase in a colorimetric reaction which is quantified in an ELISA Plate Reader at 450 nm, with a sensitivity of 10 pg/mL and an inter-assay variation coefficient <10%. Recombinant cytokine was adopted as standard.

2.13. Statistics

The results obtained appear as means of three replicate experiments plus their standard deviations, analyzed with the 22nd version of Statistical Package for the Social Sciences (SPSS). Statistical comparisons were carried out with the analysis of variance (ANOVA), and Scheffé and Games–Howell test was employed for post hoc analysis of differences between study groups, considering $p < 0.005$ as statistically significant.

3. Results and Discussion

3.1. Characterization of Mesoporous Nanospheres

Prior to any biological assay, the main physic-chemical features of the nanoparticles must be determined. For this purpose, electron microscopy (SEM and TEM) experiments, textural properties determination and FTIR analysis before and after drug-loading was carried out. Figure 1a shows an SEM image of nanoMBGs, pointing out that this material is made of non-aggregated spheres ranging in size between 150 and 250 nanometers. The spheres show porosity accessible to the external surface. TEM image (Figure 1b) provides more detailed information about the porous structure of nanoMBG spheres. The TEM image evidence that our spheres are composed of an inner cavity of about 100 nm in diameter, surrounded by a shell that exhibits a radial porosity. These two types of porosity are clearly reflected in the nitrogen adsorption/desorption isotherm shown in Figure 1c. The adsorption isotherm corresponds to a highly porous material with high surface area (see Table 1) and with a wide hysteresis loop type H2, characteristic of ink bottle-like pore as a clear reflection of the wide central cavity connected to the narrow necks of the radial pores of the shell. Finally, FTIR spectra evidence the presence of ipriflavone after the loading process (Figure 1d) with the characteristic absorption band of this compound (see Figure S1 in Supplementary Materials). Thermogravimetric analysis indicated 18% in weight of ipriflavone-load (see Figure S2 in Supplementary Materials), and the decrease of the textural parameters also evidence that the drug is filling or even occluding the pores of the spheres (Table 1).

3.2. Effects of NanoMBGs and NanoMBG-IPs on Size, Complexity, Apoptosis and Cell Cycle of MC3T3-E1 Pre-Osteoblasts

Once the main physic-chemical characteristics of nanoMBGs were determined, we proceeded to assess the potentially deleterious effects that these nanoparticles could exert on pre-osteoblast in terms of cell size, complexity, apoptosis or harmful variations in the cell cycle. No changes in pre-osteoblast size and complexity (FSC and SSC, respectively) were observed after the intracellular incorporation of nanoMBGs or nanoMBG–IPs (see Figure S3 in Supplementary Materials). In this context, we have observed in previous studies with MC3T3-E1 pre-osteoblasts that the incorporation of another type of nanoparticles, such as graphene oxide nanosheets, produced alterations as the increase

in cell size (FSC) without changes in cell complexity (SSC) [32]. However, previous studies with RAW 264.7 macrophages and nanoMBGs evidenced a significant increase of macrophage complexity (SSC) after the treatment with these nanospheres due to their uptake by macrophages [29]. It is well known that these cell parameters, FSC and SSC, depend on different factors such as the cell surface and some organelles (lysosomes, mitochondria, nucleus or pinocytic vesicles) as well as on the presence of granulated material within the cell [33].

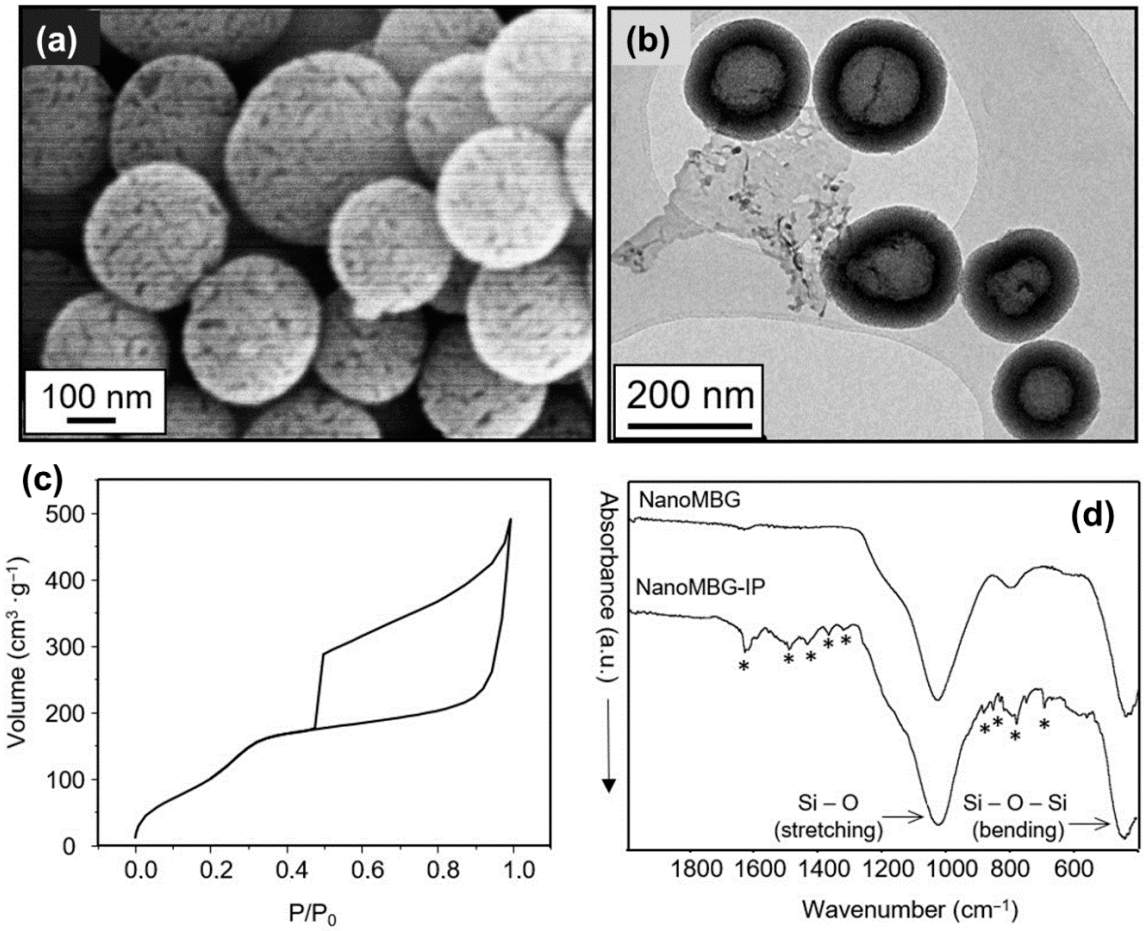


Figure 1. Characterization of mesoporous nanospheres. (**a**) scanning electron micrograph of hollow mesoporous nanospheres in the system SiO_2–CaO (nanoMBG) spheres. (**b**) Transmission electron image of nanoMBG spheres. (**c**) Nitrogen adsorption/desorption isotherm of nanoMBG spheres. (**d**) FTIR spectra of nanoMBG and IP-loaded nanospheres (nanoMBG–IP) spheres (* indicates the absorption bands corresponding to ipriflavone).

Table 1. Textural properties for nanoMBG and nanoMBG–IP spheres measured by N_2 adsorption.

Sample	Surface Area ($m^2 \cdot g^{-1}$)	Pore Volume ($cm^3 \cdot g^{-1}$)	Pore Size (nm)
nanoMBG	543.6	0.435	−2.5 nm
nanoMBG–IP	14.4	0.057	NA

The effects of nanoMBG and nanoMBG–IP nanospheres on cell cycle phases (G_0/G_1, S and G_2/M) of MC3T3-E1 pre-osteoblast and the percentage of cells in apoptosis ($SubG_1$ fraction) were analyzed. Figure 2 shows that the treatment with 50 µg/mL of nanospheres without ipriflavone for 24 h did not induce alterations on G_0/G_1, S and G_2/M phases. In the same way, nanoMBG–IPs did not induce changes in G_0/G_1 and G_2/M phases. Nevertheless, a significant increment ($p < 0.005$) of the synthesis

phase (S) was observed after the incubation of the MC3T3-E1 pre-osteoblasts with 50 μg/mL of nanoMBG–IPs, thus evidencing the protective impact of the ipriflavone into these cells. Moreover, nanoMBG and nanoMBG–IPs did not induce apoptosis on MC3T3-E1 pre-osteoblasts, detected as SubG1 fraction, in comparison with control cultures.

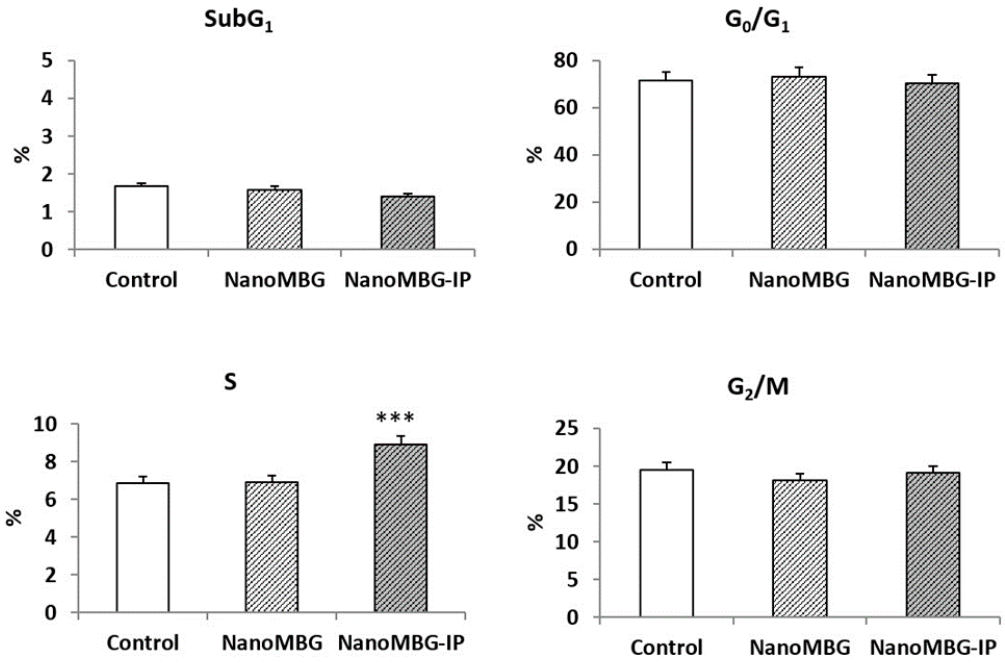


Figure 2. Effects of nanoMBGs and nanoMBG–IPs on cell cycle phases of MC3T3-E1 pre-osteoblasts and apoptosis percentage (Sub G_1 fraction) after 24 h of treatment with 50 μg/mL of nanospheres. Control conditions without nanospheres were performed at the same time. Statistical significance: *** $p < 0.005$.

3.3. Effects of NanoMBGs and NanoMBG-IPs on Viability, Intracellular Reactive Oxygen Species (ROS) and Calcium Content of MC3T3-E1 Pre-Osteoblasts

Although no adverse effects on cell cycle were observed and IP evidenced a protective impact, the incorporation of nanoparticles could trigger an increment of the intracellular content of reactive oxygen species (ROS), oxidative stress, a decrease of cell viability and toxicity mechanisms [34]. On the other hand, bioactive mesoporous materials exhibit a high capability for releasing Ca^{2+} and other ions such as soluble silicate that can stimulate the proliferation and differentiation of osteoblasts [35–37], inducing bone regeneration due to the release of these two ions [38]. Considering all these facts, in the present work, we have evaluated the cell viability, intracellular content of ROS and cytosolic calcium of MC3T3-E1 pre-osteoblasts after treatment with nanoMBGs and nanoMBG–IPs. Control conditions without nanospheres were performed at the same time. Figure 3 shows the obtained results. The fluorescence profiles of control cells, cells with Fluo4 and cells with Fluo4 plus A23187 ionophore are also shown in the lower-left figure. The fluorescence increase observed after the addition of A23187 ionophore to the cells demonstrates the sensitivity of the assay. No viability changes but significant decreases of both intracellular ROS and calcium content were observed after incubation with 50 μg/mL of nanoMBGs and nanoMBG–IPs. These results evidence the absence of oxidative stress or toxicity caused by these nanospheres in MC3T3-E1 pre-osteoblasts after their uptake.

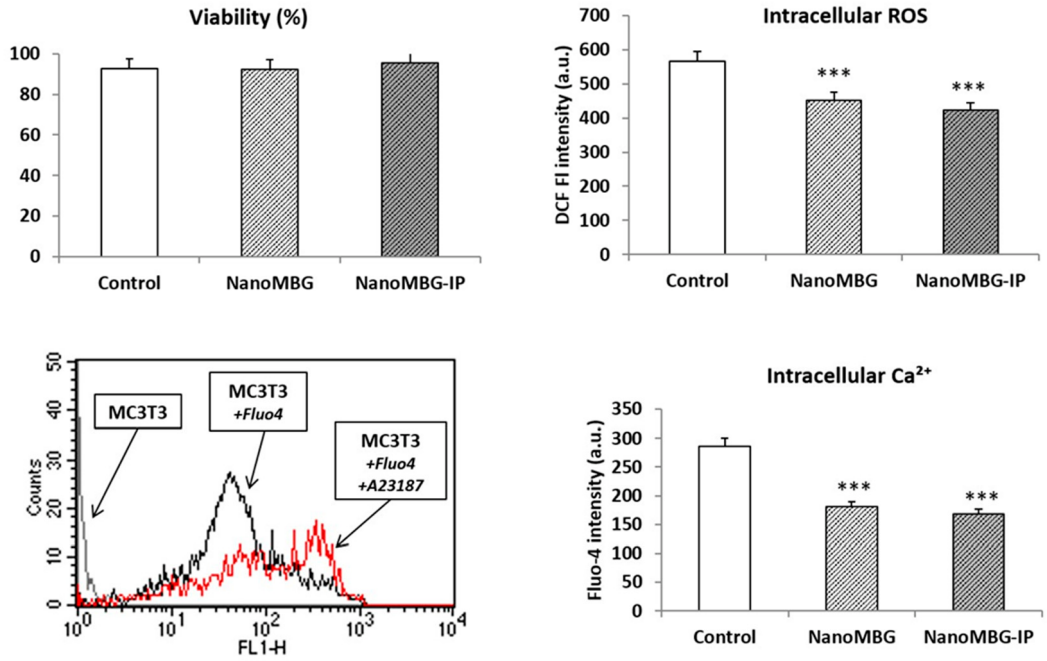


Figure 3. Effects of 50 μg/mL of nanoMBG and nanoMBG–IP nanospheres on viability, intracellular content of reactive oxygen species (ROS) and cytosolic calcium of MC3T3-E1 pre-osteoblasts, after 24 h of incubation. Control conditions without nanospheres were performed at the same time. Fluorescence profiles of control cells, cells with Fluo4 and cells with Fluo4 plus A23187 ionophore are shown in the lower-left figure. Statistical significance: *** $p < 0.005$.

3.4. *Effects of NanoMBGs and NanoMBG-IPs on Differentiation of MC3T3-E1 Pre-Osteoblasts*

The set of results obtained and described in Sections 3.2 and 3.3 evidence the excellent behavior in terms of cell viability and the absence of cytotoxicity of nanoMBGs and nanoMBG–IP. However, the application as osteoregenerative material requires the capability to stimulate the differentiation of the pre-osteoblasts toward the osteoblastic phenotype. The differentiation process of the MC3T3-E1 pre-osteoblasts includes three successive phases: (a) initial stage with active cell proliferation, but without expression of differentiation markers such as alkaline phosphatase (ALP) or mineral depositions; (b) intermediate stage with the maturation of the matrix and a high expression of ALP; and (c) final stage with matrix mineralization characterized by the presence of mineral depositions due to ALP activity [39,40]. On the other hand, ipriflavone is a synthetic drug that prevents osteoporosis by inhibiting bone resorption and maintaining bone thickness [24]. Thus, the use of nanoMBG–IPs for intracellular delivery of this drug could be a nanotherapeutic strategy to promote bone regeneration. In this context, we evaluate the impact of nanoMBG–IPs on MC3T3-E1 pre-osteoblast differentiation as a prototype of in vitro osteogenesis through the measurement of ALP activity and the quantification of matrix mineralization as key markers of MC3T3-E1 cell differentiation after 11 days of treatment with different doses of these nanospheres. Controls without nanospheres and with nanoMBGs, but without ipriflavone were performed at the same time.

Figure 4 shows that the cell incorporation of nanoMBG without ipriflavone induced a decrease of ALP activity compared to control cells after 11 days of incubation with 10 and 50 μg/mL. However, significant increases of ALP activity were observed after treatment with 5, 10 and 50 μg/mL of these nanospheres loaded with ipriflavone (nanoMBG–IPs), thus indicating the efficient intracellular release of IP and its positive in vitro effect on osteogenesis. The effect of the highest dose (50 μg/mL) of nanoMBG–IPs was lower than the obtained with 5 and 10 μg/mL of nanoMBG–IPs, evidencing the convenience of using lower doses than 50 μg/mL.

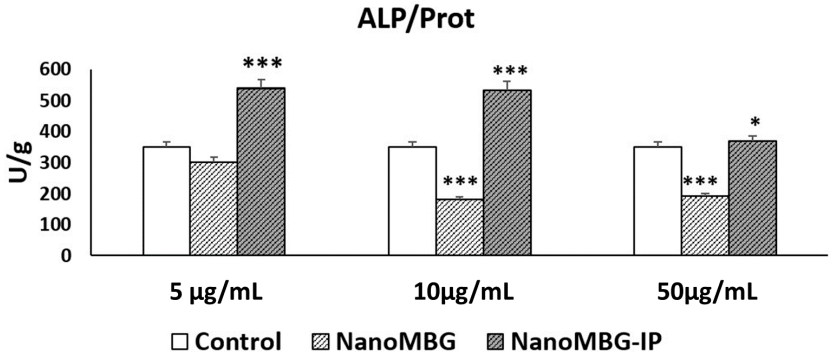


Figure 4. Effects of several doses of nanoMBGs and nanoMBG–IPs on MC3T3-E1 pre-osteoblast differentiation after 11 days, evaluated through the measurement of alkaline phosphatase (ALP) activity. Control conditions without nanospheres were performed at the same time. Statistical significance: *** $p < 0.005$, * $p < 0.05$.

Increases of matrix mineralization were detected after the incubation with 50 µg/mL of nanoMBGs and nanoMBG–IPs for 11 days, but these effects were not statistically significant (Figure S4, Supplementary Materials), probably as a result of the lower precision and sensitivity of this test.

The ALP activity results demonstrate the efficient intracellular release of the drug from the nanoMBG–IPs and suggest their potential application as intracellular drug delivery systems in a nanotherapeutic strategy to promote bone regeneration.

Regarding the effects of other nanoparticles on MC3T3-E1 cell differentiation, in previous studies with this cell type and graphene oxide (GO) nanosheets, we observed that the treatment with 40 µg/mL of 400 nm PEG-GO for 3 days did not affect the differentiation process 12 days after the intracellular uptake of the nanomaterial [32].

3.5. Effects of NanoMBGs and NanoMBG-IPs on Interleukin 6 (IL-6) Production by MC3T3-E1 Pre-Osteoblasts

Despite having demonstrated the absence of cytotoxicity of these nanospheres and having observed their capability to promote pre-osteoblast differentiation, the inflammatory response that any kind of nanoparticles could elicit should be evaluated. In this sense, the detection *in vitro* of inflammatory cytokines provides valuable information about these potential clinical complications. IL-6 is produced by many cells, including osteoblasts, monocytes, macrophages and bone marrow mononuclear cells [41]. In bone, this cytokine induces osteoclast differentiation [42,43]. On the other hand, recent studies in a murine model have shown the IL-6 is related to the processes of revascularization and bone formation after ischemic osteonecrosis [44]. In the present work, we have quantified the levels of IL-6 secreted by cultured MC3T3-E1 pre-osteoblasts after incubation with nanoMBGs and nanoMBG–IPs. Figure 5 suggests that no significant changes of IL-6 secretion were detected after treatment with these nanospheres.

With respect to IL-6, it is important to note that this cytokine and tumor necrosis factor-alpha (TNF-α) play a key role in the inflammatory response, infection and stress [45]. In the present work, no significant changes of *in vitro* IL-6 secretion by pre-osteoblasts were detected after nanoMBG and nanoMBG–IP treatment, thus indicating that the local nanomaterial administration *in vivo* would not trigger the production of this pro-inflammatory cytokine and would not activate the innate immune system. These results agree with the switch of the M1 pro-inflammatory macrophage phenotype to the M2 reparative phenotype previously observed [29].

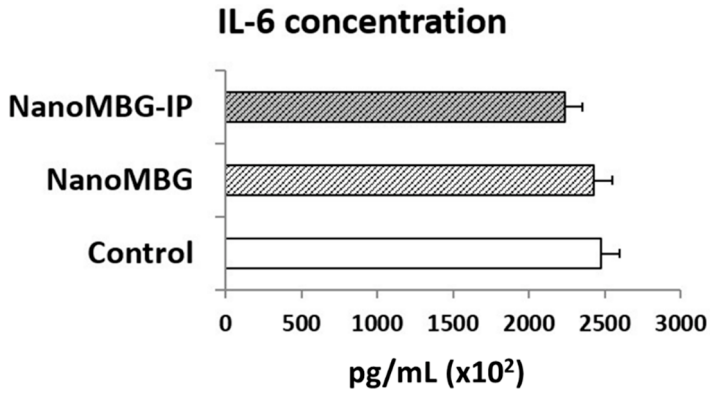


Figure 5. Effects of nanoMBGs and nanoMBG–IPs on interleukin 6 (IL-6) production by cultured MC3T3-E1 pre-osteoblasts after treatment with 50 μg/mL of nanospheres for 24 h. Control conditions without nanospheres were performed at the same time.

The results obtained so far evidence not only the excellent biocompatibility of nanoMBG–IP but also their capability to promote pre-osteoblasts differentiation towards osteoblast phenotype, thus confirming the osteogenic potential of nanoMBG–IP. In this sense, the intracellular release of the drug seems to play an important role in this process. The following experiments were carried out to shed some light on the mechanism that rules the incorporation of these nanoparticles within cells.

3.6. Uptake of NanoMBGs by MC3T3-E1 Pre-Osteoblasts

In order to evaluate the nanoparticles uptake by pre-osteoblast cells, nanoMBG nanospheres were labeled with FITC. As a first approach, MC3T3-E1 pre-osteoblasts were cultured for 15, 30 and 60 min with 10, 30 and 50 μg/mL of FITC–nanoMBG. The cells were then detached, and the amount of cell-associated fluorescence was detected by flow cytometry as a measure of the intracellular uptake of these nanospheres. As can be observed in Figure 6A, the fluorescence intensity of osteoprogenitor cells after each treatment reveals a fast and dose-dependent FITC–nanoMBG uptake after 15 min. On the other hand, a decrease in fluorescence related to the intracellular content of these nanospheres was observed after 60 min of treatment with all the doses used (Figure 6A). This fact indicates that, after FITC–nanoMBG uptake, the exocytosis of this nanomaterial also occurs, according to the process described for other nanoparticles in mammalian cells [46].

For confocal microscopy studies, the dose of 50 μg/mL of FITC–nanoMBGs and 24 h time were chosen to observe if the intracellular uptake of this nanomaterial by MC3T3-E1 pre-osteoblasts could damage the cytoskeleton structure in these conditions of high dose and longer treatment time. Control cultures without this nanomaterial were performed at the same time. Figure 6B shows the abundance of nanospheres in the cytoplasm of the pre-osteoblasts and the integrity of their morphology. The results evidence that the incorporation of FITC–nanoMBGs did not induce changes in the pre-osteoblast cytoskeleton.

3.7. Endocytic Mechanisms for FITC–NanoMBG Entry into MC3T3-E1 Pre-Osteoblasts

Five specific endocytosis inhibitors were added into the culture wells before the nanomaterial addition in order to identify the endocytic mechanisms by which these FITC–nanoMBG nanospheres are incorporated within the MC3T3-E1 cells. This indirect method consists of pretreating the cells with different inhibitors that specifically block a certain mechanism of endocytosis. In this way, when the inhibitor used reduces the entry of the nanospheres, we can know that this mechanism that has been blocked constitutes an entry route. On the contrary, if the inhibitor does not decrease the entry of the nanospheres, we will know that the mechanism that is blocking the inhibitor is not involved in the entry of the nanospheres. Figure 7 shows a scheme of the assay, a table with the mechanism affected by each inhibitor (its specific action and the corresponding reference) and a graph with the effects of these

agents on the FITC–nanoMBG uptake. Previous studies allowed us to choose the dose of the different inhibitors [47–51]. The results showed two incorporation mechanisms for FITC–nanoMBG entry into MC3T3-E1 pre-osteoblasts.

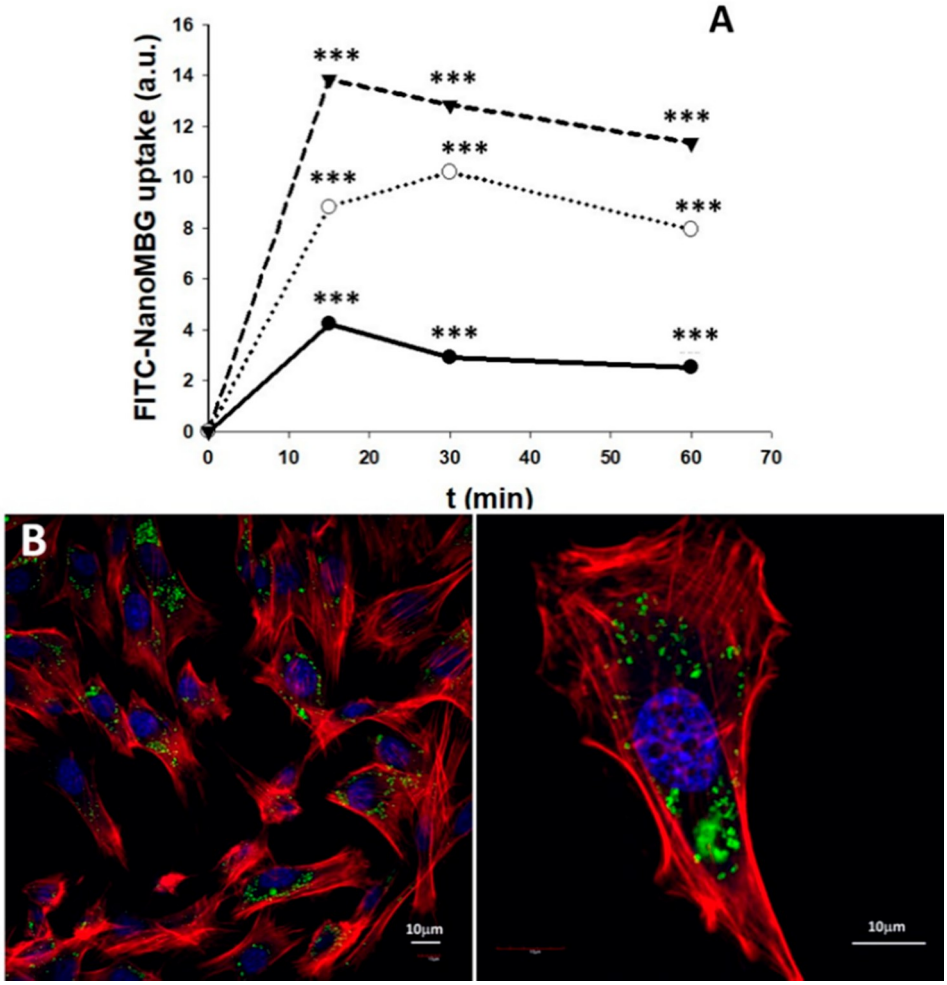
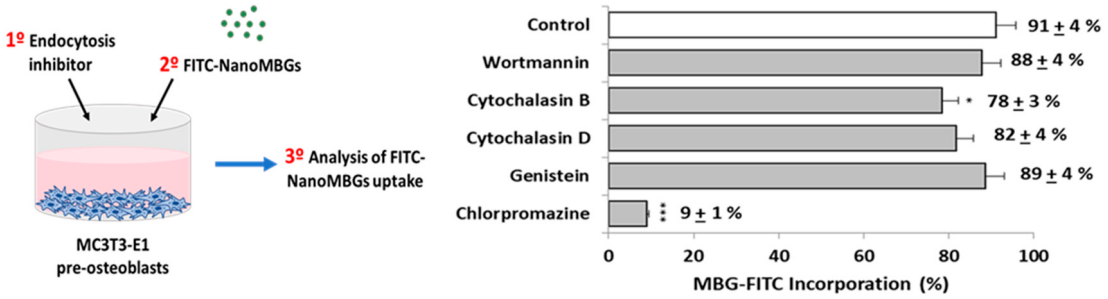


Figure 6. Intracellular uptake of nanoMBG nanospheres labeled with FITC by MC3T3-E1 pre-osteoblasts. (A) flow cytometric analysis of fluorescence intensity of cells with intracellular FITC–nanoMBG nanospheres after incubation with 10 (•), 30 (⊗) and 50 µg/mL (v) for different times (15, 30 and 60 min). Statistical significance: *** $p < 0.005$. (**B**) Confocal microscopy images of MC3T3-E1 pre-osteoblasts after 24 h of incubation with 50 µg/mL of nanoMBG nanospheres labeled with fluorescein isothiocyanate (FITC). Nuclei were stained with DAPI (blue), F-actin filaments were stained with rhodamine-phalloidin (red), and FITC–nanoMBGs are observed in green.

Cytochalasins B and D, which block actin polymerization and inhibit macropinocytosis, reduce the FITC–nanoMBG incorporation by pre-osteoblasts, although only the effect of Cytochalasin B was significant ($p < 0.05$, Figure 3). Chlorpromazine is an inhibitor of clathrin-dependent mechanisms, and this agent produced a very pronounced diminution ($p < 0.005$) of FITC–nanoMBG incorporation by MC3T3-E1 cells, thus indicating that the clathrin-dependent endocytic mechanism is the main route implicated in the entry of these nanospheres into pre-osteoblasts. Previous studies with nanosheets of graphene oxide and Saos-2 osteoblasts evidenced that these nanosheets can enter in mature osteoblasts through pathways dependent on microtubules [51]. It is important to note that the mechanisms of entry of nanomaterials into cells depend on the cell type and the characteristics of the nanoparticles. In the present study, the treatment with either wortmannin or genistein did not trigger significant changes on FITC–nanoMBG incorporation by pre-osteoblasts. Wortmannin blocks the activity of

phosphoinositide 3-kinase (PI3K) and phosphoinositide 4-kinase (PI4K) [47], with key roles in cell development and growth as adhesion, apoptosis, cytoskeletal organization, motility, proliferation, thus preventing phagocytosis mechanisms [52]. Genistein blocks Src tyrosine kinases and the dynamics of caveolae [50], and no differences were observed in the uptake of these nanospheres when it was present in the cell culture. Since wortmannin and genistein did not reduce FITC–nanoMBG uptake by pre-osteoblasts, we can conclude that neither phagocytosis nor caveolae-mediated incorporation is routes implicated in the *in vitro* uptake of these nanospheres by MC3T3-E1 cells.



INHIBITOR	AFFECTED MECHANISM	ACTION	REFERENCE
WORTMANNIN	Phagocytosis	Irreversible inhibition of phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)	Bandmann, V. *et al.* 2012
CYTOCHALASIN B	Macropinocytosis	Inhibition of actin polymerization preventing microfilaments action	Sato, K. *et al.* 2009
CYTOCHALASIN D	Macropinocytosis	Inhibition of actin polymerization preventing microfilaments action and other endocytosis pathways	Mäger, I. *et al.* 2012
GENISTEIN	Clathrin-independent endocytosis	Inhibition of Src tyrosine kinases and caveolae dynamics	Schulz, W.L. *et al.* 2012
CHLORPROMAZINE	Clathrin-dependent endocytosis	Inhibition of clathrin-coat assembly and alteration of membrane fluidity	Mäger, I. *et al.* 2012

Figure 7. Inhibitory effects of several endocytosis inhibitors on FITC–nanoMBG uptake by MC3T3-E1 pre-osteoblasts. Cells were incubated with each inhibitor for 2 h, the medium was then removed, and the cultures were treated with 50 µg/mL FITC–nanoMBGs for 2 h. Statistical significance: * $p < 0.05$, *** $p < 0.005$.

4. Conclusions

The novelty of this work is the knowledge of the effects of ipriflavone-loaded mesoporous nanospheres on the differentiation of bone-forming cells. In previous studies, the effects of these nanoparticles on already differentiated osteoblasts in coculture with osteoclasts were analyzed [25], but until now, their effects on osteoprogenitor cells were unknown. Another of the novel objectives of the present work was to understand the mechanisms by which these nanoparticles are incorporated into osteoprogenitor cells. The obtained results demonstrate active incorporation of nanoMBG–IPs by MC3T3-E1 pre-osteoblasts that stimulates their differentiation into mature osteoblast phenotype with increased alkaline phosphatase activity, thus indicating the efficient intracellular release of the drug and its positive *in vitro* effect on osteogenesis. The main mechanism by which FITC-Nano-MBGs enter pre-osteoblasts is the clathrin-dependent route, although these nanospheres can also enter through micropinocytosis. The present work reveals the absence of cytotoxicity of nanoMBG–IPs and their great potential as a nanotherapeutic strategy for the intracellular delivery of ipriflavone to promote osteogenesis in the periodontal defects. On the other hand, having demonstrated the intracellular incorporation of these nanospheres and their effective intracellular release of ipriflavone, this study represents the starting point for the use of these nanospheres as carriers of very diverse drugs (antibiotics, anti-inflammatory, antiresorptive and osteogenic drugs) not only for periodontal defects but also for infections and inflammatory processes such as those that occur in periodontitis.

Supplementary Materials: The following are available online at http://www.mdpi.com/2079-4991/10/12/2573/s1, Figure S1: FTIR spectrum of ipriflavone; Figure S2: Thermogravimetric analysis before (nanoMBG) and after loading with ipriflavone (nanoMBG–IP); Figure S3: Effects of nanoMBGs and nanoMBG–IPs (50 μg/mL) on cell size and complexity of MC3T3-E1 pre-osteoblasts after 24 h of treatment with 50 μg/mL of nanospheres. Control conditions without nanospheres were performed at the same time; Figure S4: Effects of nanoMBGs and nanoMBG–IPs on matrix mineralization by MC3T3-E1 pre-osteoblasts after 11 days of treatment with 50 μg/mL of nanospheres by Alizarin Red staining. Control conditions without nanospheres were performed at the same time.

Author Contributions: Conceptualization, D.A. and M.T.P.; methodology, L.C., N.G.-C., D.A., M.J.F. and M.T.P.; validation, D.A. and M.T.P.; formal analysis, L.C.; investigation, L.C., N.G.-C., D.A., M.J.F. and M.T.P.; resources, M.T.P., D.A. and M.V.-R.; data curation, D.A. and M.T.P.; writing—original draft preparation, M.T.P. and D.A.; writing—review and editing, L.C., N.G.-C., M.J.F., D.A., M.T.P. and M.V.-R.; visualization, N.G.-C., D.A. and M.T.P.; supervision, M.T.P., D.A., and M.V.-R.; project administration, M.T.P., D.A. and M.V.-R.; funding acquisition, M.T.P., D.A. and M.V.-R. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by Ministerio de Economía y Competitividad, Agencia Estatal de Investigación (AEI) and Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER) (MAT2016-75611-R AEI/FEDER, UE to D.A. and M.T.P.); European Research Council (Advanced Grant VERDI; ERC-2015-AdG Proposal No. 694160 to M.V.-R.).

Acknowledgments: The realization of these studies was possible thanks to research grants from Ministerio de Economía y Competitividad, Agencia Estatal de Investigación (AEI) and Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER) (MAT2016-75611-R AEI/FEDER, UE). MVR acknowledges financing from the European Research Council (Advanced Grant VERDI; ERC-2015-AdG Proposal No. 694160). LC is grateful to the Universidad Complutense de Madrid for an UCM fellowship. The authors thank the staff of the ICTS Centro Nacional de Microscopía Electrónica (Spain) and the Centro de Citometría y Microscopía de Fluorescencia (Universidad Complutense de Madrid (Spain) for the support in the studies of electron microscopy, flow cytometry and confocal microscopy.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Skallevold, H.E.; Rokaya, D.; Khurshid, Z.; Zafar, M.S. Bioactive Glass Applications in Dentistry. *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, *20*, 5960. [CrossRef] [PubMed]
2. Greenspan, D.C. *Bioglass and Bioactivity: A Brief Look Back in Bioactive Glasses: Properties, Composition and Recent Applications*; Arcos, D., Vallet-Regí, M., Eds.; Novascience Publishers: New York, NY, USA, 2020.
3. Li, R.; Clark, A.E.; Hench, L.L. An investigation of bioactive glass powders by sol-gel processing. *J. Appl. Biomater.* **1991**, *2*, 231–239. [CrossRef] [PubMed]
4. Arcos, D.; Vallet-Regí, M. Sol–gel silica-based biomaterials and bone tissue regeneration. *Acta Biomater.* **2010**, *6*, 2874–2888. [CrossRef] [PubMed]
5. Manzano, M.; Arcos, D.; Delgado, M.R.; Ruiz, E.; Gil, F.J.; Vallet-Regí, M. Bioactive Star Gels. *Chem. Mater.* **2006**, *18*, 5696–5703. [CrossRef]
6. 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]
7. Gómez-Cerezo, N.; Casarrubios, L.; Saiz-Pardo, M.; Ortega, L.; De Pablo, D.; Díaz-Güemes, I.; Fernández-Tomé, B.; Enciso, S.; Sánchez-Margallo, F.; Portolés, M.T.; et al. Mesoporous bioactive glass/ϵ-polycaprolactone scaffolds promote bone regeneration in osteoporotic sheep. *Acta Biomater.* **2019**, *90*, 393–402. [CrossRef]
8. Polo, L.; Gómez-Cerezo, N.; García-Fernández, A.; Aznar, E.; Vivancos, J.-L.; Arcos, D.; Vallet-Regí, M.; Martínez-Máñez, R. Mesoporous bioactive glasses equipped with stimuli-responsive molecular gates for the controlled delivery of levofloxacin against bacteria. *Chem. Eur. J.* **2018**, *24*, 18944. [CrossRef]
9. 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]
10. Wu, C.; Chang, J. Mesoporous bioactive glasses: Structure characteristics, drug/growth factor delivery and bone regeneration application. *Interface Focus* **2012**, *2*, 292–306. [CrossRef]
11. Wu, C.; Chang, J. Multifunctional mesoporous bioactive glasses for effective delivery of therapeutic ions and drug/growth factors. *J. Control. Release* **2014**, *193*, 282–295. [CrossRef]
12. Priyadarsini, S.; Mukherjee, S.; Mishra, M. Nanoparticles used in dentistry: A review. *J. Oral Biol. Craniofacial Res.* **2018**, *8*, 58–67. [CrossRef] [PubMed]
13. Bapat, R.A.; Joshi, C.P.; Bapat, P.; Chaubal, T.V.; Pandurangappa, R.; Jnanendrappa, N.; Gorain, B.; Khurana, S.Kesharwani, P. The use of nanoparticles as biomaterials in dentistry. *Drug Discov. Today* **2019**, *24*, 85–98. [CrossRef] [PubMed]
14. Bapat, R.A.; Chaubal, T.V.; Dharmadhikari, S.; Abdulla, A.M.; Bapat, P.; Alexander, A.; Dubey, S.K.; Kesharwani, P. Recent advances of gold nanoparticles as biomaterial in dentistry. *Int. J. Pharm.* **2020**, *586*, 119596. [CrossRef] [PubMed]
15. Zakrewski, W.; Dobrzynski, M.; Rybak, Z.; Szymonowicz, M.; Wiglusz, R.J. Selected nanomaterials' application enhaced with the use of stem cells in acceleration of alveolar bone regeneration during augmentation process. *Nanomaterials* **2020**, *10*, 1216. [CrossRef]
16. Hannig, C.; Hannig, M. Natural enamel wear—A physiological source of hydroxylapatite nanoparticles for biofilm management and tooth repair? *Med. Hypotheses* **2010**, *74*, 670–672. [CrossRef]
17. Lee, J.-H.; Kang, M.-S.; Mahapatra, C.; Kim, H.-W. Effect of Aminated Mesoporous Bioactive Glass Nanoparticles on the Differentiation of Dental Pulp Stem Cells. *PLoS ONE* **2016**, *11*, e0150727. [CrossRef]
18. Zheng, K.; Balasubramanian, P.; Paterson, T.E.; Stein, R.; MacNeil, S.; Fiorilli, S.; Vitale-Brovarone, C.; Shepherd, J.; Boccaccini, A.R. Ag modified mesoporous bioactive glass nanoparticles for enhanced antibacterial activity in 3D infected skin model. *Mater. Sci. Eng. C* **2019**, *103*, 109764. [CrossRef]
19. Huang, W.; Yang, J.; Feng, Q.; Shu, Y.; Liu, C.; Zeng, S.; Guan, H.; Ge, L.; Pathak, J.L.; Zeng, S. Mesoporous Bioactive Glass Nanoparticles Promote Odontogenesis and Neutralize Pathophysiological Acidic pH. *Front. Mater.* **2020**, *7*, 241. [CrossRef]
20. 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. [CrossRef]
21. Shang, L.; Liu, Z.; Ma, B.; Shao, J.; Wang, B.; Ma, C.; Ge, S.-H. Dimethyloxallyl glycine/nanosilicates-loaded osteogenic/angiogenic difunctional fibrous structure for functional periodontal tissue regeneration.

22. *Bioact. Mater.* **2021**, *6*, 1175–1188. [CrossRef]
23. Portal-Núñez, S.; Mediero, A.; Esbrit, P.; Sánchez-Pernaute, O.; Largo, R.; Herrero-Beaumont, G. Unexpected Bone Formation Produced by RANKL Blockade. *Trends Endocrinol. Metab.* **2017**, *28*, 695–704. [CrossRef] [PubMed]
24. Luhmann, T.; Germershaus, O.; Groll, J.; Meinel, L. Bone targeting for the treatment of osteoporosis. *J. Control. Release* **2012**, *161*, 198–213. [CrossRef] [PubMed]
25. Reginster, J.-Y.L. Ipriflavone: Pharmacological properties and usefulness in postmenopausal osteoporosis. *Bone Miner.* **1993**, *23*, 223–232. [CrossRef]
26. Mazzuoli, G.; Romagnoli, E.; Carnevale, V.; Scarda, A.; Scarnecchia, L.; Pacitti, M.T.; Rosso, R.; Minisola, S. Effects of ipriflavone on bone remodeling in primary hyperparathyroidism. *Bone Miner.* **1992**, *19* (Suppl. 1), S27–S33. [CrossRef]
27. Duan, H.; Diao, J.; Zhao, N.; Ma, Y. Synthesis of hollow mesoporous bioactive glass microspheres with tunable shell thickness by hydrothermal-assisted self-transformation method. *Mater. Lett.* **2016**, *167*, 201–204. [CrossRef]
28. Gera, S.; Sampathi, S.; Dodoala, S. Role of Nanoparticles in Drug Delivery and Regenerative Therapy for Bone Diseases. *Curr. Drug Deliv.* **2017**, *14*, 904–916. [CrossRef] [PubMed]
29. Addison, W.; Nelea, V.; Chicatun, F.; Chien, Y.-C.; Tran-Khanh, N.; Buschmann, M.D.; Nazhat, S.; Kaartinen, M.T.; Vali, H.; Tecklenburg, M.; et al. Extracellular matrix mineralization in murine MC3T3-E1 osteoblast cultures: An ultrastructural, compositional and comparative analysis with mouse bone. *Bone* **2015**, *71*, 244–256. [CrossRef]
30. 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]
31. Li, Y.; Bastakoti, B.P.; Yamauchi, Y. Smart Soft-Templating Synthesis of Hollow Mesoporous Bioactive Glass Spheres. *Chem. A Eur. J.* **2015**, *21*, 8038–8042. [CrossRef]
32. López-Noriega, A.; Arcos, D.; Vallet-Regí, M. Functionalizing Mesoporous Bioglasses for Long-Term Anti-Osteoporotic Drug Delivery. *Chem. Eur. J.* **2010**, *16*, 10879–10886. [CrossRef]
33. Cicuéndez, M.; Silva, V.S.; Hortigüela, M.J.; Matesanz, M.C.; Vila, M.; Portolés, M.T. MC3T3-E1 pre-osteoblast response and differentiation after graphene oxide nanosheet uptake. *Colloids Surf. B Biointerfaces* **2017**, *158*, 33–40. [CrossRef] [PubMed]
34. 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*, 821–827. [CrossRef]
35. Matesanz, M.-C.; Vila, M.; Feito, M.-J.; Linares, J.; Gonçalves, G.; Vallet-Regí, M.; Marques, P.A.A.P.; Portolés, M.-T. The effects of graphene oxide nanosheets localized on F-actin filaments on cell-cycle alterations. *Biomaterials* **2013**, *34*, 1562–1569. [CrossRef] [PubMed]
36. Mao, L.; Xia, L.; Chang, J.; Liu, J.; Jiang, L.; Wu, C.; Fang, B. The synergistic effects of Sr and Si bioactive ions on osteogenesis, osteoclastogenesis and angiogenesis for osteoporotic bone regeneration. *Acta Biomater.* **2017**, *61*, 217–232. [CrossRef]
37. Beck, G.R.; Ha, S.-W.; Camalier, C.E.; Yamaguchi, M.; Li, Y.; Lee, J.-K.; Weitzmann, M.N. Bioactive silica-based nanoparticles stimulate bone-forming osteoblasts, suppress bone-resorbing osteoclasts, and enhance bone mineral density in vivo. *Nanomed. Nanotechnol. Biol. Med.* **2012**, *8*, 793–803. [CrossRef]
38. Zhang, X.; Zeng, D.; Li, N.; Wen, J.; Jiang, X.; Liu, C.; Li, Y. Functionalized mesoporous bioactive glass scaffolds for enhanced bone tissue regeneration. *Sci. Rep.* **2016**, *6*, srep19361. [CrossRef]
39. Gómez-Cerezo, N.; Casarrubios, L.; Morales, I.; Feito, M.; Vallet-Regí, M.; Arcos, D.; Portolés, M.T. Effects of a mesoporous bioactive glass on osteoblasts, osteoclasts and macrophages. *J. Colloid Interface Sci.* **2018**, *528*, 309–320. [CrossRef]
40. Quarles, L.D.; Yohay, D.A.; Lever, L.W.; Caton, R.; Wenstrup, R.J. Distinct proliferative and differentiated stages of murine MC3T3-E1 cells in culture: An in vitro model of osteoblast development. *J. Bone Miner. Res.* **1992**, *7*, 683–692. [CrossRef]
41. Stein, G.S.; Lian, J.B. Molecular Mechanisms Mediating Proliferation/Differentiation Interrelationships During Progressive Development of the Osteoblast Phenotype. *Endocr. Rev.* **1993**, *14*, 424–442. [CrossRef]
42. Ara, T.; Declerck, Y.A. Interleukin-6 in bone metastasis and cancer progression. *Eur. J. Cancer* **2010**, *46*, 1223–1231. [CrossRef]
43. Udagawa, N.; Takahashi, N.; Katagiri, T.; Tamura, T.; Wada, S.; Findlay, D.M.; Martin, T.J.; Hirota, H.; Taga, T.;

44. Kishimoto, T.; et al. Interleukin (IL)-6 induction of osteoclast differentiation depends on IL-6 receptors expressed on osteoblastic cells but not on osteoclast progenitors. *J. Exp. Med.* **1995**, *182*, 1461–1468. [CrossRef] [PubMed]
45. Horwood, N.J.; Elliott, J.; Martin, T.J.; Gillespie, M. Osteotropic Agents Regulate the Expression of Osteoclast Differentiation Factor and Osteoprotegerin in Osteoblastic Stromal Cells. *Endocrinol.* **1998**, *139*, 4743. [CrossRef]
46. Kuroyanagi, G.; Adapala, N.S.; Yamaguchi, R.; Kamiya, N.; Deng, Z.; Aruwajoye, O.; Kutschke, M.; Chen, E.; Jo, C.; Ren, Y.; et al. Interleukin-6 deletion stimulates revascularization and new bone formation following ischemic osteonecrosis in a murine model. *Bone* **2018**, *116*, 221–231. [CrossRef] [PubMed]
47. Mariani, E.; Lisignoli, G.; Borzì, R.M.; Pulsatelli, L. Biomaterials: Foreign Bodies or Tuners for the Immune Response? *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, *20*, 636. [CrossRef] [PubMed]
48. Oh, N.; Park, J.H. Endocytosis and exocytosis of nanoparticles in mammalian cells. *Int. J. Nanomed.* **2014**, *9*, 51–63. [CrossRef]
49. Bandmann, V.; Müller, J.D.; Köhler, T.; Homann, U. Uptake of fluorescent nano beads into BY2-cells involves clathrin-dependent and clathrin-independent endocytosis. *FEBS Lett.* **2012**, *586*, 3626–3632. [CrossRef] [PubMed]
50. Sato, K.; Nagai, J.; Mitsui, N.; Yumoto, R.; Takano, M. Effects of endocytosis inhibitors on internalization of human IgG by Caco-2 human intestinal epithelial cells. *Life Sci.* **2009**, *85*, 800–807. [CrossRef] [PubMed]
51. Mäger, I.; Langel, K.; Lehto, T.; Eiríksdóttir, E.; Langel, Ü. The role of endocytosis on the uptake kinetics of luciferin-conjugated cell-penetrating peptides. *Biochim. Biophys. Acta* **2012**, *1818*, 502–511. [CrossRef]
52. Schulz, W.L.; Haj, A.K.; Schiff, L.A. Reovirus Uses Multiple Endocytic Pathways for Cell Entry. *J. Virol.* **2012**, *86*, 12665–12675. [CrossRef]
53. Linares, J.; Matesanz, M.C.; Vila, M.; Feito, M.J.; Gonçalves, G.; Vallet-Regí, M.; Marques, P.A.A.P.; Portolés, M.T. Endocytic Mechanisms of Graphene Oxide Nanosheets in Osteoblasts, Hepatocytes and Macrophages. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2014**, *6*, 13697–13706. [CrossRef]
54. Cantley, L.C. The Phosphoinositide 3-Kinase Pathway. *Science* **2002**, *296*, 1655–1657. [CrossRef] [PubMed]

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/).

Artículo 4: Nanomaterials 2021, 11: 1102

"Effects of ipriflavone-loaded mesoporous nanospheres on the differentiation of endothelial progenitor cells and their modulation by macrophages" L.Casarrubios, A.Polo-Montalvo, M.C.Serrano, M.J.Feito, M.Vallet-Regí, D.Arcos, M.T.Portolés

Las nanopartículas de materiales bioactivos cargadas con fármacos representan una estrategia muy prometedora para estimular la osteogénesis y la angiogénesis y para inhibir la resorción ósea. En este trabajo se evaluaron los efectos angiogénicos de nanoesferas mesoporosas cargadas con ipriflavona (nanoMBG-IPs) utilizando células progenitoras endoteliales porcinas (EPCs), esenciales para la formación de vasos sanguíneos, y analizando los efectos de estas nanopartículas sobre la expresión del factor de crecimiento endotelial vascular 2 (VEGFR2), esencial para el proceso de angiogénesis. Con este objetivo se cultivaron EPCs bajo diferentes condiciones de cultivo: (a) tratamiento de EPCs con nanoMBGs y nanoMBG-IPs, (b) cultivo con medios de macrófagos basales, de macrófagos M1 y de macrófagos M2, previamente tratados con nanoMBGs y nanoMBG-IPs, (c) cocultivo de EPCs con macrófagos en presencia de nanoMBGs y NanoMBG-IPs, y (d) cocultivo de EPCs con macrófagos angiogénicos M2d. Los mecanismos endocíticos implicados en la incorporación de las nanoesferas por las EPCs se identificaron utilizando seis inhibidores de endocitosis diferentes. Los resultados evidenciaron el gran potencial de estas nanoesferas para potenciar la expresión de VEGFR2 y la angiogénesis, tras su incorporación intracelular por parte de las EPCs a través de mecanismos de endocitosis dependientes de clatrina, fagocitosis e incorporación mediada por caveolas. El tratamiento de EPCs con medios de cultivo de macrófagos sin estimular, de macrófagos M1 y M2, y los estudios de cocultivo de EPCs/macrófagos, también confirmaron el efecto angiogénico de estas nanoesferas sobre las EPCs, incluso en presencia de células fagocíticas.

nanomaterials

MDPI

Article

Effects of Ipriflavone-Loaded Mesoporous Nanospheres on the Differentiation of Endothelial Progenitor Cells and Their Modulation by Macrophages

Laura Casarrubios [1], Alberto Polo-Montalvo [1], María Concepción Serrano [2], María José Feito [1], María Vallet-Regí [3,4,*], Daniel Arcos [3,4,*] and María Teresa Portolés [1,4,*]

[1] Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Complutense de Madrid, Instituto de Investigación Sanitaria del Hospital Clínico San Carlos (IdISSC), 28040 Madrid, Spain; laura.casarrubios.molina@gmail.com (L.C.); albpolo@ucm.es (A.P.-M.); mjfeito@ucm.es (M.J.F.)

[2] Instituto de Ciencia de Materiales de Madrid (ICMM), Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), 28049 Madrid, Spain; mc.terradas@csic.es

[3] Departamento de Química en Ciencias Farmacéuticas, Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid, Instituto de Investigación Sanitaria Hospital 12 de Octubre i + 12, Plaza Ramón y Cajal s/n, 28040 Madrid, Spain

[4] CIBER de Bioingeniería, Biomateriales y Nanomedicina, CIBER-BBN, 28040 Madrid, Spain

* Correspondence: vallet@ucm.es (M.V.-R.); arcosd@ucm.es (D.A.); portoles@quim.ucm.es (M.T.P.)

check for updates

Citation: Casarrubios, L.; Polo-Montalvo, A.; Serrano, M.C.; Feito, M.J.; Vallet-Regí, M.; Arcos, D.; Portolés, M.T. Effects of Ipriflavone-Loaded Mesoporous Nanospheres on the Differentiation of Endothelial Progenitor Cells and Their Modulation by Macrophages. *Nanomaterials* **2021**, *11*, 1102. https://doi.org/10.3390/nano11051102

Academic Editors: María Vallet-Regí, Miguel Gisbert-Garzarán and Abdelhamid Elaissari

Received: 24 March 2021
Accepted: 21 April 2021
Published: 24 April 2021

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

Copyright: © 2021 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/).

Abstract: Angiogenic biomaterials are designed to promote vascularization and tissue regeneration. Nanoparticles of bioactive materials loaded with drugs represent an interesting strategy to stimulate osteogenesis and angiogenesis and to inhibit bone resorption. In this work, porcine endothelial progenitor cells (EPCs), essential for blood vessel formation, were isolated and characterized to evaluate the in vitro effects of unloaded (NanoMBGs) and ipriflavone-loaded nanospheres (NanoMBG-IPs), which were designed to prevent osteoporosis. The expression of vascular endothelial growth factor receptor 2 (VEGFR2) was studied in EPCs under different culture conditions: (a) treatment with NanoMBGs or NanoMBG-IPs, (b) culture with media from basal, M1, and M2 macrophages previously treated with NanoMBGs or NanoMBG-IPs, (c) coculture with macrophages in the presence of NanoMBGs or NanoMBG-IPs, and (d) coculture with M2d angiogenic macrophages. The endocytic mechanisms for nanosphere incorporation by EPCs were identified using six different endocytosis inhibitors. The results evidence the great potential of these nanomaterials to enhance VEGFR2 expression and angiogenesis, after intracellular incorporation by EPCs through clathrin-dependent endocytosis, phagocytosis, and caveolae-mediated uptake. The treatment of EPCs with basal, M1, and M2 macrophage culture media and EPC/macrophage coculture studies also confirmed the angiogenic effect of these nanospheres on EPCs, even in the presence of phagocytic cells.

Keywords: endothelial progenitor cells; macrophages; mesoporous nanospheres; vascular endothelial growth factor receptor 2; ipriflavone; endocytosis

1. Introduction

The vascular system plays an essential role in the efficient supply of oxygen and nutrients needed to ensure the development of all tissues. Vascular structures can be formed through vasculogenesis (*de novo* blood vessels created during embryonic development) or angiogenesis (new vessels from a pre-existing vascular network) [1,2]. It is important to highlight that different signals between vascular and nonvascular cells are essential to initiate the angiogenic events that are required for regenerative processes [3,4]. In particular, macrophages that infiltrate the damaged tissue secrete growth factors and other molecules to stimulate angiogenesis depending on their phenotype and activation state [5,6]. It is well known that macrophages are influenced by multiple microenvironmental stimuli able to induce macrophage polarization toward M1 proinflammatory or M2 reparative

phenotypes [7]. M1 macrophages are mainly induced by IFN-γ and bacterial lipopolysaccharide (LPS), producing higher levels of proinflammatory cytokines and reactive oxygen species (ROS) [8]. In contrast, M2 macrophages are induced by cytokines such as IL-4, IL-10, IL-13, IL-21, and IL-33 and have an anti-inflammatory cytokine profile. Functionally, M2 macrophages possess proangiogenic properties and promote tissue repair and wound healing [9]. Depending on the activating stimulus, M2 macrophages can be divided into four subsets: M2a, M2b, M2c, and M2d [10], which are induced by different cytokines and produce specific molecules with different activities [8]. The fourth type of M2 macrophages, M2d, is induced by agonists that target Toll-like receptors (TLRs) through the adenosine receptor, followed by the suppression of proinflammatory cytokine production and the induction of secretion of both anti-inflammatory cytokines and vascular endothelial growth factor (VEGF) with proangiogenic properties [11,12].

VEGF acts on endothelial cells inducing angiogenesis [13] and regulates vascular permeability [14]. The secretion of this factor by macrophages plays an important role in wound healing, as well as in chronic inflammation and cancer [12]. Among the known vascular endothelial growth factors (VEGFs) and receptors (VEGFRs), VEGF-A regulates angiogenesis and vascular permeability by activating VEGFR1 and VEGFR2 receptors, with VEGFR2 being the major signal transducer for angiogenesis through the PLCγ–PKC–MAPK pathway [15]. VEGF-A also stimulates bone repair by promoting angiogenesis, maturation of osteoblasts, ossification, and bone turnover [16]. Thus, osteogenesis is a process coupled to vascularization during bone development and growth [17]. For this reason, angiogenic biomaterials are designed to promote vascularization and optimize bone regeneration [18–21]. In this context, nanoparticles of bioactive materials loaded with different drugs represent an interesting strategy to promote bone regeneration by stimulating osteogenesis and angiogenesis and inhibiting bone resorption [22,23]. Among the drugs explored with this aim, ipriflavone (IP) prevents osteoporosis by inhibiting the activity of osteoclasts [23,24] and stimulating the differentiation of pre-osteoblasts into mature osteoblasts [25]. The administration of the drug with nanoparticles allows significantly reducing the quantity of drug required to carry out the desire effect.

Since endothelial progenitor cells (EPCs) are involved in blood vessel formation, essential for tissue regeneration, porcine EPCs have been used in this work to evaluate their response to ipriflavone-loaded mesoporous bioactive nanospheres, designed to stimulate osteogenesis. These nanospheres (NanoMBGs) have shown excellent in vitro behavior in previous studies with bone cells [23,25]. The expression of VEGFR2, directly related to angiogenesis, has been analyzed in EPCs treated with these nanospheres considering the possible modulating role of macrophages, depending on their phenotype and activation state. With this objective, the actions of NanoMBGs without or with ipriflavone (NanoMBG-IPs) and macrophage mediators on angiogenesis were evaluated by assessing VEGFR2 expression, under different conditions: (a) EPCs in monoculture treated with NanoMBGs or NanoMBG-IPs, (b) EPCs treated with conditioned media from basal, M1, and M2 macrophages previously treated with NanoMBGs or NanoMBG-IPs, (c) EPCs cocultured with macrophages in the presence of NanoMBGs or NanoMBG-IPs, and (d) EPCs cocultured with M2d angiogenic macrophages. On the other hand, the endocytic mechanisms via which these nanospheres are incorporated by EPCs were identified using six endocytosis inhibitors (i.e., wortmannin, genistein, cytochalasin B, cytochalasin D, phenylarsine oxide, and chlorpromazine) before the addition of NanoMBGs labeled with fluorescein isothiocyanate (FITC-NanoMBGs). Overall, the present work will contribute to the knowledge of the incorporation mechanisms of these ipriflavone-loaded nanospheres into EPCs to promote tissue regeneration and the modulatory role played by macrophages as main cells of the innate immune response to this kind of nanomaterial.

2. Materials and Methods

2.1. Preparation, Characterization, Labeling with FITC, and Loading with Ipriflavone of Mesoporous Nanospheres

Mesoporous nanospheres (NanoMBGs) with nominal chemical composition 75 SiO_2/20 CaO/5 P_2O_5 (mol.%) were synthesized, characterized, and labeled with fluorescein isothiocyanate (FITC-NanoMBGs) as previously described [23,25]. Briefly, 80 mg of poly(styrene)-*block*-poly(acrylic acid) and 160 mg of hexadecyl trimethyl ammonium bromide (CTAB) were dissolved in tetrahydrofurane (16 mL) and water/ammonia (74 mL/2.4 mL), respectively, and mixed together under vigorous magnetic stirring. Subsequently, 25 µL of triethylphosphate (TEP) and 0.52 mL of tetraethoxysilane (TEOS) previously dissolved in ethanol were added dropwise under stirring. Then, 125 mg of $Ca(NO_3)_2$ $4H_2O$ in 1.6 mL of water was also added and stirred for 10 min more. After stirring for 24 h, the resulting product was collected by centrifugation and treated at 550 °C to remove the organic template.

The nanoparticles were subsequently labeled with FITC by dissolving 0.6 mg of FITC and 44.3 µL of aminopropyl triethoxysilane (APTS) in 0.5 mL of ethanol. This solution was added dropwise to 50 mg of nanoparticles previously suspended in toluene and left to react at 80 °C for 12 h under nitrogen atmosphere.

Ipriflavone-loaded nanoparticles (NanoMBG-IPs) were prepared by dissolving 250 mg of ipriflavone in 3 mL of acetone. Thereafter, 100 mg of previously dried nanoparticles treated at 100 °C for 24 h were added to the solution and gently stirred in an incubator at 37 °C with a rotation speed of 100 rpm for 12 h. After this period, the nanoparticles were collected by filtration under vacuum using a polyamide filter.

For morphological characterization of nanoparticles, scanning electron microscopy (SEM) and transmission electron microscopy (TEM) images were collected with a JEOL F-6335 microscope and a JEOL-1400 microscope (JEOL, Tokyo, Japan), respectively. Thermogravimetric analysis was carried out with a TG/DTA Seiko SSC/5200 thermobalance. The thermogram was obtained from 100 °C to 650 °C using a platinum crucible and α-Al_2O_3 as a reference.

2.2. Obtention and Culture of Endothelial Progenitor Cells (EPCs)

Endothelial progenitor cells (EPCs) were obtained as previously described [26,27]. Briefly, whole pig blood was diluted (1:1) in phosphate-buffered saline (PBS) with 0.1% of bovine serum albumin (BSA) and 0.6% of sodium citrate. Mononuclear cells (MNCs) were isolated using a density gradient formed with Histopaque-1077 solution (Sigma–Aldrich Corporation, St. Louis, MO, USA) in AccuspinTM tubes (Sigma–Aldrich Corporation, St. Louis, MO, USA). The samples were centrifuged at 800×*g* for 30 min at room temperature. The MNC layer was carefully collected and seeded in Endothelial Growth Medium (EGM-2, Sigma–Aldrich Corporation, St. Louis, MO, USA) in F75 polystyrene culture flasks (Corning Inc., Corning, NY, USA) at a density of 2–3×10^5 cells/cm^2 under a CO_2 (5%) atmosphere and at 37 °C. The culture medium was replaced at 96 h and then every 48 h until confluence. Confluent cultures of EPCs were maintained in EGM-2 until cells acquired the cobblestone morphology characteristic of mature endothelial cells. After confirmation of their endothelial phenotype as described below (Section 2.3), cells were cultured in EGM-2 with or without nanospheres for several times in different culture plates and at different cell densities according to the type of experiment: (a) in 12-well culture plates (Corning Inc., Corning, NY, USA) at a density of 10^5 cells/well during 24 h for the subsequent incorporation of FITC-labeled NanoMBGs for 30, 60, and 90 min (Section 2.4) and (b) in six-well culture plates (Corning Inc., Corning, NY, USA) at a density of 15×10^3 cells/well during 10 days for evaluation of VEGFR2 expression in different conditions (Sections 2.5–2.7).

2.3. Phenotypic Characterization of EPCs

After the obtention of EPCs as described above, the following markers were evaluated to assess their differentiation toward a mature endothelial phenotype after 23 and 30 days of culture in EGM-2:

- CD31, transmembrane receptor also known as platelet endothelial cell adhesion molecule-1, PECAM-1 [28];
- CD34, transmembrane cell surface glycoprotein selectively expressed within the hematopoietic system on stem and progenitor cells [29];
- eNOS, endothelial nitric oxide synthase, responsible for the endothelial production of NO [30];
- vWF, von Willebrand factor, glycoprotein produced by endothelial cells and megakaryocytes [31];
- VEGFR2, VEGF receptor 2, whose expression is restricted to endothelial cells, monocytes, and hematopoietic precursors [32].

For flow cytometry studies, 10^6 cells were used to carry out the identification of each of these markers by immunostaining with corresponding antibodies. The antibodies used in this study were as follows: anti-CD31 (TLD-3A12, ab64543, Abcam, Cambridge, UK), anti-CD34 (EP373Y, ab81289, Abcam, Cambridge, UK), anti-eNOS (M221, ab76198, Abcam, Cambridge, UK), anti-vWF (ab6994, Abcam, Cambridge, UK), and anti-VEGFR2 (ab2349, Abcam, Cambridge, UK). Two secondary antibodies were used, one conjugated with DyLight 633 (IgG (H + L) goat anti-rabbit DyLight® 633, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) and the other with Alexa 488 (IgG (H + L) Highly cross-adsorbed goat anti-mouse Alexa Fluor® Plus 488, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). All antibodies were prepared in normal goat serum (NGS) at 2% for use. The final antibody concentrations were 10 µg/mL for flow cytometry and 5 µg/mL for confocal microscopy, unless specifically prescribed by the supplier. In the case of intracellular markers (eNOS and vWF), the cells were previously permeabilized with 0.25% saponin for 10 min at 4 °C before adding the antibodies, and saponin at 0.25% was maintained at all subsequent steps of immunolabeling. To prevent nonspecific binding, cells were incubated in 10% PBS/NGS for 10 min at room temperature. After centrifugation, 300 µL of the corresponding primary antibody was added to the pellet, incubating the tubes for 30 min at room temperature in darkness. Then, 700 µL of 1% PBS/BSA was added for 10 min at room temperature for washing and, after centrifugation, the pellet was incubated with 300 µL of the corresponding secondary antibody for 30 min at room temperature in darkness. Finally, the pellet was washed with 700 µL of 1% PBS/BSA for 10 min at room temperature, centrifuged, and resuspended in 300 µL of PBS. The resulting EPC suspensions labeled with the different antibodies were analyzed in a FACScalibur Becton Dickinson flow cytometer. The fluorescence of Alexa Fluor 488 was excited at 488 nm and measured at 519 nm. The fluorescence of DyLight 633 was excited at 638 nm and measured at 658 nm.

For confocal microscopy studies, EPCs were cultured on glass coverslips under the above conditions, fixed with 0.5 mL of 4% paraformaldehyde for 10 min at room temperature and washed with PBS three times. For intracellular labeling, cell membranes were permeabilized with 0.5 mL of 70% ethanol at 4 °C for 10 min and washed with PBS three times. To avoid nonspecific binding, samples were incubated with 0.5 mL of 10% PBS/NGS for 10 min at room temperature and washed with PBS three times. Then, 50 µL of the corresponding primary antibody was added in 2% PBS/NGS at a final concentration of 5 µg/mL for 1 h at room temperature. After that, samples were washed three times with 0.5 mL of 2% PBS/NGS, and 50 µL of the corresponding secondary antibody was added to a final concentration of 5 µg/mL. After washing three times with 0.5 mL of PBS, 3 µM 4′-6-diamidine-2′-phenylindole (DAPI, Molecular Probes, Eugene, OR, USA) was added for 5 min, and the glass coverslips were mounted on slides with ProLongTM Gold (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Samples were then observed on a Leica SP2 AOBS multiphoton confocal laser microscope. DAPI fluorescence was excited at 405 nm and measured at 420–480 nm. The fluorescence of Alexa FluorTM was excited at 488 nm and measured

at 519 nm. The fluorescence of DyLightTM 633 was excited at 638 nm and measured at 658 nm.

2.4. Analysis of the Incorporation of FITC-Labeled NanoMBGs by EPCs and Identification of Endocytic Mechanisms

EPCs cultured in EGM-2 for 24 h were exposed to 50 μg/mL of FITC-NanoMBGs for 30, 60, and 90 min. After that, cells were harvested with trypsin-EDTA (0.25%), and FITC-NanoMBG incorporation was quantified through flow cytometry. The FITC-NanoMBG fluorescence was detected in a FACScalibur Becton Dickinson flow cytometer with a 530/30 filter, exciting the sample at 488 nm. Data acquisition and flow cytometric analysis conditions were set through negative and positive controls using the CellQuest Program of Becton Dickinson and maintained for all measurements. For each sample, 10^4 cells were analyzed to ensure a correct statistical significance.

For confocal microscopy studies, EPCs were cultured on circular glass coverslips in the presence of 50 μg/mL of FITC-NanoMBGs for 24 h. Afterward, cells were fixed with paraformaldehyde (3.7%) and permeated with 500 μL of Triton-X100 (0.1% in PBS). After 20 min of incubation with BSA (1% in PBS), samples were stained with rhodamine–phalloidin 1:40 (100 μL), washed with PBS, and stained with 100 μL of 3 μM DAPI. Finally, samples were observed by using an Olympus FV1200 confocal laser scanning microscope. FITC fluorescence was excited at 488 nm and measured at 491–586 nm. Rhodamine fluorescence was excited at 546 nm and detected at 600–620 nm. DAPI fluorescence was excited at 405 nm and detected at 420–480 nm.

To identify the endocytic mechanisms via which FITC-NanoMBGs were incorporated by EPCs, the treatment with six specific endocytosis inhibitors was carried out before adding the nanoparticles, maintaining the cells for 2 h under the conditions described above. The endocytosis inhibitors were as follows: 23 μM wortmannin (Enzo Life Sciences, Barcelona, Spain), 3.7 μM genistein (Enzo Life Sciences, Barcelona, Spain), 20 μM cytochalasin B (MP Biomedicals, Eschwege, Germany), 4 μM cytochalasin D (MP Biomedicals, Eschwege, Germany), 3.7 μM phenylarsine oxide (PAO, Sigma–Aldrich Corporation, St. Louis, MO, USA), and 30 μM chlorpromazine (Enzo Life Sciences, Barcelona, Spain). Then, 50 μg/mL of FITC-NanoMBGs were added to the medium and cells were maintained for 30 min under the conditions described above. Finally, cells were collected with trypsin-EDTA (0.25%), and the FITC-NanoMBG incorporation in each case was quantified by flow cytometry. Controls without inhibitors were carried out in parallel. The dose of each inhibitor was chosen according to previous studies [25,33–37].

2.5. Evaluation of VEGFR2 Expression in EPCs after Treatment with NanoMBGs and NanoMBG-IPs

EPCs were cultured in the presence of 50 μg/mL of unloaded and IP-loaded nanospheres (NanoMBGs and NanoMBG-IPs, respectively) for 10 days under the conditions described above, refreshing the culture medium with nanospheres every 3 days. To evaluate the intracellular action of ipriflavone on the differentiation of EPCs, cells were harvested with trypsin-EDTA (0.25%), and VEGFR2 expression was quantified by flow cytometry as a specific marker of EPC differentiation after immunostaining with the corresponding antibody as described above (Section 2.3).

2.6. Culture, M1/M2 Stimulation, and Treatment of RAW 264.7 Macrophages with NanoMBGs and NanoMBG-IPs. Treatment of EPCs with Macrophage Conditioned Media to Evaluate VEGFR2 Expression

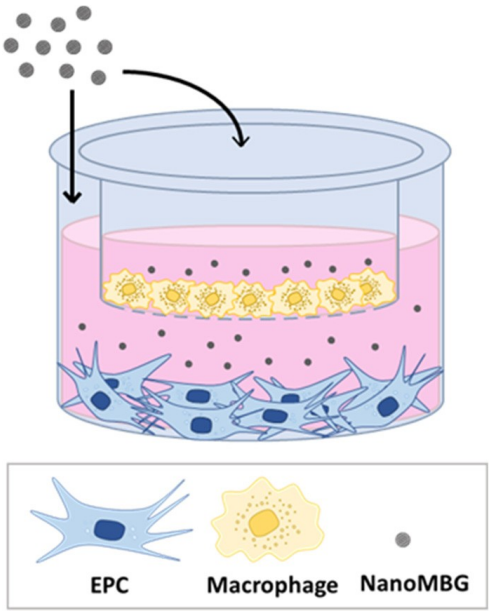
RAW 264.7 macrophages (American Type Culture Collection, ATCC) were seeded in six-well culture plates (Corning Inc., Corning, NY, USA), at a density of 10^5 cells/mL, in 2 mL of Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS, Gibco, BRL), 1 mM L-glutamine (BioWhittaker Europe, Verviers, Belgium), penicillin (200 μg/mL, BioWhittaker Europe, Belgium), and streptomycin (200 μg/mL, BioWhittaker Europe, Belgium) at 37 °C under a CO_2 (5%) atmosphere. Cells were

treated for 24 h in the absence or in the presence of 50 µg/mL of unloaded and IP-loaded nanospheres (NanoMBGs and NanoMBG-IPs, respectively) in basal or stimulated conditions in order to induce the polarization of macrophages toward M1 or M2 phenotypes. To induce the M1 phenotype, macrophages were culture in the presence of *E. coli* lipopolysaccharide (LPS, 250 ng/mL, Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, MO, USA) [38]. To induce the M2 phenotype, macrophages were culture in the presence of interleukin-10 (IL-10, 40 ng/mL, BioLegend, San Diego, CA, USA) [39]. After these treatments, media were aspirated and kept at −20 °C until use. EPCs were cultured in six-well culture plates (15×10^3 cells/well) and treated for 10 days with these conditioned media from basal, M1, and M2 macrophages to evaluate their effects on VEGFR2 expression by flow cytometry as described above (Section 2.3). The conditioned medium was changed every 3 days.

2.7. Coculture of EPCs and RAW 264.7 Macrophages in the Presence of NanoMBGs and NanoMBG-IPs. Evaluation of VEGFR2 Expression in EPCs and CD206 Expression in RAW 264.7 Macrophages

EPCs were seeded in six-well culture plates at a density of 15×10^3 cells/well. Simultaneously, RAW 264.7 cells were seeded in transwell inserts (0.4 µm pore size, Corning Inc., Corning, NY, USA) at a density of 15×10^3 cells/transwell in 1.3 mL of the same culture medium and placed into the six-well culture plates containing seeded EPCs (Scheme 1). For coculture, we used a medium composed of 50% DMEM and 50% EGM-2, having previously verified that both cell types proliferate adequately. These cocultures were carried out in the presence or the absence of 50 µg/mL of NanoMBGs without or with ipriflavone (NanoMBG-IPs) for 7 days at 37 °C under a CO_2 (5%) atmosphere. In parallel, EPCs and macrophages were cultured alone in wells and transwell inserts, respectively, as controls. After coculturing, EPCs and macrophages were washed with PBS, harvested using 0.25% trypsin-EDTA solution and cell scrapers, respectively, centrifuged at 310 × *g* for 10 min, and resuspended in PBS for the analysis of the expression of VEGFR2 in EPCs and CD206 in RAW 264.7 macrophages by flow cytometry. VEGFR2 expression, as a specific marker of EPCs differentiation into mature endothelium, was evaluated by flow cytometry as described above (Section 2.3). CD206 expression, as a specific marker of M2 macrophage phenotype [40], was quantified by flow cytometry as described below. After detachment and centrifugation, macrophages were incubated in 45 µL of staining buffer (PBS, 2.5% FBS Gibco, BRL and 0.1% sodium azide, Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, MO, USA) with 5 µL of normal mouse serum inactivated for 15 min at 4 °C in order to block the Fc receptors on the macrophage plasma membrane, before adding the primary antibody, and to prevent nonspecific binding. Then, cells were incubated with FITC anti-mouse CD206 (15 µg/mL, BioLegend, San Diego, CA, USA) for 30 min in the dark. Labeled cells were analyzed using a FACSCalibur flow cytometer. FITC fluorescence was excited at 488 nm and measured with a 530/30 band pass filter.

The effects of NanoMBGs and NanoMBG-IPs on the expression of VEGFR2 and CD206 in EPC/macrophage cocultures were compared with the expression of these specific markers when EPCs were cocultured with M2d angiogenic macrophages. M2d angiogenic macrophages were obtained from RAW 264.7 macrophages treated with 5'-*N*-ethyl-carboxamido-adenosine (NECA, 1 µM, MedChemExpress, Monmouth Junction, NJ, USA)/*E. coli* LPS (100 ng/mL, Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, MO, USA) [12].



Scheme 1. Cocultures of endothelial progenitor cells (EPCs) and RAW 264.7 macrophages in the presence of 50 μg/mL of NanoMBG nanospheres with or without ipriflavone.

2.8. Statistics

Results were expressed as the means of three identical experiments with their corresponding standard deviations, analyzed using the 22nd version of Statistical Package for the Social Sciences (SPSS). Statistical comparisons were carried out by one-way analysis of variance (ANOVA), and Scheffé and Games–Howell tests were used for post-hoc analysis of differences between study groups, considering $p < 0.05$ as statistically significant.

3. Results and Discussion

3.1. Characterization of Mesoporous Nanospheres

Figure 1a,b show representative SEM and TEM images obtained from Nano-MBG samples, i.e., before loading with ipriflavone. The particles showed an external spherical morphology (Figure 1a) and a mesoporous structure consisting of a hollow core surrounded by a radial mesoporous shell (Figure 1b). Subsequent TEM observations after the loading process indicated a significant loss of mesoporous structure because of drug loading process (Figure 1c). The amount of loaded ipriflavone was 19.3% ± 1.7% (wt.%) as determined by thermogravimetric analysis, pointing out that the mesoporous structure introduced by the organic templates was appropriate for the use of Nano-MBG particles as matrices for loading this antiosteoporotic drug.

3.2. Differentiation and Phenotypic Characterization of EPCs

EPCs are considered a promising cell strategy for tissue engineering applications due to their highly proliferative and antithrombogenic behavior [41,42]. This cell type can be easily obtained from peripheral blood [26,27], and it is very appropriate as an in vitro experimental model for the study of the angiogenic potential of different biomaterials [19,21,43,44]. In this work, after isolating EPCs from porcine peripheral blood and culturing for 23 and 30 days in EGM-2 differentiation medium, the expression of CD31, CD34, VEGFR2, eNOS, and vWF, as endothelial phenotype markers, was analyzed by flow cytometry.

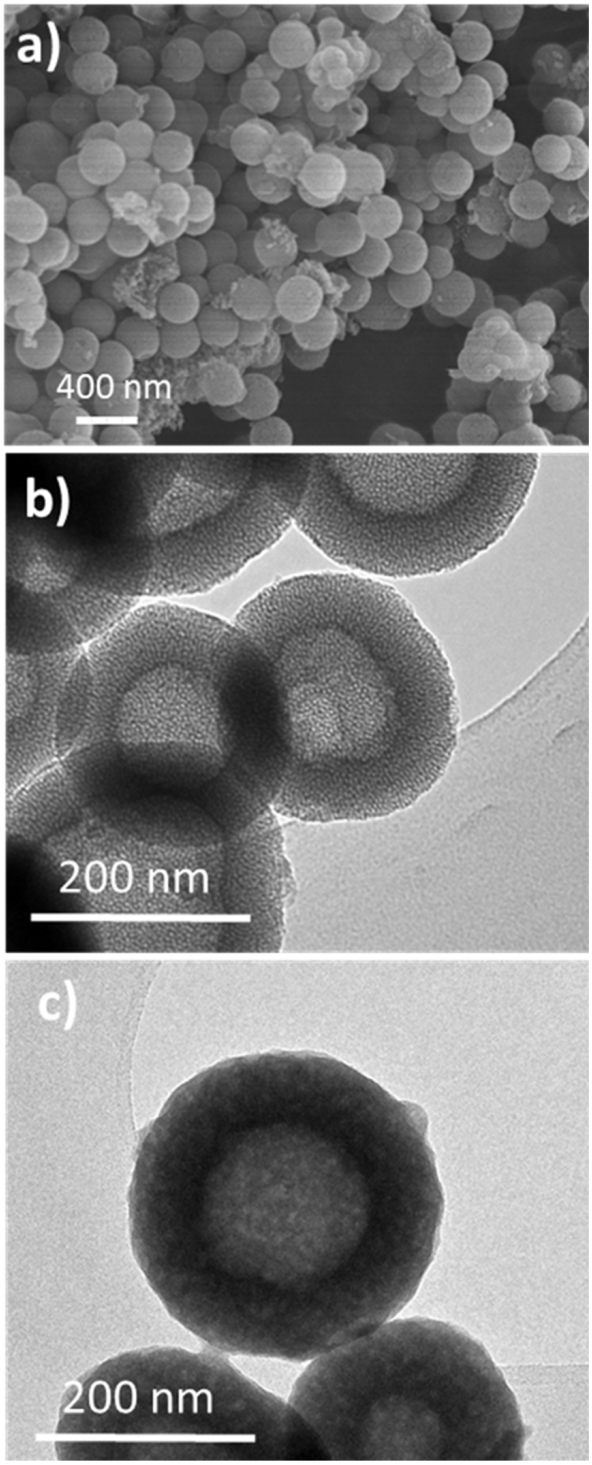


Figure 1. Representative SEM micrograph obtained from Nano-MBGs (**a**). Representative TEM images of Nano-MBGs before loading with ipriflavone (**b**) and after loading with iproflavone (Nano-MBG-IPs) (**c**).

As observed in Figure 2, the expression of the endothelial phenotype markers significantly increased in a time-dependent manner, thus indicating the correct differentiation of the EPCs toward a mature endothelial phenotype. When comparing the values obtained at 23 and 30 days, VEGFR2 and vWF (Figure 2B) showed more significant increases in comparison to the other markers CD31, CD34, and eNOS (Figure 2A). According to these results and considering that the expression of VEGFR2 is directly related to angiogenesis, VEGFR2 was chosen as a reference marker to assess the potential angiogenic effect of

ipriflavone-loaded nanospheres (NanoMBG-IPs) on EPCs after 30 days of differentiation, as well as the modulating role of M1 and M2 macrophages on them.

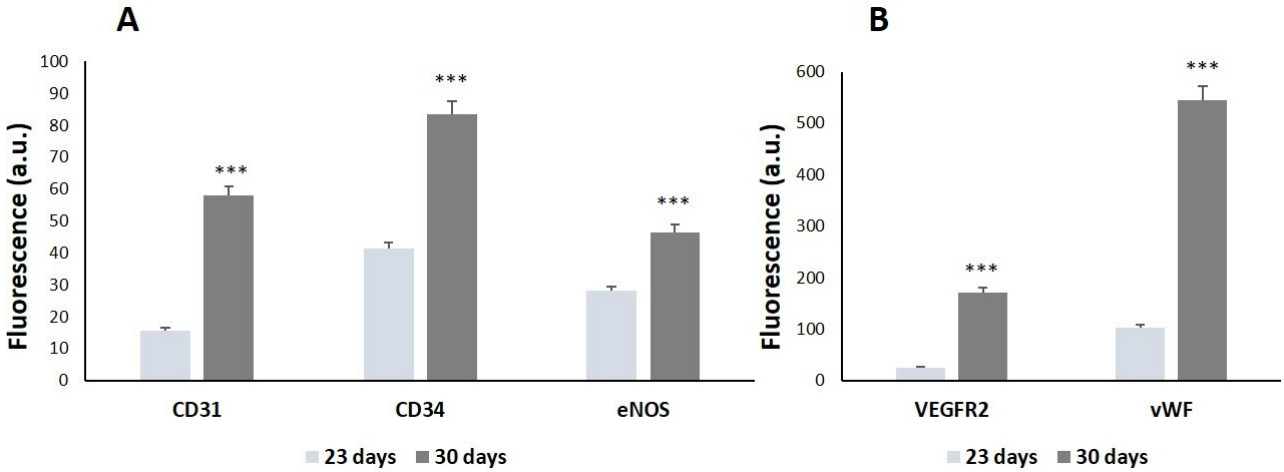


Figure 2. Phenotypic characterization of EPCs in culture. The expression of (**A**) CD31, CD34, and eNOS and (**B**) VEGFR2 and vWF, was evaluated in EPCs as endothelial phenotype markers by immunofluorescence labeling and flow cytometry after 23 and 30 days of differentiation. In each sample, 10,000 cells were analyzed. Statistical significance: *** $p < 0.005$.

3.3. Incorporation of FITC-Labeled NanoMBGs by EPCs and Endocytic Mechanisms

To evaluate the incorporation of NanoMBGs by EPCs, these nanospheres were labeled with FITC. EPCs were cultured for 24 h and then treated with 50 μg/mL of FITC-NanoMBGs for 30, 60, and 90 min in order to quantify the amount of intracellular uptake of this nanomaterial by flow cytometry. Figure 3A shows the intracellular fluorescence intensity of EPCs after this treatment, evidencing a fast and time-dependent uptake of FITC-NanoMBGs, in agreement with previous studies carried out with these nanospheres in other cell types [25,45]. Moreover, confocal microscopy studies were carried out after treatment of EPCs with 50 μg/mL of FITC-NanoMBGs for 24 h to observe the intracellular uptake of this nanomaterial and to evaluate if its incorporation could damage the cytoskeleton structure. Figure 4 shows the abundance of nanospheres into the cytoplasm of EPCs and the integrity of their morphology without cytoskeleton alterations after the uptake.

On the other hand, to identify the endocytic mechanisms via which these nanospheres are incorporated by EPCs, six endocytosis inhibitors (i.e., wortmannin, genistein, cytochalasin B, cytochalasin D, phenylarsine oxide, and chlorpromazine) were used before the addition of FITC-NanoMBGs. Since these agents affect different proteins, thus blocking specific endocytic mechanisms, their use indirectly provides information on the pathways that could be involved in the entry of these nanospheres. In this sense, when the inhibitor used decreases the uptake of nanospheres, the blocked mechanism constitutes an entry pathway. In contrast, if the inhibitor does not decrease the incorporation of the nanospheres, that specific mechanism that has been blocked by the inhibitor is not involved in the nanosphere entry. The dose of each inhibitor was chosen according to previous studies [25,33–37]. As it can be observed in Figure 3B, all inhibitors except cytochalasin D significantly decreased the incorporation of FITC-NanoMBGs, demonstrating that this nanomaterial is incorporated into EPCs via several uptake mechanisms.

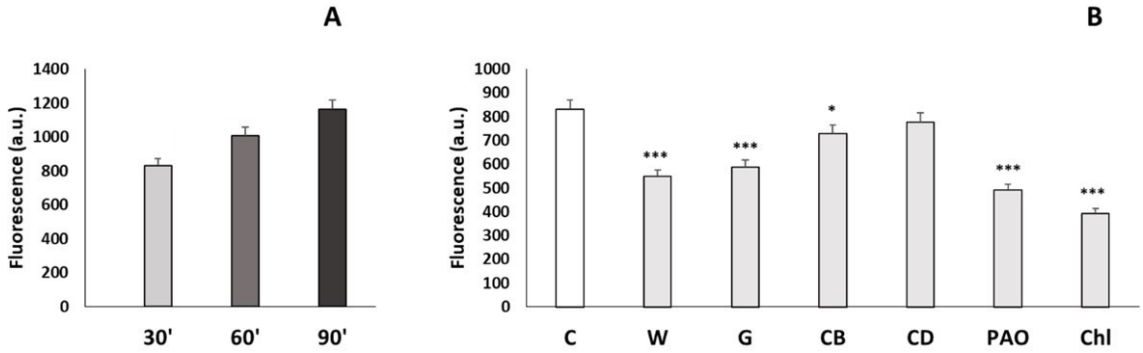


Figure 3. (**A**) Incorporation of FITC-NanoMBGs by EPCs evaluated by flow cytometry. Fluorescence intensity of EPCs with intracellular FITC-NanoMBGs after treatment with 50 μg/mL for different times (30, 60, and 90 min). Statistical significance: *** $p < 0.005$. (**B**) Effects of specific endocytosis inhibitors on FITC-NanoMBG incorporation by EPCs. EPCs were treated for 2 h with each inhibitor before treatment with 50 μg/mL FITC-NanoMBGs for 30 min. FITC-NanoMBG incorporation in each case was quantified by flow cytometry. Control cells without inhibitors were carried out in parallel. C = control cells, W = cells treated with wortmannin, G = cells treated with genistein, CB = cells treated with cytochalasin B, CD = cells treated with cytochalasin D, PAO = cells treated with phenylarsine oxide, Chl = cells treated with chlorpromazine. Statistical significance: * $p < 0.05$, *** $p < 0.005$.

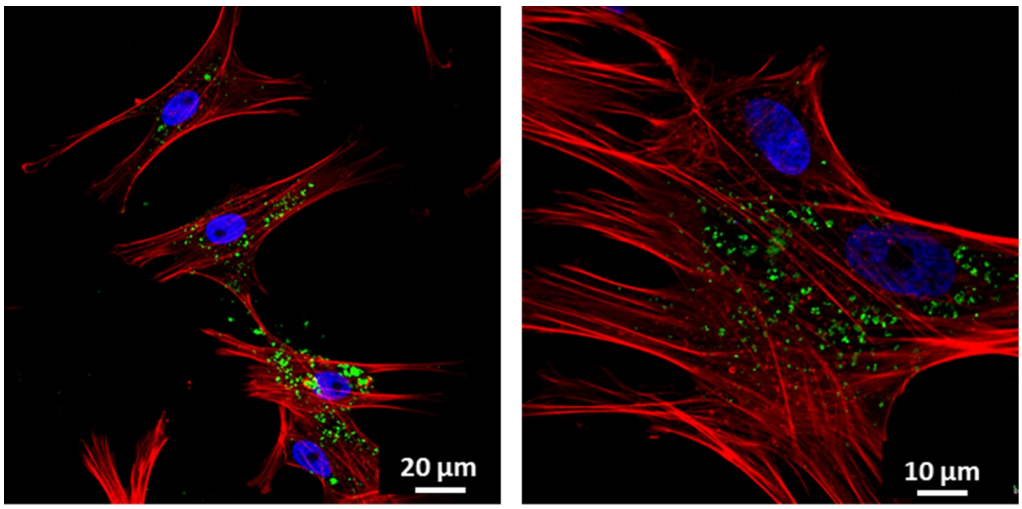


Figure 4. Incorporation of FITC-NanoMBGs by EPCs observed by confocal microscopy. Images of EPCs after 24 h of incubation with 50 μg/mL of FITC-NanoMBGs. Nuclei were stained with DAPI (blue), F-actin filaments were stained with rhodamine-phalloidin (red), and FITC-NanoMBGs are observed in green.

Specifically, wortmannin inhibits phosphoinositide 3-kinase (PI3K) and phosphoinositide 4-kinase (PI4K) [33], which play important roles in cell adhesion, proliferation, motility, apoptosis, and cytoskeletal organization, impacting the phagocytosis mechanisms [46]. On the other hand, genistein produces inhibition of Src tyrosine kinases and affects clathrin-independent endocytosis mediated by caveolae [36]. Since wortmannin and genistein significantly decreased the incorporation of FITC-NanoMBGs by EPCs ($p < 0.005$), we can conclude that phagocytosis and caveolae-mediated uptake are mechanisms involved in the uptake of these nanospheres by this cell type.

Cytochalasins B and D inhibit macropinocytosis via actin polymerization blockage, preventing microfilament action [35,36]. These inhibitors slightly decreased the nanomaterial uptake, but only the effect of cytochalasin B was significant at these experimental conditions ($p < 0.05$). Similar results were obtained in a previous study, when the effect of these inhibitors on FITC-NanoMBG incorporation by pre-osteoblasts was analyzed [25]. Phenylarsine oxide (PAO), an inhibitor of clathrin-dependent endocytosis [34,47,48], and

chlorpromazine, also an inhibitor of clathrin-mediated endocytosis [35], induced more significantly pronounced effects than the other agents, evidencing that clathrin-dependent endocytosis is the main entry mechanism of FITC-NanoMBGs into EPCs.

3.4. Effects of NanoMBGs and NanoMBG-IPs on VEGFR2 Expression in EPCs. Modulating Role of M1 and M2 Macrophages

After demonstration of an efficient intracellular incorporation of FITC-NanoMBGs into EPCs by flow cytometry and confocal microscopy and elucidation of the entry pathways of this nanomaterial into these cells, the effect of unloaded (NanoMBGs) and ipriflavone-loaded nanospheres (NanoMBG-IPs) on the differentiation process of EPCs was analyzed by studying VEGFR2 expression as a specific marker of endothelial differentiation. As it can be observed in Figure 5A, the uptake of NanoMBGs and NanoMBG-IPs induced significant increases in the percentage of $VEGFR2^+$ EPCs compared to control cells after 10 days of treatment with 50 μg/mL of these nanomaterials. These results evidence the ability of these mesoporous nanospheres, even without the drug, to stimulate VEGFR2 expression in EPCs and highlight their potential action on angiogenesis. This effect was more pronounced with NanoMBG-IPs than with NanoMBGs, thus indicating the efficient intracellular release of IP from these nanospheres and its positive in vitro effect on the differentiation of EPCs toward more mature endothelial phenotypes. These data are in consonance with results obtained by us and other authors in relation to the stimulation of osteogenesis and angiogenesis by delivering Si ions and functional drugs from mesoporous silica nanospheres [23,25,49]. Moreover, since macrophages secrete growth factors and other molecules to stimulate angiogenesis depending on their phenotype and activation state [5,6], we wanted to assess the modulating role of conditioned media from basal, M1, and M2 macrophages on the differentiation of EPCs and the effects of the previous 24 h treatment of these macrophages with 50 μg/mL of NanoMBGs and NanoMBG-IPs. Figure 5B–D show the percentages of $VEGFR2^+$ EPCs after 10 days in the presence of the following macrophage conditioned media: (B) treatment with culture media from basal macrophages previously cultured for 24 h in the absence or in the presence of 50 μg/mL of NanoMBGs or NanoMBG-IPs; (C) treatment with culture media from *E. coli* LPS-stimulated M1 macrophages previously cultured for 24 h in the absence or in the presence of 50 μg/mL of NanoMBGs or NanoMBG-IPs; (D) treatment with culture media from IL-10-stimulated M2 macrophages previously cultured for 24 h in the absence or in the presence of 50 μg/mL of NanoMBGs or NanoMBG-IPs.

The treatment of EPCs for 10 days with culture media from basal, M1, and M2 macrophages previously cultured for 24 h in the absence of nanospheres induced significant increases in the percentage of $VEGFR2^+$ EPCs (control bar in Figure 5B–D) compared to control cells (control bar in Figure 5A). However, these increases were less pronounced than the increments produced by the direct treatment of EPCs with NanoMBGs or NanoMBG-IPs (NanoMBGs bar and NanoMBG-IPs bar in Figure 5A). The similar effect of culture media from control macrophages in basal conditions or in both stimulated conditions (stimulation towards M1 or towards M2) demonstrates that the modulatory effect of macrophages on EPCs differentiation is related to macrophage intervention *per se*, independently of the existence or not of stimuli and the type of stimulus used in these assays. When we investigated the effect of conditioned media from macrophages previously treated with both NanoMBGs and NanoMBG-IPs (NanoMBGs bar and NanoMBG-IPs bar in Figure 5B–D), similar results were obtained, thus indicating that the pretreatment of macrophages with these nanospheres under basal or stimulated conditions does not change the effect induced by macrophage-released mediators on VEGFR2 expression. Previous studies evidenced that these NanoMBGs did not induce macrophage polarization toward the M1 proinflammatory phenotype, favoring the M2 reparative phenotype and increasing the macrophage response capability against stimuli such as LPS and IL-4 [23].

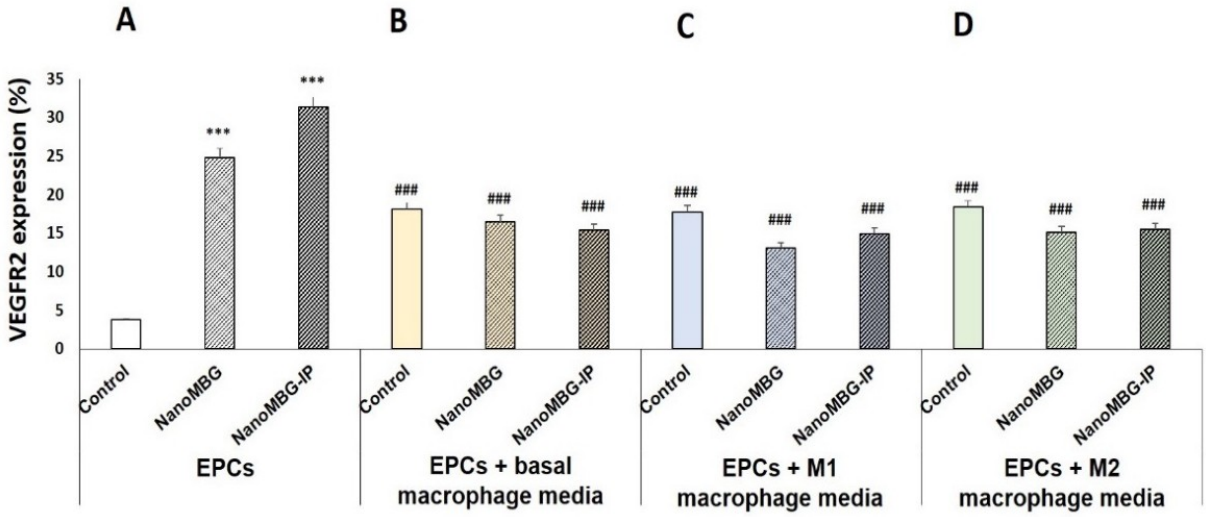


Figure 5. Effects of unloaded (NanoMBGs) and ipriflavone-loaded nanospheres (NanoMBG-IPs) on VEGFR2 expression in EPCs and modulating role of M1 and M2 macrophages. Percentages of VEGFR2$^+$ EPCs were analyzed by flow cytometry after 10 days of treatment under the following conditions: (**A**) direct treatment with 50 μg/mL of either NanoMBGs or NanoMBG-IPs; (**B**) treatment with culture media of basal macrophages previously cultured for 24 h in the absence or in the presence of 50 μg/mL of NanoMBGs or NanoMBG-IPs; (**C**) treatment with culture media of *E. coli* LPS-stimulated M1 macrophages previously cultured for 24 h in the absence or in the presence of 50 μg/mL of NanoMBGs or NanoMBG-IPs; (**D**) treatment with culture media of IL-10-stimulated M2 macrophages previously cultured for 24 h in the absence or in the presence of 50 μg/mL of NanoMBGs or NanoMBG-IPs. Statistical significance: *** $p < 0.005$ (comparisons with control EPCs directly treated with either NanoMBGs or NanoMBG-IPs), ### $p < 0.005$ (comparison with EPCs in the same culture conditions without macrophage conditioned medium).

3.5. Effects of NanoMBGs and NanoMBG-IPs on VEGFR2 and CD206 Expression in Cocultured EPCs and RAW 264.7 Macrophages, Respectively

Next, we analyzed the effect of NanoMBGs and NanoMBG-IPs in cocultures of EPCs and RAW 264.7 macrophages, so that they could maintain communication with each other. These cocultures were carried out in the presence or the absence of 50 μg/mL of NanoMBGs or NanoMBG-IPs for 7 days. After coculture, EPCs and macrophages were harvested separately for the analysis of VEGFR2 and CD206 expression in EPCs and RAW 264.7 macrophages, respectively. EPCs and macrophages cultured alone served as controls. The expression of these specific markers when EPCs were cocultured with M2d angiogenic macrophages obtained from RAW 264.7 macrophages treated with 1 μM NECA, and 100 ng/mL of *E. coli* LPS was also used for comparison.

As can be observed in Figure 6, the coculture of EPCs with control RAW macrophages or M2d angiogenic macrophages produced a decrease or increase in VEGFR2 expression, respectively, when compared to monocultured EPCs. Although these changes were not statistically significant, they are in line with previous results by other authors who demonstrated that anti-inflammatory M2, but not proinflammatory M1 macrophages, promote angiogenesis in vivo [50,51].

The presence of either NanoMBGs or NanoMBG-IPs in the EPC/RAW coculture induced pronounced and significant increases in the percentage of VEGFR2$^+$ EPCs, in agreement with results obtained with monocultured EPCs (Figure 5). Again, these data demonstrate the angiogenic effect of this nanomaterial, regardless of the presence of ipriflavone. A nonsignificant increase was observed in the presence of NanoMBG-IPs compared to NanoMBG; however, it appears that, under these coculture conditions, the action of the drug is masked due to the presence of macrophages in the coculture, which also incorporate the nanospheres and do not allow the effect of the drug to be appreciated. Under these experimental conditions, only the angiogenic effect of the nanomaterial itself is evident. These results are in agreement with the data in Figure 5, which shows a similar

effect of the conditioned media from macrophages previously treated with both NanoMBGs and NanoMBG-IPs on VEGFR2 expression in EPCs, thus indicating that the presence of the drug in the nanospheres does not change the effect of macrophages on VEGFR2 expression by EPCs.

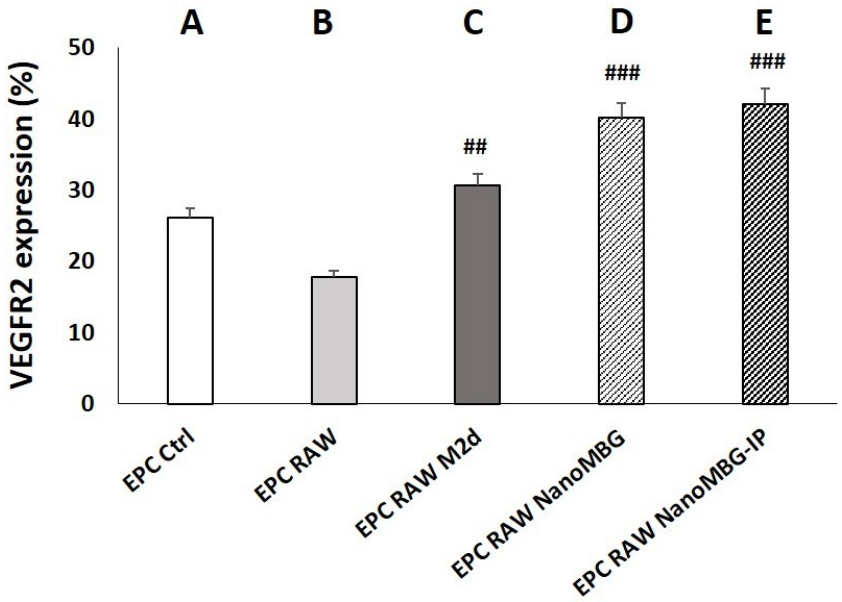


Figure 6. Effects of unloaded (NanoMBGs) and ipriflavone-loaded nanospheres (NanoMBG-IPs) on VEGFR2 expression in EPCs cocultured with RAW 264.7 macrophages. Percentages of $VEGFR2^+$ EPCs after 7 days under the following conditions: (**A**) EPCs in monoculture; (**B**) EPCs cocultured with RAW 264.7 macrophages in the absence of nanospheres and without stimuli; (**C**) EPCs cocultured with M2d angiogenic macrophages obtained from RAW 264.7 macrophages treated with 1 μM NECA and 100 ng/mL of *E. coli* LPS; (**D**) EPCs cocultured with RAW 264.7 macrophages in the presence of 50 μg/mL of NanoMBGs; (**E**) EPCs cocultured with RAW 264.7 macrophages in the presence of 50 μg/mL of NanoMBG-IPs. Statistical significance: ### $p < 0.005$, ## $p < 0.01$ (comparisons with EPC RAW).

Figure 7 shows the effect of NanoMBGs and NanoMBG-IPs on CD206 expression in RAW 264.7 macrophages cocultured with EPCs. Although coculture of EPCs with control RAW macrophages did not induce changes in the percentage of $CD206^+$ macrophages, when EPCs were cocultured with M2d angiogenic macrophages, a significant increase in this parameter was observed when compared to monocultured control RAW 264.7 cells. This result is consistent with the role of CD206 as a specific marker for M2 macrophage phenotype [40]. On the other hand, the presence of NanoMBGs without IP in the RAW/EPC coculture induced a significant increase of the percentage of $CD206^+$ macrophages when compared to control RAW 264.7 cells in monoculture and in coculture with EPCs according to previous studies [23]. The treatment of RAW/EPC cocultures with NanoMBG-IPs also produced an increase in the $CD206^+$ percentage, but this was not statistically significant, thus revealing that it is the nanomaterial itself, and not the drug, which induces this marker increase in macrophages. Although the beneficial role of ipriflavone preventing osteoporosis has been evidenced [23–25], data on the effects of this drug on macrophages are very scarce. Thus, even when flavonoids can inhibit enzymes or transcription factors relevant in inflammation processes [52], Masilamani et al. indicated that ipriflavone had no effect in the suppression of effector cells of allergies [53]. Further studies are needed to understand how ipriflavone acts on macrophages and other cell types.

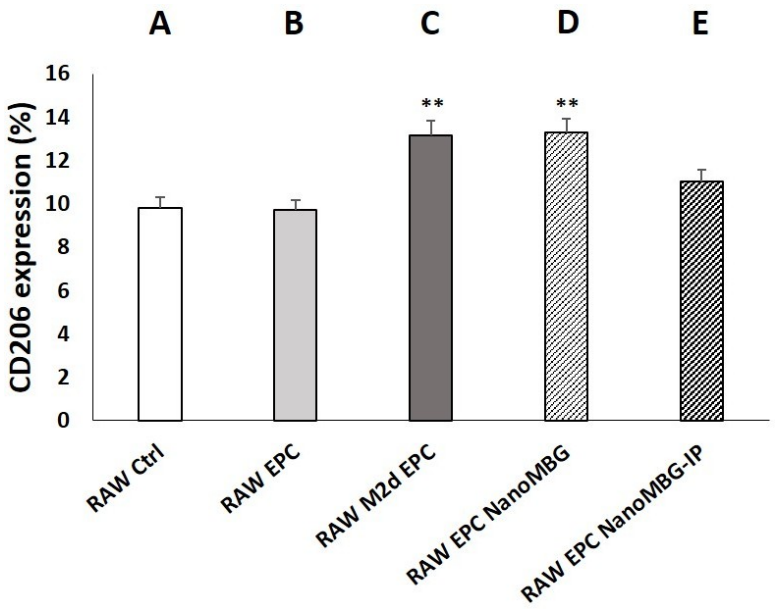


Figure 7. Effects of unloaded (NanoMBGs) and ipriflavone-loaded nanospheres (NanoMBG-IPs) on CD206 expression in RAW 264.7 macrophages cocultured with EPCs. Percentages of $CD206^+$ macrophages after 7 days under the following conditions: (**A**) RAW 264.7 macrophages in monoculture; (**B**) RAW 264.7 macrophages cocultured with EPCs in the absence of nanospheres and without stimuli; (**C**) M2d angiogenic macrophages obtained from RAW 264.7 macrophages treated with 1 μM NECA and 100 ng/mL of *E. coli* LPS and cocultured with EPCs; (**D**) RAW 264.7 macrophages cocultured with EPCs in the presence of 50 μg/mL of NanoMBGs; (**E**) RAW 264.7 macrophages cocultured with EPCs in the presence of 50 μg/mL of NanoMBG-IPs. Statistical significance: ** $p < 0.01$ (comparisons with control RAW cells in monoculture).

4. Conclusions

Our study evidences the great potential of unloaded and ipriflavone-loaded mesoporous nanospheres to promote the expression of VEGFR2, directly related to angiogenesis, after their incorporation by endothelial progenitor cells (EPCs). The pathways involved in the entry of these nanospheres into EPCs include clathrin-dependent endocytosis, as the main entry mechanism, as well as phagocytosis and caveolae-mediated uptake. The treatment of EPCs with culture media from basal, M1, and M2 macrophages and studies with cocultures of EPCs with macrophages in the absence and presence of these nanomaterials confirmed the maintenance of their angiogenic effect on EPCs even in the presence of phagocytic cells. Further studies with in vivo models will be conducted to determine the benefits of these nanospheres for bone tissue regeneration via induction of both osteogenesis and angiogenesis.

Author Contributions: Conceptualization, D.A. and M.T.P.; methodology, L.C., A.P.-M., M.C.S., D.A., M.J.F., and M.T.P.; validation, D.A. and M.T.P.; formal analysis, L.C.; investigation, L.C., A.P.-M., D.A., M.C.S., M.J.F., and M.T.P.; resources, M.T.P., D.A., and M.V.-R.; data curation, D.A. and M.T.P.; writing—original draft preparation, M.T.P., L.C., and D.A.; writing—review and editing, M.T.P., D.A., M.C.S., L.C., and M.V.-R.; visualization, D.A., M.C.S., and M.T.P.; supervision, M.T.P., D.A., M.C.S., and M.V.-R.; project administration, M.T.P., D.A., and M.V.-R.; funding acquisition, M.T.P., D.A., and M.V.-R. All authors read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by the Ministerio de Economía y Competitividad, Agencia Estatal de Investigación (AEI), Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER) (MAT2016-75611-R AEI/FEDER, UE to D.A. and M.T.P.), and European Research Council (Advanced Grant VERDI; ERC-2015-AdG Proposal No. 694160 to M.V.-R.).

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: Data is contained within the article.

Acknowledgments: The realization of these studies was possible thanks to research grants from the Ministerio de Economía y Competitividad, Agencia Estatal de Investigación (AEI) and Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER) (MAT2016-75611-R AEI/FEDER, UE). M.V.-R. acknowledges financing from the European Research Council (Advanced Grant VERDI; ERC-2015-AdG Proposal No. 694160). L.C. is grateful to the Universidad Complutense de Madrid for a UCM fellowship. The authors thank the staff of the ICTS Centro Nacional de Microscopía Electrónica and the Centro de Citometría y Microscopía de Fluorescencia (Universidad Complutense de Madrid, Spain) for the support with electron microscopy, flow cytometry, and confocal microscopy studies.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Jain, R.K. Molecular regulation of vessel maturation. *Nat. Med.* **2003**, *9*, 685–693. [CrossRef] [PubMed]
2. Newman, A.C.; Nakatsu, M.N.; Chou, W.; Gershon, P.D.; Hughes, C.C. The requirement for fibroblasts in angiogenesis: Fibroblast-derived matrix proteins are essential for endothelial cell lumen formation. *Mol. Biol. Cell* **2011**, *22*, 3791–3800. [CrossRef]
3. Rafii, S.; Butler, J.M.; Ding, B.S. Angiocrine functions of organ-specific endothelial cells. *Nature* **2016**, *529*, 316–32512. [CrossRef] [PubMed]
4. Li, J.; Zhang, Y.P.; Kirsner, R.S. Angiogenesis in wound repair: Angiogenic growth factors and the extracellular matrix. *Microsc. Res. Tech.* **2003**, *60*, 107–114. [CrossRef] [PubMed]
5. Nucera, S.; Biziato, D.; De Palma, M. The interplay between macrophages and angiogenesis in development, tissue injury and regeneration. *Int. J. Dev. Biol.* **2011**, *55*, 495–503. [CrossRef]
6. Crowther, M.; Brown, N.J.; Bishop, E.T.; Lewis, C.E. Microenvironmental influence on macrophage regulation of angiogenesis in wounds and malignant tumors. *J. Leukoc. Biol.* **2001**, *70*, 478–490. [PubMed]
7. Porcheray, F.; Viaud, S.; Rimaniol, A.C.; Leone, C.; Samah, B.; Dereuddre-Bosquet, N.; Dormont, D.; Gras, G. Macrophage activation switching: An asset for the resolution of inflammation. *Clin. Exp. Immunol.* **2005**, *142*, 481–489. [CrossRef]
8. Shapouri-Moghaddam, A.; Mohammadian, S.; Vazini, H.; Taghadosi, M.; Esmaeili, S.A.; Mardani, F.; Seifi, B.; Mohammadi, A.; Afshari, J.T.; Sahebkar, A. Macrophage plasticity, polarization, and function in health and disease. *J. Cell Physiol.* **2018**, *233*, 6425–6440. [CrossRef]
9. Mantovani, A.; Biswas, S.K.; Galdiero, M.R.; Sica, A.; Locati, M. Macrophage plasticity and polarization in tissue repair and remodelling. *J. Pathol.* **2013**, *229*, 176–185. [CrossRef]
10. Martinez, F.O.; Sica, A.; Mantovani, A.; Locati, M. Macrophage activation and polarization. *Front. Biosci.* **2008**, *13*, 453–461. [CrossRef]
11. Ferrante, C.J.; Pinhal-Enfield, G.; Elson, G.; Cronstein, B.N.; Hasko, G.; Outram, S.; Leibovich, S.J. The adenosine-dependent angiogenic switch of macrophages to an M2-like phenotype is independent of interleukin-4 receptor alpha (IL-4Ralpha) signaling. *Inflammation* **2013**, *36*, 921–931. [CrossRef]
12. Pinhal-Enfield, G.; Ramanathan, M.; Hasko, G.; Vogel, S.N.; Salzman, A.L.; Boons, G.J.; Leibovich, S.J. An Angiogenic Switch in Macrophages Involving Synergy between Toll-Like Receptors 2, 4, 7, and 9 and Adenosine A2A Receptors. *Am. J. Pathol.* **2003**, *163*, 711–721. [CrossRef]
13. Ferrara, N.; Davis-Smyth, T. The biology of vascular endothelial growth factor. *Endocr. Rev.* **1997**, *18*, 4–25. [CrossRef]
14. Dvorak, H.F.; Nagy, J.A.; Feng, D.; Brown, L.F.; Dvorak, A.M. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor and the significance of microvascular hyperpermeability in angiogenesis. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **1999**, *237*, 97–132.
15. Shibuya, M. Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptor (VEGFR) signaling in angiogenesis: A crucial target for anti- and pro-angiogenic therapies. *Genes Cancer* **2011**, *2*, 1097–1105. [CrossRef]
16. Street, J.; Bao, M.; Bunting, S.; Peale, F.V.; Ferrara, N.; Steinmetz, H.; Hoeffel, J.; Cleland, J.L.; Daugherty, A.; van Bruggen, N. Vascular endothelial growth factor stimulates bone repair by promoting angiogenesis and bone turnover. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2002**, *99*, 9656–9661. [CrossRef]
17. Patel, Z.S.; Young, S.; Tabata, Y.; Jansen, J.A.; Wong, M.E.K.; Mikos, A.G. Dual delivery of an angiogenic and an osteogenic growth factor for bone regeneration in a critical size defect model. *Bone* **2008**, *43*, 931–940. [CrossRef] [PubMed]
18. Moon, J.J.; West, J.L. Vascularization of engineered tissues: Approaches to promote angio-genesis in biomaterials. *Curr. Top. Med. Chem.* **2008**, *8*, 300–310. [PubMed]
19. Izquierdo-Barba, I.; Santos-Ruiz, L.; Becerra, J.; Feito, M.J.; Fernández-Villa, D.; Serrano, M.C.; Díaz-Güemes, I.; Fernández-Tomé, B.; Enciso, S.; Sánchez-Margallo, F.M.; et al. Synergistic effect of Si-hydroxyapatite coating and VEGF adsorption on Ti6Al4V-ELI scaffolds for bone regeneration in an osteoporotic bone environment. *Acta Biomater.* **2019**, *83*, 456–466. [CrossRef]
20. Ngo, M.T.; Harley, B.A.C. Angiogenic biomaterials to promote therapeutic regeneration and investigate disease progression. *Biomaterials* **2020**, *255*, 120207. [CrossRef]
21. Casarrubios, L.; Gómez-Cerezo, N.; Sánchez-Salcedo, S.; Feito, M.J.; Serrano, M.C.; Saiz- Pardo, M.; Ortega, L.; de Pablo, D.; Díaz-Güemes, I.; Fernández-Tomé, B.; et al. Silicon substituted hydroxyapatite/VEGF scaffolds stimulate bone regeneration in osteoporotic sheep. *Acta Biomater.* **2020**, *101*, 544–553. [CrossRef] [PubMed]
22. 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]
23. Casarrubios, L.; Gómez-Cerezo, N.; Feito, M.J.; Vallet-Regí, M.; Arcos, D.; Portolés, M.T. Incorporation and effects of mesoporous bioactive glass nanospheres loaded with ipriflavone on osteoblast/osteoclast cocultures. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2018**, *133*, 258–268. [CrossRef]
24. Reginster, J.Y. Ipriflavone: Pharmacological properties and usefulness in postmenopausal osteoporosis. *Bone Miner.* **1993**, *23*, 223–232. [CrossRef]
25. 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]
26. Serrano, M.C.; Pagani, R.; Ameer, G.A.; Vallet-Regí, M.; Portolés, M.T. Endothelial cells derived from circulating progenitors as an effective source to functional endothelialization of NaOH-treated poly(epsilon-caprolactone) films. *J. Biomed. Mater. Res. A* **2008**,

87, 964–971. [CrossRef]
27. Allen, J.; Khan, S.; Serrano, M.C.; Ameer, G. Characterization of porcine circulating progenitor cells: Toward a functional endothelium. *Tissue Eng.* **2008**, *14*, 183–194. [CrossRef]
28. van Mourik, J.A.; Leeksma, O.C.; Reinders, J.H.; de Groot, P.G.; Zandbergen-Spaargaren, J. Vascular endothelial cells synthesize a plasma membrane protein indistinguishable from the platelet membrane glycoprotein IIa. *J. Biol. Chem.* **1985**, *260*, 11300–11306. [CrossRef]
29. Wood, H.B.; May, G.; Healy, L.; Enver, T.; Morriss-Kay, G.M. CD34 expression patterns during early mouse development are related to modes of blood vessel formation and reveal additional sites of hematopoiesis. *Blood* **1997**, *90*, 2300–2311. [CrossRef] [PubMed]
30. Kuhlencordt, P.J.; Rosel, E.; Gerszten, R.E.; Morales-Ruiz, M.; Dombkowski, D.; Atkinson, W.J.; Han, F.; Preffer, F.; Rosenzweig, A.; Sessa, W.C.; et al. Role of endothelial nitric oxide synthase in endothelial activation: Insights from eNOS knockout endothelial cells. *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.* **2004**, *286*, C1195–C1202. [CrossRef] [PubMed]
31. Zanetta, L.; Marcus, S.G.; Vasile, J.; Dobryansky, M.; Cohen, H.; Eng, K.; Shamamian, P.; Mignatti, P. Expression of Von Willebrand factor, an endothelial cell marker, is upregulated by angiogenesis factors: A potential method for objective assessment of tumor angiogenesis. *Int. J. Cancer* **2000**, *85*, 281–288. [CrossRef]
32. Ferrara, N. Role of vascular endothelial growth factor in regulation of physiological angiogenesis. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **2001**, *280*, C1358–C1366. [CrossRef]
33. Bandmann, V.; Müller, J.D.; Köhler, T.; Homann, U. Uptake of fluorescent nano beads into BY2-cells involves clathrin-dependent and clathrin-independent endocytosis. *FEBS Lett.* **2012**, *586*, 3626–3632. [CrossRef]
34. Sato, K.; Nagai, J.; Mitsui, N.; Yumoto, R.; Takano, M. Effects of endocytosis inhibitors on internalization of human IgG by Caco-2 human intestinal epithelial cells. *Life Sci.* **2009**, *85*, 800–807. [CrossRef] [PubMed]
35. Mäger, I.; Langel, K.; Lehto, T.; Eiríksdóttir, E.; Langel, Ü. The role of endocytosis on the uptake kinetics of luciferin-conjugated cell-penetrating peptides. *Biochim. Biophys. Acta* **2012**, *1818*, 502–511. [CrossRef]
36. Schulz, W.L.; Haj, A.K.; Schi, L.A. Reovirus Uses Multiple Endocytic Pathways for Cell Entry. *J. Virol.* **2012**, *86*, 12665–12675. [CrossRef] [PubMed]
37. Linares, J.; Matesanz, M.C.; Vila, M.; Feito, M.J.; Gonçalves, G.; Vallet-Regí, M.; Marques, P.A.A.P.; Portolés, M.T. Endocytic mechanisms of graphene oxide nanosheets in osteoblasts, hepatocytes and macrophages. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2014**, *6*, 13697–13706. [CrossRef]
38. Diez-Orejas, R.; Feito, M.J.; Cicuéndez, M.; Casarrubios, L.; Rojo, J.M.; Portolés, M.T. Graphene oxide nanosheets increase Candida albicans killing by proinflammatory and reparative peritoneal macrophages. *Colloids Surf. B* **2018**, *171*, 250–259. [CrossRef]
39. Makita, N.; Hizukuri, Y.; Yamashiro, K.; Murakawa, M.; Hayashi, Y. IL-10 enhances the phenotype of M2 macrophages induced by IL-4 and confers the ability to increase eosinophil migration. *Int. Immunol.* **2014**, *27*, 131–141. [CrossRef] [PubMed]
40. Mosser, D.M.; Edwards, J.P. Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat. Rev. Immunol.* **2008**, *8*, 958–969. [CrossRef]
41. Yamamoto, K.; Takahashi, T.; Asahara, T.; Ohura, N.; Sokabe, T.; Kamiya, A.; Ando, J. Proliferation, differentiation, and tube formation by endothelial progenitor cells in response to shear stress. *J. Appl. Physiol.* **2003**, *95*, 2081–2088. [CrossRef]
42. Shirota, T.; He, H.; Yasui, H.; Matsuda, T. Human endothelial progenitor cell-seeded hybrid graft: Proliferative and antithrombogenic potentials *in vitro* and fabrication processing. *Tissue Eng.* **2003**, *9*, 127–136. [CrossRef]
43. Serrano, M.C.; Pagani, R.; Vallet-Regí, M.; Peña, J.; Comas, J.V.; Portolés, M.T. Nitric oxide production by endothelial cells derived from blood progenitors cultured on NaOH-treated polycaprolactone films: A biofunctionality study. *Acta Biomater.* **2009**, *5*, 2045–2053. [CrossRef] [PubMed]
44. Feito, M.J.; Serrano, M.C.; Oñaderra, M.; Matesanz, M.C.; Sánchez-Salcedo, S.; Arcos, D.; Vallet-Regí, M.; Portolés, M.T. Effects of immobilized VEGF on endothelial progenitor cells cultured on silicon substituted and nanocrystalline hydroxyapatites. *RSC Adv.* **2016**, *6*, 92586–92595. [CrossRef]
45. Montes-Casado, M.; Sanvicente, A.; Casarrubios, L.; Feito, M.J.; Rojo, J.M.; Vallet-Regí, M.; Arcos, D.; Portolés, P.; Portolés, M.T. An immunological approach to the biocompatibility of mesoporous SiO_2-CaO nanospheres. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, 8291. [CrossRef]
46. Cantley, L.C. The phosphoinositide 3-kinase pathway. *Science* **2002**, *6*, 1655–1657. [CrossRef]
47. Yang, C.Y.; Tai, M.F.; Lin, C.P.; Lu, C.P.; Lu, C.W.; Wang, J.L.; Hsiao, J.K.; Liu, H.M. Mechanism of cellular uptake and impact of ferucarbotran on macrophage physiology. *PLoS ONE* **2011**, *6*, e25524. [CrossRef]
48. Kiyoshima, D.; Kawakami, K.; Hayakawa, K.; Tatsumi, H.; Sokabe, M. Force- and Ca^{2+}-dependent internalization of integrins in cultured endothelial cells. *J. Cell. Sci.* **2011**, *124*, 3859–3870. [CrossRef] [PubMed]
49. Shi, M.; Zhou, Y.; Shao, J.; Chen, Z.; Song, B.; Chang, J.; Wua, C.; Xiao, Y. Stimulation of osteogenesis and angiogenesis of hBMSCs by delivering Si ions and functional drug from mesoporous silica nanospheres. *Acta Biomater.* **2015**, *21*, 178–189. [CrossRef]
50. Jetten, N.; Verbruggen, S.; Gijbels, M.J.; Post, M.J.; De Winther, M.P.J.; Donners, M.M.P.C. Anti-inflammatory M2, but not pro-inflammatory M1 macrophages promote angiogenesis *in vivo*. *Angiogenesis* **2014**, *17*, 109–118. [CrossRef]
51. Yang, Y.; Guo, Z.; Chen, W.; Wang, X.; Cao, M.; Han, X.; Zhang, K.; Teng, B.; Cao, J.; Wu, W.; et al. M2 macrophage-derived exosomes promote angiogenesis and growth of pancreatic ductal adenocarcinoma by targeting E2F2. *Mol. Ther.* **2021**, *29*, 1226–1238. [CrossRef] [PubMed]
52. Maleki, S.J.; Crespo, J.F.; Cabanillas, B. Anti-inflammatory effects of flavonoids. *Food Chem.* **2019**, *299*, 125124. [CrossRef] [PubMed]
53. Masilamani, M.; Chang, L.M.; Kamalakannan, M.; Schussler, E.; Rassbach, W.; Sampson, H.A. Dietary isoflavone supplementation for food allergy: A pilot study. *J. Allergy Clin. Immunol. Pract.* **2017**, *5*, 1760–1762. [CrossRef] [PubMed

RESPUESTA DE LINFOCITOS TH2 A NANOESFERAS DE SÍLICE MESOPOROSA

RESUMEN

Las nanoesferas de vidrio mesoporoso bioactivo (nanoMBGs) tienen un gran potencial para su aplicación clínica, especialmente para el tratamiento de enfermedades como la osteoporosis, el cáncer y procesos infecciosos.
La biocompatibilidad y la adecuada respuesta celular para la que ha sido diseñado el nanomaterial, son cruciales en el éxito o fracaso funcional del nanomaterial una vez incorporado en el organismo. Estudios recientes han revelado que la interacción de los biomateriales con las células inmunitarias del huésped, entre las que se incluyen las APCs, los linfocitos T y B, puede tener implicaciones negativas para la remodelación de los tejidos, lo que pone de manifiesto la importancia de los estudios de biocompatibilidad con células del sistema inmune. Los linfocitos T, helper o colaboradores son células especializadas del sistema inmune, que juegan un papel central como mediadores de la respuesta celular dirigida principalmente contra agentes intracelulares. Además, son esenciales en la regulación de la respuesta inmune.
Por ello, en el presente estudio se ha evaluado la biocompatibilidad *in vitro* de estas nanoesferas con dos tipos celulares implicados en la inmunidad adaptativa, la línea de linfocitos T $CD4^+$ Th2 SR.D10 y la línea de linfocitos T $CD4^+$ Th1 AE103.
Los ensayos de citometría de flujo muestran que las nanopartículas fueron captadas rápida y eficazmente *in vitro* por los dos tipos de linfocitos T, Th1 y Th2, y que no fueron citotóxicas, ya que no tuvieron ningún efecto sobre la viabilidad, el tamaño y complejidad celular. El efecto significativo de la wortmanina y la clorpromazina en la internación de las nanoMBG-FITCs indica la implicación de la fagocitosis y la endocitosis dependiente de clatrina, puesto que inhibe la fosfoinositol 3-quinasa (PI3K) y el ensamblaje de la cubierta de clatrina, respectivamente. Además, las nanoMBGs y nanoMBG-IPs favorecen la producción de citoquinas antiinflamatorias intracelulares, como la IL-4 en la línea de linfocitos T CD4+ Th2 SR.D10. Por lo tanto, los resultados obtenidos nos permiten concluir que la incorporación de nanoMBGs y nanoMBG-IPs no alteran el fenotipo reparador, característico de esta línea celular de linfocitos T cooperadores Th2, implicados en la reparación tisular.

INTRODUCCIÓN

Las nanoesferas de vidrio mesoporoso bioactivo (nanoMBGs) tienen un gran potencial para las aplicaciones clínicas, especialmente para el tratamiento de enfermedades como el cáncer y procesos infecciosos[368,371]. Recientemente numerosos estudios se centran en el uso de estas nanopartículas para la administración intracelular de fármacos, ya que podrían reducir la toxicidad y los efectos secundarios del medicamento. Sin embargo, la biocompatibilidad del nanomaterial y la adecuada respuesta celular frente a este, son esenciales en el éxito o el fracaso funcional una vez incorporados en el organismo[372]. Por lo tanto, la evaluación *in vitro* de los efectos de estas nanoMBGs en el sistema inmunitario es un aspecto esencial que se ha abordado en el presente trabajo.

La respuesta inmune comprende mecanismos de defensa tanto innatos como adaptativos, con la participación coordinada de diferentes poblaciones celulares. El sistema inmunitario innato constituye la primera línea de defensa contra los agentes infecciosos y las partículas extrañas. En este primer estadío intervienen neutrófilos, monocitos, células dendríticas y macrófagos, que llevan a cabo la fagocitosis y producen especies reactivas de oxígeno (ROS), péptidos antimicrobianos y mediadores inflamatorios.
Una vez que el nanomaterial entra en contacto con los fluidos corporales, puede sufrir cambios significativos en su superficie por la adsorción de diferentes proteínas plasmáticas en función de su hidrofobicidad. Así, se forma una película que recubre la superficie del nanomaterial, determinando el reconocimiento del material extraño y su posible eliminación por las células del sistema inmune innato[373].
Las nanopartículas pueden ser fagocitadas por los macrófagos o las células dendríticas, que son las células presentadoras de antígeno (APC), clave en la respuesta inmune, ya que son capaces de internar el nanomaterial, procesarlo y presentar los antígenos al resto de las células del sistema inmune, modulando de esta forma la respuesta inmunitaria innata. Por ello, son cada vez más los estudios con nanopartículas centrados en la modulación de la inmunogenicidad y, por tanto, en la respuesta inflamatoria aguda y/o crónica[373,375].

Las APCs vinculan la respuesta inmune innata con una respuesta adaptativa específica a los antígenos que presentan. Estas células exponen en su superficie receptores de reconocimiento de patrones (PRR), que, en el caso del sistema inmune innato, pertenecen mayoritariamente a la familia de receptores de tipo Toll (TLRs), que permiten detectar patógenos invasores o signos de estrés y daño celular. La activación de estos receptores induce respuestas inflamatorias en leucocitos de linaje mieloide a través de la vía NF-κB, induciendo la producción de citoquinas inflamatorias como IL-1, IL-8, TNF-α e IL-12[376]. Además, los TLRs activados producen la maduración y aumentan la expresión de moléculas coestimuladoras, como CD80, CD86 y CD40. Estas proteínas, expresadas en la superficie de células presentadoras de antígeno, son necesarias para la activación de linfocitos T, ya que aumentan la expresiónen su superficie de moléculas del Complejo Mayor de Histocompatibilidad (MHC tipo II), que exponen péptidos antigénicos[377].

Las APCs maduras migran a los órganos linfoides secundarios, como los ganglios linfáticos donde actúan como APCs profesionales y estimulan a los linfocitos T naïve, proporcionándoles tres tipos de señales necesarias para que los linfocitos T se activen y se conviertan en células T efectoras[376-378].

Estos tres tipos de señales provienen de (Fig. 1): (i) la interacción del receptor de la célula T (TCR-CD3), que reconoce como ligando a péptidos pequeños, asociados con moléculas del complejo principal de histocompatibilidad (MHC) en la membrana plasmática de macrófagos y otras células presentadoras de antígenos. En este proceso colaboran los correceptores CD4 o CD8 en la célula T, que estabilizan las interacciones mediadas por TCR y favorecen la comunicación intracelular; (ii) la señalización coestimulatoria mediada por las moléculas presentes en las APCs de la familia B7 (CD80, CD86), que actúan como ligandos de CD28, que es la principal molécula coestimuladora de la célula T. Este reconocimiento especifico, conduce a la proliferación de la célula T con capacidad de reconocer el antígeno; la tercera señal, (iii) corresponde a la señalización mediada por citoquinas secretadas por las APCs, que son determinantes en la diferenciación de la célula T. En este proceso, se produce un intercambio de señales entre la APC y la célula T, que conducen a la activación de los linfocitos entrando en un proceso de diferenciación, que determinará el tipo de célula efectora en la que se convertirá.

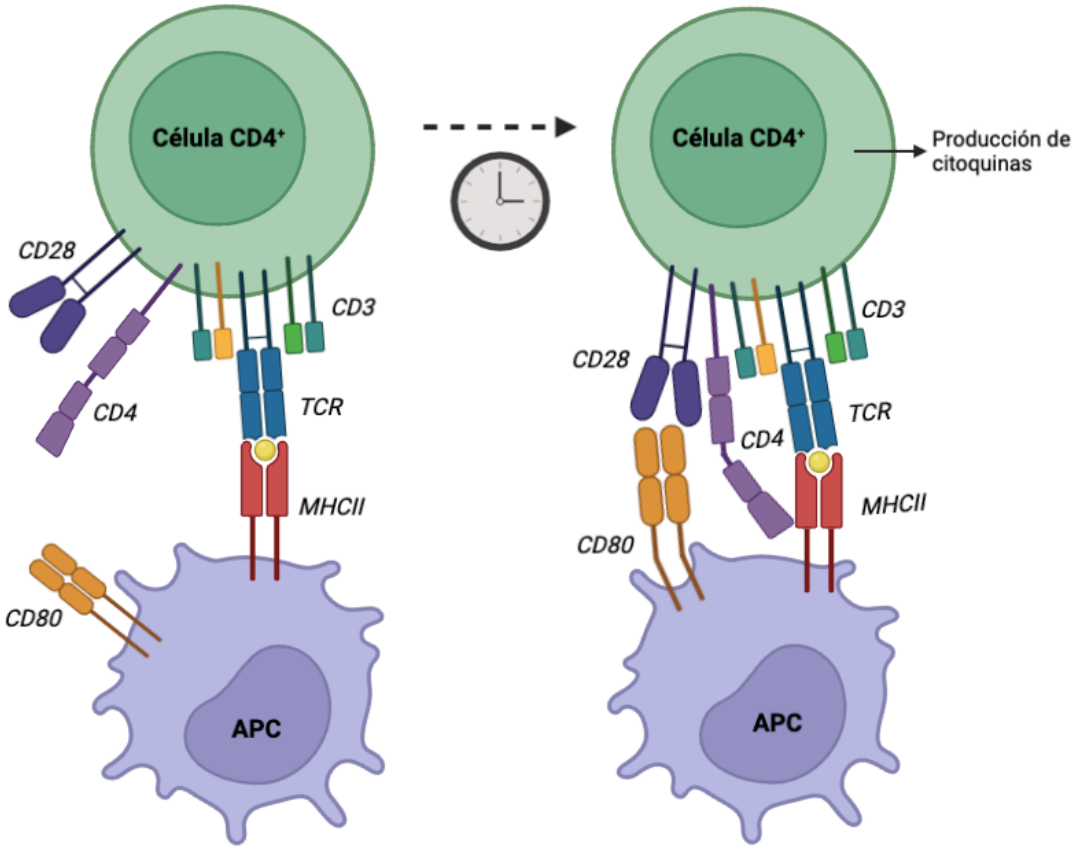


Figura 1. Representación de la interacción entre una APC MCH II con un linfocito T CD4+.

En el caso de las células T helper o cooperadoras con fenotipo CD4+, se puede favorecer la conversión en células de tipo Th1, promovida por IL-12 e IFN-Ɣ, Th2 por IL-4 e IL-10,

o Th17 por IL-6 e IL-21 (Fig. 15 Introducción general). Cada una de estas células lleva a cabo respuestas inmunes específicas asociadas al tejido afectado. Otra subpoblación de linfocitos T CD4+ son los T reguladores (Treg) que expresan constitutivamente altas concentraciones del receptor CD25+ y están implicados, fundamentalmente, en suprimir las células T efectoras autorreactivas[379-380].

Recientemente, se ha descrito una subpoblación de células T CD4+ presente en los folículos de las células B, llamadas células T helper foliculares (T_{fh}), especializadas en colaborar con los linfocitos B para desencadenar una respuesta inmune adaptativa produciendo anticuerpos específicos[381] (Fig. 15 Introducción general). Las células T_{fh} expresan el receptor de quimioquina CXCR5, Bcl6, PD-1, «inducible T-cell costimulator» (ICOS) y CD40L, y liberan interleuquina 21[378,381-382]. Las APCs también interactúan con los linfocitos T CD8+ citotóxicos para promover su función lítica efectora específica de antígeno.

Estudios recientes en el campo de la bionanotecnología, han revelado que la interacción de los biomateriales con las células inmunitarias del huésped, incluidas las APCs y los linfocitos T y B, puede tener implicaciones negativas para la remodelación de los tejidos, lo que pone de manifiesto la importancia de los estudios de biocompatibilidad del sistema inmune[169,183].

Resultados

1. Incorporación de nanoMBG-FITCs en linfocitos Th2CD4$^+$ SR.D10 y linfocitos Th1 CD4$^+$ AE103

Los linfocitos T, helper o colaboradores son células especializadas del sistema inmune, que juegan un papel central como mediadores de la respuesta celular dirigida principalmente contra agentes intracelulares. Además, son esenciales en la regulación de la respuesta inmune. Con el fin de evaluar la incorporación de nanoesferas por los linfocitos T, éstos se cultivaron durante 15, 30 y 60 min con 10, 30 y 50 µg/ml de nanoMBG-FITCs. La cantidad de fluorescencia en el interior celular se detectó mediante citometría de flujo. La Fig. 2 muestra la incorporación de nanoMBG-FITCs en una línea diferenciada de linfocitos Th2 CD4+ SR.D10 (panel A) y una línea de linfocitos Th1 CD4$^+$ AE103 (panel B). El porcentaje de células que incorporaron nanoMBG-FITCs y la intensidad de fluorescencia a los diferentes tiempos, se cuantificaron por citometría de flujo. Como se observa en la Fig. 2 paneles A y B, la incorporación de nanoMBG-FITCs en ambas líneas de linfocitos T fue muy rápida. En el caso de las SRD10 (panel A), dicha incorporación fue dependiente del tiempo y de la dosis empleada. Así, el porcentaje de células que incorporaron nanoMBG-FITCs tras 15, 30 y 60 minutos, fue significativamente mayor ($p<0,005$) en presencia de 30 y 50 µg/ml de nanoesferas, que con la dosis de 10 µg/ml. El porcentaje de incorporación con 10 µg/ml de nanoesferas durante 15 y 30 min de exposición no mostró diferencias estadísticamente significativas. Sin embargo, con esta misma dosis a 60 min, sí se observó un incremento significativo de este parámetro.

En el caso de la línea de linfocitos Th1 AE103 (panel B), el porcentaje de células que incorporó las nanoesferas fue muy elevado, rápido e independiente de la dosis empleada. En cuanto a la cantidad de nanoMBG-FITCs que incorpora cada célula, tanto los SR.D10 como los AE103 a los 30 minutos de exposición no se habían saturado, y por lo tanto, no estaría produciéndose la exocitosis de las mismas, que es el proceso descrito para la eliminación de otras nanopartículas en células de mamíferos[383].

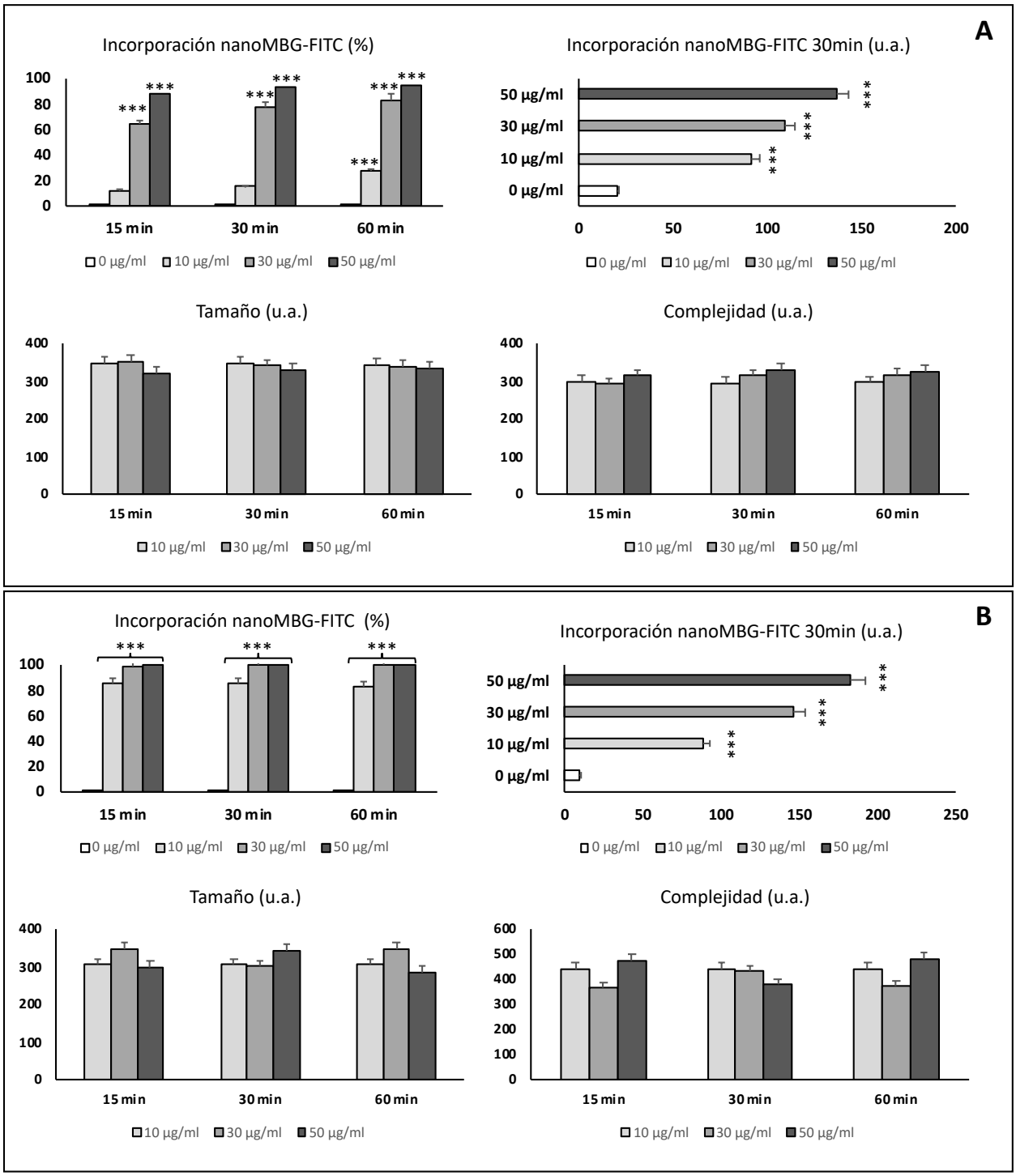


Figura 2. A) Incorporación de nanoMBGs marcadas con FITC en línea de linfocitos Th2 $CD4^+$ SR.D10 y B) línea de linfocitos Th1 $CD4^+$ AE103

Asimismo, se observa que la cantidad intracelular de nanoMBG-FITCs en estas células fue dependiente de las concentraciones empleadas, obteniéndose diferencias estadísticamente significativas en todos los casos (paneles A y B).

No se observaron cambios en el tamaño y la complejidad de los linfocitos (FSC y SSC, respectivamente) después de la incorporación de nanoMBG-FITCs. Estos resultados están de acuerdo con los obtenidos en estudios previos con preosteoblastos MC3T3-E1 en los que la incorporación de estas nanoesferas no alteraba los parámetros

anteriormente citados[348]. En este contexto, hemos observado que otros nanomateriales como las nanopartículas de óxido de grafeno, producen un aumento del tamaño celular de los preosteoblastos (FSC) sin afectar a su complejidad (SSC)[384]. En estudios previos con otra línea celular representativa de la respuesta inmune innata, los macrófagos RAW 264.7, se observó que la exposición a nanoMBGs produjo un aumento significativo de la complejidad celular (SSC) debido a su incorporación por los macrófagos[347].

2. Mecanismos endocíticos para la entrada de nanoMBG-FITCs en linfocitos Th2 CD4$^+$ SR.D10

Para analizar los mecanismos moleculares de incorporación de nanoMBG-FITC en la línea Th2 CD4$^+$ SR.D10, se utilizó un método indirecto que consiste en pretratar las células con cinco inhibidores específicos de diferentes mecanismos de endocitosis, antes de la incubación con las nanoesferas. Pasados 30 min, se cultivaron las células durante 90 min con 50 µg/ml de nanoMBG-FITCs en presencia de cada inhibidor y se analizó la incorporación por citometría de flujo (Fig. 3A). De esta forma, cuando el inhibidor utilizado reduce la entrada de las nanoesferas, podemos concluir que este mecanismo ha sido bloqueado y que constituye una vía de entrada. Estudios previos nos permitieron seleccionar la dosis utilizada de los diferentes inhibidores sin alterar la viabilidad celular[385-386].

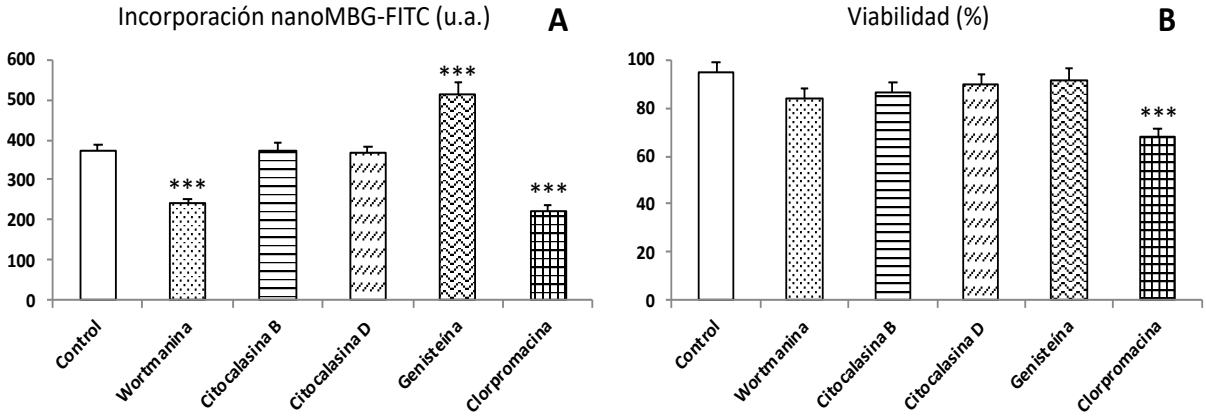


Figura 3. Mecanismos endocíticos para la entrada de nanoMBG-FITCs en linfocitos Th2 CD4$^+$ SR.D10

La wortmanina (inhibidor de fagocitosis mediada por PI3 quinasa), y la clorpromazina (inhibidor de endocitosis mediada por clatrina), disminuyeron la incorporación de nanoMBG-FITCs en las células Th2 CD4$^+$ SR.D10. Esto indica que la captación de estas nanoesferas por la línea celular SR.D10 está mediada por mecanismos en los que participa la PI3 quinasa y procesos mediados por clatrina. Sin embargo, no se encontraron efectos significativos de la citocalasina B o D, agentes que bloquean la polimerización de actina e inhiben la macropinocitosis. Por otra parte, se produjo una mayor incorporación de nanoMBG-FITCs en las células SR.D10 en presencia de genisteína,lo que indica que la endocitosis mediada por caveolas no está involucrada en la internación de nanoMBG-FITCs en esta línea celular. La genisteína inhibe múltiples tirosina quinasas de la familia Src, lo que afecta a varios procesos como la endocitosis o

la señalización quimiotáctica, y por lo tanto la dinámica de las caveolas[387]. Además, la genisteína está implicada directamente en la polimerización de actina en las células Th2 $CD4^+$ de memoria[388] una polimerización de actina alterada inducida por genisteína podría favorecer la internación de nanomateriales en la línea de células Th2 $CD4^+$ SR.D10 (Figura3A). Este mismo efecto se observó con nanopartículas de óxido de grafeno en células óseas Saos-2 después del tratamiento con genisteína[386]. Sin embargo, no se observa este efecto en la línea mieloide dendrítica DC2.4, por lo que se puede concluir que las diferencias en los mecanismos de internación de nanoMBG-FITCs en diferentes líneas celulares podría deberse a las diferencias de linaje entre las células, a la expresión de determinados receptores de superficie o a la sensibilidad de los mediadores de señales frente a los diferentes inhibidores[389]. La Figura 3B muestra los efectos de estos inhibidores específicos de endocitosis y de las nanoMBG-FITCs sobre la viabilidad celular de los linfocitos Th2 $CD4^+$SR.D10, comparándolos con los controles sin inhibidores y sin materiales, realizados en paralelo. Aunque se obtuvieron valores de viabilidad elevados con esta línea linfocitaria tras estos tratamientos, la clorpromacina indujo una disminución significativa de este parámetro, lo que confirma una cierta citotoxicidad de este compuesto[348]. Los estudios con inhibidores no pudieron realizarse con la línea de linfocitos AE103 debido a su mayor sensibilidad, y a los bajos valores de viabilidad obtenidos con estas células.

3. Efecto de las nanoesferas nanoMBGs y nanoMBG-IPs en las fases del ciclo celular de los linfocitos Th2 $CD4^+$ SR.D10

Se analizaron los efectos de las nanoesferas sin cargar (nanoMBGs) y cargadas con ipriflavona (nanoMBG-IPs) en las fases del ciclo celular (G0/G1, S-G2/M) de linfocitos Th2 $CD4^+$SR.D10 y el porcentaje de células en apoptosis (fracción SubG1) en ausencia y presencia de interleuquinas. La Figura 4 muestra que el tratamiento con 50 µg/ml de nanoesferas sin ipriflavona durante 24 h en ausencia de interleuquinas, indujo un incremento del porcentaje de células en las fases S-G2M, acompañado de una disminución de la fase G0/G1 ($p < 0,005$). Este efecto fue más pronunciado con las esferas cargadas con IP. Sin embargo, en presencia de un medio de cultivo rico en interleuquinas, no se obtuvieron alteraciones en ninguna de las fases, demostrando la importancia de este medio enriquecido en la activación de estas células (medio Click suplementado con FCS al 10%, 5 U/ml de mrIL-2 recombinante de ratón, 10 U/ml de mrIL-4 y 25 pg/ml de mrIL-1). Además, las nanoMBGs y nanoMBG-IPs no indujeron apoptosis en los linfocitos, detectada como fracción SubG1, en comparación con los cultivos control, tanto en ausencia como en presencia de interleuquinas.

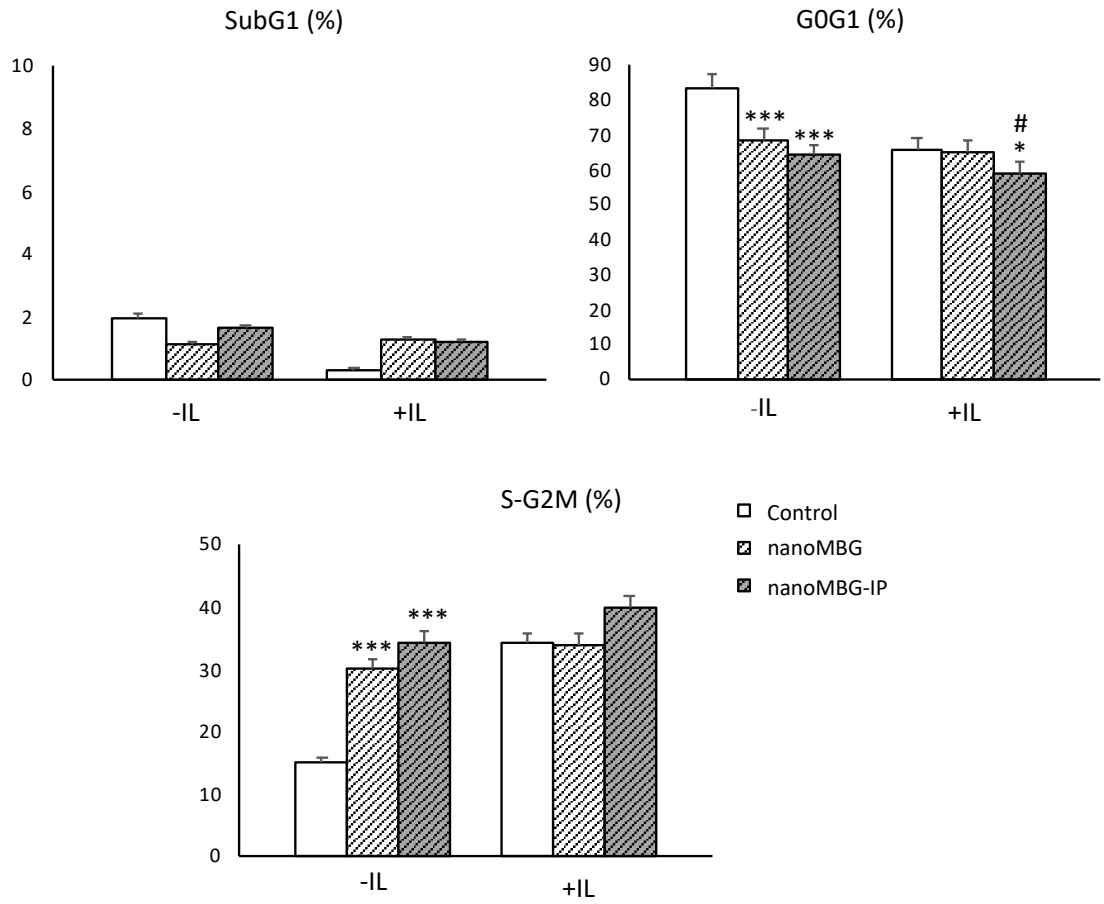


Figura 4. Efecto de las nanoMBGs y nanoMBG-IPs en las fases del ciclo celular de los linfocitos Th2 $CD4^+$ SR.D10

4. Efecto de las nanoesferas nanoMBGs y nanoMBG-IPs en la proliferación de los linfocitos Th2 $CD4^+$ SR.D10

En el presente estudio se han evaluado *in vitro* los efectos de las nanoesferas nanoMBGs y nanoMBG-IPs en la proliferación de los linfocitos Th2 tras la activación específica del receptor TCR-CD3 (receptor de antígeno de las células T), del receptor de superficie CD4 (principal correceptor de células T helper o cooperadoras), y estimulando conjuntamente a través de TCR y CD4 (Figura 1 Introducción). La activación de los linfocitos promueve procesos de diferenciación que determinarán el tipo de célula en las que se convertirán y las citoquinas específicas que secretará.

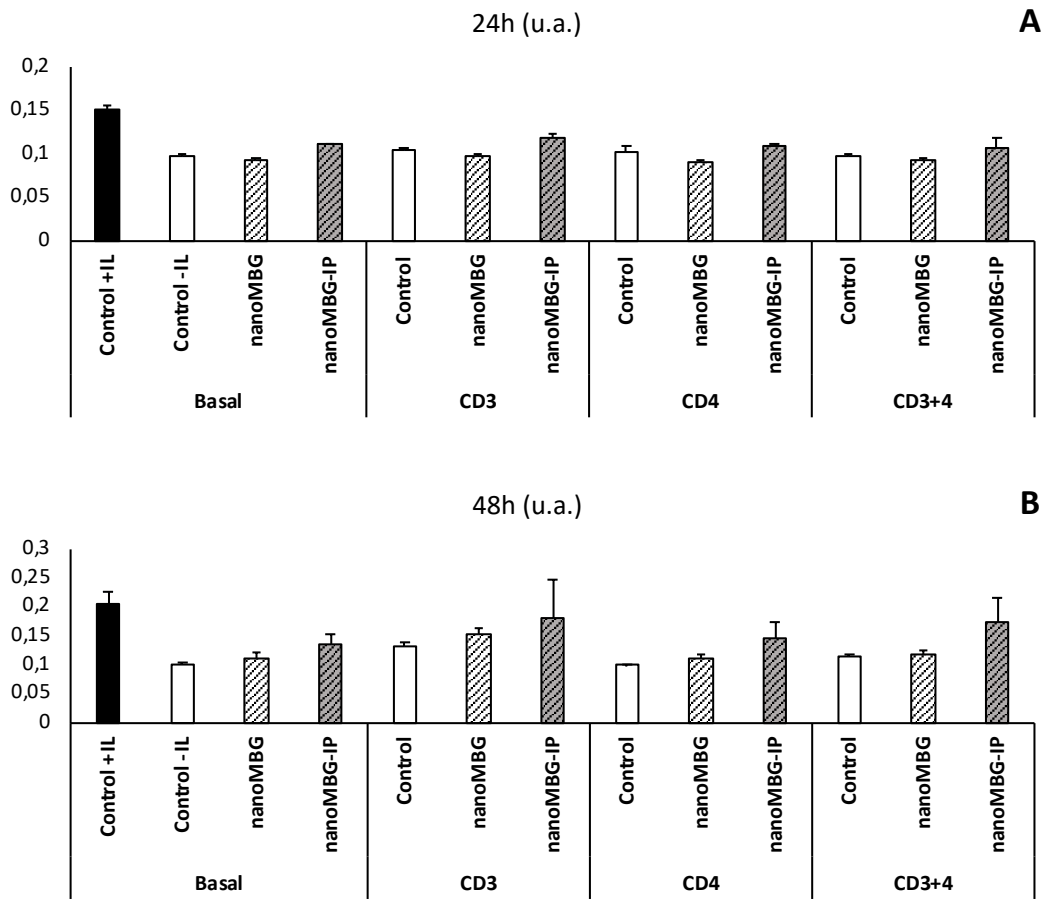


Figura 5. Efecto de las nanoesferas nanoMBGs y nanoMBG-IPs en la proliferación de los linfocitos Th2 $CD4^+$ SR.D10 en condiciones basales y activados.

Las células SRD10 se aislaron del clon de células T colaboradoras $CD4^+$ de ratón, D10 G4.1 (D10), de ahí, su denominación, "syngeneic-reactive D10". Es una línea diferenciada de linfocitos Th2 $CD4^+$ que muestra hiperreactividad a los estímulos dependientes e independientes de TCR, lo que indica que presenta un umbral de activación más bajo que el clon original, y ofrece la posibilidad de cultivarlas en presencia de un medio rico en interleuquinas, lo que hace de esta línea celular sea un modelo experimental de gran interés para analizar mecanismos de activación en células T[369]. Por este motivo, para realizar los ensayos de activación, se lavaron exhaustivamente las células cultivadas para eliminar las interleuquinas presentes en el medio de cultivo y se sometieron a la estimulación con los anticuerpos mencionados anteriormente.

Los linfocitos Th2 $CD4^+$ SR.D10 se estimularon durante 24 y 48 horas, Fig 5 paneles A y B respectivamente, con los anticuerpos monoclonales anti-CD3, anti-CD4 o anti CD3+CD4 en presencia o ausencia de nanoesferas nanoMBGs y nanoMBG-IPs. Como se observa en la Fig 5, los linfocitos responden adecuadamente a todos los estímulos en presencia y ausencia de nanoMBGs y nanoMBG-IPs, por lo tanto, la presencia de estos nanomateriales no modifica de forma significativa las condiciones de activación de los linfocitos. Solo se observó un ligero incremento significativo en el caso de nanoMBG-IPs en condiciones basales a ambos tiempos de exposición, y tras estimular a través del correceptor CD4 a las 24 h.

Como cabía esperar, en condiciones basales sin estímulos, en ausencia de un medio rico en interleuquinas, la proliferación de los linfocitos fue menor que en presencia de las interleuquinas por lo mencionado en el apartado anterior.

5. Efecto de las nanoesferas nanoMBGs y nanoMBG-IPs sobre la viabilidad y la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) de los linfocitos Th2 $CD4^+$ SR.D10

Aunque no se observaron efectos adversos sobre el ciclo celular y los linfocitos respondieron adecuadamente a todos los estímulos activadores, tanto en presencia como en ausencia de nanoMBGs y nanoMBG-IPs, la incorporación de nanopartículas podría desencadenar un incremento del contenido intracelular de especies reactivas de oxígeno (ROS) y la inducción de estrés oxidativo, que son los principales mecanismos de toxicidad propuestos para los nanomateriales[390]. Por otro lado, estas nanoesferas mesoporosas bioactivas están formadas por óxidos de silicio, calcio y fósforo, cuyos iones juegan un papel importante en la proliferación celular, en la homeostasis y el remodelado óseo[16].

Teniendo en cuenta todos estos hechos, en el presente trabajo se ha evaluado la viabilidad celular y el contenido intracelular de especies reactivas de oxígeno (ROS) de los linfocitos Th2 $CD4^+$ SR.D10 en condiciones basales y activados con anticuerpos específicos, el receptor de los linfocitos T (TCR-CD3), el principal correceptor de linfocitos Th2 (CD4), y estimulando conjuntamente a través de los dos receptores (TCR-CD3+CD4), tras el tratamiento con nanoMBGs y nanoMBG-IPs. La presencia o ausencia de un medio de cultivo rico en interleuquinas y las condiciones de control celular sin nanoesferas, se realizaron siguiendo el mismo protocolo experimental. La Figura 6 muestra los resultados obtenidos. En ausencia de nanoesferas, se observó un aumento de la intensidad de fluorescencia después de la estimulación a través del receptor de linfocitos TCR/CD3 y CD4 cuando se adicionan los anticuerpos monoclonales YCD3-1 (anti-CD3ε)[391] y GK1.5 (anti-CD4)[392] respectivamente a la línea SR.D10, lo que demuestra la sensibilidad del ensayo (Fig. 6A).

Se observó un aumento significativo de ROS a nivel intracelular tras la activación de TCR/CD3 y de CD4 que fue revertido cuando la línea de linfocitos recibió los dos estímulos al mismo tiempo (Fig. 6A).

Por otro lado, el tratamiento con 50 µg/ml de nanoesferas sin ipriflavona durante 24 h en ausencia de interleuquinas, indujo un incremento de ROS que se ve modulado en presencia de los estímulos a través de los principales receptores de linfocitos T, siendo significativamente apreciable en el caso de la estimulación a través del TCR/CD3. En el caso del tratamiento en presencia de nanoesferas con ipriflavona, se observó un patrón similar al obtenido en ausencia de nanoesferas, es decir, un aumento significativo de ROS a nivel intracelular tras la activación de TCR/CD3 y reversión del efecto cuando la línea de linfocitos recibió la estimulación a través de TCR/CD3 y CD4 (Fig. 6A).

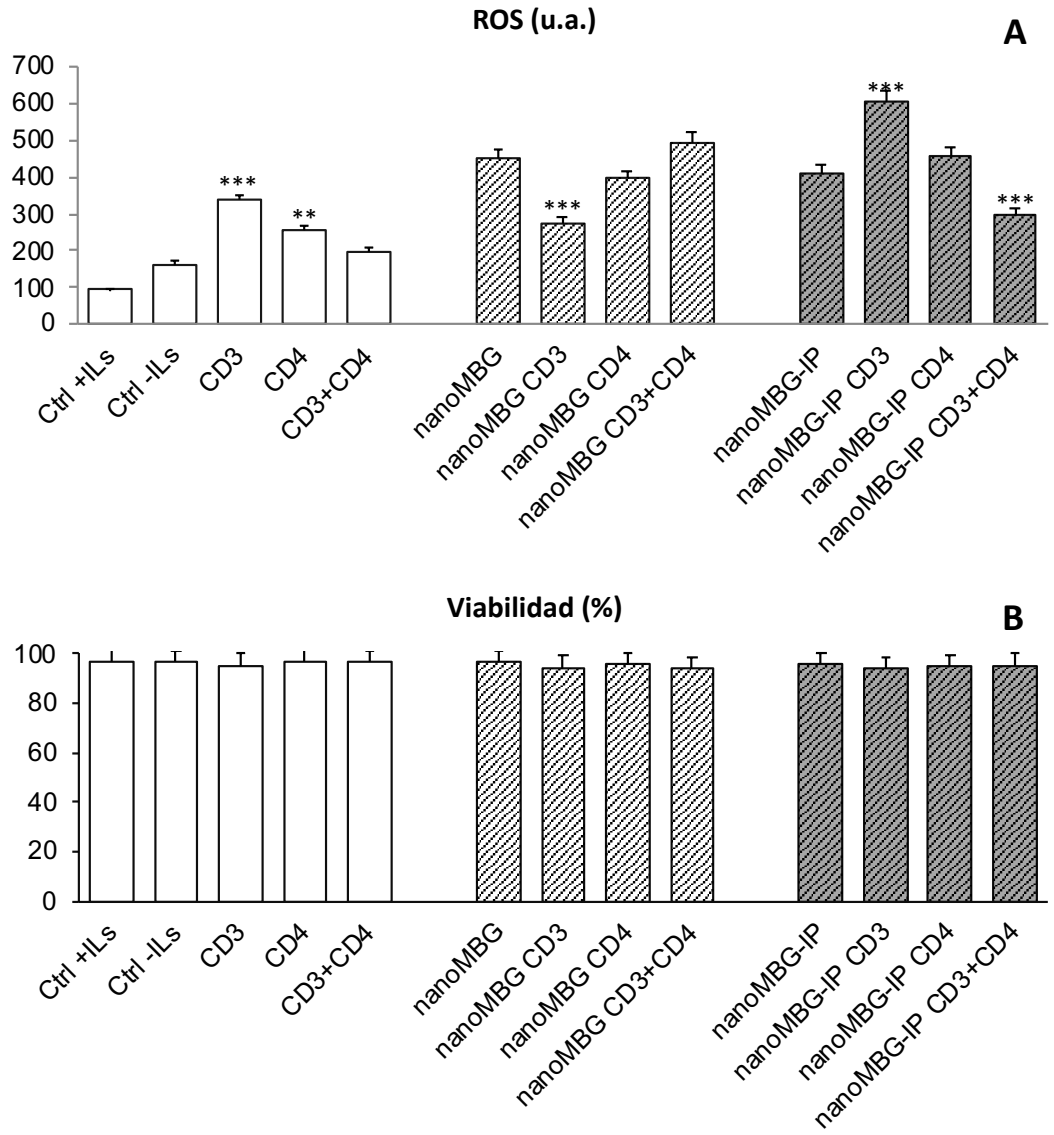


Figura 6. Efecto de las nanoesferas nanoMBGs y nanoMBG-IPs sobre la viabilidad y la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) de los linfocitos Th2 $CD4^+$ SR.D10 en condiciones basales y activados.

Está ampliamente demostrado que para la completa estimulación antigénica a través del complejo TCR/CD3 son necesarias varias moléculas coestimuladoras que se expresan durante la fase de timocitos inmaduros, como son los correceptores CD4 y CD8 que, inicialmente se expresan conjuntamente. Durante el proceso de maduración se selecciona una de estas glicoproteínas de superficie, dando lugar a células $TCR^+/CD4^+$ o células $TCR^+/CD8^+$. Las células $CD4^+$ expresan TCRs específicos que reconocen antígenos presentados por el complejo mayor de histocompatibilidad MHC de clase II y ejercen principalmente funciones cooperadoras. Estas interacciones contribuyen a la formación del complejo trimolecular MHC/TCR/CD4 (Figura 5), que induce la activación de la quinasa p56lck, quinasa asociada intracelularmente a la región amino terminal de CD4. Esta señal junto con la activación de proteín tirosin quinasas (PTKs) asociadas al complejo TCR-CD3, como son las quinasas $p59^{fyn}$, ZAP-70 y $p72^{syc}$, provoca una eficiente cascada de señalización necesaria para la correcta activación funcional del linfocito $T^{393-394}$. En las células $TCD4^+$ empleadas en este estudio, los anticuerpos anti-TCR/CD3

inducen la asociación de CD4 al complejo TCR[395], necesaria para la activación linfocitaria, por lo que podemos afirmar la importancia de la estimulación de CD4 en la activación de las células T por anti TCR-CD3. Este aspecto es importante, ya que se asegura que las células T solo serán activadas cuando reconozcan los péptidos antigénicos presentados en un contexto de MHC de clase II por las células presentadoras de antígeno (APCs), que previamente hayan reconocido y procesado patógenos, junto con la estimulación del correceptor CD4, evitando de esta forma que el linfocito responda de forma inadecuada (Figura 1).

Las especies reactivas de oxígeno (ROS) actúan como regulador intracelular cuando se generan de forma controlada en puntos concretos de la célula, así, modifican la función de proteínas mediante la oxidación reversible de cisteínas, regulando las proteínas quinasas y fosfatasas, los factores de transcripción y canales iónicos[396]. Además, se ha demostrado que los ROS interfieren en los sistemas de cascadas de señalización relacionadas con la proliferación celular, incluyendo entre otros, la activación del factor nuclear de transcripción NF-κB, el factor activador de la proteína 1 (AP-1), fosfolipasa-A2, MAPKs y c-Jun quinasa, cruciales para la expresión de moléculas efectoras requeridas en la función de los linfocitos[397]. Además, las nanoMBGs y nanoMBG-IPs no indujeron cambios en la viabilidad en los linfocitos, detectada como porcentaje de células vivas, en comparación con los cultivos control, tanto en ausencia como en presencia de interleuquinas y en todas las situaciones de activación (Fig 6B). Estos resultados ponen en evidencia que, a pesar del aumento de ROS en algunas de las condiciones ensayadas, la internación de nanoMBGs y nanoMBG-IPs no modifican de forma significativa las condiciones de activación de los linfocitos ni afecta a la viabilidad celular.

6. Efecto de las nanoesferas nanoMBGs y nanoMBG-IPs sobre la producción de interleuquina 4 (IL-4) y 10 (IL-10) de los linfocitos Th2 CD4$^+$ SR.D10

Aunque se ha observado que las nanoesferas no resultan citotóxicas ni afectan a la activación de los linfocitos, debe evaluarse su posible efecto inflamatorio. En este sentido, recientemente se ha demostrado que los macrófagos peritoneales de ratón polarizados hacia un fenotipo M2 producen citoquinas reguladoras, incluidas IL-4, IL-13, TGF-β e IL-10 y podrían suprimir la proliferación de células T *in vitro*. Por otro lado, la IL-10, como principal agente regulador antiinflamatorio secretado por los macrófagos M2, es esencial para asegurar la tolerancia inmunológica[398].

Algunas citoquinas como la IL-4 y la IL-10 son fundamentales para la correcta reparación y regeneración de los tejidos debido a su papel en el cambio de fenotipo M1 (proinflamatorio) a M2 (antiinflamatorio)[399].

Para estudiar a fondo el efecto potencial de nanoesferas nanoMBGs y nanoMBG-IPs en la producción de estas citoquinas antiinflamatorias, en el presente trabajo, se han cuantificado los niveles de IL-4 e IL-10, medidas como expresión de interleuquinas intracelulares antiinflamatorias, secretadas por linfocitos Th2 CD4$^+$ SR.D10 cultivados después de la incubación con nanoMBGs y nanoMBG-IPs en condiciones basales y estimuladas.

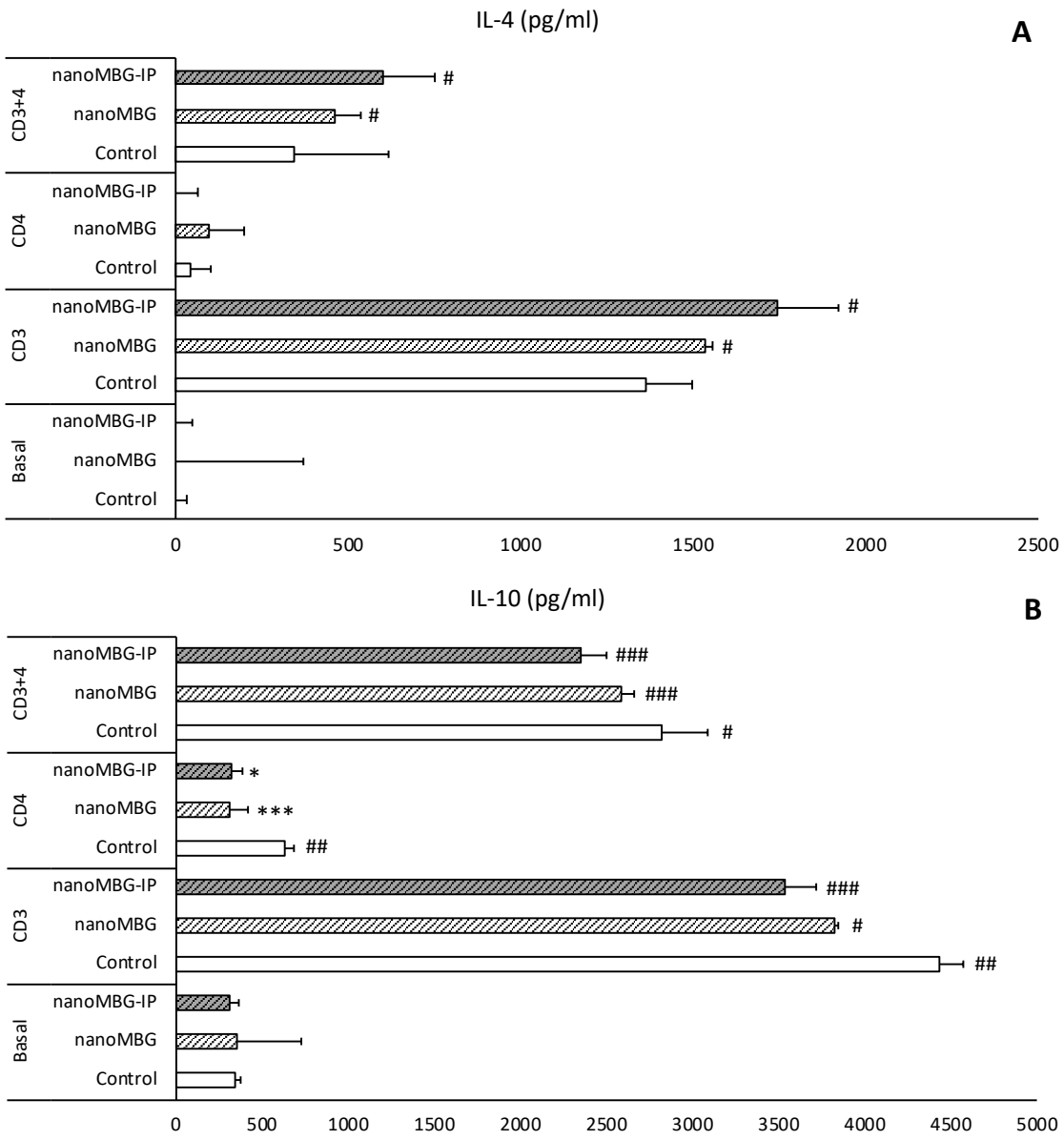


Figura 7. Efecto de las nanoesferas nanoMBG y nanoMBG-IP en la producción de IL-4 e IL-10 por los linfocitos Th2 $CD4^+$ SR.D10 en condiciones basales y estimulados.

Como se puede observar en la Fig. 7 paneles A y B, en condiciones basales y tras 24h de incubación con los materiales, no se detectaron efectos significativos de nanoMBGs y nanoMBG-IPs sobre la expresión intracelular de IL-4 y el factor regulador/antiinflamatorio IL-10. En el caso del análisis de la presencia de IL-4 en sobrenadantes de linfocitos activados a través del receptor TCR-CD3 y a través de TCR-CD3+CD4, se observó un aumento significativo tanto en presencia de nanoMBGs, como en presencia de nanoMBG-IPs, Fig. 7, panel A. Estos resultados indican que la presencia de la citoquina reguladora antiinflamatoria IL-4, se ve aumentada tras la internación de nanoesferas nanoMBGs y nanoMBG-IPs favoreciendo la secreción de esta citoquina en el caso de estimular adecuadamente al linfocito a través de su receptor y correceptor.
Por otro lado, como se puede observar en la Fig. 7, panel B, la secreción de citoquina IL-10 se modificó significativamente en comparación con los controles en ausencia de material. Se detectaron aumentos significativos de IL-10 en las células de control en

todas las condiciones de estimulación (## p < 0,001, *p < 0,05). Sin embargo, tras la incorporación de nanoesferas nanoMBGs y nanoMBG-IPs, se observó un una disminución significativa en comparación con sus respectivos controles.

Por lo tanto, los resultados obtenidos nos permiten concluir que la incorporación de nanoMBGs y nanoMBG-IP mantuvieron el fenotipo reparador, característico de esta línea celular de linfocitos T cooperadores Th2, implicados en la reparación tisular, lo que indica que la respuesta inmune a estas nanopartículas es adecuada. Además, este trabajo nos permite contribuir a una mejor comprensión del estado funcional de los linfocitos tras el tratamiento con estos potenciales nanotransportadores.

ESTUDIOS DE METABOLÓMICA EN PREOSTEOBLASTOS TRATADOS CON NANOESFERAS DE SÍLICE MESOPOROSA

La espectroscopía por resonancia magnética nuclear (RMN) de alta resolución es una técnica altamente sensible y reproducible para realizar el análisis cualitativo y cuantitativo de una amplia gama de metabolitos[400-401]. Mediante el estudio de los metabolitos consumidos, liberados al medio y producidos por diferentes tipos celulares[400,402], esta técnica permite detectar pequeñas variaciones en su concentración e identificar las rutas bioquímicas que pueden verse alteradas como respuesta a la presencia de diferentes agentes. En este caso el objetivo ha sido conocer si la incorporación intracelular de nanoMBG y nanoMBG-IP produce modificaciones metabólicas en los preosteoblastos, comparando el efecto de la liberación intracelular de la ipriflavona con el del tratamiento directo de las células con dicho fármaco. Estudios previos demuestran la eficacia de la técnica para estudiar la respuesta celular a diferentes fármacos, tanto para su evaluación como para su desarrollo[403-404].

El análisis de la respuesta metabólica de los preosteoblastos, MC3T3-E1 una vez que han incorporado las nanoesferas cargadas y sin cargar con ipriflavona es esencial para conocer de qué forma la composición y las características fisicoquímicas del material, así como la liberación de ipriflavona, pueden afectar a la correcta diferenciación de estas células, responsables de la síntesis de nuevo hueso y células clave en un escenario de osteoporosis.

En este estudio se ha evaluado el contenido metabólico basal de preosteoblastos MC3T3-E1 cultivados durante distintos tiempos en ausencia o en presencia de 50 μg/ml de nanoMBGs, 50 μg/ml de nanoMBG-IPs y 50 μg/ml de IP (para analizar el efecto del fármaco aplicado de forma directa). Para comprender los mecanismos implicados en la respuesta de este tipo celular a los biomateriales utilizados, se han tomado muestras a 3 y 7 días, como tiempos de respuesta celular temprana y tardía, respectivamente. De este modo, se pretende conocer las rutas metabólicas alteradas en el inicio del tratamiento y si éstas se ven compensadas a los 7 días.
El estudio incluye un análisis completo de los metabolitos que se están produciendo/acumulando en el interior de las células (análisis del contenido metabólico celular), así como de los metabolitos que se están consumiendo/liberando al exterior celular (análisis del contenido metabólico de los sobrenadantes de los cultivos). Se utilizó como control el medio de cultivo sin células mantenido en las mismas condiciones de cultivo durante ambos tiempos.
El análisis completo de los cambios que producen las nanoMBGs y las nanoMBG-IPs en el metaboloma de los preosteoblastos MC3T3-E1 permitirá completar la caracterización de la respuesta *in vitro* a estos nanomateriales y explicar los efectos observados tras su administración *in vivo* en conejas osteoporóticas, cuyos resultados se están analizando actualmente.

Resultados

1. Análisis del contenido metabólico extracelular de preosteoblastos MC3T3-E1 control cultivados durante 3 y 7 días

Los sobrenadantes de los cultivos celulares de preosteoblastos MC3T3-E1 cultivados durante 3 y 7 días en cada una de las condiciones estudiadas (control, nanoMBGs, nanoMBG-IPs e IP) se analizaron por RMN, obteniendo un espectro de resonancia para cada muestra (Fig. 1).

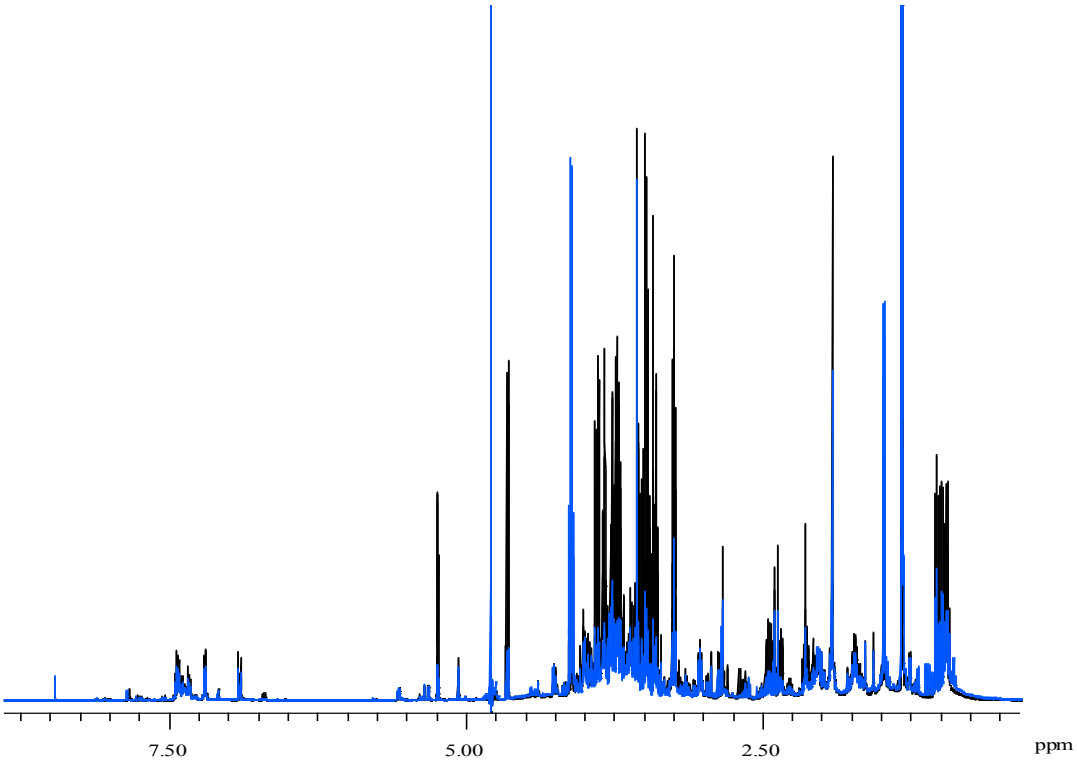


Figura 1. Espectro 1D de los sobrenadantes de medio a 3 días. Medio acelular (negro)y medio condicionado por las células control (azul).

Una vez obtenido el espectro de resonancia magnética 1D de las muestras de sobrenadantes, se determinó a qué metabolito correspondía cada señal obtenida, utilizando los espectros 2D para comprobar cada asignación (Tabla 1).

NO.	COMPOUND	δ ^{1}H IN PPM (L)	δ ^{1}H IN PPM (R)
1	**3-Methyl-2-oxovalerate**	1.1135	1.1081
2	**5,6-Dihydrothymine**	1.2112	1.2067
3	**Acetate**	1.9242	1.9161
4	**Alanine**	1.4820	1.4726
5	**Asparagine**	2.9464	2.9409
6	**Aspartate**	2.7129	2.7078
7	**Creatine**	3.0419	3.0385
8	**Formate**	8.4628	8.4577
9	**Fructose**	3.5878	3.5831
10	**Glucose**	3.2551	3.2465
11	**Glycine**	3.5653	3.5599
12	**Glutamine**	2.4397	2.4338
13	**Histidine**	7.0952	7.0779
14	**Isobutyrate**	1.0839	1.0790
15	**Isoleucine**	1.0283	1.0179
16	**Lactate**	4.0964	4.0899
17	**Leucine**	0.9817	0.9725
18	**Lysine**	3.0182	3.0128
19	**Methionine**	2.6355	2.6314
20	**NADH**	4.3998	4.3892
21	**Phenylalanine**	7.3474	7.3380
22	**Phosphocholine**	3.2118	3.2055
23	**Proline**	2.0077	2.0014
24	**Pyroglutamate**	4.1978	4.1932
25	**Pyruvate**	2.3800	2.3746
26	**Serine**	3.9693	3.9650
27	**Succinate(+pyro)**	2.4088	2.4042
28	**Tyrosine**	6.9043	6.8954
29	**Tryptophan**	7.5438	7.5362
30	**Un0.93(s)**	0.9390	0.9328
31	**Un0.94(s)**	0.9508	0.9466
32	**Un1.57(s)**	1.5760	1.5683
33	**Un1.64(s)**	1.6439	1.6356
34	**Un5.2(d)**	5.2500	5.2390
35	**Valine**	1.0600	1.0483

Tabla 1. Intervalos del espectro de RMN (ppm, izquierdo y derecho) a los que se encuentra, aproximadamente, cada uno de los metabolitos más frecuentes.

Los espectros 1D informan acerca de un sitio químico, sobre cómo es su ambiente, cuántos núcleos hay presentes o cuántos hay próximos, pero no informan de las relaciones que se producen entre ellos, es decir, los acoplamientos que se producen entre los espines. Para ello, se registraron los espectros 2D, como el COSY o el TOCSY, o espectroscopía de correlaciones, en el que se pueden encontrar relaciones homonucleares a través de un enlace por el que se transmitirá la magnetización.

El conjunto de los espectros 1D y 2D permitirá dilucidar la estructura atómica de las macromoléculas en disolución.

La Figura 1 representa en negro el contenido metabólico del medio sin células (mantenido durante el mismo tiempo y en las mismas condiciones que los cultivos celulares) comparado con el contenido metabólico del medio procedente de las células control en azul. De esta forma, se puede analizar qué metabolitos se consumen y excretan al medio en condiciones basales, como queda reflejado en la Figura 2.

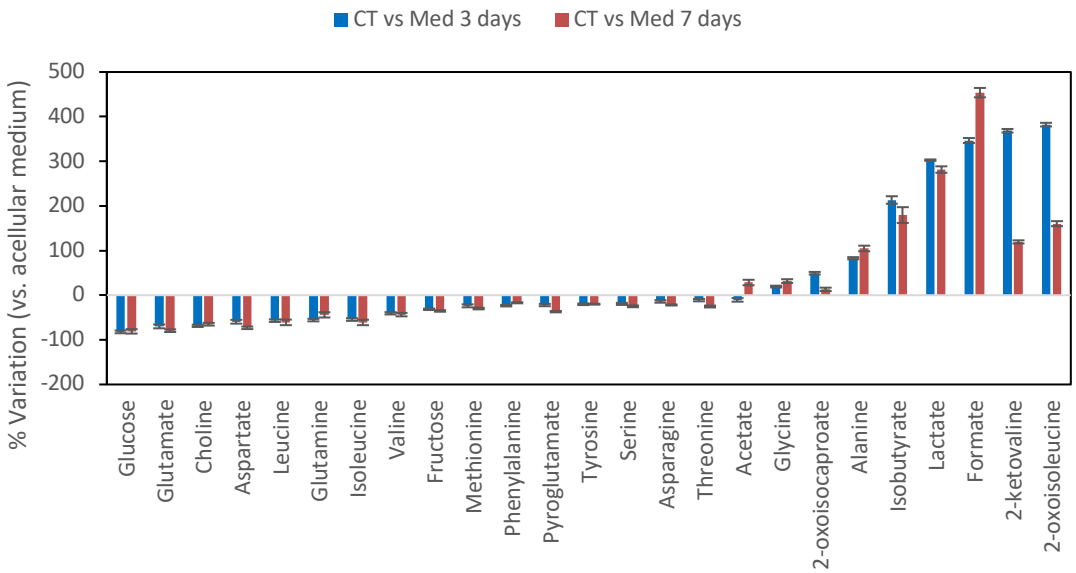


Figura 2. Comparación del contenido metabólico de los sobrenadantes procedentes de las muestras control con respecto a los de las muestras de medios acelulares.

En el medio de los cultivos celulares se detectó una disminución de glucosa y fructosa, así como la disminución de numerosos aminoácidos, indicando su consumo como fuente de energía. La disminución de estos metabolitos se vió acompañada de un incremento en lactato y alanina, metabolitos probablemente producidos a partir del piruvato obtenido en la glicolisis, así como el incremento de diversos alfa-cetoácidos y otros productos de degradación del esqueleto carbonado de aminoácidos, utilizados para la obtención de energía.

2. Análisis del contenido metabólico extracelular de preosteoblastos MC3T3-E1 cultivados durante 3 y 7 días en presencia de nanoMBGs, nanoMBG-IPs e IP

Se analizaron las muestras con el programa Metaboanalyst 5.0, obteniéndose diferentes representaciones del contenido metabólico de las muestras.

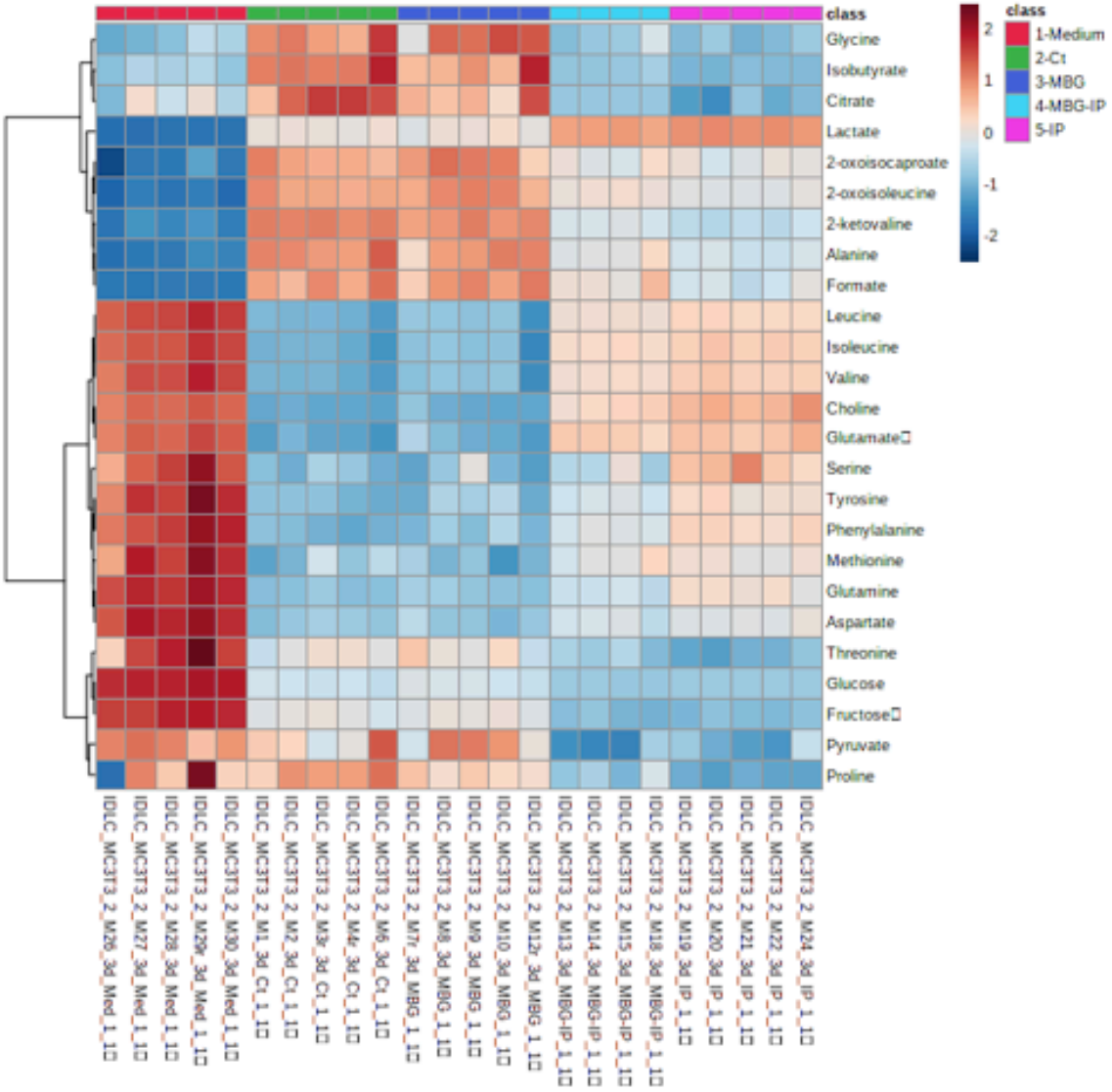


Figura 3. Heatmap de las variaciones de los principales metabolitos extracelulares entre observadas en las diferentes condiciones: medio acelular (rojo), MC3T3-E1 control (verde), MC3T3-E1 cultivados durante 3 días en presencia de nanoMBGs (azul oscuro), nanoMBG-IPs (azul claro) e IP (rosa).

En la Figura 3 se observa que a tiempos cortos de incubación con los materiales (3 días) las células consumen aminoácidos esenciales (leucina, isoleucina, valina, treonina, metionina) y no esenciales (glutámico, serina, prolina, tirosina), siendo este consumo superior en las condiciones nanoMBG-IPs e IP.

En las condiciones control y nanoMBGs, las células son capaces de producir aminoácidos no esenciales que no contiene el medio, como glicina y alanina.

En todas las condiciones estudiadas seobserva el consumo de glucosa por las células como fuente de energía. En el caso de nanoMBG-IPs e IP se aprecia mayor consumo de piruvato y liberación de lactato al medio en comparación con las condiciones control y nanoMBGs.

Las células control y las tratadas con nanoMBGs producen isobutirato y formato, mientras que estos metabolitos no se producen con nanoMBG-IPs e IP.

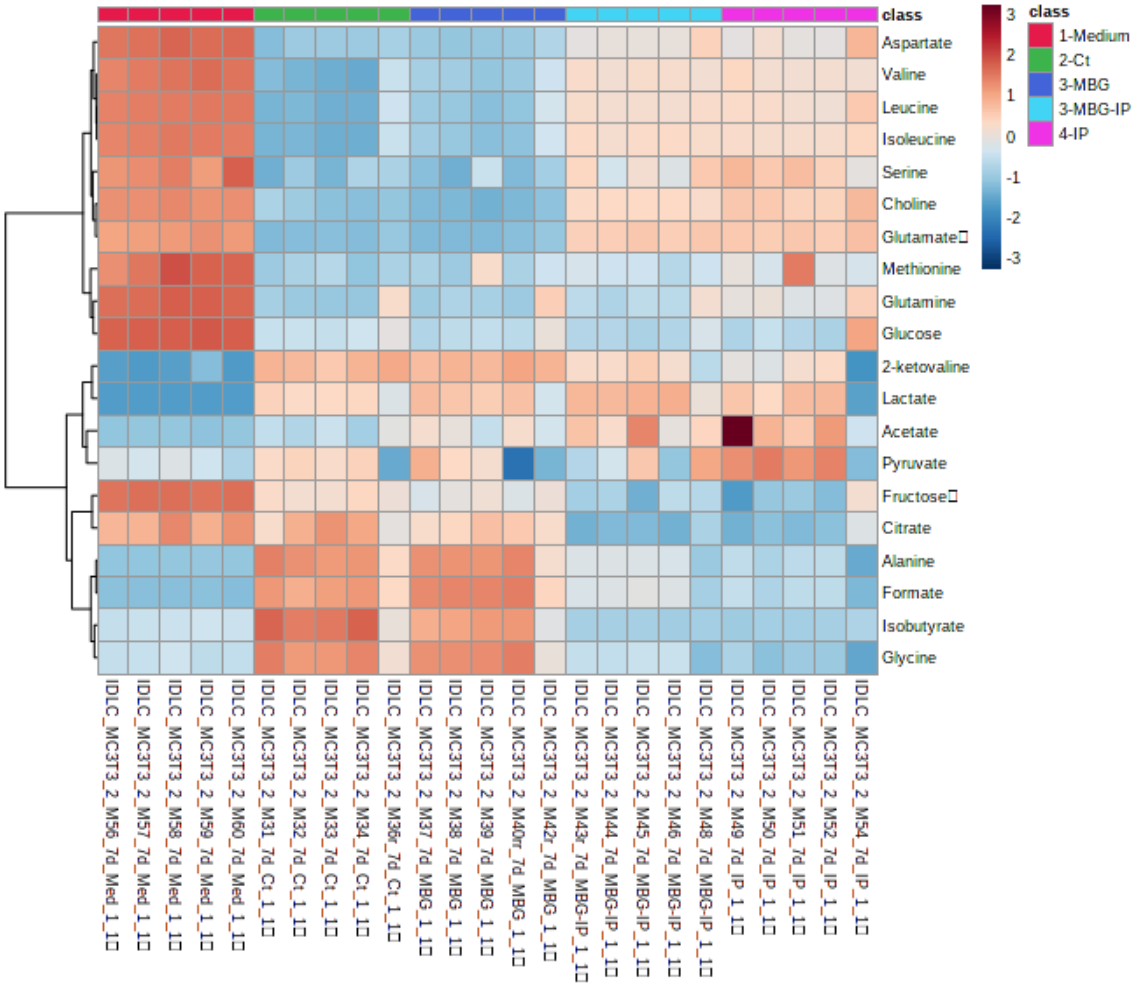


Figura 4. Heatmap de las variaciones de los principales metabolitos extracelulares observadas en las diferentes condiciones: medio acelular (rojo), MC3T3-E1 control (verde), MC3T3-E1 cultivados durante 7 días en presencia de nanoMBGs (azul oscuro), nanoMBG-IPs (azul claro) e IP (rosa).

En la Figura 4 se observa que a tiempos largos de incubación con los materiales (7días), las células Control y las tratadas con nanoMBGs siguen produciendo aminoácidos no esenciales que no contiene el medio, como alanina y glicina mientras que esto no ocurre con nanoMBG-IPs e IP.

Por otro lado, las células Control y las tratadas con nanoMBGs siguen produciendo isobutirato y formato, mientras que estos metabolitos no se producen después de 7 días con nanoMBG-IPs e IP.

Las células tratadas con nanoMBG-IPs e IP consumen mucha fructosa y citrato, metabolitos que se incorporarán respectivamente a la glicolisis y al ciclo de Krebs, para obtener energía.

3. Análisis del contenido metabólico intracelular de preosteoblastos MC3T3-E1 cultivados durante 7 días en presencia de nanoMBGs, nanoMBG-IPs e IP

Las extracciones del contenido intracelular de los cultivos celulares de preosteoblastos MC3T3-E1 cultivados durante 7 días en cada una de las condiciones estudiadas (control, nanoMBGs, nanoMBG-IPs e IP) se analizaron por RMN, obteniendo un espectro de resonancia para cada muestra (Fig. 5).

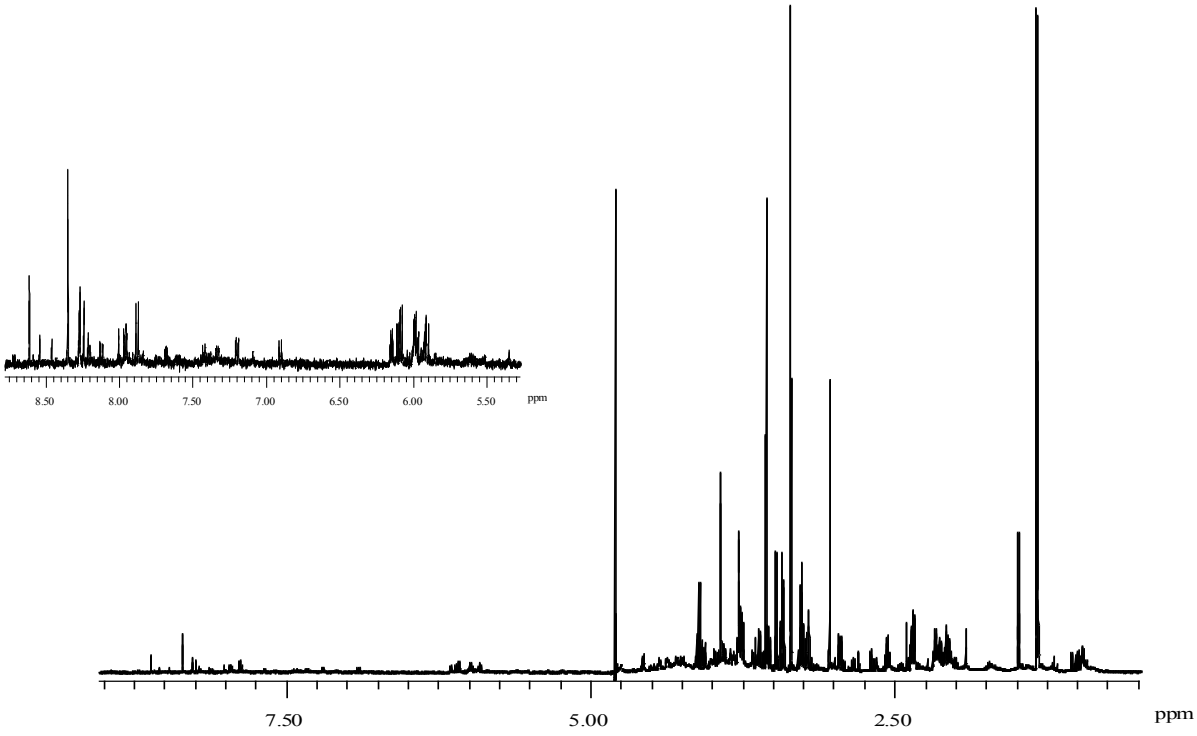


Figura 5. Espectro 1D de una muestra acuosa control (la imagen superior izquierda se corresponde con la ampliación de la región izquierda inferior del espectro)

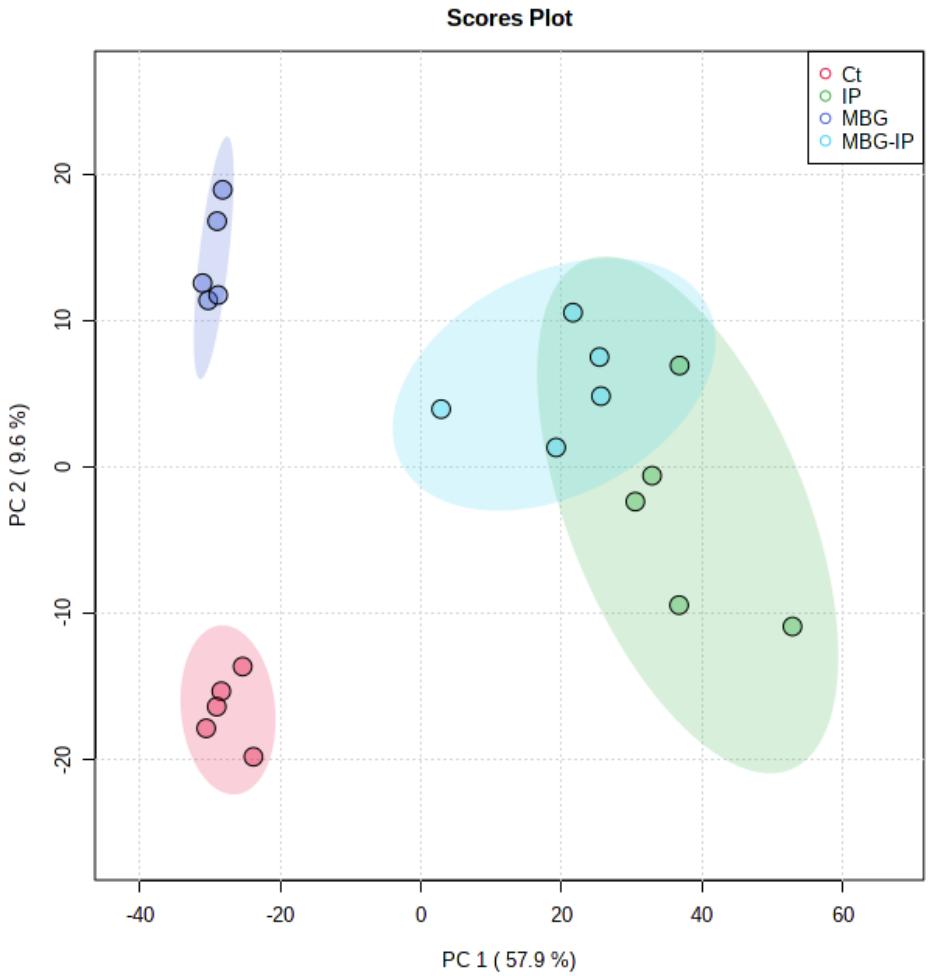


Figura 6. Distribución de los grupos según el análisis de componentes principales (PCA)

La Figura 6 muestra la distribución de los grupos realizada en base al análisis de componentes principales (PCA), mediante el cual las variables que más diferencias acumulan entre las condiciones se agrupan, generando un mapa de distribución de las muestras en base a sus similitudes/diferencias.

Las muestras control y tratadas con nanoMBGs quedan completamente diferenciadas de las demás. Sin embargo, las muestras con nanoMBG-IPs e IP solapan, lo cual podría estar justificado por la presencia del fármaco.

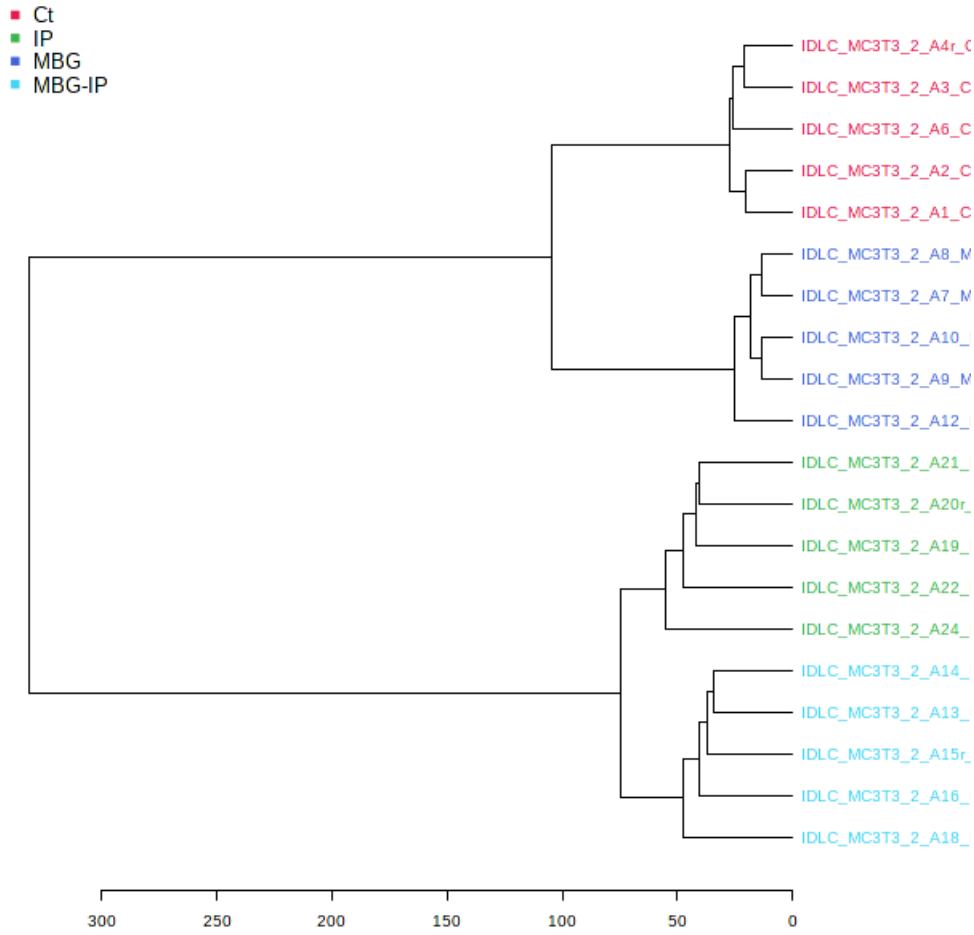
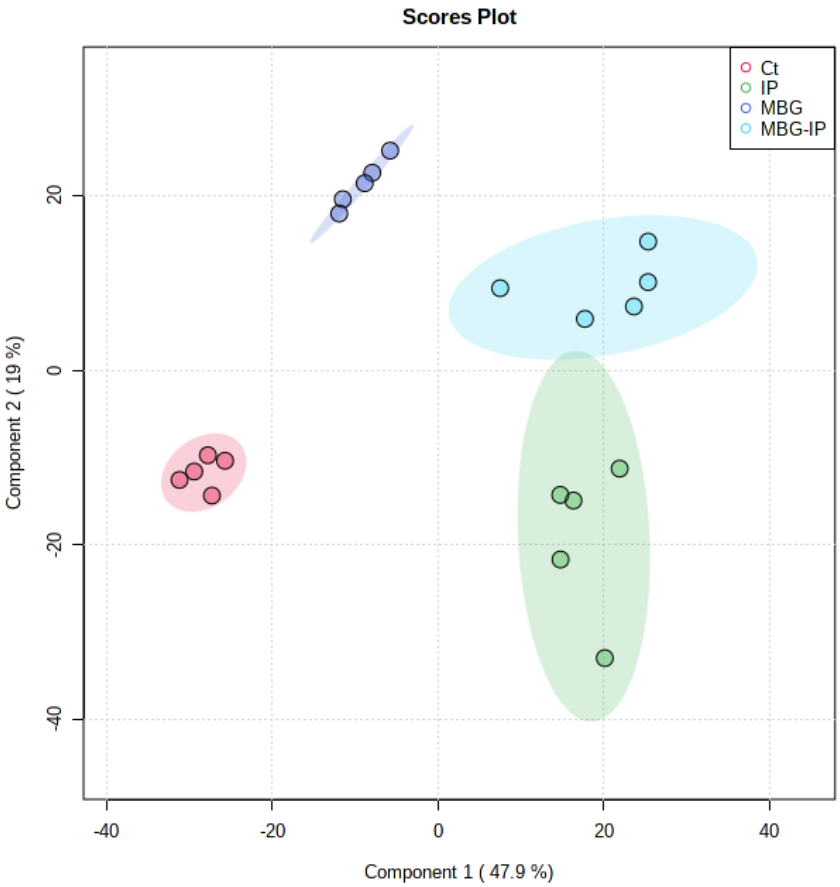


Figura 7. Dendrograma de las muestras en base a sus similitudes

Cuando se representan las muestras en un dendrograma, como en la Figura 7, se observa que la distribución en base a sus similitudes continúa diferenciando claramente a los grupos control y nanoMBGs, separados de nanoMBG-IPs e IP.

Curiosamente, *in vitro,* se ha comprobado que la presencia del fármaco en las nanoMBG-IPs amortigua algunos de los efectos observados con las nanoesferas sin fármaco, como son los efectos inflamatorios[348], y potencian el fenotipo reparador[349]. Sin embargo, a nivel metabólico, los cambios observados con nanoMBG-IP son más pronunciados que los obtenidos con nanoMBGs.



PLS-DA cross validation details:

Measure	1 comps	2 comps	3 comps	4 comps	5 comps
Accuracy	0.25	0.7	0.95	0.95	0.95
R2	0.41957	0.901	0.9806	0.99401	0.9976
Q2	0.21943	0.70656	0.75959	0.7523	0.75077

Figura 8. Distribución de grupos según el análisis discriminante de los mínimos cuadrados parciales (PLS-DA). R2 como fiabilidad de cada componente.

Por otro lado, se realizó el PLS-DA (análisis supervisado, Figura 8), en el que se observan las diferencias entre los grupos de forma similar a lo observado en el PCA (no supervisado). La diferencia principal con el anterior (PCA) radica en que en el análisis PLS-DA sí se conocen previamente las clases en las que se agrupan las muestras, mientras que en el PCA es aplicado cuando se trabaja con un amplio número de muestras cuya relación se desconoce. La clasificación obtenida es similar en uno y en otro (Figura 7 y Figura 8).

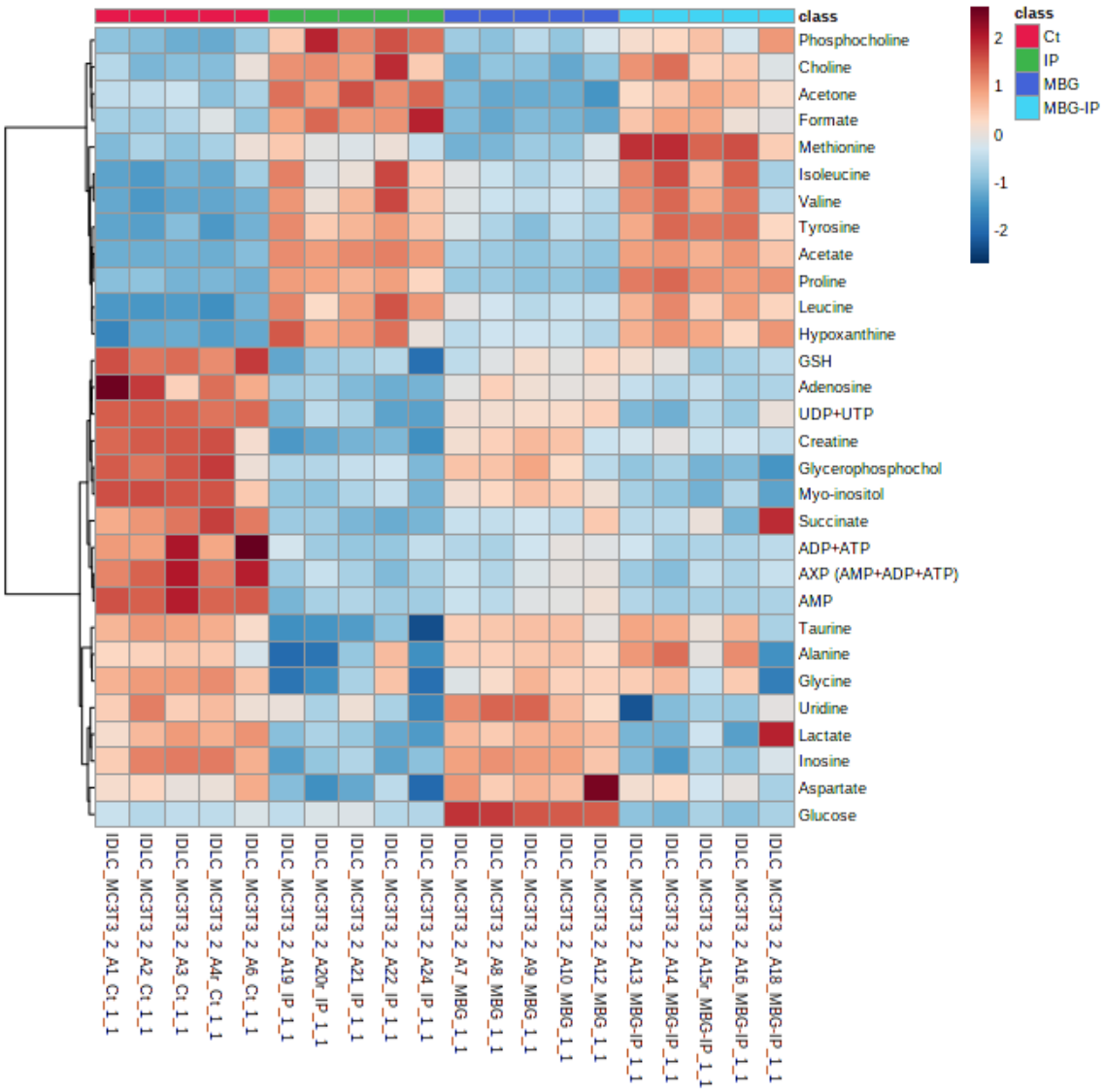


Figura 9. Heatmap de las variaciones de los principales metabolitos intracelulares observadas en las diferentes condiciones: MC3T3-E1 control (rojo), MC3T3-E1 cultivados durante 7 días en presencia de nanoMBGs (azul oscuro), nanoMBG-IPs (azul claro) e IP (verde).

Al analizar las variaciones de los metabolitos intracelulares se vuelve a observar cómo el comportamiento de las muestras control se parece más a las muestras tratadas con nanoMBGs y los efectos de nanoMBG-IPs e IP son similares (Fig. 9). Sin embargo, la concentración de taurina, alanina y glicina es superior en los preosteoblastos tratados con nanoMBG-IPs que con IP.

La comparación del contenido intracelular y extracelular de los diferentes metabolitos permite obtener las siguientes conclusiones preliminares:

El consumo de algunos aminoácidos (aspartato, valina, leucina, isoleucina) y del amino-alcohol colina es muy elevado en las situaciones control y nanoMBG, mientras que no lo es tanto con nanoMBG-IP e IP. Esto podría indicar una activa síntesis de proteínas y del fosfolípido fosfatidilcolina en las primeras condiciones, no siendo tan activos estos procesos en presencia del fármaco.

En la situación control y con nanoMBGs se produce y excreta mucho citrato al medio. Este metabolito es un intermediario del ciclo de Krebs y además puede proporcionar acetil CoA para la síntesis de ácidos grasos. Se ha demostrado un papel beneficioso del citrato en el proceso de mineralización de la matriz extracelular de los osteoblastos para la regeneración ósea[405]. Por otra parte, se ha observado que elevados niveles de citrato podrían estimular la inducción de estrés oxidativo por especies reactivas de oxígeno en células hepáticas[406].

En todas las condiciones estudiadas se consume gran cantidad de los aminoácidos metionina y glutamina, así como fructosa y glucosa. Con nanoMBG se acumula glucosa en el interior celular, mientras que en las demás condiciones sus niveles son muy bajos, probablemente debido a su consumo como fuente de energía.

En todas las condiciones se produce gran cantidad de 2-cetovalina, como producto del catabolismo de la valina, y lactato y piruvato, resultado de la degradación de glucosa. El piruvato también es producto del catabolismo de algunos aminoácidos (alanina, cisteina, glicina, serina, treonina y triptófano) que podrían estar siendo degradados como fuente de energía.

En las condiciones nanoMBG-IP e IP, no se produce alanina, formato, isobutirato ni glicina. Sin embargo, se detectan elevadas concentraciones de estos metabolitos en las condiciones control y nanoMBG.

El tratamiento con nanoMBG-IPs e IP produce la acumulación de colina, fosfocolina, acetona, formiato, metionina, leucina, isoleucina, valina, tirosina, acetato, prolina e hipoxantina. El incremento de colina y fosfocolina podría deberse a una estimulación de la síntesis de estas moléculas como precursoras de fosfatidil colina (colina y fosfocolina) o a una degradación de este fosfolípido. Puesto que metionina, leucina, isoleucina y valina, son aminoácidos esenciales, su aumento podría estar relacionado con la degradación de proteínas celulares y no con la síntesis de estos aminoácidos. La presencia de hipoxantina refleja la degradación activa de bases púricas.

DISCUSIÓN

DISCUSIÓN GLOBAL

Los nuevos biomateriales diseñados para su aplicación en ingeniería de tejido óseo tienen como principal función tratar patologías asociadas a este tejido y lograr su regeneración integrándose en el tejido natural, así como servir de vehículos para la liberación local de fármacos, proteínas o genes.

En cuanto a las biocerámicas como las hidroxiapatitas, que han de servir de superficie o andamio para el crecimiento de células y nuevo tejido, el principal objetivo es potenciar su osteointegración, es decir, su integración en el tejido óseo preexistente, que estará fuertemente condicionada por las propiedades químicas y topográficas de la superficie del material. En esta línea, se ha trabajado en la **reducción del tamaño de los cristales** (nanocristalinidad) durante su síntesis, con el fin de aumentar su superficie para facilitar el anclaje de células y proteínas cruciales en la adhesión celular, como vitronectina[407-408] o fibronectina[409-410], así como incrementar su reactividad para acelerar y asegurar su gradual desintegración e incorporación en el hueso natural[411]. En el **capítulo 1** de esta Tesis Doctoral, se muestra cómo al adsorber **factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF)** a los **andamios de hidroxiapatita sustituida con silicio cristalina (SiHA)** y **nanocristalina (nanoSiHA)** mediante uniones no covalentes, la desorción del VEGF inmovilizado, aunque mínima, es mayor (0,02 wt%) en el caso de los andamios de SiHA que en los de nanoSiHA (0,002 wt%), lo que se corresponde con la superior capacidad de adsorción de proteínas de las superficies nanocristalinas. Este bajo porcentaje de desorción del VEGF de los materiales de hidroxiapatita coincide con lo observado en estudios previos[412].

La nanocristalinidad de las hidroxiapatitas sustituidas con silicio promueve la adhesión de proteínas como albúmina y fibrinógeno[311] y retrasa la proliferación, diferenciación y actividad de los osteoclastos tanto a 7 días de cultivo[411] como a 21 días[311], probablemente debido a que estos materiales producen una inhibición de la expresión de RANK, como demostraron Mladenovic et al.[413]. Algunos estudios relacionan la alteración de la osteoclastogénesis y la disminución de la actividad resortiva con la reducción de señales intercelulares mediadoras en las uniones gap en macrófagos, lo que impide la fusión y diferenciación de los macrófagos a osteoclastos, así como la unión necesaria con la superficie ósea para que se produzca la resorción[414-415].

Aunque estos efectos producidos por la nanocristalinidad de las hidroxiapatitas pueden resultar prometedores en escenarios de osteoporosis, en la presente Tesis se ha comprobado que esta propiedad produce una pérdida de anclaje de los osteoblastos, lo que provoca que mueran por apoptosis al no ser capaces de adherirse correctamente sobre la superficie del biomaterial[411]. Este tipo de apoptosis mediada por la falta de anclaje se conoce como *anoikis*. Algunos autores apuntan que los osteoblastos necesitan adhesiones estables con un dominio de contacto superiores a 100 nm de ancho para sobrevivir[416], evidenciando así que las irregularidades de la superficie de las hidroxiapatitas nanocristalinas de entre 100 nm y 1 µm impiden o dificultan la proliferación celular comparadas con las superficies cristalinas[417-418]. Los estudios realizados en ovejas osteoporóticas con andamios de hidroxiapatitas sustituidas con silicio cristalina (SiHA) y nanocristalina (nanoSiHA) corroboran la pérdida de anclaje

celular que provoca el biomaterial nanoSiHA previamente observada *in vitro*[411] y además evidencian cómo la elevada reactividad de la nanoSiHA *in vivo* produce una degradación acelerada e inespecífica del material, pudiendo ser una fuente de calcio, silicio y fosfato alrededor del material e incluso provocar la migración de las partículas liberadas fuera del área del implante[348]. Otros autores han demostrado previamente cómo ésta rápida erosión de la superficie del material nanocristalino puede impedir la formación de adhesiones estables y por tanto, imposibilitar la proliferación celular sobre este tipo de materiales[419-420]. Así también se explica que las células precursoras de los osteoblastos, los preosteoblastos MC3T3-E1, no sean capaces de adherirse ni por tanto proliferar ni diferenciarse a osteoblastos sobre la superficie nanocristalina de los andamios nanoSiHA, mientras que sí lo hacen sobre los andamios de SiHA.

Son numerosos los estudios que postulan que los materiales con superficies con una estructura intermedia entre la micro y nanotopografía podrían resultar claves en la construcción de andamios para ingeniería de tejido óseo. En este sentido, Xia et al.[421] y Lin et al.[422] demostraron que las superficies con topografía híbrida micro-nano promueven la adhesión de proteínas y la proliferación y diferenciación de los osteoblastos, pudiendo ser, por tanto, un factor crítico en el diseño de sustitutos óseos funcionales.

Por otra parte, *in vivo* se observó un mayor número de osteoclastos alrededor de los implantes de nanoSiHA que alrededor de los de SiHA. Esta diferencia podría deberse a que alrededor del andamio, *in vivo*, las células pueden encontrar otras superficies de hueso sobre las que anclarse y proliferar, y a que la composición fisicoquímica del material nanocristalino sí permite el reclutamiento de osteoclastos y su proliferación, efecto que queda enmascarado en los estudios *in vitro*. Además, *in vivo* se produce la activación de la respuesta inmune, aumentando notablemente la presencia de componentes de la inflamación alrededor de los andamios de nanoSiHA, aunque estas diferencias no resultaron estadísticamente significativas. Matesanz et al. comprobaron que este material *in vitro* no provocaba polarización de los macrófagos RAW 264.7 hacia fenotipo proinflamatorio M1, sino que favorecía la polarización hacia fenotipo reparador M2[311] y, recientemente, Mahon et al.[423] han demostrado cómo *in vitro* andamios fabricados a partir de partículas de nanohidroxiapatita también producen la polarización de macrófagos humanos hacia el fenotipo M2.
La polarización de los macrófagos hacia fenotipos reparadores tiene una implicación directa en la osteointegración del implante, ya que, como demuestran recientemente Zhu et al.[424], al polarizarse hacia M2, los macrófagos expresan elevados niveles de CD206, IL-4 e IL-10 y además liberan elevadas cantidades de BMP-2, promoviendo de forma directa la diferenciación de células madre mesenquimales hacia osteoblastos, lo que favorece los procesos de regeneración ósea.

Respecto a la capacidad angiogénica del material, ésta parece independiente del tamaño de cristal, puesto que tanto los andamios de SiHA como los de nanoSiHA permiten la proliferación de células angiogénicas *in vitro*. Posiblemente esto se deba a las fuertes uniones que genera este tipo celular con su entorno, ya que presenta múltiples tipos de moléculas de adhesión, desde la superfamilia de las inmunoglobulinas (ICAM-1, ICAM-2, ICAM-3, PECAM-1 y VCAM-1) hasta la familia de las selectinas (E-

selectina)[425-426]. Xiao et al. coinciden con este resultado mostrando que la nano y microarquitectura de la capa superficial de la hidroxiapatita promueve la angiogénesis en células endoteliales humanas de cordón umbilical (HUVECs, human umbilical vein endothelial cells)[427]. Otros autores han demostrado cómo la presencia del silicio en estos materiales es uno de los principales factores que promueven indirectamente la vascularización ya que, los iones de silicio una vez liberados del andamio, favorecen la secreción de factores angiogénicos como PDGF-BB en los macrófagos[428]. Es importante destacar que, como han demostrado Li et al., la presencia de macrófagos M2 es crucial para la regulación y remodelación de la angiogénesis, ya que además de potenciarla, la regulan a través de la secreción de metaloproteasa-3 de matriz (TIMP3), que inhibe tanto la actividad MMP9 como la señalización de VEGF, a través del bloqueo del receptor VEGFR2[428].

Cuando se adsorbe el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) sobre la superficie de ambos tipos de hidroxiapatita (SiHA y nanoSiHA), mediante uniones no covalentes estables que permiten mantener el VEGF biológicamente activo[429], aumenta *in vivo* el crecimiento óseo alrededor del implante así como la presencia de vasos sanguíneos. Sin embargo, el porcentaje de osificación y el grosor de las trabéculas formadas alrededor de los andamios de nanoSiHA/VEGF siguen siendo inferiores al de las que se forman alrededor de los andamios de SiHA y SiHA/VEGF. Esto indica que el VEGF incrementa la diferenciación de los preosteoblastos, de acuerdo con lo observado *in vitro* mediante la medida del incremento en la producción de ALP, pero solo en el caso de SiHA/VEGF, ya que el material nanocristalino demostró no ser apto para su crecimiento aún inmovilizando el VEGF sobre él. También es de destacar el aumento observado *in vivo* en los niveles de vascularización, tanto alrededor de los andamios de SiHA/VEGF como sobre nanoSiHA/VEGF, lo que demuestra lo prometedora que puede resultar la adsorción de este factor en los biomateriales para potenciar los procesos de osteogénesis y angiogénesis. El efecto biológico del VEGF adsorbido en estos andamios ha sido observado en los estudios *in vitro* e *in vivo* realizados en esta Tesis Doctoral, que han corroborado la hipótesis inicial y están en concordancia con lo demostrado por otros autores[258,289,290].

Por otro lado, **la reducción de la escala** de las biocerámicas hacia valores nanométricos permite ampliar sus posibilidades de uso, como es el caso de las **nanoesferas de sílice mesoporosa cargadas con ipriflavona** como fármaco antiosteoporótico, utilizadas en el **segundo capítulo** de esta Tesis. En este sentido, los estudios de biocompatibilidad son ligeramente diferentes, ya que al tratarse de nanopartículas (alrededor de 100 nm), de tamaño inferior al celular (alrededor de 20 μm), resulta imprescindible analizar la incorporación de las mismas por los principales tipos celulares presentes en las zonas del implante y su posible efecto citotóxico.

En la presente Tesis Doctoral se ha evaluado cómo estos nanomateriales pueden afectar a la síntesis de nuevo tejido óseo, llevada a cabo por los osteoblastos; a la resorción del mismo, llevada a cabo por los osteoclastos; a la diferenciación de las céulas precursoras de ambos tipos celulares (preosteoblastos y monocitos-macrófagos, respectivamente); así como la respuesta inmune que producen, a través del estudio de su efecto sobre los

macrófagos y linfocitos; y su acción sobre la vascularización del tejido, evaluada con células progenitoras endoteliales.

En cuanto a los efectos de estas nanoesferas sobre el proceso de **remodelado óseo**, se puso a punto el modelo de cocultivo de osteoblastos (células Saos-2), como tipo celular responsable de la síntesis de tejido óseo, y osteoclastos (diferenciados *in vitro* a partir de macrófagos RAW 264.7), como tipo celular responsable de la resorción ósea. El objetivo de este cocultivo era mimetizar la situación fisiológica y observar el efecto de estos nanomateriales en la regulación que ejercen los osteoblastos sobre los osteoclastos, y viceversa.

Las nanopartículas no afectan a la proliferación de los osteoblastos Saos-2 pero sí alteran ligeramente las fases de su ciclo celular, produciendo una tendencia al aumento de la síntesis de material genético (S) para prepararse para la división celular (G2/M), fase que se reduce ligeramente. También se ha observado un incremento significativo de la fracción SubG1, relacionada con la apoptosis, aunque ésta se mantiene dentro de niveles mínimos y aceptables. En cuanto a los osteoclastos, la incorporación intracelular de las nanopartículas no altera su proliferación, viabilidad ni tamaño. Sin embargo, se observa un aumento significativo de la complejidad celular que probablemente se deba a la propia incorporación del material.

Ambos tipos celulares son capaces de incorporar grandes cantidades de nanoMBG-FITCs y la comunicación que se establece entre ambos tipos celulares no altera ni dificulta la incorporación del nanomaterial, que se mantiene en el tiempo. Sin embargo, el número de osteoblastos que presentan en su interior el nanomaterial y la cantidad de nanoesferas incorporadas son superiores a los observados en osteoclastos, tanto en monocultivo como en cocultivo, a 3 y 7 días de cultivo.

La ipriflavona liberada intracelularmente una vez incorporadas las nanoMBG-IPs, produce la reducción en un 20% de la proliferación de los osteoclastos, cuando éstos se cultivan en presencia de osteoblastos, sin afectar a la proliferación de los osteoblastos ni a la viabilidad de ninguno de los dos tipos celulares.

Es importante destacar que tanto los osteoblastos como los osteoclastos en cocultivo mantienen su morfología celular característica cuando incorporan tanto las nanoesferas sin fármaco (nanoMBG-FITCs) como con fármaco (nanoMBG-IPs). El mantenimiento de las características propias de cada tipo celular una vez que han captado estos nanomateriales, resulta imprescindible para que puedan adherirse correctamente sobre la superficie ósea y, en el caso de los osteoclastos, para que puedan formar el anillo de F-actina y generar la zona de sellado en la que se llevará a cabo la degradación del tejido óseo, necesaria para el proceso de remodelado. En el presente trabajo se ha comprobado que la actividad resortiva de los osteoclastos se ve reducida cuando se cultivan en presencia de osteoblastos, demostrando que los osteoblastos modulan la actividad de los osteoclastos *in vitro*, mediante la producción de RANKL y OPG. Estos agentes potenciarán e inhibirán, respectivamente, la fusión de los precursores de los osteoclastos y por tanto, la formación de osteoclastos maduros y activos[76]. Las nanoesferas sin fármaco, nanoMBGs, no alteran la actividad resortiva de los osteoclastos, comportándose de manera similar a las células control sin material. Sin embargo, la incorporación intracelular de nanoMBG-IPs produce una disminución tanto en la profundidad de las huellas de resorción que dejan los osteoclastos sobre discos de nanoSiHA (utilizada en estos estudios), como en la cantidad de cavidades de resorción

que generan sobre la superficie de esta hidroxiapatita tras 7 días de cultivo. Se ha descrito que la IP al unirse a los receptores de estrógenos, provoca un influjo de Ca^{2+} al interior de los osteoclastos, lo que inhibe la formación de la zona de sellado sobre la superficie ósea y la consiguiente actividad resortiva[430-432], actuando de forma similar a la vitamina K[131].

Para conocer los efectos de estas nanoesferas sobre el proceso de **osteogénesis**, se utilizaron preosteoblastos MC3T3-E1 como modelo experimental de dicho proceso *in vitro*. Es importante valorar el efecto de este nanomaterial sobre la capacidad de diferenciación de las células precursoras de los osteoblastos a fenotipo osteoblástico, ya que de este proceso dependerá la generación de nuevo tejido óseo. Los preosteoblastos MC3T3-E1 incorporan estas nanoesferas de forma dosis-dependiente y, curiosamente, a partir de los 15-20 minutos, se alcanza un valor máximo de incorporación y comienza a producirse la liberación de éstas, evidenciando así que la incorporación/liberación de estos nanomateriales en este tipo celular es un mecanismo dinámico, de la misma forma que se ha observado con macrófagos[433]. El mecanismo principal que emplean los preosteoblastos para incorporar estas nanoesferas es la endocitosis dependiente de clatrina, como han demostrado también otros autores con nanopartículas de sílice[434] y de oro[435].
La incorporación de las nanoMBGs y nanoMBG-IPs no alteró el tamaño, ni la complejidad, ni la viabilidad de los preosteoblastos, y tampoco indujo apoptosis en este tipo celular. Respecto a los estudios de ciclo celular de preosteoblastos MC3T3-E1, las nanoMBGs no producen ninguna alteración de las fases, mientras que cuando el fármaco está presente, las nanoMBG-IPs provocan un ligero aumento de la fase de síntesis (S) de estos preosteoblastos, evidenciando una posible estimulación del crecimiento de este tipo celular. Además, ambos tipos de nanopartículas disminuyen el contenido intracelular de especies reactivas de oxígeno y de Ca^{2+} citosólico en los preosteoblastos, pudiendo estar ejerciendo un efecto protector al asegurar el mantenimiento del potencial de membrana mitocondrial y así la producción de ATP, como se ha observado con otros materiales[436]. En los estudios de metabolómica observamos que las modificaciones producidas por el tratamiento con estas nanoesferas están relacionadas con el consumo de glucosa y la degradación de proteínas y aminoácidos para la obtención de energía, así como la generación de fosfolípidos de membrana, siendo menor el consumo de metabolitos en el caso de los preosteoblastos tratados con nanoMBG-IPs e IP.

Respecto a los niveles de ALP, actividad específica de osteoblastos maduros, se ha demostrado en este estudio que la incorporación de nanoMBGs tras 11 días de incubación, produce una disminución de este parámetro, sin embargo, cuando estas nanoesferas van cargadas con ipriflavona (nanoMBG-IPs), inducen un aumento muy significativo de ALP. Esto evidencia que el elevado efecto del fármaco en la potenciación de la diferenciación de este tipo celular[134,437] se mantiene cuando esta incorporado en las nanoesferas. Este resultado es de gran importancia, ya que revela que la liberación intracelular del fármaco se ha producido de forma eficaz, estimulando la diferenciación de los preosteoblastos, lo que favorecería la regeneración ósea si estas nanoMBG-IPs fueran administradas de forma local en hueso. Teniendo en cuenta que se ha demostrado además que la ipriflavona potencia los efectos de los estrógenos[438],

alcanzando así mayores cantidades de calcitonina de una forma tejido-específica[439], se seleccionaron las nanoMBG-IPs como potencial candidato para el tratamiento de osteoporosis *in vivo*, estudiando su efecto en conejas ovariectomizadas como modelo animal de osteoporosis. Muy recientemente, se ha comprobado el efecto de las nanoMBG-IPs en este modelo, analizando el grosor de las trabéculas óseas y comprobando que el porcentaje de osificación se incrementa con este nanomaterial[440].

Como cualquier biomaterial, las nanoesferas deben producir la **respuesta inmune** apropiada para permitir su uso en el tratamiento de hueso osteoporótico. Los estudios realizados con macrófagos RAW 264.7 demuestran que las nanoMBGs no alteran la proliferación ni la viabilidad de este tipo celular. Tampoco producen la polarización de los macrófagos hacia fenotipo proinflamatorio (M1), pero sí aumenta el número de células polarizadas hacia fenotipo reparador (M2), manteniendo la morfología celular alargada característica de este fenotipo[441]. Algunos autores han señalado que esta inhibición de la respuesta proinflamatoria es característica de las nanopartículas de sílice mesoporosa, y que se lleva a cabo a través de la inhibición de la vía Wnt5A/Ca^{2+}, encargada de estimular la producción de citoquinas en el macrófago responsables de la activación de las células T y, por tanto, de la generación y mantenimiento en el tiempo la respuesta inflamatoria[410].
En este contexto, es importante destacar que, según lo observado en otro trabajo, los macrófagos RAW 264.7 mantienen inalterada su inmunocompetencia una vez incorporan las nanoMBGs, pudiendo responder ante infecciones fúngicas como la provocada por la levadura oportunista *Candida albicans* e, incluso, estas nanoesferas potencian su capacidad fagocítica de manera transitoria[433].

Con el objetivo de realizar un análisis más sensible para cuantificar las posibles alteraciones que generan las nanoMBGs y nanoMBG-IPs en la expresión de diferentes genes proinflamatorios y antiinflamatorios se llevó a cabo un estudio mediante qPCR de los genes más representativos del fenotipo proinflamatorio M1 (IL6, TNFa, NFKB1, NOS2) y reparador M2 (IL10, IL1B, IL12, P38) tras 24 horas de cultivo de macrófagos RAW 264.7 en presencia de nanoMBGs y nanoMBG-IPs. Ninguno de los materiales provocó el aumento o la disminución en la expresión de forma estadísticamente significativa de ninguno de los genes analizados[440].

Otros autores han encontrado diferencias en la expresión génica de genes implicados en la polarización de macrófagos a M1/M2 cultivados sobre andamios de composición similar a la de las nanoMBGs, observando primero una polarización a M1 seguida de una respuesta reparadora (M2)[428]. Sin embargo, los ensayos realizados por estos autores son a 7 días de cultivo con el material, a diferencia de la respuesta temprana, de 24 horas, evaluada en este trabajo. Es de destacar que en otros estudios se ha demostrado que la ipriflavona, como flavonoide, es capaz de inhibir enzimas y factores de transcripción implicados en la inflamación[442].

Por otro lado, se evaluó la producción de IL6 por los preosteoblastos MC3T3-E1 en contacto con nanoMBGs y nanoMBGs, ya que además de los macrófagos, los preosteoblastos son capaces de producirla[443]. Esta citoquina es especialmente relevante en la regulación del remodelado óseo por inducir la diferenciación de los osteoclastos[444-

[445], en los procesos de revascularización[446] y en la respuesta proinflamatoria[447]. No se observaron cambios en la producción de IL6 con ninguno de los dos nanomateriales, confirmando que la administración local de nanoMBGs y nanoMBG-IPs no desencadena la producción de esta citoquina proinflamatoria *in vitro*.
Los ensayos recientes realizados con los tipos celulares implicados en la respuesta inmune adaptativa, demuestran que la incorporación de nanoMBGs y nanoMBG-IPs en linfocitos Th1 $CD4^+$, representados por la línea celular AE103, y linfocitos Th2 $CD4^+$, representados por la línea celular SR.D10, no genera respuestas citotóxicas ni proinflamatorias e incluso, favorecen la síntesis de citoquinas antiinflamatorias, como la IL4.
Estudios previos muestran que estas nanoMBGs no resultan citotóxicas ni inflamagénicas en linfocitos ni en células dendríticas tras su incorporación[389].

La **vascularización** del tejido alrededor de cualquier biomaterial implantado en el organismo, es crucial para asegurar la correcta incorporación del mismo y la supervivencia tanto del tejido preexistente como del que se irá regenerando. Para conocer los posibles efectos angiogénicos de las nanoesferas nanoMBGs y nanoMBG-IPs, se utilizaron células progenitoras endoteliales (EPCs) como modelo de células implicadas en la formación de vasos sanguíneos con elevada capacidad proliferativa y comportamiento antritrombogénico[412,448]. Se comprobó que las EPCs incorporaban las nanoMBG-FITCs de forma dosis- y tiempo-dependiente a través de endocitosis dependiente de clatrina, endocitosis mediada por caveolas y fagocitosis. Esto se corresponde con lo observado por otros autores. Liu et al. demostraron cómo este tipo celular incorpora partículas de oro de diámetro inferior a las nanoMBGs a través de endocitosis mediada por claveolas[449], Tamaru et al. comprobaron cómo células endoteliales de cerebro de ratón incorporaban nanopartículas mediante endocitosis dependiente de clatrina y endocitosis mediada por caveolas[450]. Lin et al. corroboraron que las EPCs apenas incorporan nanoMBGs por macropinocitosis mediada por polimerización de actina, puesto que este tipo celular tiene niveles basales de macropinocitosis muy bajos, que podrían verse elevados por la acción de diversos factores de crecimiento[451].
La capacidad de diferenciación de estas células progenitoras hacia fenotipo endotelial maduro se evaluó a través de la expresión del receptor 2 para el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEFGR2). Tras 10 días de cultivo con nanoMBGs y nanoMBG-IPs se produjo un incremento en la expresión de VEGFR2 con ambos nanomateriales. Este efecto resultó más acusado cuando las nanoesferas contenían ipriflavona, lo que concuerda con resultados previos, donde se observó que la presencia del silicio y del fármaco en estas nanoesferas favorece los procesos de osteogénesis y angiogénesis[347-348,427,452].

Dado que los macrófagos ejercen un fuerte papel regulador de la angiogénesis a través de la liberación de algunas moléculascomo el VEGF[453-454], se cultivaron macrófagos RAW 264.7 durante 24 horas en presencia de nanoMBGs y nanoMBG-IPs y de estímulos de la polarización hacia los fenotipos M1 (LPS) y M2 (IL10). Los sobrenadantes de cada condición se añadieron a los cultivos de EPCs, analizando así el efecto de las moléculas liberadas por los macrófagos sobre la diferenciación de las células progenitoras endoteliales. Se observó que la expresión de VEGFR2 incrementó en todos los casos de

forma similar, sin influir la estimulación previa de los macrófagps con LPS, así como tampoco influyó la presencia de nanoMBGs ni nanoMBG-IPs en el cultivo de los macrófagos. Sin embargo, las nanoMBGs y nanoMBG-IPs directamente en contacto con las EPCs, incrementaron la expresión de VEGFR2 de forma más pronunciada que los medios condicionados. Esto revela que la modulación que ejercen los macrófagos sobre las células progenitoras endoteliales se produce de manera constitutiva, independiente del fenotipo que adquieran o de estímulos externos como la presencia de los materiales, como ya habían demostrado otros autores[455]. Para comprobar si el efecto modulador de los macrófagos observado con los medios condicionados pudiera verse alterado por la interregulación que ejercen las células progenitoras endoteliales sobre éstos, se pusieron a punto cocultivos de EPCs con macrófagos durante 7 días, en presencia de nanoMBGs y nanoMBG-IPs. La polarización de los macrófagos a fenotipo M2d proangiogénico por tratamiento con LPS/NECA, permitió obtener un control positivo para evaluar la expresión de VEGFR2 en las EPCs en estos cocultivos[456-457]. El cocultivo de macrófagos sin estimular con células progenitoras endoteliales no produjo incrementos en la expresión de VEGFR2, mientras que el cocultivo con macrófagos polarizados a M2d sí estimuló la expresión de dicho receptor en las EPCs. Es de destacar que el efecto angiogénico de las nanoMBGs y de las nanoMBG-IPs, evaluado mediante el análisis de la expresión de VEGFR2, fue superior al producido por los macrófagos M2d, lo que concuerda con lo observado por otros autores con vidrios bioactivos de composición similar a las nanoMBGs[458-459].

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

En la presente Tesis Doctoral se ha evaluado la respuesta celular a dos biomateriales diseñados para el tratamiento del hueso osteoporótico:

Capítulo I - Andamios de hidroxiapatita cristalina y nanocristalina sustituida con silicio, sin tratar y tratados con factor de crecimiento del endotelio vascular (SiHA, nanoSiHA, SiHA/VEGF y nanoSiHA/VEGF, respectivamente)

Capítulo II - Nanoesferas mesoporosas sin cargar y cargadas con ipriflavona (nanoMBGs y nanoMBG-IPs, respectivamente):

Los resultados obtenidos han permitido alcanzar las conclusiones que se exponen a continuación.

Andamios SiHA, nanoSiHA, SiHA/VEGF y nanoSIHA/VEGF (Capítulo I)

1. **El factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) se adsorbe con elevada eficacia sobre la superficie de los andamios SiHA y nanoSiHA**, manteniendo su actividad biológica, tanto *in vitro* como *in vivo,* y mejorando la biocompatibilidad y las propiedades osteogénicas de los dos tipos de andamios estudiados.

2. La proliferación *in vitro* de las células progenitoras endoteliales (EPCs) sobre la superficie de los andamios nanoSiHA/VEGF y SiHA/VEGF es significativamente mayor que en los andamios sin VEGF, evidenciando la importancia de la adsorción de este factor de crecimiento para mejorar la proliferación y supervivencia de las células progenitoras endoteliales, implicadas en el proceso de angiogénesis.

3. Los andamios SiHA inducen de forma significativa **la proliferación y la diferenciación de preosteoblastos MC3T3-E1** sobre su superficie **en comparación con los andamios nanoSiHA**. **La presencia de VEGF adsorbido** en estos dos tipos de andamios no mejora la proliferación de los preosteoblastos, pero **induce un aumento significativo de la diferenciación de preosteoblastos sobre los andamios SiHA/VEGF**.

4. **Los estudios *in vivo***, realizados en ovejas osteoporóticas, **evidencian una degradación acelerada de los andamios nanoSiHA y nanoSiHA/VEGF**, provocando la migración de las partículas liberadas fuera del área del implante y la **presencia de componentes inflamatorios**, descartando su uso como sustitutos óseos.

5. **Los andamios SiHA/VEGF**, fabricados con SiHA cristalina y tratados con VEGF, **promueven *in vivo* la regeneración del tejido óseo**, incluso en escenarios patológicos adversos como la osteoporosis, observándose un **alto grado de osificación**, **trabéculas más gruesas y mayor presencia de osteoblastos y vasos sanguíneos.**

Nanoesferas mesoporosas nanoMBGs y nanoMBG-IPs (Capítulo II)

1. La puesta a punto del **cocultivode osteoblastos Saos-2 y osteoclastos** diferenciados a partir de macrófagos RAW 264.7 como modelo experimental, ha permitido conocer los **efectos de nanoMBGs y nanoMBG-IPs tras su incorporación intracelular** enlos dos tipos celulares encargados del **remodelado óseo**, manteniendo la comunicación intercelular con el fin de mimetizar la situación fisiológica.

2. **NanoMBGs y nanoMBG-IPs son incorporadas eficazmente por osteoblastos y osteoclastos en cocultivo. La incorporación intracelular de nanoMBG-IPs induce una disminución significativa de la proliferación de osteoclastos y de su actividad resortiva** después de 7 días en cocultivo, sin afectar a la proliferación y viabilidad de los osteoblastos.

3. Los **preosteoblastos MC3T3-E1 incorporan eficazmente las nanoesferas** mediante **endocitosis dependiente de clatrina. La incorporación de nanoMBG-IPs estimula *in vitro* la diferenciación de los preosteoblastos en osteoblastos maduros**, evidenciando el potencial de estas nanoesferas para inducir el proceso de osteogénesis.

4. Los estudios de **metabolómica** realizados mediante RMN de alta resolución han permitido conocer los efectos de la incorporación intracelular de nanoMBGs y nanoMBG-IPs en la **producción, consumo y secreción de diferentes metabolitos en preosteoblastos MC3T3-E1**.

5. NanoMBGs y nanoMBG-IPs no inducen *in vitro* la polarización de macrófagos RAW 264.7 a fenotipo proinflamatorio M1 y sí favorecen el fenotipo antiinflamatorio M2, clave en la reparación del tejido tras la implantación de cualquier biomaterial

6. NanoMBGs y nanoMBG-IPs no generan respuestas proinflamatorias ni citotóxicas en las líneas celulares **AE103 y SR.D10,** representativas de **linfocitos Th1 y Th2**, respectivamente. Asimismo, no alteran la activación de los linfocitos T $CD4^+$ SR.D10.

7. Las **células progenitoras endoteliales (EPCs) incorporan las nanoesferas principalmente mediante endocitosis dependiente de clatrina. La incorporación de nanoMBGs y nanoMBG-IPs promueve la expresión de VEGFR2**, de forma más pronunciada tras la liberación intracelular del fármaco, evidenciando el potencial de estas nanoesferas para inducir el proceso de angiogénesis.

8. La puesta a punto del **cocultivo de macrófagos RAW 264.7 y EPCs** como modelo experimental, ha permitido analizar el **papel modulador de los macrófagos** sobre estas **células angiogénicas en ausencia y presencia de nanoesferas**.El tratamiento de EPCs con medios de cultivo de macrófagos basales, M1 y M2 y los estudios de cocultivo de EPCs/macrófagos también confirmaron el **efecto angiogénico de estas nanoesferas sobre las EPCs, incluso en presencia de células fagocíticas**.

Esta Tesis ha permitido evaluar de forma muy satisfactoria la respuesta celular, *in vitro* e *in vivo*, a dos tipos de biomateriales diseñados para tratamiento de hueso osteoporótico: *a)* andamios 3D de hidroxiapatita cristalina sustituida con silicio decorados con VEGF para favorecer la regeneración ósea tras su implantación y *b)* nanoesferas de vidrio mesoporoso bioactivo cargadas con ipriflavona para su aplicación local y la liberación intracelular del fármaco antiosteoporótico en células óseas. Los resultados obtenidos permiten proponer estos biomateriales como excelentes candidatos para futuros estudios preclínicos que permitirían la prevención y el tratamiento de la osteoporosis mediante dos estrategias muy diferentes.

CONCLUSIONS

CONCLUSIONS

In this Doctoral Thesis, the cellular response to two biomaterials designed for the treatment of osteoporotic bone has been evaluated:

Chapter I - Silicon-substituted crystalline and nanocrystalline hydroxyapatite scaffolds, untreated and treated with vascular endothelial growth factor (SiHA, nanoSiHA, SiHA/VEGF and nanoSiHA/VEGF, respectively)

Chapter II - Uncharged and ipriflavone-loaded mesoporous nanospheres (nanoMBGs and nanoMBG-IPs, respectively):

The results obtained have made it possible to reach the conclusions below:

SiHA, nanoSiHA, SiHA/VEGF and nanoSIHA/VEGF scaffolds (Chapter I)

1. Vascular endothelial growth factor (VEGF) is highly efficiently adsorbed on the surface of SiHA and nanoSiHA scaffolds, maintaining its biological activity, both *in vitro* and *in vivo*, and improving the biocompatibility and osteogenic properties of the two types of scaffolds studied.

2. The in vitro proliferation of endothelial progenitor cells (EPCs) on the surface of the nanoSiHA/VEGF and SiHA/VEGF scaffolds is significantly higher than on the scaffolds without VEGF, showing the importance of the adsorption of this growth factor to improve the proliferation and survival of endothelial progenitor cells, involved in the angiogenesis process.

3. SiHA scaffolds significantly induce MC3T3-E1 preosteoblast proliferation and differentiation on their surface compared to nanoSiHA scaffolds. The presence of VEGF adsorbed on these two types of scaffolds does not enhance preosteoblast proliferation, but **induces a significant increase in preosteoblast differentiation on SiHA/VEGF scaffolds.**

4. *In vivo* studies, carried out in osteoporotic sheep, **show an accelerated degradation of the nanoSiHA and nanoSiHA/VEGF scaffolds**, causing the migration of the released particles outside the implant area and **the presence of inflammatory components**, leading to discard their use as bone substitutes.

5. SiHA/VEGF scaffolds, made with crystalline SiHA and treated with VEGF, **promote bone tissue regeneration *in vivo***, even in adverse pathological scenarios such as osteoporosis, showing a **high degree of ossification, thicker trabeculae and a greater presence of osteoblasts and blood vessels**.

Mesoporous nanospheres nanoMBGs and nanoMBG-IPs (Chapter II)

1. The development of the **co-culture of Saos-2 osteoblasts and osteoclasts** differentiated from RAW 264.7 macrophages as an experimental model has allowed to determine the **effects of nanoMBGs and nanoMBG-IPs after their intracellular incorporation** in the two cell types responsible for bone remodeling, maintaining intercellular communication in order to mimic the physiological situation.

2. NanoMBGs and nanoMBG-IPs are efficiently uptaken up by osteoblasts and osteoclasts in coculture. **The intracellular incorporation of nanoMBG-IPs induces a**

significant decrease in osteoclast proliferation and resorptive activity after 7 days in co-culture, without affecting osteoblast proliferation and viability.

3. MC3T3-E1 preosteoblasts efficiently incorporate nanospheres by clathrin-dependent endocytosis. The incorporation of nanoMBG-IPs stimulates *in vitro* the differentiation of preosteoblasts into mature osteoblasts, showing the potential of these nanospheres to induce the osteogenesis process.

4. Metabolomics studies carried out using high-resolution NMR have revealed **the effects of intracellular incorporation of nanoMBGs and nanoMBG-IPs on the production, consumption and secretion of different metabolites in MC3T3-E1 preosteoblasts**.

5. NanoMBGs and nanoMBG-IPs do not induce *in vitro* the polarization of RAW 264.7 macrophages to the proinflammatory M1 phenotype and they do favor the anti-inflammatory M2 phenotype, key in tissue repair after the implantation of any biomaterial

6. NanoMBGs and nanoMBG-IPs do not generate proinflammatory or cytotoxic responses in the AE103 and SR.D10 cell lines, representative of Th1 and Th2 lymphocytes, respectively. In addition, they do not alter the activation of CD4+ SR.D10 T lymphocytes.

7. Endothelial progenitor cells (EPCs) mainly incorporate the nanospheres by clathrin-dependent endocytosis. The incorporation of nanoMBGs and nanoMBG-IPs promotes the expression of VEGFR2, in a more pronounced way after the intracellular release of the drug, showing the potential of these nanospheres to induce the angiogenesis process.

8. The development of the **co-culture of RAW 264.7 macrophages and EPCs** as an experimental model has made it possible to analyze the **modulatory role of macrophages** on these angiogenic cells in the absence and presence of nanospheres. Treatment of EPCs with basal, M1, and M2 macrophage culture media and EPC/macrophage co-culture studies confirmed **the angiogenic effect of these nanospheres on EPCs**, even in the presence of phagocytic cells.

This Thesis has made it possible to evaluate in a very satisfactory way the cellular response, *in vitro* and *in vivo*, to two types of biomaterials designed for the treatment of osteoporotic bone: *a)* 3D scaffolds of crystalline hydroxyapatite substituted with silicon and decorated with VEGF to promote bone regeneration after its implantation and *b)* bioactive mesoporous glass nanospheres loaded with ipriflavone for local application and intracellular release of the anti-osteoporotic drug in bone cells. The obtained results allow us to propose these biomaterials as excellent candidates for future preclinical studies that would allow the prevention and treatment of osteoporosis through two very different strategies.

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

1. Park J, Lakes S. Biomaterials. An introduction. Chapter I. Introduction.Springer Science & Business Media 2007; pp. 14.
2. Williams D, Zhang X. Definitions of Biomaterials for the Twenty-First. CenturyII. Biomaterials and biomedical materials. Elsevier 2019; pp. 15-23.
3. Zenz CR. Conference on Biomaterials WS2008. For Genomics and Bioinformatics 2008.
4. Hudecki A, Kiryczyński G, Łos JM. Biomaterials, definition, overview. Chapter 7. Stem Cells and Biomaterials for Regenerative Medicine. Elsevier 2019.
5. Geetha M, Singh SK, Asokamani R, Gogia AK. Ti based biomaterials, the ultimate choice for orthopaedic implants. A review. Prog Mater Sci 2008;54:397–425.
6. Arjunan A, Baroutaji A, Robinson J, Praveen AS, Pollard A, Wang C. Encyclopedia of Smart Materials Vol. 1.Future Directions and Requirements for Tissue Engineering Biomaterials2022; pp. 195-218.
7. Ratner BD. A history of biomaterials. Biomaterials science 2013.
8. Arthur A, Zierold MD.Reaction of bone to various metals. Arch Surg. 1924;9(2):365-412.
9. Nevins M, Langer B. The successful application of osseointegrated implants to the posterior jaw: a long-term retrospective study. Int J Oral Maxillofac Implants. 1993;8(4):428-32.
10. Hench LL, Splinter RJ, Allen WC, Greenlee TK. Bonding mechanisms at the interface of ceramic prosthetic materials. J Biomed Mater Res 1971;2:117–41.
11. Izquierdo-Barba I, Arcos D, Sakamoto Y, Terasaki O, López-Noriega A, Vallet-Regí M. High performance mesoporous bioceramics mimicking bone mineralization. Chem. Mater. 2008; 20:3191–3198.
12. Wu C, Chang J. Multifunctional mesoporous bioactive glasses for effective delivery of therapeutic ions and drug/growth factors. J. Control. Release 2014;193:282–295.
13. Polo L, Gómez-Cerezo N, Aznar E, Vivancos JL, Sancenón F, Arcos D, et al. Molecular gates in mesoporous bioactive glasses for the treatment of bone tumours and infection. Acta Biomater. 2017; 50:114–126.
14. Polo L, Gómez-Cerezo N, García-Fernández A, Aznar E, Vivancos JL, Arcos D, et al. Mesoporous bioactive glasses equipped with stimuli-responsive molecular gates for the controlled delivery of levofloxacin against bacteria. Chem. Eur. J. 2018; 24:18944–18951.
15. Chen Q, Thouas G. Biomaterials: A basic introduction. CRC Press 2014.
16. Vallet Regí M, Salinas A. Bone Repair Biomaterials. Chapter 6. Ceramics as bone repair materials. Elsevier 2019.
17. Hench LL, Chronology of Bioactive Glass Development and Clinical Applications. New J. Glas. Ceram. 2013; 3(2):67.
18. Love B. Biomaterials. A systems approach to engineering concepts. Chapter 8. Ceramic biomaterials. Elsevier 2017; pp. 185-204.
19. Smeets R, Stadlinger B, Schwarz F, Beck-Broichsitter B, Jung O, et al. Impact of Dental Implant Surface Modifications on Osseointegration. Biomed Res Int. 2016; 2016:6285620.
20. Hench LL, Polak JM. Third-generation biomedical materials. Science 2002;295:1014–7.
21. Smith L. Ceramic plastic material as a bone substitute. Arch Surg 1963; 87:653–61.
22. Christel P, Meunier A, Dorlot JM, Crolet JM, Witvoet J, Sedel L, et al. Biomechanical compatibility and design of ceramic implants for orthopaedic surgery. Bioceramics: material characteristics versus in vivo behaviour. Ann NY Acad Sci. 1988; 523:234–56.
23. Akagawa Y, Ichikawa Y, Nikai H, Tsuru H. Interface histology of unloaded and early loaded partially-stabilized zirconia endosseous implant in initial bone healing. J Prosthet Dent 1993; 69:599–604.
24. Qizhi C, George T. Biomaterials: a basic introduction. Boca Raton: CRC Press, Taylor & Francis Group 2015.
25. Rahaman MN, Day DE, Bal BS, Fu Q, Jung SB, Bonewald LF, et al., Bioactive glass in tissue engineering. Acta Biomater 2011; 7(6):2355-73.
26. Patel NR, Gohil PP. A review on biomaterials: scope, applications & human anat- omy significance. Int J Emerg Technol Adv Eng 2012; 2(4):91-101.
27. Zhang F, Chang J, Lu J, Lin K, Ning C. Bioinspired structure of bioceramics for bone regeneration in load-bearing sites. Acta Biomater. 2007; 3:896–904.
28. Dorozhkin SV. Bioceramics of calcium orthophosphates. Biomaterials 2010; 31:1465–85.
29. Daculsi G, Fellah BH, Miramond T. The essential role of calcium phosphate bioceram- ics. In: Ben-Nissan B, editor. Bone regeneration. Springer series in biomaterials science and engineering, vol. 2. Berlin, Heidelberg: Springer 2014.

30. Wang GC, Lu ZF, Zreiqat H. Bioceramics for skeletal bone regeneration. In: Bone substitute biomaterials. 2014; pp. 180–6.
31. Elliott JC. Structure and chemistry of the apatites and other calcium orthophosphates. London: Elsevier 1994.
32. Arcos D, Vallet-Regí M. Bioceramics for drug delivery, Acta Mater. 2013; 61:890.
33. Ratner BD, Castner DG. Biomedical surface science: foundations to frontiers. Surf Sci 2002; 500:28–60.
34. Sánchez-Salcedo S, Nieto A, Vallet-Regí M. Hydroxyapatite/ß-tricalciumphosphate/aga- rose macroporous scaffolds for bone tissue engineering. Chem Eng J 2008; 137:62–71.
35. Castillo RR, Lozano D, Vallet-Regí M. Mesoporous Silica Nanoparticles as Carriers for Therapeutic Biomolecules. *Pharmaceutics*. 2020; 12(5):432.
36. Vallet-Regí M, Izquierdo-Barba I, Colilla M. Structure and functionalization of mesoporous bioceramics for bone tissue regeneration and local drug delivery. Philos Trans A Math Phys Eng Sci. 2012; 370(1963):1400-21.
37. Vallet-Regí M, Colilla M, Izquierdo-Barba I, Manzano M. Mesoporous Silica Nanoparticles for Drug Delivery: Current Insights. Molecules. 2017; 23(1):47.
38. Xia W, Chang J. Well-ordered mesoporous bioactive glasses (MBG): A promising bioactive drug delivery system. J. Control. Release. 2006; 110:522.
39. Wang Y, Zhao Q, Han N, Bai L, Li J, Liu J, et al. Mesoporous silica nanoparticles in drug delivery and biomedical applications. Nanomedicine. 2015; 11(2):313-27.
40. Jain P, Hassan N, Iqbal Z, Dilnawaz F. Mesoporous Silica Nanoparticles: A Versatile Platform for Biomedical Applications. Recent Pat Drug Deliv Formul. 2018; 12(4):228-237.
41. Wu C, Chang J. Mesoporous bioactive glasses: structure characteristics, drug/ growth factor delivery and bone regeneration application. Interface Focus 2012; 2:292–306.
42. Zhu Y, Yue M, Guo T, Li F, Li Z, Yang D, et al. PEI-PEG-Coated Mesoporous Silica Nanoparticles Enhance the Antitumor Activity of Tanshinone IIA and Serve as a Gene Transfer Vector. Evid Based Complement Alternat Med. 2021; 2021:6756763.
43. Yang Y, Zhang M, Song H, Yu C. Silica-Based Nanoparticles for Biomedical Applications: From Nanocarriers to Biomodulators. Acc Chem Res. 2020; 53(8):1545-1556.
44. Tüncel Ö, Kahraman E, Bağci G, Atabey N, Özçelik S. Engineered silica nanoparticles are biologically safe vehicles to deliver drugs or genes to liver cells. Mater Sci Eng C Mater Biol Appl. 2021; 119:111585.
45. Croissant JG, Fatieiev Y, Khashab NM. Degradability and clearance of silicon, organosilica, silsesquioxane, silica mixed oxide, and mesoporous silica nanoparticles. Adv Mater. 2017; 29(9).
46. Hanafi-Bojd MY, Ansari L, Malaekeh-Nikouei B. Codelivery of anticancer drugs and siRNA by mesoporous silica nanoparticles. Ther Deliv. 2016; 7(9):649-55.
47. Ovejero Paredes K, Díaz-García D, García-Almodóvar V, Lozano-Chamizo L, Marciello M, Díaz-Sánchez M, et al. Multifunctional silica-based nanoparticles with controlled release of organotin metallodrug for targeted theranosis of breast cancer. Cancers (Basel). 2020 Jan 12;12(1):187
48. Colino CI, Lanao JM, Gutierrez-Millan C. Recent advances in functionalized nanomaterials for the diagnosis and treatment of bacterial infections. Mater Sci Eng C Mater Biol Appl. 2021; 121:111843.
49. Thomas T, Martin A, Lafage-Proust MH. Fisiología del tejido óseo. ECM-Podología 2011; 13(2):1-17.
50. Hart NH, Nimphius S, Rantalainen T, Ireland A, Siafarikas A, Newton RU. Mechanical basis of bone strength: influence of bone material, bone structure and muscle action. J Musculoskelet Neuronal Interact. 2017; 17(3):114-139.
51. Fernandez E, Gonzalez H, Castro A, Lisboa D. Osteología: relevancia de conceptos médicos en el ámbito odontológico. Rev. Clin. Periodoncia Implantol. Rehabil. Oral. 2015; 8(1)1:83-92.
52. Fox SI. Fisiología Humana. 12º Ed. Mcgraw-hill 2014.
53. Yamada M, Tohno Y, Tohno S, Utsumi M, Moriwake Y, Yamada G. Silicon compatible with the height of human vertebral column. Biol Trace Elem Res. 2003; 95: 113-121.
54. Canfield AE, Doherty MJ, Ashton BA. Osteogenic potential of vascular pericytes. In: Davies JE ed. Bone Engineering. Toronto: Davies JE ed.; 2000: pp. 143-51.
55. Ross MH. Atlas de histología descriptiva. Editorial Médica Panamericana 2010.
56. Yamaguchi A, Komori T, Suda T. Regulation of osteoblast differentiation mediated by Bone Morphogenetic Proteins, Hedgehogs, and Cbfa1. Endocr Rev 2000; 21:393-411.
57. Kobayashi Y, Maeda K, Takahashi N. Roles of Wnt signaling in bone formation and resorption. Japanese Dental Science Review. 2008 ; 44(1):76-82.
58. Chen X, Wang Z, Duan N, Zhu G, Schwarz EM, Xie C. Osteoblast-osteoclast interactions. Connect Tissue Res. 2018; 59(2):99-107.

59. Kim JM, Lin C, Stavre Z, Greenblatt MB, Shim JH. Osteoblast-osteoclast communication and bone homeostasis. Cells 2020; 9(9):2073.
60. Hojo H, Ohba S, Chung U. Signaling pathways regulating the specification and differentiation of the osteoblast lineage. Regenerative Medicine 2015; 1:57-62.
61. Pfeilschifter J, Laukhuf F, Müller-Beckman B,Blum WF, Pfister T, Ziegler R. Parathyroid hormone increases the concentration of insuline-like growth factor I and transforming growth factor beta 1 in rat bone. J Clin Invest 1995; 96:767-774.
62. Tang Y, Wu X, Lei W, Pang L, Wan C, Shi Z, et al. TGF-beta1-induced migration of bone mesenchymal stem cells couples bone resorption with formation. Nature Medicine 2009; 15(7):757-765.
63. Arboleya L, Castañeda S. Osteoimmunology: The Study of the Relationship Between the Immune System and Bone Tissue. Reumatología Clínica 2013; 9(5):303–315.
64. Aubin JE, Liu F. The osteoblasts lineage. In: Principles of Bone Biology. San Diego, California: Academic Press; 1996: pp. 51-67.
65. Manolagas SC, Jilka BL. Bone marrow, cytokines and bone remodeling. New Engl J Med 1995; 332:305-311.
66. Elias J, Tang W, Howitz MC. Cytokine and Hormonal stimulation of human osteosarcoma cytokine-11 production. Endocrinol 1995; 136: 489-498.
67. Batra N, Kar R, Jiang JX. Gap junctions and hemichannels in signal transmission, function and development of bone. Biochimica et Biophysica Acta, Biomembranes, 2012; 1818(8):1909-1918.
68. Civitelli R. Cell-cell communication in the osteoblast/osteocyte lineage. Arch Biochem Biophys. 2008; 473(2):188-92.
69. Loiselle AE, Jiang JX, Donahue HJ. Gap junction and hemichannel functions in osteocytes. Bone 2013; 54(2):205-12.
70. van Bezooijen RL, Roelen BA, Visser A, Wee-Pals L, de Wilt E, Karperien M, et al. Sclerostin is an osteocyte-expressed negative regulator of bone formation, but not a classical BMP antagonist. J Exp Med 2004; 199:805-14.
71. Aubin JE, Turksen K, Hersche JNM. Osteoblastic cell Lineage. En: Noda M, ed. Cellular and Molecular Biology of Bone. San Diego, Academic Press Inc. 1993; 1-45.
72. Teitelbaum SL. Bone resorption by osteoclasts. Science 2000; 289:1504-8.
73. Mundy GR. Cytokines and growth factors in the regulation of bone remodeling. J Bone Miner Res 1993; 8:505-10.
74. Park JH, Lee NK, Lee SY. Current understanding of rank signaling in osteoclast differentiation and maturation. Mol Cells. 2017; 40(10):706-713.
75. Song C, Yang X, Lei Y, Zhang Z, Smith W, Yan J, Kong L. Evaluation of efficacy on RANKL induced osteoclast from RAW 264.7 cells. J Cell Physiol. 2019; 234(7):11969-11975.
76. Boyce BF, Xing L. Functions of RANKL/RANK/OPG in bone modeling and remodeling. Arch Biochem Biophys. 2008; 0473(2):139-46.
77. Simonet WS, Lacey DL, Dunstan CR, Kelley M, Chang M-S, Luethy R et al. Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density. Cell 1997; 89:309-19.
78. Burgess TL, Quian Y, Kaufman S, Ring BD, Van G, Capparelli C et al. The ligand for osteoprotegerin (OPGL) directly activates mature osteoclasts. J Cell Biol 1999; 145:527-38.
79. Lacey DL, Timms E, Tan HL, Kelley MJ, Dunstan CR, Burguess TL et al. Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclasts differentiation and activation. Cell 1998; 93:165-76.
80. Pateinakis P, Papagianni A, Douma S, Efstriatiadis G, Memmos D. Associations of fetuin-A and osteoprotegerin with arterial stiffness and early atherosclerosis in chronic hemodialysis patients. BMC Nephrology 2013; 14:122.
81. Zhou S, Fang X, Xin H, Li W, Qiu H, Guan S. Osteoprotegerin Inhibits Calcification of Vascular Smooth Muscle Cell via Down Regulation of the Notch1-RBP-Jκ/Msx2 Signaling Pathway. PLoS ONE. 2013; 8(7).
82. Berendsen AD, Olsen BR. Bone development. Bone 2015; 80:14-18.
83. Long F, Ornitz DM. Development of the endochondral skeleton. Cold Spring Harb Perspect Biol. 2013; 5(1):a008334.
84. Raggatt LJ, Partridge NC. Cellular and molecular mechanisms of bone remodeling. J Biol Chem. 2010; 285(33):25103-8.
85. Halleen JM, Räisänen SR, Alatalo SL, Väänänen HK. Potential function for the ROS-generating activity of TRACP. Journal of Bone and Mineral Research 2003; 18(10):1908-1911.

86. Schaller S, Henriksen K, Sveigaard C, Heegaard AM, Hélix N, Stahlhut M, et al. The chloride channel inhibitor NS3736 prevents bone resorption in ovariectomized rats without changing bone formation. J Bone Miner Res. 2004; 19:1144-53.
87. Bucay N, Sarosi I, Dunstan CR, Morony S, Tarpley J, Capparelli C, et al. Osteoprotegerin-deficient mice develop early onset osteoporosis and arterial calcification. Genes & Development. 1998; 12(9):1260-1268.
88. Carter PH, Schipani E. The roles of parathyroid hormone and calcitonin in bone remodeling: prospects for novel therapeutics. Endocr Metab Immune Disord Drug Targets. 2006; 6(1):59-76.
89. Nakamichi Y, Udagawa N, Suda T, Takahashi N. Mechanisms involved in bone resorption regulated by vitamin D. J Steroid Biochem Mol Biol. 2018; 177:70-76.
90. Levasseur R. NIH Consensus development panel on osteoporosis prevention, diagnosis and therapy. JAMA 2001; 285:785-95.
91. Kyllönen, M. D'Este, M. Alini, D. Eglin, Local drug delivery for enhancing fracture healing in osteoporotic bone. Acta Biomater. 2015; 11:412.
92. D. Arcos, A.R. Boccaccini, M. Bohner, A. Díez-Pérez, M. Epple, E. Gómez- Barrena, et al. The relevance of biomaterials to the prevention and treatment of osteoporosis. Acta Biomater. 2014; 10:1793.
93. Haugen HJ. Bone grafts: which is the ideal biomaterial? Journal of clinical periodontology, 2019.
94. Jakob F, Ebert R, Ignatius A, Matsushita T, Watanabe Y, Groll J, et al. Bone tissue engineering in osteoporosis. Maturitas 2013; 75:118.
95. Lane JM, Russell L, Khan SN. Osteoporosis. Clin Orthop Relat Res. 2000; 372:139-50.
96. Curtis EM, Moon RJ, Harvey NC, Cooper C. The impact of fragility fracture and approaches to osteoporosis risk assessment worldwide. Bone 2017; 104:29-38.
97. Bijelic R, Milicevic S, Balaban J. Risk Factors for Osteoporosis in Postmenopausal Women. Med Arch. 2017; 71(1):25-28.
98. Lane NE. Epidemiology, etiology, and diagnosis of osteoporosis. Am J Obstet Gynecol. 2006; 194(2 Suppl):S3-11.
99. Lupsa BC, Insogna K. Bone health and osteoporosis. Endocrinol Metab Clin North Am. 2015; 44(3):517-30.
100. Cech D. Prevention of osteoporosis: From infancy through older adulthood. Hong Kong Physiotherapy Journal 2012; 30:6-12.
101. Riggs BL. The mechanisms of estrogen regulation of bone resorption. J Clin Invest. 2000; 106(10):1203-4.
102. Riggs BL, Khosla S, Melton JL. Sex steroids and the construction and conservation of the adult skeleton. Endocr Rev. 2002; 23:279-302.
103. Malkin I, Karasik D, Livshits G, Kobyliansky E. Modelling of age-related bone loss using cross-sectional data. Annals of Human Biology 2002; 29(3):256-270.
104. Llavero M, Gargallo J, Botella S, de la Higuera M. Osteoporosis. Medicine. 2018; 12(69):4062-74.
105. Abuna RPF, Almeida LO, Souza ATP, Fernandes RR, Sverzut TFV, Scaf B, et al. Adipocytes and osteoporosis inhibit osteoblast differentiation by downregulating histone acetylation. Bone Reports 2020; 13:100429.
106. González-Macías J, Pino-Montes J, Olmos JM, Nogués X. Guías de práctica clínica en la osteoporosis posmenopáusica, glucocorticoidea y del varón. Sociedad Española de Investigación Ósea y del Metabolismo Mineral. Rev Clin Esp. 2015; 215(9):479-542.
107. Marques EA, Mota J, Carvalho J. Exercise effects on bone mineral density in older adults: a meta-analysis of randomized controlled trials. Age (Dordr). 2012; 34(6):1493-515.
108. Shahi P, Díaz Muñoz de la Espada V. Bifosfonatos en oncología. An Med Interna 2005; 22:544-7.
109. Merigo E, Manfredi M, Meleti M, Corradi D, Vescovi P. Jaw bone necrosis without previous dental extractions associated with the use of bisphosphonates (pamidronate and zoledronate): a four-case report. J Oral Pathol Med 2005; 34: 613-7.
110. Giner M, Gómez D, Vila A, Álvarez A, Montañés F. Bisphosphonates safety in osteoporosis treatment. Farmacéuticos de atención primaria 2012; 10(2):44-49.
111. Chavassieux P, Seeman E, Delmas PD. Insights into material and structural basis of bone fragility from diseases associated with fractures: how determinants of the biomechanical properties of bone are compromised by disease. Endocr Rev 2007; 28: 151-64.
112. Eastell R, O'Neill TW, Hofbauer LC, Langdahl B, Reid IR, Gold DT, et al. Postmenopausal osteoporosis. Nat Rev Dis Primers. 2016; 2:16069.

113. Khosla S, Bilezikian JP, Dempster DW, Lewiecki EM, Miller PD, Neer RM, et al. Benefits and risks of bisphosphonate therapy for osteoporosis. J Clin Endocrinol Metab. 2012;97:2272-82.
114. Shane E, Burr D, Abrahamsen B, Adler RA, Brown TD, Cheung AM, et al. Atypical subtrochanteric and diaphyseal femoral fractures: second report of a task force of the American Society for Bone and Mineral Research. J Bone Miner Res. 2014; 29(1):1-23.
115. Khan AA, Morrison A, Hanley DA, Felsenberg D, McCauley LK, O'Ryan F, et al. Diagnosis and management of osteo- necrosis of the jaw: a systematic review and international consensus. J Bone Miner Res. 2015; 30:3-23.
116. Cummings SR, San Martin J, McClung MR, Siris ES, Eastell R, Reid IR, et al. FREEDOM Trial. Denosumab for prevention of fractures in postmenopausal women with osteoporosis. N Engl J Med. 2009; 361(8):756-65.
117. Diker-Cohen T, Rosenberg D, Avni T, Shepshelovich D, Tsvetov G, Gafter-Gvili A. Risk for Infections During Treatment With Denosumab for Osteoporosis: A Systematic Review and Meta-analysis. J Clin Endocrinol Metab. 2020; 105(5):dgz322.
118. Cappuzzo KA, Delafuente JC. Teriparatide for severe osteoporosis. Ann Pharmacother. 2004; 38(2):294-302.
119. Reginster JY, Brandi ML, Cannata-Andía J, Cooper C, Cortet B, Feron JM, et al. The position of strontium ranelate in today's management of osteoporosis. Osteoporos. Int. 2015; 26 (6):1667-1671.
120. Tabatabaei-Malazy O, Salari P, Khashayar P, Larijani B. New horizons in treatment of osteoporosis. DARU J. Pharm. Sci. 2017; 25(1):2.
121. Middleton E, Kandaswami C, Theoharides T. The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer. Pharmacol Rev. 2000; 52(4):673-751.
122. Zand RSR, Jenkins DJ, Diamandis EP. Steroid hormone activity of flavonoids and related compounds. Breast Cancer Res Treat. 2000; 62(1):35-49.
123. Peterson JJ, Dwyer JT, Jacques PF, McCullough ML. Associations between flavonoids and cardiovascular disease incidence or mortality in European and US populations. Nutr Rev. 2012; 70(9):491-508.
124. Sarkar FH, Li Y. Soy isoflavones and cancer prevention. Cancer Invest. 2003; 21(5):744-757.
125. Setchell KD, Cassidy A. Dietary isoflavones: biological effects and relevance to human health. J Nutr. 1999; 129(3):758S-767S.
126. Cos P, De Bruyne T, Apers S, Berghe DV, Pieters L, Vlietinck AJ. Phytoestrogens: recent developments. Planta Med. 2003; 69(7): 589-599.
127. Yao J, Zhang J, Hou JF. Effects of ipriflavone on caged layer bone metabolism in vitro and in vivo. Poult Sci. 2007; 86(3):503-7.
128. Sharan K, Siddiqui JA, Swarnkar G, Maurya R, Chattopadhyay N. Role of phytochemicals in the prevention of menopausal bone loss: evidence from in vitro and in vivo, human interventional and pharma-cokinetic studies. Curr Med Chem. 2009; 16(9):1138-57.
129. Bonucci E, Ballanti P, Martelli A, Mereto E, Brambilla G, Bianco P, et al. Ipriflavone inhibits osteoclast differentiation in parathyroid transplanted parietal bone of rats. Calcif Tissue Int. 1992; 50(4):314-9.
130. Tsutsumi N, Kawashima K, Nagata H, Tsuyuki J, Itoh F, Arai N, et al. Effects of KCA-098 on bone metabolism: comparison with those of ipriflavone. Jpn J Pharmacol. 1994; 65(4):343-9.
131. Notoya K, Yoshida K, Shirakawa Y, Taketomi S, Tsuda M. Similarities and differences between the effects of ipriflavone and vitamin K on bone resorption and formation in vitro. Bone 1995; 16:S349-S353.
132. BGao AG, Zhou YC, Hu ZJ, Lu BB. Ipriflavone promotes osteogenesis of MSCs derived from osteoporotic rats. Eur Rev Med Pharmacol Sci. 2018; 22(14):4669-4676.
133. Han Y, Wang X, Ma D, Wu X, Yang P, Zhang J. Ipriflavone promotes proliferation and osteogenic differentiation of periodontal ligament cells by activating GPR30/PI3K/AKT signaling pathway. Drug Des Devel Ther. 2018; 12:137-148.
134. Benvenuti S, Tanini A, Frediani U, Bianchi S, Masi L, Casano R, et al. Effects of ipriflavone and its metabolites on a clonal osteoblastic cell line. J Bone Miner Res. 1991; 6(9):987-96.
135. Cheng SL, Zhang SF, Nelson TL, Warlow PM, Civitelli R. Stimulation of human osteoblast differentiation and function by ipriflavone and its metabolites. Calcif Tissue Int. 1994; 55(5):356-62.
136. Sortino MA, Aleppo G, Scapagnini U, Canonico PL. Ipriflavone inhibits phosphoinositide hydrolysis and Ca2+ uptake in the osteoblast-like UMR-106 cells. Eur J Pharmacol 1992; 226:273-277.
137. Bonucci E, Silvestrini G, Ballanti P, Masi L, Franchi A, Bufalino L, et al. Cytological and ultrastructural investigation on osteoblastic and preosteoclastic cells grown in vitro in the presence of ipriflavone: preliminary results. Bone Miner. 1992;19 Suppl 1:S15-25.
138. Kitatani K, Morii H. Ipriflavone. Nihon Rinsho. 1998; 56(6):1537-43.

139. Cecchini MG, Fleisch H, Muhlbauer RC. Ipriflavone inhibits bone resorption in intact and ovariectomized rats. Calcif Tissue Int 1997; 61:9-11.
140. Chen X, Qin B, Li X, Jin T, Zhu G, Zhou W, et al. Effects of fluoride and cadmium co-exposure on bone in male rats. Biol Trace Elem Res. 2013; 154(3):396-402.
141. Rezaee T, Bouxsein ML, Karim L. Increasing fluoride content deteriorates rat bone mechanical properties. Bone 2020; 136:115369.
142. Guo L, Wei X, Zhang Z, Wang X, Wang C, Li P, et al. Ipriflavone attenuates the degeneration of cartilage by blocking the Indian hedgehog pathway. Arthritis Res Ther. 2019; 21(1):109.
143. Gao AG, Zhou YC, Hu ZJ, Lu BB. Ipriflavone promotes osteogenesis of MSCs derived from osteoporotic rats. Eur Rev Med Pharmacol Sci. 2018; 22(14):4669-4676.
144. Jin XJ, Yu DY, Huang LQ. Effect of ipriflavone on egg laying performance and egg quality of Lohmann caged layers. Journal of Zhejiang Agricultural Sciences 2005; 4:325–327.
145. Ushiroyama T, Okamura S, Ikeda A, Ueki M. Efficacy of ipriflavone and 1α vitamin D therapy for the cessation of vertebral bone loss. International Journal of Gynecology & Obstetrics 1995; 48:283–288.
146. Hu Q, Long C, Wu D, You X, Ran L, Xu J, et al. The efficacy and safety of ipriflavone in postmenopausal women with osteopenia or osteoporosis: A systematic review and meta-analysis. Pharmacol Res. 2020; 159:104860.
147. Shadjou N, Hasanzadeh M. Silica-based mesoporous nanobiomaterials as promoter of bone regeneration process. J Biomed Mater Res A. 2015; 103(11):3703-16.
148. Mora-Raimundo P, Lozano D, Benito M, Mulero F, Manzano M, Vallet-Regí M. Osteoporosis Remission and New Bone Formation with Mesoporous Silica Nanoparticles. Adv Sci (Weinh). 2021; 8(16):e2101107.
149. Wu JA, Chen YC, Tu LH. Dopamine-Conjugated Carbon Dots Inhibit Human Calcitonin Fibrillation. Nanomaterials (Basel). 2021; 11(9):2242.
150. Barry M, Pearce H, Cross L, Tatullo M, Gaharwar AK. Advances in Nanotechnology for the Treatment of Osteoporosis. Curr Osteoporos Rep. 2016; 14(3):87-94.
151. Wei D, Jung J, Yang H, Stout DA, Yang L. Nanotechnology Treatment Options for Osteoporosis and Its Corresponding Consequences. Curr Osteoporos Rep. 2016; 14(5):239-47.
152. Zeng Y, Hoque J, Varghese S. Biomaterial-assisted local and systemic delivery of bioactive agents for bone repair. Acta Biomater. 2019; 93:152-168.
153. Amini AR, Laurencin CT, Nukavarapu SP. Bone tissue engineering: recent advances and challenges. Crit Rev Biomed Eng. 2012; 40(5):363-408.
154. Dimitriou R, Jones E, McGonagle D, Giannoudis PV. Bone regeneration: current concepts and future directions, BMC Med. 2011; 9:66.
155. Vaikkath D, Nair PD. Advances in tissue regeneration through nanomaterials, Chapter 7. In: Drug Delivery Nanosystems for Biomedical Applications. Micro and Nano-technologies 2018; 153-162.
156. Giannoudis PV, Chris Arts JJ, Schmidmaier G, Larsson S. What should be the characteristics of the ideal bone graft substitute? Injury. 2011; 42 Suppl 2:S1-2.
157. Steffi C, Wang W. Bioactive glasses and their application in Bone Tissue Engineering. Chapter 2. In: Bioactive Glasses: Properties, Composition and Recent Applications. Nova 2020.
158. Badhe RV, Akinfosile O, Bijukumar D, Barba M, Mathew MT. Systemic toxicity eliciting metal ion levels from metallic implants and orthopedic devices. A mini review. Toxicol Lett. 2021; 350:213-224.
159. Jones JR. Review of bioactive glass: from Hench to hybrids. Acta Biomater. 2013; 9(1):4457-86.
160. Brånemark PI. Vital microscopy of bone marrow in rabbit. Scand J Clin Lab Invest 1959; 11(Suppl 38):1–82.
161. Rigo ECS, Boschi AO, Yoshimoto M, Allegrini SJ, Konig BJ, Carbonari MJ. Evaluation in vi- tro and in vivo of biomimetic hydroxyapatite coated on titanium dental implants. Mater Sci Eng C 2004; 24:647–51.
162. Junker R, Dimakis A, Thoneick M, Jansen JA. Effects of implant surface coatings and composition on bone integration: a systematic review. Clin Oral Implants Res 2009; 20(Suppl 4):185–206.
163. Dohan DM, Coelho PG, Kang B-S, Sul Y-T, Albrektsson T. Classification of osseointegrated implant surfaces: materials, chemistry and topography. Trends Biotechnol 2010; 28(4):198–206.
164. Coelho PG, Jimbo R, Tovar N, Bonfante EA. Osseointegration: hierarchical designing encompassing the macrometer, micrometer, and nanometer length scales. Dent Mater 2015; 31(1): 37–52.
165. Mendonça G, Mendonça DBS, Aragão FJL, Cooper LF. Advancing dental implant surface technology - from micron- to nanotopography. Biomaterials 2008; 29(28):3822–35.
166. Moore WR, Graves SE, Bain GI. Synthetic bone graft substitutes. ANZ J Surg. 2001; 71(6):354-61.
167. Giannoudis PV, Dinopoulos H, Tsiridis E. Bone substitutes: an update. Injury. 2005; 36 (3):S20-7.

168. Love RJ, Jones KS. Adaptive inmune responses to biomateriales. Comprehensive Biomaterials II, Volume 4, Elsevier, Oxford, 2011, pp. 37–47.
169. Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. Cellular and Molecular Immunology. Elsevier, 2012.
170. Karki R, Kanneganti TD. The 'cytokine storm': molecular mechanisms and therapeutic prospects. Trends in immunology 2021; 42(8):681-705.
171. Yang XF, Yin Y, Wang H. Vascular inflammation and atherogenesis are activated via receptors for PAMPs and suppressed by regulatory T cells. Drug Discovery Today: Therapeutic Strategies 2008: 5(2):125-142.
172. Liu W, Liu J, Ning Y, Ding B, Wang X, Wang Z, et al. Recent Progress in Understanding PAMP- and Effector-Triggered Immunity against the Rice Blast Fungus Magnaporthe oryzae. Molecular Plant 2013; 6(3):605-620.
173. Araujo-Gomes N, Romero-Gavilán F, Zhang Y, Martinez-Ramos C, Elortza F, Azkargota M, et al. Complement proteins regulating macrophage polarisation on biomaterials. Colloids and surfaces B: Biointerfaces 2019; 181:125-133.
174. Nakkala JR, Li Z, Ahmad W, Wang K, Gao C. Immunomodulatory biomaterials and their application in therapies for chronic inflammation-related diseases. Acta Biomaterialia 2021; 123:1-30.
175. Chen L, Liu J, Zhang Y, Zhang G, Kang Y, Chen A, et al. The toxicity of silica nanoparticles to the immune system. Nanomedicine 2018; 13(15):1939-1962.
176. Yunna C, Mengru H, Lei W, Weidong C. Macrophage M1/M2 polarization. European Journal of Pharmacology Volume 2020; 877:173090.
177. Abdelaziz MH, Abdelwahab SF, Wan J, Cai W, Huixuan W, Jianjun C, et al. Alternatively activated macrophages; a double-edged sword in allergic asthma. J. Transl. Med. 2020; 18:58.
178. Lynch RI, Lavelle Ed C. Immuno-modulatory biomaterials as antiinflammatory therapeutics. Biochemical Pharmacology 2022; 197:114890.
179. Ping J, Zhou C, Dong Y, Wu X, Huang X, Sun B, et al. Modulating immune microenvironment during bone repair using biomaterials: Focusing on the role of macrophages. Mol Immunol. 2021; 138:110-120.
180. Oishi Y, Manabe I. Macrophages in inflammation, repair and regeneration. Int Immunol. 2018; 30(11):511-528.
181. Kim SY, Nair MG. Macrophages in wound healing: activation and plasticity. Immunol Cell Biol. 2019; 97(3):258-267.
182. Sadtler K, Singh A, Wolf MT, Wang XK, Pardoll DM, Elisseeff JH. Design, clinical translation and immunological response of biomaterials in regenerative medicine. Nat. Rev. Mater. 2016; 1:16040.
183. Mariani E, Lisignoli G, Borzì RM, Pulsatelli L. Biomaterials: Foreign Bodies or Tuners for the Immune Response?. Int J Mol Sci. 2019; 20(3):636.
184. Julier Z, Park AJ, Briquez PS, Martino MM. Promoting tissue regeneration by modulating the immune system. Acta Biomater. 2017; 53:13-28.
185. Anderson JM, McNally AK. Biocompatibility of implants: lymphocyte/macrophage interactions. Semin Immunopathol. 2011; 33(3):221-33.
186. Moreno AN, Jamur MC, Oliver C, Roque-Barreira MC. Mast cell degranulation induced by lectins: effect on neutrophil recruitment. Int Arch Allergy Immunol. 2003; 132(3):221-30.
187. De Filippo K, Dudeck A, Hasenberg M, Nye E, van Rooijen N, Hartmann K, et al. Mast cell and macrophage chemokines CXCL1/CXCL2 control the early stage of neutrophil recruitment during tissue inflammation. Blood. 2013; 121(24):4930-7.
188. Monaco C, Andreakos E, Kiriakidis S, Feldmann M, Paleolog E. T-cell-mediated signaling in immune, inflammatory and angiogenic processes: the cascade of events leading to inflam- matory diseases. Curr Drug Targets Inflamm Allergy 2004; 3:35–42.
189. Burger D, Dayer JM. Cytokines, acute-phase proteins, and hormones: IL-1 and TNF-alpha production in contact-mediated activation of monocytes by T lymphocytes. Ann NY Acad Sci 2002; 966:464–473.
190. Beech JT, Andreakos E, Ciesielski CJ, Green P, Foxwell BM, Brennan FM. T-cell contact-dependent regulation of CC and CXC chemokine production in monocytes through differen- tial involvement of NFkappaB: implications for rheumatoid arthritis. Arthritis Res Ther 2006; 8:R168.
191. Calvi LM, Adams GB, Weibrecht KW, Weber JM, Olson DP, Knight MC, Martin RP, Schipani E, Divieti P, Bringhurst FR, Milner LA, Kronenberg HM, Scadden DT. Osteoblastic cells regulate the haematopoietic stem cell niche. Nature. 2003 Oct 23;425(6960):841-6.
192. Monroe DG, McGee-Lawrence M, Oursler MJ, Westendorf JJ. Update on Wnt signaling in bone cell biology and bone disease. Gene 2012; 492:1-18.

193. Yoneda T, Ishimaru N, Arakaki R, Kobayashi M, Izawa T, Moriyama K, et al. Estrogen deficiency accelerates murine autoimmune arthritis associated with receptor activator of nuclear factor kappa B ligand-mediated osteoclastogenesis. Endocrinology 2004; 145:2384-2391.
194. Anderson JM, Rodriguez A, Chang DT. Foreign body reaction to biomaterials. Semin Immunol. 2008; 20(2):86-100.
195. Vishwakarma NS, Bhise MB, Evangelista J, Rouwkema J, Dokmeci MR, Ghaemmaghami AM, et al. Trends Biotechnol. 2016; 34:470–482.
196. Rahmati M, Mozafari M. Selective Contribution of Bioactive Glasses to Molecular and Cellular Pathways. ACS Biomater Sci Eng. 2020; 6(1):4-20.
197. Franz S, Rammelt S, Scharnweber D, Simon JC. Immune Responses to Implants – A Review of the Implications for the Design of Immunomodulatory Biomaterials. Biomaterials 2011; 32:6692–6709.
198. Chatterjee M, Ehrenberg A, Toska LM, Metz LM, Klier M, Krueger I, et al. Molecular Drivers of Platelet Activation: Unraveling Novel Targets for Anti-Thrombotic and Anti-Thrombo-Inflammatory Therapy. Int J Mol Sci. 2020; 21(21):7906.
199. de Leval X, Hanson J, David JL, Masereel B, Pirotte B, Dogné JM. New developments on thromboxane and prostacyclin modulators part II: prostacyclin modulators. Curr Med Chem. 2004; 11(10):1243-52.
200. Ebeigbe AB, Talabi OO. Vascular Effects of Histamine. Niger J Physiol Sci. 2014; 29(1):7-10.
201. Lee J, Byun H, Madhurakkat Perikamana SK, Lee S, Shin H. Current Advances in Immunomodulatory Biomaterials for Bone Regeneration. Adv Healthc Mater. 2019; 8(4):e1801106.
202. Rahmati M, Silva EA, Reseland JE, Heyward AC, Haugen HJ. Biological responses to physicochemical properties of biomaterial surface. Chem Soc Rev. 2020; 49(15):5178-5224.
203. Abaricia JO, Farzad N, Heath TJ, Simmons J, Morandini L, Olivares-Navarrete R. Control of innate immune response by biomaterial surface topography, energy, and stiffness. Acta Biomater. 2021; 133:58-73.
204. Kou PM, Babensee JE. Macrophage and dendritic cell phenotypic diversity in the context of biomaterials. J Biomed Mater Res A. 2011; 96(1):239-60.
205. Sheikh Z, Brooks PJ, Barzilay O, Fine N, Glogauer M. Macrophages, Foreign Body Giant Cells and Their Response to Implantable Biomaterials. Materials (Basel). 2015; 8(9):5671-5701.
206. Wei Q, Becherer T, Angioletti-Uberti S, Dzubiella J, Wischke C, Neffe AT, et al. Protein interactions with polymer coatings and biomaterials. Angew Chem Int Ed Engl. 2014;53(31):8004-31.
207. Kim J. Systematic approach to characterize the dynamics of protein adsorption on the surface of biomaterials using proteomics. Colloids Surf B Biointerfaces. 2020; 188:110756.
208. Diegelmann RF, Evans MC. Wound healing: an overview of acute, fibrotic and delayed healing. Front Biosci. 2004; 9:283-9.
209. Mosesson MW. Fibrinogen and fibrin structure and functions. J Thromb Haemost. 2005; 3(8):1894-904.
210. Boni OO, Lamboni L, Souho T, Gauthier M, Yang G. Immunomodulation and cellular response to biomaterials: the overriding role of neutrophils in healing. Mater. Horiz. 2019; 6:1122–1137.
211. Karin M, Clevers H. Reparative inflammation takes charge of tissue regeneration. Nature. 2016; 529(7586):307-15.
212. Esche C, Stellato C, Beck LA. Chemokines: key players in innate and adaptive immunity. J Invest Dermatol. 2005; 125(4):615-28.
213. Vishwakarma A, Bhise NS, Evangelista MB, Rouwkema J, Dokmeci MR, Ghaemmaghami AM, Vrana NE, Khademhosseini A. Engineering immunomodulatory biomaterials to tune the inflammatory response. Trends Biotechnol. 2016; 34(6):470-482.
214. Chen GY, Nuñez G. Sterile inflammation: sensing and reacting to damage. Nat Rev Immunol. 2010; 10(12):826-37.
215. Zdolsek J, Eaton JW, Tang L. Histamine release and fibrinogen adsorption mediate acute inflammatory responses to biomaterial implants in humans. J. Transl. Med. 2007; 5:31.
216. Rodriguez A, Meyerson H, Anderson JM. Quantitative In Vivo Cytokine Analysis at Synthetic Biomaterial Implant Sites. J. Biomed. Mater. Res. A 2009; 89:152–159.
217. Wynn TA, Vannella KM. Macrophages in tissue repair, regeneration, and fibrosis. Immunity. 2016 Mar 15;44(3):450-462.
218. Eming SA, Wynn TA, Martin P. Inflammation and metabolism in tissue repair and regeneration. Science. 2017; 356(6342):1026-1030.
219. Mack M. Inflammation and fibrosis. Matrix Biol. 2018; 68-69:106-121.
220. Xu P, Sefton MV. Expression of matrix metalloproteinase-2 and -9 in exudates associated with polydimethyl siloxane and gelatin tubes implanted in mice. J. Biomed. Mater. Res. A 2004; 71: 226–232.

221. Raphael I, Nalawade S, Eagar TN, Forsthuber TG. T cell subsets and their signature cytokines in autoimmune and inflammatory diseases. Cytokine. 2015; 74(1):5-17.
222. Chang DT, Jones JA, Meyerson H, Colton E, Kwon IK, Matsuda T, Anderson JM. Lymphocyte/macrophage interactions: biomaterial surface-dependent cytokine, chemokine, and matrix protein production. J Biomed Mater Res A. 2008; 87(3):676-87.
223. Cosmi L, Maggi L, Santarlasci V, Liotta F, Annunziato F. T helper cells plasticity in inflammation. Cytometry A. 2014; 85(1):36-42.
224. Wang N, Liang H, Zen K. Molecular mechanisms that influence the macrophage m1-m2 polarization balance. Front Immunol. 2014; 5:614.
225. Shapouri-Moghaddam A, Mohammadian S, Vazini H, Taghadosi M, Esmaeili SA, Mardani F, et al. Macrophage plasticity, polarization, and function in health and disease. J Cell Physiol. 2018; 233(9):6425-6440.
226. Miossec P, Kolls JK. Targeting IL-17 and TH17 cells in chronic inflammation. Nat Rev Drug Discov. 2012; 11(10):763-76.
227. De Simone V, Franzè E, Ronchetti G, Colantoni A, Fantini MC, Di Fusco D, et al. Th17-type cytokines, IL-6 and TNF-α synergistically activate STAT3 and NF-κB to promote colorectal cancer cell growth. Oncogene. 2015; 34(27):3493-503.
228. Liu M, Li S, Li MO. TGF-β control of adaptive immune tolerance: a break from treg cells. Bioessays. 2018; 40(11):e1800063.
229. Lin TY, Gerber T, Taniguchi-Sugiura Y, Murawala P, Hermann S, Grosser L, et al. Fibroblast dedifferentiation as a determinant of successful regeneration. Dev Cell. 2021; 56(10):1541-1551.e6.
230. Park C, Lee SW, Kim J, Song EH, Jung HD, Park JU, et al. Reduced fibrous capsule formation at nano-engineered silicone surfaces via tantalum ion implantation. Biomater Sci. 2019; 7(7):2907-2919.
231. Anderson JM. Multinucleated giant cells. Curr Opin Hematol. 2000; 7(1):40-7.
232. Anderson JM. Inflammation, wound healing, and the foreign body response. Chapter 4.2. In: Ratner BD, Hoffman AS, Schoen FJ, Lemons JE (eds) Biomaterials science: an introduction to materials in medicine. Elsevier, New York, 2004; 296–304.
233. Tang L, Eaton JW. Inflammatory responses to biomaterials. Am J Clin Pathol. 1995; 103(4):466-71.
234. Anderson JM, Schoen FJ, Brown SA, Merritt K. Implant retrieval and evaluation. Chapter 9.5. In: Ratner BD, As Hoffman, Schoen FJ, Lemons JE (eds) Biomaterials science: an introduction to materials in medicine. Elsevier, New York, 2004; 771–782.
235. Anderson JM, Defife K, Mcnally A, Collier T, Jenney C. Monocyte, macrophage and foreign body giant cell interactions with molecularly engineered surfaces. J. Mater. Sci. Mater. Med. 1999; 10:579–588.
236. Li WA, Lu BY, Gu L, Choi Y, Kim J, Mooney DJ. The effect of surface modification of mesoporous silica microrod scaffold on immune cell activation and infiltration. Biomaterials. 2016; 83:249-56.
237. Lin Z, Shen D, Zhou W, Zheng Y, Kong T, Liu X, et al. Regulation of extracellular bioactive cations in bone tissue microenvironment induces favorable osteoimmune conditions to accelerate in situ bone regeneration. Bioact. Mater. 2021; 6:2315-2330.
238. Izquierdo-Barba I, Santos-Ruiz L, Becerra J, Feito MJ, Fernández-Villa D, Serrano MC, et al. Synergistic effect of Si-hydroxyapatite coating and VEGF adsorption on Ti6Al4V-ELI scaffolds for bone regeneration in an osteoporotic bone environment. Acta Biomater. 2019; 83:456-466.
239. Chellat F, Merhi Y, Moreau A, Yahia L. Therapeutic potential of nanoparticulate systems for macrophage targeting. Biomaterials 2005; 26:7260-7275.
240. Niikura K, Matsunaga T, Suzuki T, Kobayashi S, Yamaguchi H, Orba Y, et al. Gold nanoparticles as a vaccine platform: influence of size and shape on immunological responses in vitro and in vivo. ACS Nano 2013; 7:3926-3938.
241. Sussman EM, Halpin MC, Muster J, Moon RT, Ratner BD. Porous implants modulate healing and induce shifts in local macrophage polarization in the foreign body reaction. Ann. Biomed. Eng., 2014; 42:1508-1516.
242. Blakney AK, Swartzlander MD, Bryant SJ. The effects of substrate stiffness on the in vitro activation of macrophages and in vivo host response to poly(ethylene glycol)-based hydrogels. J. Biomed. Mater. Res. 2012; 100:1375-1386.
243. Lee S, Choi J, Shin S, Im YM, Song J, Kang SS, et al. Analysis on migration and activation of live macrophages on transparent flat and nanostructured titanium. Acta Biomater. 2011; 7:2337-2344.
244. Tepper OM, Capla JM, Galiano RD, Ceradini DJ, Callaghan MJ, Kleinman ME, et al. Adult vasculogenesis occurs through in situ recruitment, proliferation, and tubulization of circulating bone marrow–derived cells. Blood 2005; 105 (3):1068–1077.

245. Potente M, Gerhardt H, Carmeliet P. Basic and therapeutic aspects of angiogenesis. Cell. 2011; 146(6):873-87.
246. Hellström M, Gerhardt H, Kalén M, Li X, Eriksson U, Wolburg H, et al. Lack of pericytes leads to endothelial hyperplasia and abnormal vascular morphogenesis. J Cell Biol 2001; 153:543-553.
247. Gaengel K, Genové G, Armulik A, Betsholtz C. Endothelial-mural cell signaling in vascular development and angiogenesis. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2009; 29(5):630-8.
248. Gridley T. Notch signaling in the vasculature. Curr. Top. Dev. Biol. 2010; 92:277-309.
249. Swift MR, Weinstein BM. Arterial-venous specification during development. Circ. Res. 2009; 104:576-588.
250. Eilken HM, Adams RH. Dynamics of endothelial cell behavior in sprouting angiogenesis. Curr. Opin. Cell Biol. 2010; 22:617-625.
251. Phng LK, Gerhardt H. Angiogenesis: a team effort coordinated by notch. Dev. Cell 2009; 16:196-208.
252. Nyberg P, Xie L, Kalluri R. Endogenous inhibitors of angiogenesis. Cancer Res. 2005; 65(10):3967-79.
253. Augustin HG, Koh GY, Thurston G, Alitalo K. Control of vascular morphogenesis and homeostasis through the angiopoietin-Tie system. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 2009; 10:165-177.
254. Ferrara N. VEGF: an update on biological and therapeutic aspects. Curr Opin Biotechnol. 2000; 11(6):617-24.
255. Ferrara N, Davis-Smyth T. The biology of vascular endothelial growth factor. Endocr Rev 1997; 18:4-25.
256. Alon T, Hemo I, Itin A, Pe'er J, Stone J, Keshet E. Vascular endothelial growth factor acts as a survival factor for newly formed retinal vessels and has implications for retinopathy of prematurity. Nat Med 1995; 1:1024-1028.
257. Ashina K, Tsubosaka Y, Kobayashi K, Omori K, Murata T. VEGF-induced blood flow increase causes vascular hyper-permeability in vivo. Biochem Biophys Res Commun. 2015; 464(2):590-5.
258. Ferrara N, Gerber HP, LeCouter J: The biology of VEGF and its receptors. Nat Med 2003; 9(6): 669-676.
259. Veikkola T, Karkkainen M, Cleasson-Welsh L, Alitalo K: Regulation of angiogenesis via vascular endothelial growth factor receptors. Cancer Res 2000, 60: 203-212.
260. Partanen TA, Paavonen K: Lymphatic versus blood vascular endothelial growth factors and receptors in humans. Microsc Res Tech 2001, 55: 108-121.
261. Jakobsson L, Franco CA, Bentley K, Collins RT, Ponsioen B, Aspalter IM, et al. Endothelial cells dynamically compete for the tip cell position during angiogenic sprouting. Nat. Cell Biol. 2010; 12:943-953.
262. Shibuya M. Structure and function of VEGF/VEGF-receptor system involved in angiogenesis. Cell Struct Funct 2001; 26:25-35.
263. Dvorak HF. Angiogenesis: update 2005. J Thromb Haemost 2005; 3:1835-1842.
264. Conway EM, Collen D, Carmeliet P. Molecular mechanisms of blood vessel growth. Cardiovasc Res. 2001; 49: 507-521.
265. D'Arcangelo D, Facchiano F, Barlucchi LM, Melillo G, Illi B, Testolin L, et al. Acidosis inhibits endothelial cell apoptosis and function and induces basic fibroblast growth factor and vascular endothelial growth factor expression. Circ Res 2000; 86:312-318.
266. Ausprunk DH, Folkman J. Migration and proliferation of endothelial cells in preformed and newly formed blood vessels during tumor angiogenesis. Microvasc Res. 1977; 14: 53-65.
267. Bartoszewski R, Moszyńska A, Serocki M, Cabaj A, Polten A, Ochocka R, et al. Primary endothelial cell-specific regulation of hypoxia-inducible factor (HIF)-1 and HIF-2 and their target gene expression profiles during hypoxia. FASEB J. 2019; 33(7):7929-7941.
268. Watts ER, Walmsley SR. Inflammation and Hypoxia: HIF and PHD Isoform Selectivity. Trends Mol Med. 2019; 25(1):33-46.
269. Isner JM. Tissue responses to ischemia: local and remote responses for preserving perfusion of ischemic muscle. J Clin Invest. 2000; 106:615-619.
270. Qin SL, Li TS, Kubo M, Ohshima M, Furutani A, Hamano K. Transient increase of cytokines in the acute ischemic tissue is beneficial to cell-based therapeutic angiogenesis. Circ J. 2008; 72(12):2075-80.
271. Brogi E, Schatteman G, Wu T, Kim EA, Varticovski L, Keyt B, et al. Hypoxia-induced paracrine regulation of vascular endothelial growth factor receptor expression. J Clin Invest. 1996; 97(2):469-76.
272. Wong BW, Marsch E, Treps L, Baes M, Carmeliet P. Endothelial cell metabolism in health and disease: impact of hypoxia. EMBO J. 2017; 36(15):2187-2203.
273. Michiels C. Endothelial cell functions. Journal of Cellular Physiology 2003; 196(3):430–443.
274. Sumpio BE, Riley RJ, Dardik A. Cells in focus: endothelial cell. The International Journal of Biochemistry & Cell Biology 2002; 34(12):1508–1512.

275. Grote K, Salguero G, Ballmaier M, Dangers M, Drexler H, Schieffer B. The angiogenic factor CCN1 promotes adhesion and migration of circulating CD34+ progenitor cells: potential role in angiogenesis and endothelial regeneration. Blood 2007; 3(110):877-885.
276. Masuda S, Matsuura K, Shimizu T. Preparation of iPS cell-derived CD31+ endothelial cells using three-dimensional suspension culture. Regenerative Therapy 2018; 9:1-9.
277. El-Mansi S, Nightingale TD. Emerging mechanisms to modulate VWF release from endothelial cells. The International Journal of Biochemistry & Cell Biology 2020; 7(131).
278. Edelberg JM, Tang L, Hattori K, Lyden D, Rafii S. Young adult bone marrow-derived endothelial precursor cells restore aging-impaired cardiac angiogenic function. Circ Res. 2002; 90:E89-E93.
279. Zhang ZG, Zhang L, Jiang Q, Chopp M. Bone marrow-derived endothelial progenitor cells participate in cerebral neovascularization after focal cerebral ishcemia in the adult mouse. Circ Res. 2002; 90:284-288.
280. Grant MB, May WS, Caballero S, et al. Adult hematopoietic stem cells provide functional hemangioblast activity during retinal neovascularization. Nat Med. 2002; 8:607-612.
281. Lyden D, Hattori K, Dias S, et al. Impaired recruitment of bone-marrow-derived endothelial and hematopoietic precursor cells blocks tumor angiogenesis and growth. Nat Med. 2001; 7:1194-1201.
282. Kalka C, Masuda H, Takahashi T, Kalka-Moll WM, Silver M, Kearney M, et al. Transplantation of ex vivo expanded endothelial progenitor cells for therapeutic neovascularization. Proc Natl Acad Sci U S A. 2000; 97(7):3422-7.
283. Akita T, Murohara T, Ikeda H, Sasaki K, Shimada T, Egami K, et al. Hypoxic preconditioning augments efficacy of human endothelial progenitor cells for therapeutic neovascularization. Lab Invest. 2003; 83(1):65-73.
284. Tepper OM, Galiano RD, Capla JM, Kalka C, Gagne PJ, Jacobowitz GR, et al. Human endothelial progenitor cells from type II diabetics exhibit impaired proliferation, adhesion, and incorporation into vascular structures. Circulation. 2002; 106(22):2781-6.
285. Hill JM, Zalos G, Halcox JP, Schenke WH, Waclawiw MA, Quyyumi AA, et al. Circulating endothelial progenitor cells, vascular function, and cardiovascular risk. N Engl J Med. 2003; 348(7):593-600.
286. Rouwkema J, Khademhosseini A. Vascularization and angiogenesis in tissue engineering: beyond creating static networks. Trends Biotechnol. 2016; 34:733–745.
287. Hung HS, Chen HC, Tsai CH, Lin SZ. Novel approach by nanobiomaterials in vascular tissue engineering, Cell Transplant. 2011; 20:63–70.
288. Joner M, Finn AV, Farb A, Mont EK, Kolodgie FD, Ladich E, et al. Pathology of drug-eluting stents in humans: delayed healing and late thrombotic risk. J Am Coll Cardiol 2006; 48:203–205.
289. Street J, Bao M, deGuzman L, Bunting S, Peale FV Jr, Ferrara N, et al. Vascular endothelial growth factor stimulates bone repair by promoting angiogenesis and bone turnover. Proc Natl Acad Sci U S A. 2002; 99(15):9656-61.
290. Wernike MO, Montjovent Y, Liu D, Wismeijer EB, Hunziker KA, Siebenrock W, et al. VEGF incorporated into calcium phosphate ceramics promotes vascularisation and bone formation in vivo. European Cells & Materials 2010; 19(3).
291. Bolander ME. Regulation of fracture repair by growth factors. Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine 1992; 200:165.
292. Kargozar S, Baino F, Hamzehlou S, Hill RG, Mozafari M. Bioactive glasses: sprouting angiogenesis in tissue engineering. Trends Biotechnol 2018; 36:430–44.
293. Patel ZS, Young S, Tabata Y, Jansen JA, Wong MEK, Mikos AG. Dual delivery of an angiogenic and an osteogenic 650 growth factor for bone regeneration in a critical size defect model. Bone 2008; 43:931–940.
294. Li H, Xue K, Kong N, Liu K, Chang J. Silicate bioceramics enhanced vascularization and osteogenesis through stimulating interactions between endothelia cells and bone marrow stromal cells. Biomaterials. 2014; 35(12):3803-18.
295. Mao C, Chen X, Miao G, Lin C. Angiogenesis stimulated by novel nanoscale bioactive glasses. Biomed Mater. 2015; 10(2):025005.
296. Bi L, Rahaman MN, Day DE, Brown Z, Samujh C, Liu X, et al. Effect of bioactive borate glass microstructure on bone regeneration, angiogenesis, and hydroxyapatite conversion in a rat calvarial defect model. Acta Biomater. 2013; 9(8):8015-26.
297. Zhao S, Li L, Wang H, Zhang Y, Cheng X, Zhou N, et al. Wound dressings composed of copper-doped borate bioactive glass microfibers stimulate angiogenesis and heal full-thickness skin defects in a rodent model. Biomaterials 2015; 53:379-91.

298. Thian ES, Huang J, Best SM, Barber ZH, Brooks RA, Rushton N, et al. The response of osteoblasts to nanocrystalline silicon-substituted hydroxyapatite thin films. Biomaterials 2006; 27:2692-2698.
299. Lew KS, Othman R, Ishikawa K, Yeoh FY. Macroporous bioceramics: a remarkable material for bone regeneration. J Biomater Appl 2012; 27:345–58.
300. Mastrogiacomo M, Muraglia A, Komlev V, Peryin F, Rustichelli F, Crovace A, et al. Tissue engineering of bone: search for a better scaffold. Orthodontics and Craniofacial Research 2005; 8:277- 284.
301. Pietak AM, Reid JW, Stott MJ, Sayer M. Silicon substitution in the calcium phosphate bioceramics. Biomaterials 2007; 28:4023-4032.
302. Tanizawa Y, Suzuki T. Effects of silicate ions on the formation and transformation of calcium phosphates in neutral aqueous solutions. Journal of the Chemical Society, Faraday Transactions 1995; 91.
303. Rondanelli M, Faliva MA, Peroni G, Gasparri C, Perna S, Riva A, et al. Silicon: A neglected micronutrient essential for bone health. Exp Biol Med 2021; 246(13):1500-1511.
304. Götz W, Tobiasch E, Witzleben S, Schulze M. Effects of Silicon Compounds on Biomineralization, Osteogenesis, and Hard Tissue Formation. Pharmaceutics 2019; 11(3):117.
305. Jugdaohsingh R, Anderson SH, Lakasing L, Sripanyakorn S, Ratcliffe S, Powell JJ. Serum silicon concentrations in pregnant women and newborn babies. Br J Nutr. 2013; 110(11):2004-10.
306. Porter AE, Patel N, Skepper JN, Best SM, Bonfield W. Comparison of in vivo dissolution processes in hydroxyapatite and silicon-substituted hydroxyapatite bioceramics. Biomaterials 2003; 24:4609-4620.
307. Vallet-Regí M, Arcos D. Silicon substituted hydroxyapatites. A method to upgrade calcium phosphate based implants. Journal of Materials Chemistry 2005; 15:1509-1516.
308. Thian ES, Ahmad Z, Huang J, Edirisinghe MJ, Jayasinghe SN, Ireland DC, et al. The role of surface wettability and surface charge of electrosprayed nanoapatites on the behaviour of osteoblasts. Acta Biomaterialia 2010; 6:750–755.
309. Carlisle E. Si: an essential element for the chick. Science 1972; 178:619-621.
310. Botelho CM, Brooks RA, Spence G, McFarlane I, Lopes MA, Best SM, et al. J. Biomed. Mater. Res., Part A 2006; 78:709–720.
311. Matesanz MC, Linares J, Lilue I, Sánchez-Salcedo S, Feito MJ, Arcos S, et al. Nanocrystalline silicon substituted hydroxyapatite effects on osteoclast differentiation and resorptive activity. J. Mater. Chem. B. 2014; 2:2910.
312. Li H, Chang J. Bioactive silicate materials stimulate angiogenesis in fibroblast and endothelial cell co-culture system through paracrine effect. Acta Biomater. 2013; 9:6981–6991.
313. Wang J, Shaw LL. Nanocrystalline hydroxyapatite with simultaneous enhancements in hardness and toughness. Biomaterials 2009; 30(34):6565-6572.
314. Sato M, Webster TJ. Nanobiotechnology: implications for the future of nanotechnology in orthopedic applications. Expert Review of Medical Devices 2004; 1(1):105-14.
315. Chan CK, Kumar TS, Liao S, Murugan R, Ngiam M, Ramakrishnan S. Biomimetic nanocomposites for bone graft applications. Nanomedicine 2006; 1(2):177-88.
316. Du M, Chen J, Liu K, Xing H, Song C. Recent advances in biomedical engineering of nano-hydroxyapatite including dentistry, cancer treatment and bone repair. Composites Part B: Engineering 2021; 215:108790.
317. Wu Y, Li Q, Xu B, Fu H, Li Y. Nano-hydroxyapatite coated TiO2 nanotubes on Ti-19Zr-10Nb-1Fe alloy promotes osteogenesis *in vitro*. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces 2021; 112019.
318. Sharon JL, Puleo DA. Immobilization of glycoproteins such as VEGF, on biodegradable substrates. Acta Biomaterialia 2008; 4:1016-1023.
319. Feito MJ, Lozano RM, Alcaide M, Ramírez-Santillán C, Arcos D, Vallet-Regí M, et al. Immobilization and bioactivity evaluation of FGF-1 and FGF-2 on powdered silicon-doped hydroxyapatite and their scaffolds for bone tissue engineering. Journal of Materials Science: Materials in Medicine 2011; (2):405-416.
320. Kottakis F, Polytarchou C, Foltopoulou P, Sanidas I, Kampranis SC, Tsichlis PN. FGF-2 regulates cell proliferation, migration and angiogénesis through an NDY1/KDM2B-miR-101-EZH2 pathway. Molecular Cell 2011; 43:285-298.
321. Hossain M, Irwin R, Baumann MJ, McCabe LR. Hepatocyte growth factor (HGF) adsorption kinectics and enhancement of osteoblast differentiation on hydroxyapatite surfaces. Biomaterials 2005; 26:2595-2602.
322. Ho QT, Kuo CJ. Vascular endothelial growth factor: biology and therapeutic applications. Int J Biochem Cell Biol 2007; 39:1349-1357.
323. Smith RJ, Koobatian MT, Shahini A, Swartz DD, Andreadis ST. Capture of endotelial cells under flow using immobilized vascular endotelial growth factor. Biomaterials 2015; 51:303-312.

324. Li J, Cao F, Wu B, Yang J, Xu W, Wang W, et al. Immobilization of bioactive vascular endothelial growth factor onto Ca-deficient hydroxyapatite-coated Mg by covalent bonding using polydopamine. J Orthop Translat. 2021; 30:82-92.
325. Brey EM, Uriel S, Greisler HP, McIntire LV. Therapeutic neovascularization: contributions from bioengineering. Tissue Engineering 2005; 11(3-4):567-584.
326. Hench LL. The story of Bioglass. J Mater Sci Mater Med. 2006; 17(11):967-78.
327. Hench LL. Biomaterials: A forecast for the future. Biomaterials 1998; 19:1419–1423.
328. Baino F, Novajra G, Miguez-Pacheco V, Boccaccini AR, Vitale-Brovarone C. Bioactive glasses: Special applications outside the skeletal system. J. Non-Cryst. Solids. 2016; 432:15–30.
329. Salinas AJ, Shruti S, Malavasi G, Menabue L, Vallet-Regi M. Substitutions of cerium, gallium and zinc in ordered mesoporous bioactive glasses. Acta Biomater 2011; 7:3452–8.
330. Jones JR, Tsigkou O, Coates EE, Stevens MM, Polak JM, Hench LL. Extracellular matrix formation and mineralization on a phosphate-free porous bioactive glass scaffold using primary human osteoblast (HOB) cells. Biomaterials 2007; 28(9):1653-63.
331. Tsigkou O, Jones JR, Polak JM, Stevens MM. Differentiation of fetal osteoblasts and formation of mineralized bone nodules by 45S5 Bioglass conditioned medium in the absence of osteogenic supplements. Biomaterials 2009; 30(21):3542-50.
332. Detsch R, Alles S, Hum J, Westenberger P, Sieker F, Heusinger D, et al. Osteogenic differentiation of umbilical cord and adipose derived stem cells onto highly porous 45S5 Bioglass®-based scaffolds. J Biomed Mater Res A. 2015; 103(3):1029-37.
333. Davies JE. Bone bonding at natural and biomaterial surfaces. Biomaterials 2007; 28:5058.
334. Kokubo T, Kushitani H, Sakka S, Kitsugi T, Yamamuro T. Solutions able to reproduce in vivo surface-structure changes in bioactive glass-ceramic A-W3, J. Biomed. Mater. Res. 1990; 24:721.
335. Sun H, Wu C, Dai K, Chang J, Tang T. Proliferation and osteoblastic differentiation of human bone marrow-derived stromal cells on akermanite-bioactive ceramics. Biomaterials 2006; 27:5651.
336. Gillam DG, Tang JY, Mordan NJ, Newman HN. The effects of a novel Bioglass dentifrice on dentine sensitivity: a scanning electron microscopy investigation. J Oral Rehabil. 2002; 29(4):305-13.
337. Zheng K, Boccaccini AR. Sol-gel processing of bioactive glass nanoparticles: a review. Advances in Colloid and interface science 2017; 249:363-373.
338. Yan X, Yu C, Zhou H, Tang J, Zhao D. Highly ordered mesoporous bioactive glasses with superior in vitro bone-forming bioactivities. Angew Chem Int Ed 2004; 43:5980–4.
339. Grosso D, Cagnol F, Soler-Illia GJ, Crepaldi EL, Amenitsch H, Brunet-Bruneau A, et al. Fundamentals of mesostructuring through evaporation-induced self-assembly. Adv. Funct. Mater. 2004; 14:309.
340. Zhao S, Li Y, Li D. Synthesis of CaO-SiO2-P2O5 mesoporous bioactive glasses with high P2O5 content by evaporation induced self assembly process. J Mater Sci Mater Med. 2011; 22(2):201-8.
341. Kong CH, Steffi C, Shi Z, Wang W. Development of mesoporous bioactive glass nanoparticles and its use in bone tissue engineering. J Biomed Mater Res B Appl Biomater. 2018; 106(8):2878-2887.
342. Wu C, Fan W, Chang J, Xiao Y. Mussel-inspired porous SiO_2 scaffolds with improved mineralization and cytocompatibility for drug delivery and bone tissue engineering. Journal of materials chemistry 2011; 45.
343. Wu C, Fan W, Chang J, Xiao Y. Mesoporous bioactive glass scaffolds for efficient delivery of vascular endothelial growth factor. J Biomater Appl. 2013; 28(3):367-74.
344. Zhu M, Shi J, He Q, Zhang L, Chen F, Chen Y. An emulsification-solvent evaporation route to mesoporous bioactive glass microspheres for bisphosphonate drug delivery. J. Mater. Sci. 2012; 47:2256.
345. Maranhão RC, Tavares ER. Advances in non-invasive drug delivery for atherosclerotic heart disease. Expert Opin Drug Deliv. 2015; 12(7):1135-47.
346. López-Noriega A, Arcos D, Vallet-Regí M. Functionalizing mesoporous bioglasses for long-term anti-osteoporotic drug delivery. Chemistry. 2010; 16(35):10879-86.
347. Casarrubios L, Gómez-Cerezo N, Feito MJ, Vallet-Regí M, Arcos D, Portolés MT. Incorporation and effects of mesoporous bioactive glass nanospheres loaded with ipriflavone on osteoblast/osteoclast cocultures. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics 2018; 133:258–268.
348. Casarrubios L, Gómez-Cerezo N, Feito MJ, Vallet-Regí M, Arcos D, Portolés MT. Ipriflavone-loaded mesoporous nanospheres with potential applications for periodontal treatment. Nanomaterials 2020; 10:2573.
349. Casarrubios L, Polo-Montalvo A, Serrano MC, Feito MJ, Vallet-Regí M, Arcos D, Portolés MT. Effects of ipriflavone-loaded mesoporous nanospheres on the differentiation of endothelial progenitor cells and their modulation by macrophages. Nanomaterials 2021; 11:1102.

350. Dai C, Guo H, Lu J, Shi J, Wei J, Liu C. Osteogenic evaluation of calcium/magnesium-doped mesoporous silica scaffold with incorporation of rhBMP-2 by synchrotron radiation-based μCT. Biomaterials 2011; 32(33):8506-17.
351. Perez RA, El-Fiqi A, Park JH, Kim TH, Kim JH, Kim HW. Therapeutic bioactive microcarriers: co-delivery of growth factors and stem cells for bone tissue engineering. Acta Biomater. 2014; 10(1):520-30.
352. Salinas AJ, Esbrit P, Vallet-Regí M. A tissue engineering approach based on the use of bioceramics for bone repair. Biomater Sci. 2013; 1(1):40-51.
353. Han P, Wu C, Chang J, Xiao Y. The cementogenic differentiation of periodontal ligament cells via the activation of Wnt/β-catenin signalling pathway by Li+ ions released from bioactive scaffolds. Biomaterials. 2012; 33(27):6370-9.
354. Gargiulo N, Cusano AM, Causa F, Caputo D, Netti PA. Silver-containing mesoporous bioactive glass with improved antibacterial properties. J Mater Sci Mater Med. 2013; 24(9):2129-35.
355. 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(1):129-38 .
356. Zhang Y, Wei L, Chang J, Miron RJ, Shi B, Yi S, et al. 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(41):5711-5722.
357. Wu C, Chang J. Mesoporous bioactive glasses: structure characteristics, drug/growth factor delivery and bone regeneration application. Interface Focus 2012; 2(3):292-306.
358. Wu C, Zhou Y, Xu M, Han P, Chen L, Chang J, et al. Copper-containing mesoporous bioactive glass scaffolds with multifunctional properties of angiogenesis capacity, osteostimulation and antibacterial activity. Biomaterials 2013; 34(2):422-33.
359. Wu C, Fan W, Zhu Y, Gelinsky M, Chang J, Cuniberti G, et al. Multifunctional magnetic mesoporous bioactive glass scaffolds with a hierarchical pore structure. Acta Biomater. 2011; 7(10):3563-72.
360. Zhu Y, Zhang Y, Wu C, Fang Y, Yang J, Wang S. The effect of zirconium incorporation on the physiochemical and biological properties of mesoporous bioactive glasses scaffolds. Microporous and mesoporous materials 2011; 143(2–3):311-319.
361. Hoppe A, Mouriño V, Boccaccini AR. Therapeutic inorganic ions in bioactive glasses to enhance bone formation and beyond. Biomater. Sci. 2013; 1:254–256.
362. Lin R, Deng C, Li X, Liu Y, Zhang M, Qin C, et al. Copper-incorporated bioactive glass-ceramics inducing anti-inflammatory phenotype and regeneration of cartilage/bone interface. Theranostics. 2019; 9(21):6300-6313.
363. Hild W, Pollinger K, Caporale A, Cabrele C, Keller M, Pluym N, et al. G protein-coupled receptors function as logic gates for nanoparticle binding and cell uptake. Proc Natl Acad Sci USA. 2010; 107(23):10667-72.
364. Yun H, Kim S, Hyeon Y. Preparation of 3D cubic ordered mesoporous bioactive glasses. Solid state sciences 2008; 10:1083-1092.
365. Salgado AJ, Coutinho OP, Reis RL. Bone tissue engineering: state of the art and future trends. Macromol Biosci. 2004; 4(8):743-65.
366. Salinas AJ. Mesoporous bioactive glasses. Chapter 7. In: Bioactive Glasses: Properties, Composition and Recent Applications. Nova 2020.
367. Moghaddam SPH, Mohammadpour R, Ghandehari H. In vitro and in vivo evaluation of degradation, toxicity, biodistribution, and clearance of silica nanoparticles as a function of size, porosity, density, and composition. J Control Release. 2019; 311-312:1-15.
368. Yang G, Phua SZF, Bindra AK, Zhao Y. Degradability and clearance of inorganic nanoparticles for biomedical applications. Adv. Mater. 2019; 31(10):1805730.
369. Ojeda G, Ronda M, Ballester S, Díez-Orejas R, Feito MJ, García-Albert L, Rojo JM, Portolés P. A hyperreactive variant of a CD4+ T cell line is activated by syngeneic antigen presenting cells in the absence of antigen. Cell Immunol. 1995; 164(2):265-78.
370. Yagi J, Baron J, Buxser S, Janeway CA Jr. Bacterial proteins that mediate the association of a defined subset of T cell receptor:CD4 complexes with class II MHC. J Immunol. 1990; 144(3):892-901.
371. Vallet-Regí M, González B, Izquierdo-Barba I. Nanomaterials as Promising Alternative in the Infection Treatment. Int. J. Mol. Sci. 2019; 20:3806.
372. Sefton MV, Babensee JE, Woodhouse KA. Innate and adaptive immune responses in tissue engineering. Semin. Immunol. 2008; 20:83–85.
373. Swartzwelter BJ, Fux AC, Johnson L, Swart E, Hofer S, Hofstätter N, et al. The Impact of Nanoparticles on Innate Immune Activation by Live Bacteria. Int J Mol Sci. 2020; 21(24):9695.

374. Wang J, Chen HJ, Hang T, Yu Y, Liu G, He G, et al. Physical activation of innate immunity by spiky particles. Nat. Nanotechnol. 2018; 13:1078–1086.
375. Boraschi D, Italiani P, Palomba R, Decuzzi P, Duschl A, Fadeel B, et al. Nanoparticles and innate immunity: new perspectives on host defence. Semin Immunol. 2017; 34:33-51.
376. Dowling JK, Mansell A. Toll-like receptors: the swiss army knife of immunity and vaccine development. Clin Transl Immunology. 2016; 5(5):e85.
377. Kapsenberg M.L. Dendritic-cell control of pathogen-driven T-cell polarization. Nat. Rev. Immunol. 2003; 3:984–993.
378. Na H, Cho M, Chung Y. Regulation of Th2 cell immunity by dendritic cells. Immune Netw. 2016; 16:1–12.
379. Talaat RM, Mohamed SF, Bassyouni IH, Raouf AA. Th1/Th2/Th17/Treg cytokine imbalance in systemic lupus erythematosus (SLE) patients: Correlation with disease activity. Cytokine. 2015; 72(2):146-53.
380. Yu SL, Kuan WP, Wong CK, Li EK, Tam LS. Immunopathological roles of cytokines, chemokines, signaling molecules, and pattern-recognition receptors in systemic lupus erythematosus. Clin Dev Immunol. 2012; 2012:715190.
381. McHeyzer-Williams LJ, Pelletier N, Mark L, Fazilleau N, McHeyzer-Williams MG. Follicular helper T cells as cognate regulators of B cell immunity. Curr Opin Immunol. 2009; 2:266–73.
382. Crotty S. Follicular helper CD4 T cells (TFH). Annu Rev Immunol. 2011; 29:621-63.
383. Oh N, Park JH. Endocytosis and exocytosis of nanoparticles in mammalian cells. Int J Nanomedicine. 2014; 9:51–63.
384. Cicuéndez M, Silva VS, Hortigüela MJ, Matesanz MC, Vila M, Portolés MT. MC3T3-E1 pre-osteoblast response and differentiation after graphene oxide nanosheet uptake. Colloids Surf B Biointerfaces 2017; 158:33-40.
385. Mäger I, Langel K, Lehto T, Eiríksdóttir E, Langel U. The role of endocytosis on the uptake kinetics of luciferin-conjugated cell-penetrating peptides. Biochim Biophys Acta. 2012; 1818(3):502-11.
386. Linares J, Matesanz MC, Vila M, Feito MJ, Gonçalves G, Vallet-Regí M, et al. Endocytic mechanisms of graphene oxide nanosheets in osteoblasts, hepatocytes and macrophages. ACS Appl Mater Interfaces. 2014; 6(16):13697-706.
387. Schulz WL, Haj AK, Schiff LA. Reovirus uses multiple endocytic pathways for cell entry. J Virol. 2012; 86(23):12665-75.
388. Guo J, Xu X, Rasheed TK, Yoder A, Yu D, Liang H, et al. Genistein interferes with SDF-1- and HIV-mediated actin dynamics and inhibits HIV infection of resting CD4 T cells. Retrovirology 2013; 10:62.
389. Montes-Casado M, Sanvicente A, Casarrubios L, Feito MJ, Rojo JM, Vallet-Regí M, et al. An Immunological Approach to the Biocompatibility of Mesoporous SiO2-CaO Nanospheres. Int J Mol Sci. 2020; 21(21):8291.
390. Matesanz MC, Vila M, Feito MJ, Linares J, Gonçalves G, Vallet-Regí M, et al. The effects of graphene oxide nanosheets localized on F-actin filaments on cell-cycle alterations. Biomaterials 2013; 34:1562–1569.
391. Portolés P, Rojo J, Golby A, Bonneville M, Gromkowski S, Greenbaum L, et al. Monoclonal antibodies to murine CD3 define distinct epitopes, one of which may interact with CD4 during T cell activation. J. Immunol. 1989; 142:4169–4175.
392. Dialynas DP, Wilde DB, Marrack P, Pierres A, Wall KA, Havran W, et al. Characterization of the murine antigenic determinant, designated L3T4a, recognized by monoclonal antibody GK1.5: expression of L3T4a by functional T cell clones appears to correlate primarily with class II MHC antigen-reactivity. Immunol Rev. 1983; 74:29-56.
393. Malissen B, Bongrand P. Early T cell activation: integrating biochemical, structural, and biophysical cues. Annu Rev Immunol. 2015; 33:539-61.
394. Glassman CR, Parrish HL, Lee MS, Kuhns MS. Reciprocal TCR-CD3 and CD4 Engagement of a Nucleating pMHCII Stabilizes a Functional Receptor Macrocomplex. Cell Rep. 2018; 22(5):1263-1275.
395. Rojo JM, Saizawa K, Janeway CA Jr. Physical association of CD4 and the T-cell receptor can be induced by anti-T-cell receptor antibodies. Proc Natl Acad Sci USA. 1989; 86(9):3311-5.
396. Ortega N, Rosas C. Señalización celular asociada a especies reactivas de oxígeno y su rol en cicatrización de heridas. J. health med. sci. 2020; 6(3):199-205.
397. Plotnikov A, Zehorai E, Procaccia S, Seger R. The MAPK cascades: signaling components, nuclear roles and mechanisms of nuclear translocation. Biochim Biophys Acta. 2011; 1813(9):1619-33.
398. Oishi S, Takano R, Tamura S, Tani S, Iwaizumi M, Hamaya Y, et al. M2 polarization of murine peritoneal macrophages induces regulatory cytokine production and suppresses T-cell proliferation. Immunology 2016; 149:320-328.

399. Wynn TA, Vannella KM. Macrophages in Tissue Repair, Regeneration, and Fibrosis. Immunity 2016; 44(3):450-462.
400. Cuperlovic-Culf M, Barnett DA, Culf AS, Chute I. Cell culture metabolomics: applications and future directions. Drug discovery today 2010; 15(15-16):610-621.
401. Markley JL, Bruschweiler R, Edison AS, Eghbalnia HR, Powers R, Raftery D, et al. The future of NMR-based metabolomics. Current Opinion in Biotechnology 2017; 43:34-40.
402. Duarte IF, Lamego I, Rocha C, Gil AM. NMR metabonomics for mammalian cell metabolism studies. Bioanalysis 2009; 1(9):1597-1614.
403. Halama A. Metabolomics in cell culture - a strategy to study crucial metabolic pathways in cancer development and the response to treatment. Archives of Biochemistry and Biophysics 2014; 564:100-109.
404. Carrola J, Bastos V, de Oliveira JMPF, Oliveira H, Santos C, Gil AM et al. Insights into the impact of silver nanoparticles on human keratinocytes metabolism through NMR metabolomics. Archives of Biochemistry and Biophysics 2016; 589:53-61.
405. Granchi D, Baldini N, Ulivieri FM, Caudarella R. Role of Citrate in Pathophysiology and Medical Management of Bone Diseases. Nutrients 2019; 11(11):2576.
406. van de Wier B, Balk JM, Haenen GR, Giamouridis D, Bakker JA, Bast BC, et al. Elevated citrate levels in non-alcoholic fatty liver disease: the potential of citrate to promote radical production. FEBS Lett. 2013; 587(15):2461-6.
407. Li T, Hao L, Li J, Du C, Wang Y. Insight into vitronectin structural evolution on material surface chemistries: The mediation for cell adhesion. Bioactive Materials 2020; 5(4):1044-1052.
408. Brun P, Scorzeto M, Vassanelli S, Castagliuolo I, Palù G, Ghezzo F, et al. Mechanisms underlying the attachment and spreading of human osteoblasts: From transient interactions to focal adhesions on vitronectin-grafted bioactive surfaces. Acta Biomaterialia 2013; 9(4):6105-6115.
409. Leite ML, Soares DG, Anovazzi G, Anselmi C, Hebling J, de Souza Costa CA. Fibronectin-loaded collagen/gelatin hydrogel is a potent signaling biomaterial for dental pulp regeneration. Journal of endodontics 2021; 47(7):1110-1117.
410. Chen YW, Hsieh SC, Yang YC, Hsu SH, Kung ML, Lin PY, et al. Functional engineered mesenchymal stem cells with fibronectin-gold composite coated catheters for vascular tissue regeneration. Nanomedicine 2018; 14(3):699-711.
411. Casarrubios L, Matesanz MC, Sánchez-Salcedo S, Arcos D, Vallet-Regí M, Portolés MT. Nanocrystallinity effects on osteoblast and osteoclast response to silicon substituted hydroxyapatite. J Colloid Interface Sci. 2016; 482:112-120.
412. Feito MJ, Serrano MC, Oñaderra M, Matesanz MC, Sánchez-Salcedo S, Arcos D, et al. Effects of immobilized VEGF on endothelial progenitor cells cultured on silicon substituted and nanocrystalline hydroxya- patites, RSC Adv. 2016; 6:92586–92595.
413. Mladenovic Z, Johansson A, Willman B, Shahabi K, Björn E, Ransjö M. Soluble silica inhibits osteoclast formation and bone resorption in vitro. Acta Biomaterialia 2014; 10(1):406-418.
414. Ransjo M, Sahli J, Lie A. Expression of connexin 43 mRNA in microisolated murine osteoclasts and regulation of bone resorption in vitro by gap junction inhibitors. Biochem Biophys Res Commun 2003; 303:1179-1185.
415. Matemba SF, Lie A, Ransjo M. Regulation of osteoclastogenesis by gap junction communication. J Cell Biochem 2006; 99:528-537.
416. Okada S, Ito H, Nagai A, Komotori J, Imai H. Adhesion of osteoblast-like cells on nanostructured hydroxyapatite. Acta Biomaterialia 2010; 6(2):591-597.
417. Bacakova L, Filova E, Parizek M, Ruml T, Svorcik V. Modulation of cell adhesion, proliferation and differentiation on materials designed for body implants. Biotechnology advances 2011; 29(6):739-767.
418. Steinerova M, Matejka R, Stepanovska J, Filova E, Stankova L, Rysova M, et al. Human osteoblast-like SAOS-2 cells on submicron-scale fibers coated with nanocrystalline diamond films. Materials Science and Engineering: C 2021; 121:111792.
419. Collar-Dutilleul PY, Panayotov I, Secret E, Cunin F, Gergely C, Cuisinier F, et al. Initial stem cell adhesion on porous silicon surface: molecular architecture of actin cytoskeleton and filopodial growth. Nanoscale Res. Lett. 2014; 9(1):564.
420. Premnath P, Tan B, Venkatakrishnan K. Engineering functionalized multi-phased silicon/silicon oxide nano-biomaterials to passivate the aggressive proliferation of cancer. Sci. Rep. 2015; 5:12141.
421. Xia L, Lin K, Jiang X, Fang B, Xu Y, Liu J, et al. Effect of nano-structured bioceramic surface on osteogenic differentiation of adipose derived stem cells. Biomaterials 2014; 35:8514-8527.

422. Lin K, Xia L, Gan J, Zhang Z, Chen H, Jiang X, et al. Tailoring the nanostructured surfaces of hydroxyapatite bioceramics to promote protein adsorption, osteoblast growth, and osteogenic differentiation. ACS Appl. Mater. Interfaces 2013; 5:8008−8017.
423. Mahon OR, Browe DC, Gonzalez-Fernandez T, Pitacco P, Whelan IT, Von Euw S, et al. Nano-particle mediated M2 macrophage polarization enhances bone formation and MSC osteogenesis in an IL-10 dependent manner. Biomaterials 2020; 239:119833.
424. Zhu Y, Liang H, Liu X, Wu J, Yang C, Wong TM, et al. Regulation of macrophage polarization through surface topography design to facilitate implant-to-bone osteointegration. Sci Adv. 2021; 7(14):eabf6654.
425. Macías C. Moléculas de adhesión. Chapter 11. In: Suardíaz J, Cruz C, Colina A. Laboratorio Clínico. La Habana: Editorial Ciencias Médicas 2004.
426. Bevilacqua MP. Endothelial leukocyte adhesion molecules. Ann Rev Inmunol 1993; 11:767-804.
427. Liu X, Miao Y, Liang H, Diao J, Hao L, Shi Z, et al. 3D-printed bioactive ceramic scaffolds with biomimetic micro/nano-HAp surfaces mediated cell fate and promoted bone augmentation of the bone–implant interface in vivo. Bioactive Materials 2022; 12:120-132.
428. Li T, Peng M, Yang Z, Zhou X, Deng Y, Jiang C, et al. Wang 3D-printed IFN-γ-loading calcium silicate-β-tricalcium phosphate scaffold sequentially activates M1 and M2 polarization of macrophages to promote vascularization of tissue engineering bone Acta Biomater. 2018; 71:96-107.
429. Hu X, Neoh KG, Zhang J, Kang ET, Wang W. Immobilization strategy for optimizing VEGF's concurrent bioactivity towards endothelial cells and os- teoblasts on implant surfaces, Biomaterials 2012; 33:8082–8093.
430. Miyauchi A, Notoya K, Taketomi S, Takagi Y, Fujii Y, Jinnai K, et al. Novel ipriflavone receptors coupled to calcium influx regulate osteoclast differentiation and function Endocrinology 1996; 137(8):3544–3550.
431. Li Z, Kong K, Qi W. Osteoclast and its roles in calcium metabolism and bone development and remodeling. Biochem Biophys Res Commun. 2006; 343(2):345-50.
432. Hwang SY, Putney JW Jr. Calcium signaling in osteoclasts. Biochim Biophys Acta. 2011; 1813(5):979-83.
433. Diez-Orejas R, Casarrubios L, Feito MJ, Rojo JM, Vallet-Regi M, Arcos D, et al. Effects of mesoporous SiO2-CaO nanospheres on the murine peritoneal macrophages/Candida albicans interface. Int. Immunopharmacol. 2021; 94:107457.
434. Eom HJ, Choi J. Clathrin-mediated endocytosis is involved in uptake and toxicity of silica nanoparticles in Caenohabditis elegans. Chem Biol Interact. 2019; 311:108774.
435. Ng CT, Tang FM, Li JJ, Ong C, Yung LL, Bay BH. Clathrin-mediated endocytosis of gold nanoparticles in vitro. Anat Rec (Hoboken). 2015; 298(2):418-27.
436. MacDougall G, Anderton RS, Trimble A, Mastaglia FL, Knuckey NW, Meloni BP. Poly-arginine-18 (R18) Confers Neuroprotection through Glutamate Receptor Modulation, Intracellular Calcium Reduction, and Preservation of Mitochondrial Function. Molecules. 2020; 25(13):2977.
437. Wang X, Zheng A, Xin XZ, Peng LJ, Wang J, Cao LY, et al. Osteogenic Induction of Low-dose Ipriflavone on Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells Extracted from Osteoporosis Rats. Chin J Dent Res. 2021; 24(3):153-158.
438. Yamazaki I, Kinoshita M. Calcitonin secreting property of ipriflavone in the presence of estrogen. Life Sci 1986; 38:1535-1541.
439. Cecchini MG, Fleisch H, Muhlbauer RC. Ipriflavone inhibits bone resorption in intact and ovariectomized rats. Calcif Tissue Int 1997; 61:9-11.
440. Arcos D, Gómez-Cerezo N, Casarrubios L, Feito MJ, Saiz-Pardo M, Ortega L, et al. Injectable mesoporous bioactive nanoparticles for bone regeneration in osteoporotic model. 32th Annual conference of the European society for biomaterials (ESB 2022).
441. McWhorter FY, Wang T, Nguyen P, Chung T, Liu WF. Modulation of macrophage phenotype by cell shape. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 2013; 110:17253–172538.
442. Maleki SJ, Crespo JF, Cabanillas B. Anti-inflammatory effects of flavonoids. Food Chem. 2019; 299:125124.
443. Ara T, Declerck YA. Interleukin-6 in bone metastasis and cancer progression. Eur. J. Cancer 2010; 46:1223–1231.
444. Udagawa N, Takahashi N, Katagiri T, Tamura T, Wada S, Findlay DM, et al. Interleukin (IL)-6 induction of osteoclast differentiation depends on IL-6 receptors expressed on osteoblastic cells but not on osteoclast progenitors. J. Exp. Med. 1995; 182:1461–1468.

445. Horwood NJ, Elliott J, Martin TJ, Gillespie M. osteotropic agents regulate the expression of osteoclast differentiation factor and osteoprotegerin in osteoblastic stromal cells. Endocrinol. 1998; 139:4743.
446. Kuroyanagi G, Adapala NS, Yamaguchi R, Kamiya N, Deng Z, Aruwajoye O, et al. Interleukin-6 deletion stimulates revascularization and new bone formation following ischemic osteonecrosis in a murine model. Bone 2018; 116:221–231.
447. Mariani E, Lisignoli G, Borzì RM, Pulsatelli L. Biomaterials: Foreign Bodies or Tuners for the Immune Response? Int. J. Mol. Sci. 2019; 20:636.
448. Serrano MC, Pagani R, Ameer GA, Vallet-Regí M, Portolés MT. Endothelial cells derived from circulating progenitors as an effective source to functional endothelialization of NaOH-treated poly(epsilon-caprolactone) films. J Biomed Mater Res A. 2008; 87(4):964-71.
449. Liu Y, Yoo E, Mahler GJ, Doiron AL. Endothelial barrier dysfunction induced by nanoparticle exposure through actin remodeling via caveolae/raft-regulated calcium signalling. NanoImpact. 2018; 11:82-91.
450. Tamaru M, Akita H, Kajimoto K, Sato Y, Hatakeyama H, Harashima H. An apolipoprotein E modified liposomal nanoparticle: ligand dependent efficiency as a siRNA delivery carrier for mouse-derived brain endothelial cells. Int J Pharm. 2014; 465(1-2):77-82.
451. Lin XP, Mintern JD, Gleeson PA. Macropinocytosis in Different Cell Types: Similarities and Differences. Membranes (Basel). 2020; 10(8):177.
452. Shi M, Zhou Y, Shao J, Chen Z, Song B, Chang J, et al. Stimulation of osteogenesis and angiogenesis of hBMSCs by delivering Si ions and functional drug from mesoporous silica nanospheres. Acta Biomater. 2015; 21:178–189.
453. Nucera S, Biziato D, De Palma M. The interplay between macrophages and angiogenesis in development, tissue injury and regeneration. Int. J. Dev. Biol. 2011; 55:495–503.
454. Crowther M, Brown NJ, Bishop ET, Lewis CE. Microenvironmental influence on macrophage regulation of angiogenesis in wounds and malignant tumors. J. Leukoc. Biol. 2001; 70:478–490.
455. Gerri C, Marín-Juez R, Marass M, Marks A, Maischein HM, Stainier DYR. Hif-1α regulates macrophage-endothelial interactions during blood vessel development in zebrafish. Nat Commun. 2017; 8:15492.
456. Jetten N, Verbruggen S, Gijbels MJ, Post MJ, De Winther MPJ, Donners MMPC. Anti-inflammatory M2, but not pro-inflammatory M1 macrophages promote angiogenesis in vivo. Angiogenesis 2014; 17:109–118.
457. Yang Y, Guo Z, Chen W, Wang X, Cao M, Han X, et al. M2 macrophage-derived exosomes promote angiogenesis and growth of pancreatic ductal adenocarcinoma by targeting E2F2. Mol. Ther. 2021; 29:1226–1238.
458. Bellucci D, Braccini S, Chiellini F, Balasubramanian P, Boccaccini AR, Cannillo V. Bioactive glasses and glass-ceramics versus hydroxyapatite: Comparison of angiogenic potential and biological responsiveness. J Biomed Mater Res A. 2019; 107(12):2601-2609.
459. Keshaw H, Forbes A, Day RM. Release of angiogenic growth factors from cells encapsulated in alginate beads with bioactive glass. Biomaterials. 2005; 26(19):4171-9.

APÉNDICE

Listado de publicaciones relacionadas con esta Tesis Doctoral:

- **Casarrubios L**, Matesanz MC, Sánchez-Salcedo S, Arcos D, Vallet-Regí M, Portolés MT. Nanocrystallinity effects on osteoblast and osteoclast response to silicon substituted hydroxyapatite. Journal of Colloid and Interface Science. 2016;482: 112-120.

- Feito MJ, Diez-Orejas R, Cicuéndez M, **Casarrubios L**, Rojo JM, Portolés MT. Characterization of M1 and M2 polarization phenotypes in peritoneal macrophages after treatment with graphene oxide nanosheets. Colloids Surf., B. 2018;176: 96-105.

- Diez-Orejas R, Feito MJ, Cicuéndez M, **Casarrubios L**, Rojo JM, Portolés MT. Graphene oxide nanosheets increase Candida albicans killing by pro-inflammatory and reparative peritoneal macrophages. Colloids Surf., B. 2018;171: 250-259.

- Salinas AJ, Blanco-Becares JM, Mersinlioglu O, **Casarrubios L**, Fernández-Villa D, Feito MJ, Portolés MT, González B, Vallet-Regí M. Synthesis, characterization and biocompatibility study of mesolamellar calcium phosphate hybrids prepared via anionic surfactant templating. ChemistrySelect. 2018;3(24).

- Gómez-Cerezo N, **Casarrubios L**, Morales I, Feito MJ, Vallet-Regí M, Arcos D, Portolés MT. Effects of a mesoporous bioactive glass on osteoblasts, osteoclasts and macrophages. J. Colloid Interface Sci. 2018;15: 309-320.

- Gómez-Cerezo N, **Casarrubios L**, Saiz-Pardo M, Ortega L, de Pablo D, Díaz-Güemes I, Fernández-Tomé B, Enciso S, Sánchez-Margallo FM, Portolés MT, Arcos D, Vallet-Regí M. Mesoporous bioactive glass/ε-polycaprolactone scaffolds promote bone regeneration in osteoporotic sheep. Acta Biomater. 2019;90: 393-402.

- Portolés MT,**Casarrubios L**."Cell responses to mesoporous bioactive glasses" in "Bioactive Glasses: Mechanical Properties, Composition and Applications" Ed. Nova Science Publishers. 2020;291-320.

- Feito MJ, **Casarrubios L**, Oñaderra M, Gómez-Duro M, Arribas P, Polo-Montalvo A, Vallet-Regí M, Arcos D, Portolés MT.Response of RAW 264.7 and J774A.1 macrophages to microparticles and nanoparticles of mesoporous bioactive glass: A comparative study. Colloids Surf., B. 2021;208,112110.

- Diez-Orejas R, **Casarrubios L**, Feito MJ, Rojo JM, Vallet-Regí M, Arcos D, Portolés MT.Effects of mesoporous SiO2-CaO nanospheres on the murine peritoneal macrophages / *Candida albicans* interface.Int. Immunopharmacol. 2021;94:107457.

- Montes-Casado M, Sanvicente A, **Casarrubios L**, Feito MJ, Rojo JM, Vallet-Regí M,Arcos D, Portolés P, Portolés MT.An Immunological Approach to the Biocompatibility of Mesoporous SiO_2-CaO Nanospheres.Int. J. Mol. Sci. 2020;21,8291.

- Polo-Montalvo A, **Casarrubios L**, Serrano MC, Sanvicente A, Feito MJ, Arcos D,Portolés MT.Effective actions of ion release from mesoporous bioactive glass and macrophage mediators on the differentiation of osteoprogenitor and endothelial progenitor cells. Pharmaceutics. 2021;13,1152.

Journal of Colloid and Interface Science 482 (2016) 112–120

Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Colloid and Interface Science

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

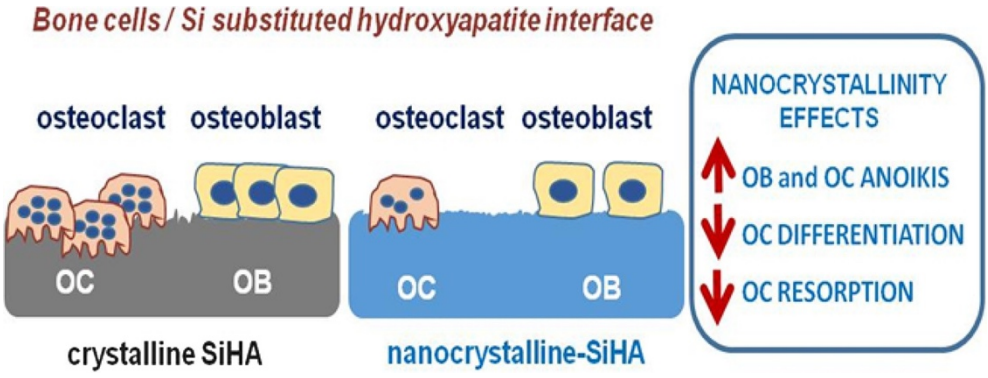
Regular Article

Nanocrystallinity effects on osteoblast and osteoclast response to silicon substituted hydroxyapatite

Laura Casarrubios [a,b], María Concepción Matesanz [a], Sandra Sánchez-Salcedo [c,d], Daniel Arcos [c,d], María Vallet-Regí [c,d], María Teresa Portolés [a,b,⇑]

[a] Department of Biochemistry and Molecular Biology I, Faculty of Chemistry, Universidad Complutense de Madrid, Spain
[b] Instituto de Investigación Sanitaria San Carlos IdISSC, Spain
[c] Department of Inorganic and Bioinorganic Chemistry, Faculty of Pharmacy, Universidad Complutense de Madrid, Instituto de Investigación Hospital 12 de Octubre i+12, Spain
[d] Networking Research Center on Bioengineering/Biomaterials and Nanomedicine, CIBER-BBN, Spain

graphical abstract



article info

Article history:
Received 19 June 2016
Revised 27 July 2016
Accepted 28 July 2016
Available online 29 July 2016

Keywords:
Nanocrystallinity
Hydroxyapatite
Silicon
Osteoclast
Osteoblast
Anoikis
Osteoporosis
Cell adhesion
Apoptosis
Cell cycle

abstract

Hypothesis: Silicon substituted hydroxyapatites (SiHA) are highly crystalline bioceramics treated at high temperatures (about 1200 °C) which have been approved for clinical use with spinal, orthopedic, periodontal, oral and craniomaxillofacial applications. The preparation of SiHA with lower temperature methods (about 700 °C) provides nanocrystalline SiHA (nano-SiHA) with enhanced bioreactivity due to higher surface area and smaller crystal size. The aim of this study has been to know the nanocrystallinity effects on the response of both osteoblasts and osteoclasts (the two main cell types involved in bone remodelling) to silicon substituted hydroxyapatite.
Experiments: Saos-2 osteoblasts and osteoclast-like cells (differentiated from RAW-264.7 macrophages) have been cultured on the surface of nano-SiHA and SiHA disks and different cell parameters have been evaluated: cell adhesion, proliferation, viability, intracellular content of reactive oxygen species, cell cycle phases, apoptosis, cell morphology, osteoclast-like cell differentiation and resorptive activity.
Findings: This comparative *in vitro* study evidences that nanocrystallinity of SiHA affects the cell/biomaterial interface inducing bone cell apoptosis by loss of cell anchorage (anoikis), delaying osteoclast-like cell differentiation and decreasing the resorptive activity of this cell type. These results suggest the potential use of nano-SiHA biomaterial for preventing bone resorption in treatment of osteoporotic bone.
© 2016 Elsevier Inc. All rights reserved.

* Corresponding author.
E-mail addresses: arualanilom@hotmail.com (L. Casarrubios), conchitamatesanz@hotmail.com (M.C. Matesanz), sansanch@ucm.es (S. Sánchez-Salcedo), arcosd@ucm.es (D. Arcos), vallet@ucm.es (M. Vallet-Regí), portoles@quim.ucm.es (M.T. Portolés).

Contents lists available at ScienceDirect

Colloids and Surfaces B: Biointerfaces

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

Characterization of M1 and M2 polarization phenotypes in peritoneal macrophages after treatment with graphene oxide nanosheets

María José Feito[a,*], Rosalía Diez-Orejas[b], Mónica Cicuéndez[c,d], Laura Casarrubios[a], José María Rojo[e], María Teresa Portolés[a,*]

[a] Department of Biochemistry and Molecular Biology, Faculty of Chemistry, Universidad Complutense de Madrid, Instituto de Investigación Sanitaria del Hospital Clínico San Carlos (IdISSC), 28040, Madrid, Spain
[b] Department of Microbiology and Parasitology, Faculty of Pharmacy, Universidad Complutense de Madrid, 28040, Madrid, Spain
[c] CICECO-Aveiro Institute of Materials, Department of Chemistry, University of Aveiro, Campus Universitário de Santiago, 3810-193, Aveiro, Portugal
[d] TEMA-Nanotechnology Research Group, Mechanical Engineering Department, University of Aveiro, Campus Universitário de Santiago, 3810-193, Aveiro, Portugal
[e] Department of Molecular Biomedicine, Centro de Investigaciones Biológicas, CSIC, 28040, Madrid, Spain

ARTICLE INFO

Keywords:
Graphene oxide nanosheets
Peritoneal macrophages
Cytokine profiling
Macrophage polarization

ABSTRACT

Macrophages play a key role in nanoparticle removal and are primarily responsible for their uptake and trafficking *in vivo*. Due to their functional plasticity, macrophages display a spectrum of phenotypes between two extremes indentified as pro-inflammatory M1 and reparative M2 macrophages, characterized by the expression of specific cell surface markers and the secretion of different cytokines. The influence of graphene oxide (GO) nanosheets functionalized with poly(ethylene glycol-amine) and labelled with fluorescein isothiocyanate (FITC-PEG-GO) on polarization of murine peritoneal macrophages towards M1 and M2 phenotypes was evaluated in basal and stimulated conditions by flow cytometry and confocal microscopy through the expression of different cell markers: CD80 and iNOS as M1 markers, and CD206 and CD163 as M2 markers. Although FITC-PEG-GO did not induce M1 or M2 macrophage polarization after 24 and 48 h in basal conditions, this nanomaterial decreased the percentage of M2 reparative macrophages. We have also compared control macrophages with macrophages that have or have not taken up FITC-PEG-GO after treatment with these nanosheets (GO^+ and GO^- cells, respectively). The CD80 expression diminished in GO^+ macrophages after 48 h of GO treatment but the CD206 expression in GO^+ population showed higher values than in both GO- population and control macrophages. In the presence of pro-inflammatory stimuli (LPS and IFN-γ), a significant decrease of $CD80^+$ cells was observed after treatment with GO. This nanomaterial also induced significant decreases of $CD206^+$ and $CD163^+$ cells in the presence of reparative stimulus (IL-4). The CD80, iNOS and CD206 expression was lower in both GO^- and GO^+ cells than in control macrophages. However, higher CD163 expression was obtained in both GO^- and GO^+ cells in comparison with control macrophages. All these facts suggest that FITC-PEG-GO uptake did not induce the macrophage polarization towards the M1 pro-inflammatory phenotype, promoting the control of the M1/M2 balance with a slight shift towards M2 reparative phenotype involved in tissue repair, ensuring an appropriate immune response to these nanosheets.

1. Introduction

Graphene-related nanomaterials like graphene oxide (GO) present exceptional physical and chemical properties [1] that confer them a great potential for biomedical applications [2] including tissue engineering [3,4], gene and drug delivery [5–8] and theragnosis [9–12]. However, their biocompatibility has not been fully assessed and there is no much information concerning the mechanisms underlying its potential toxicity [13,14]. Thus, GO can induce adverse effects on health, mainly due to their smaller size, larger surface area and reactive properties [15–17]. Recent studies have evidenced that GO nanosheets can be quickly endocytosed by different cell types promoting several cellular responses as intracellular oxidative stress [18–21]. Our previous results show that several mechanisms take part in FITC-PEG-GO uptake, depending on the characteristics of each cell type. Thus, macropinocytosis seems to be a general internalization process in human Saos-2 osteoblasts, human HepG2 hepatocytes and murine RAW-264.7 macrophages. Besides macropinocytosis, FITC-PEG-GO can enter

* Corresponding authors.
E-mail addresses: mjfeito@pdi.ucm.es (M.J. Feito), portoles@quim.ucm.es (M.T. Portolés).

Colloids and Surfaces B: Biointerfaces 171 (2018) 280–289

Contents lists available at ScienceDirect

Colloids and Surfaces B: Biointerfaces

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

Graphene oxide nanosheets increase *Candida albicans* killing by pro-inflammatory and reparative peritoneal macrophages

Rosalía Diez-Orejas[a,*], María José Feito[b], Mónica Cicuéndez[c,d], Laura Casarrubios[b], José María Rojo[e], María Teresa Portolés[b,*]

[a] Department of Microbiology and Parasitology, Faculty of Pharmacy, Universidad Complutense de Madrid, 28040, Madrid, Spain
[b] Department of Biochemistry and Molecular Biology, Faculty of Chemistry, Universidad Complutense de Madrid, Instituto de Investigación Sanitaria del Hospital Clínico San Carlos (IdISSC), 28040, Madrid, Spain
[c] CICECO-Aveiro Institute of Materials, Department of Chemistry, University of Aveiro, Campus Universitario de Santiago, 3810-193, Aveiro, Portugal
[d] TEMA-Nanotechnology Research Group, Mechanical Engineering Department, University of Aveiro, Campus Universitario de Santiago, 3810-193, Aveiro, Portugal
[e] Department of Molecular Biomedicine, Centro de Investigaciones Biológicas, CSIC, 28040, Madrid, Spain

ARTICLE INFO

Keywords:
Graphene oxide
Macrophage
Candida albicans
Phagocytosis
CFU inhibition
Nanomaterial

ABSTRACT

Graphene oxide (GO) is a new nanomaterial with different potential biomedical applications due to its excellent physicochemical properties and ease of surface functionalization. Macrophages play key roles in the control of fungal infections preventing invasive candidiasis by both limiting the growth of the opportunistic fungal pathogen *Candida albicans* and activating other immune effector cells. In order to know if macrophages maintain their immunocompetence against this microorganism after GO uptake, we have evaluated the interactions at the interface of GO nanosheets, macrophages and *Candida albicans*. Poly (ethylene glycol-amine)-derivatized GO nanosheets labelled with fluorescein isothiocyanate (FITC-PEG-GO), were efficiently taken up by peritoneal macrophages inducing a significant increase of *C. albicans* phagocytosis by both pro-inflammatory macrophages (M1/stimulated with LPS/IFN-γ) and reparative macrophages (M2/stimulated with IL-4). On the other hand, after FITC-PEG-GO treatment and *C. albicans* infection, the percentages of GO^+ macrophages diminished when *Candida* uptake increased in every condition (macrophages with no stimuli, M1 and M2 macrophages), thus suggesting the exocytosis of this nanomaterial as a dynamic mechanism favoring fungal phagocytosis. For the first time, we have analyzed the effects of PEG-GO nanosheets on *Candida albicans* killing by unstimulated, M1 and M2 macrophages, evidencing that intracellular GO modulates the macrophage candidacidal activity in a multiplicity of infection (MOI) dependent manner. At MOI 1, the high intracellular GO levels increase the fungicidal activity of basal and stimulated macrophages. At MOI 5, as intracellular GO decreases, the previous pro-inflammatory or reparative stimulus predefines the killing ability of macrophages. In summary, GO treatment enhances classical M1 macrophage activation, important for pathogen eradication, and diminishes alternative activation of M2 macrophages, thus decreasing fungal persistence and avoiding chronic infectious diseases.

1. Introduction

Candida albicans is an opportunistic fungal pathogen that is a frequent cause of mucosal infections along with disseminated candidiasis with high mortality rates [1]. The importance of phagocytes in the immune response against the fungus and the resolution of the infection is well stablished [2], and their absence or defect clearly favors the infection [3]. Macrophages are particularly important because they are critical to prevent invasive candidiasis [4] by both limiting *C. albicans* burden and recruiting and activating other immune effector cells [5].

Macrophages are innate immune cells that possess unique abilities to polarize towards different phenotypes that allow them to respond to changes in their microenvironment. In the extremes of their activation spectrum, these phenotypes are classified as classical (M1) and alternative (M2) activated macrophages [6–8]. Whereas M1 macrophages play a major role in host defense against various microbial pathogens, including fungi, M2 macrophages are instrumental in immune-regulation and wound healing [6–8]. Thus, macrophages can modify their metabolic functions from killing/inhibitory (M1 cells) to healing/growth promoting (M2 cells) [9]. One characteristic difference between

* Corresponding authors.
E-mail addresses: rosaliad@farm.ucm.es (R. Diez-Orejas), portoles@quim.ucm.es (M.T. Portolés).

ChemPubSoc Europe
DOI: 10.1002/slct.201703130
Chemistry SELECT Full Papers

Materials Science inc. Nanomaterials & Polymers

Synthesis, Characterization and Biocompatibility of Mesolamellar Calcium Phosphate Hybrids Prepared by Anionic Surfactant Templating

Antonio J. Salinas,[a, b] José M. Blanco-Bécares,[a] Okan Mersinlioglu,[a] Laura Casarrubios,[c] Daniel Fernández-Villa,[c] María J. Feito,[c] Teresa Portolés,[c] Blanca González,*[a, b] and Mar´ıa Vallet-Reg´ı[a, b]

Calcium phosphate (CaP) based hybrid materials have been been characterized by several physico-chemical techniques. A synthesized through a precipitation method in aqueous potential application of these lamellar calcium phosphate medium in the presence of the anionic surfactant sodium based hybrids can be as matrixes in drug delivery systems with dodecylbenzene sulfonate (SDBS) as structure directing agent. the possibility of loading hydrophobic drugs in the organic Parameters of synthesis, such as Ca/P molar ratio, surfactant interlayers. To evaluate their potential as biomaterials, the concentration and initial pH, have been investigated trying to biocompatibility of two hybrids has been studied *in vitro* with get mesostructured CaP phases. A lamellar-like hybrid meso- human Saos-2 osteoblasts. Cell assays showed that, upon the phase consisting in several wavy layers of apatite or apatite- appropriate synthesis and stabilization conditions, a biocom-brushite nanoplates was successfully obtained. Materials have patible CaP and SDBS mesolamellar hybrid can be prepared.

Introduction

Calcium phosphate (CaP) materials are of great relevance as biomaterials due to their unique biocompatibility and bioactivity, which have led to their wide use in bone tissue engineering and therapeutic delivery.[1–6] With this purpose, mesostructured materials, such as ordered mesoporous silica materials both in bulk and nanoparticles, are reaching a great relevance on such biomedical applications because they present the ability to adsorb biologically active molecules and release them in a controlled manner.[7–11] These ceramic silica-based materials are obtained through a self-assembly process in which supramolecular assemblies of surfactants direct the formation of a mesostructure during the condensation of the soluble inorganic species.[12–14] This technique of surfactant-templating has been used as well to prepare other mesoporous inorganic solids such as metal oxides and alumninophosphates.[15] However, the synthesis of mesostructured CaPs following this approach has been less successful. It is attributed to the fact that the inorganic framework is strongly connected through ionic bonds between calcium and phosphate ions and the CaP crystalline phase is rapidly formed during a precipitation process. The fast generation of discrete crystalline CaPs could hinders the previous interaction of the ions in solution with the surfactants used as templates of the mesophase.

However, biological systems are able to produce organic-inorganic hybrid structures through biomineralization processes.[16–18] Then, using biomimetic mineralization methods to fabricate functional materials with ordered nanostructures, many key authors in the field have developed organic-inorganic mesostructures with complex architectures based on CaPs[19–24] as well as based on $CaCO_3$.[25–26]

To date, no clear evidences of mesoporous hydroxyapatite (HA) have been reported. Only very poorly defined hexagonal mesoporous structures using cetyltrimethylammonium bromide as template[27] or possible hexagonal 2D mesostructures of hybrid materials, whose mesostructure disappears after calcination, using mixtures of anionic and cationic surfactants have been published.[28] Also, the use of non ionic block copolymers has been tried as a neutral templating of mesoporous hydroxyapatite.[29,30] Thus far, mesoporous hydroxyapatite has been produced with a significantly enhanced specific surface area using double emulsion droplets as microreactors.[31] Moreover, a modified hard templating route based in ordered mesoporous carbon as hard template has been used

[a] Dr. A. J. Salinas, J. M. Blanco-Bécares, Dr. O. Mersinlioglu, Dr. B. González, Prof. M. Vallet-Regí
Departamento de Química en Ciencias Farmacéuticas (Química Inorgánica y Bioinorgánica)
Facultad de Farmacia
Universidad Complutense de Madrid
Plaza de Ramón y Cajal s/n, 28040 Madrid, Spain
E-mail: blancaortiz@ucm.es
[b] Dr. A. J. Salinas, Dr. B. González, Prof. M. Vallet-Regí
Networking Research Center on Bioengineering, Biomaterials and Nanomedicine (CIBER-BBN), Spain
Instituto de Investigación Sanitaria Hospital 12 de Octubre i+ 12
Madrid, Spain
[c] L. Casarrubios, D. Fernández-Villa, Dr. M. J. Feito, Prof. T. Portolés
Departamento de Bioquímica y Biología Molecular
Facultad de Ciencias Químicas
Universidad Complutense de Madrid
Instituto de Investigación Sanitaria del Hospital Clínico San Carlos (IdISSC)
Ciudad Universitaria, 28040 Madrid, Spain.

Supporting information for this article is available on the WWW under https://doi.org/10.1002/slct.201703130

Journal of Colloid and Interface Science 528 (2018) 309–320

Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Colloid and Interface Science

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

Regular Article

Effects of a mesoporous bioactive glass on osteoblasts, osteoclasts and macrophages

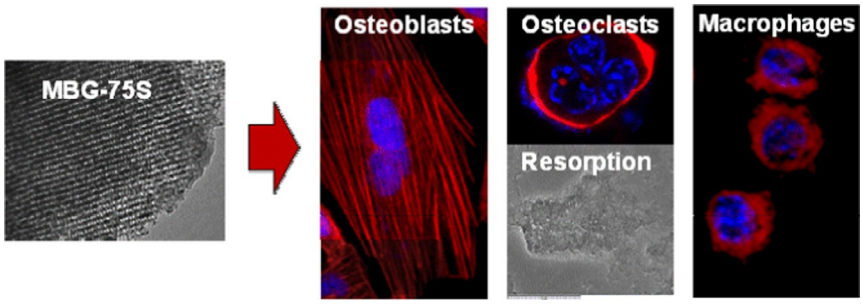
N. Gómez-Cerezo [a,b], L. Casarrubios [c], I. Morales [c], M.J. Feito [c], M. Vallet-Regí [a,b,⇑], D. Arcos [a,b,⇑], M.T. Portolés [c,⇑]

[a] Departamento de Química en Ciencias Farmacéuticas, Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid, Instituto de Investigación Sanitaria Hospital 12 de Octubre i+12, Plaza Ramón y Cajal s/n, 28040 Madrid, Spain

[b] CIBER de Bioingeniería, Biomateriales y Nanomedicina, CIBER-BBN, Madrid, Spain

[c] Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Complutense de Madrid, Instituto de Investigación Sanitaria del Hospital Clínico San Carlos (IdISSC), 28040 Madrid, Spain

graphical abstract



article info

Article history:
Received 18 April 2018
Revised 23 May 2018
Accepted 27 May 2018
Available online 29 May 2018

Keywords:
Mesoporous bioactive glasses
Osteoblasts
Osteoclasts
Macrophages

abstract

A mesoporous bioactive glass (MBG) of molar composition $75SiO_2$-$20CaO$-$5P_2O_5$ (MBG-75S) has been synthetized as a potential bioceramic for bone regeneration purposes. X-ray diffraction (XRD), Fourier transform infrared spectroscopy (FT-IR), nitrogen adsorption studies and transmission electron microscopy (TEM) demonstrated that MBG-75S possess a highly ordered mesoporous structure with high surface area and porosity, which would explain the high ionic exchange rate (mainly calcium and silicon soluble species) with the surrounded media. MBG-75S showed high biocompatibility in contact with Saos-2 osteoblast-like cells. Concentrations up to 1 mg/ml did not lead to significant alterations on either morphology or cell cycle. Regarding the effects on osteoclasts, MBG-75S allowed the differentiation ofRAW-264.7 macrophages into osteoclast-like cells but exhibiting a decreased resorptive activity. These results point out that MBG-75S does not inhibit osteoclastogenesis but reduces the osteoclast bone- resorbing capability. Finally, *in vitro* studies focused on the innate immune response, evidenced that MBG-75S allows the proliferation of macrophages without inducing their polarization towards the M1 pro-inflammatory phenotype. This *in vitro* behavior is indicative that MBG-75S would just induce the required innate immune response without further inflammatory complications under *in vivo* conditions. The overall behavior respect to osteoblasts, osteoclasts and macrophages, makes this MBG a very inter- esting candidate for bone grafting applications in osteoporotic patients.

© 2018 Published by Elsevier Inc.

* Corresponding authors at: Departamento de Química en Ciencias Farmacéuticas, Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid, Instituto de Investigación Sanitaria Hospital 12 de Octubre i+12, Plaza Ramón y Cajal s/n, 28040 Madrid, Spain (M. Vallet-Regí and D. Arcos). Departamento de Bioquímica y Biología molecular, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Complutense de Madrid, Instituto de Investigación Sanitaria del Hospital Clínico San Carlos (IdISSC), 28040 Madrid, Spain (M.T. Portolés).
E-mail addresses: vallet@ucm.es (M. Vallet-Regí), arcosd@ucm.es (D. Arcos), portoles@quim.ucm.es (M.T. Portolés).

Acta Biomaterialia 90 (2019) 393–402

Contents lists available at ScienceDirect

Acta Biomaterialia

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

Full length article

Mesoporous bioactive glass/e-polycaprolactone scaffolds promote bone regeneration in osteoporotic sheep

N. Gómez-Cerezo [a,b], L. Casarrubios [c], M. Saiz-Pardo [d], L. Ortega [d], D. de Pablo [d], I. Díaz-Güemes [e], B. Fernández-Tomé [e], S. Enciso [e], F.M. Sánchez-Margallo [e], M.T. Portolés [c,⇑], D. Arcos [a,b,⇑], M. Vallet-Regí [a,b,⇑]

[a] Departamento de Química en Ciencias Farmacéuticas, Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid, Instituto de Investigación Sanitaria Hospital, 12 de Octubre i+12, Plaza Ramón y Cajal s/n, 28040 Madrid, Spain
[b] CIBER de Bioingeniería Biomateriales y Nanomedicina (CIBER-BBN), Spain
[c] Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Complutense de Madrid, Instituto de Investigación Sanitaria Hospital Clínico San Carlos (IdISSC), 28040 Madrid, Spain
[d] Servicio de Anatomía Patológica. Hospital Clínico San Carlos, Facultad de Medicina Universidad Complutense de Madrid, Instituto de Investigación Sanitaria Hospital Clínico San Carlos (IdISSC), 28040 Madrid, Spain
[e] Centro de Cirugía de Mínima Invasión Jesús Usón, Cáceres, Spain

ARTICLE INFO

Article history:
Received 6 February 2019
Received in revised form 19 March 2019
Accepted 5 April 2019
Available online 6 April 2019

Keywords:
Mesoporous bioactive glass
Scaffolds
Osteoporosis
Zoledronic acid
Bone regeneration

ABSTRACT

Macroporous scaffolds made of a SiO_2-CaO-P_2O_5 mesoporous bioactive glass (MBG) and e-polycaprolactone (PCL) have been prepared by robocasting. These scaffolds showed an excellent *in vitro* biocompatibility in contact with osteoblast like cells (Saos 2) and osteoclasts derived from RAW 264.7 macrophages. *In vivo* studies were carried out by implantation into cavitary defects drilled in osteoporotic sheep. The scaffolds evidenced excellent bone regeneration properties, promoting new bone formation at both the peripheral and the inner parts of the scaffolds, thick trabeculae, high vascularization and high presence of osteoblasts and osteoclasts. In order to evaluate the effects of the local release of an antiosteoporotic drug, 1% (%wt) of zoledronic acid was incorporated to the scaffolds. The scaffolds loaded with zoledronic acid induced apoptosis in Saos 2 cells, impeded osteoclast differentiation in a time dependent manner and inhibited bone healing, promoting an intense inflammatory response in osteoporotic sheep.

Statement of significance

In addition to an increase in bone fragility and susceptibility to fracture, osteoporosis also hinders the clinical success of endosseous implants and grafting materials for the treatment of bone defects. For the first time, macroporous scaffolds made of mesoporous bioactive glass and ɛ-caprolactone have been evaluated in a sheep model that mimics the osteoporosis conditions in humans. These implants fostered bone regeneration, promoting new bone formation at both the peripheral and the inner parts of the scaffolds, showing thick trabeculae and a high vascularization degree. Our results indicate that macroporous structures containing highly bioactive mesoporous glasses could be excellent candidates for the regenerative treatment of bone defects in osteoporotic patients.

© 2019 Acta Materialia Inc. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Osteoporosis has been defined as "a systemic disease characterized by low bone mass and micro-architectural deterioration of bone tissue, with consequent increase in bone fragility and susceptibility to fracture" [1] and it is associated with significant morbidity and mortality [2,3]. Osteoporosis also hinders the clinical success of endosseous implants and grafting materials for the treatment of bone defects [4]. The systemic metabolism and the site morphological conditions make difficult not only the primary

* Corresponding authors at: Departamento de Química en Ciencias Farmacéuticas, Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid, Instituto de Investigación Sanitaria Hospital, 12 de Octubre i+12, Plaza Ramón y Cajal s/n, 28040 Madrid, Spain (D. Arcos) and (M. Vallet-Regí), Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Complutense de Madrid, Instituto de Investigación Sanitaria Hospital Clínico San Carlos (IdISSC), 28040 Madrid, Spain (M.T. Portolés).
E-mail addresses: portoles@quim.ucm.es (M.T. Portolés), arcosd@ucm.es (D. Arcos), vallet@ucm.es (M. Vallet-Regí).

In: Bioactive Glasses ISBN: 978-1-53618-337-5
Editors: D. Arcos and M. Vallet-Regí © 2020 Nova Science Publishers, Inc.

Chapter 8

CELL RESPONSES TO MESOPOROUS BIOACTIVE GLASSES

María Teresa Portolés** and Laura Casarrubios
Departamento de Bioquímica y Biología Molecular,
Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Complutense de Madrid,
Instituto de Investigación Sanitaria del Hospital Clínico San Carlos
(IdISSC), Madrid, Spain

ABSTRACT

Mesoporous bioactive glasses (MBGs) are bioceramics designed primarily to regenerate bone tissue due to their ability to form a layer of hydroxyapatite in contact with biological fluids and bind to surrounding bone tissue. In addition, their ordered mesoporous structure allows drugs, such as antiosteoporotic or antimicrobial agents, to be loaded inside their pores for the treatment of osteoporosis and bone infections, respectively. On the other hand, the ions released from MBGs stimulate the processes of osteogenesis and angiogenesis and can also regulate the immune response to these biomaterials. In this chapter, we expose the literature published to date on the cell responses to MBGs prepared in different

Colloids and Surfaces B: Biointerfaces 208 (2021) 112110

Contents lists available at ScienceDirect

Colloids and Surfaces B: Biointerfaces

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

Protocols

Response of RAW 264.7 and J774A.1 macrophages to particles and nanoparticles of a mesoporous bioactive glass: A comparative study

M.J. Feito [a,*], L. Casarrubios [a], M. Oñaderra [a], M. Gómez-Duro [a], P. Arribas [a], A. Polo-Montalvo [a], M. Vallet-Regí [b,c,**], D. Arcos [b,c], M.T. Portolés [a,c,**]

[a] Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Complutense de Madrid, Instituto de Investigación Sanitaria del Hospital Clínico San Carlos (IdISSC), 28040 Madrid, Spain
[b] Departamento de Química en Ciencias Farmacéuticas, Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid, Instituto de Investigación Sanitaria Hospital 12 de Octubre i+12, Plaza Ramón y Cajal s/n, 28040 Madrid, Spain
[c] CIBER de Bioingeniería, Biomateriales y Nanomedicina, CIBER-BBN, 28040 Madrid, Spain

ARTICLE INFO

Keywords:
Mesoporous bioactive glasses
Nanomaterials
Macrophages
Innate immune response
Biocompatibility
Cytokine

ABSTRACT

Mesoporous bioactive glasses (MBGs) are bioceramics designed to induce bone tissue regeneration and very useful materials with the ability to act as drug delivery systems. MBGs can be implanted in contact with bone tissue in different ways, as particulate material, in 3D scaffolds or as nanospheres. In this work, we assessed the effects of particles of mesoporous bioactive glass MBG-75S and mesoporous nanospheres NanoMBG-75S on RAW 264.7 and J774A.1 macrophages, which present different sensitivity and are considered as ideal models for the study of innate immune response. After evaluating several cellular parameters (morphology, size, complexity, proliferation, cell cycle and intracellular content of reactive oxygen species), the action of MBG-75S particles and NanoMBG-75S on the polarization of these macrophages towards the pro-inflammatory (M1) or reparative (M2) phenotype was determined by the expression of specific M1 (CD80) and M2 (CD206, CD163) markers. We previously measured the adsorption of albumin and fibrinogen on MBG-75S particles and the production of pro-inflammatory cytokines as TNF-α and IL-6 by macrophages in response to these particles. This comparative study demonstrates that particles of mesoporous bioactive glass MBG-75S and mesoporous nanospheres NanoMBG-75S allow the appropriated development and function of RAW 264.7 and J774A.1 macrophages and do not induce polarization towards the M1 pro-inflammatory phenotype. Therefore, considering that these mesoporous biomaterials offer the possibility of loading drugs into their pores, the results obtained indicate their high potential for use as drug-delivery systems in bone repair and osteoporosis treatments without triggering an adverse inflammatory response.

1. Introduction

The increase in life expectancy in modern societies highlights a higher prevalence of age-related bone diseases such as osteoporosis, bone cancer and bone infections [1]. Regarding biomaterials used for the repair of bone defects, these are implantable materials designed to contact with living tissues, trigger bone formation and produce an adequate immune response. In this context, the implantation of any biomaterial in the organism triggers different events, particularly, in the first stages after biomaterial-tissue contact, proteins from physiological fluids and blood adsorb to the biomaterial surface and activate the coagulation cascade, complement system, platelet adhesion as well as cells involved in the immune response [2,3]. Coagulation together with platelet adhesion and activation, constitute the main events in surface-induced thrombosis, which is the most critical limitation of biomaterials that may be in contact with blood [4]. Thrombosis is a multifactorial pathology, resulting from the interaction of multiple factors leading to an imbalance between the prothrombotic, anticoagulant and thrombolytic processes. Hypoalbuminemia is another factor related to hyperaggregability [5]. Fibrinogen, albumin, immunoglobulins, vitronectin and apolipoproteins are usually present in significant amounts on the adsorption surfaces of different biomaterials [6].

* Corresponding author.
** Corresponding authors at: CIBER de Bioingeniería, Biomateriales y Nanomedicina, CIBER-BBN, 28040 Madrid, Spain.
E-mail addresses: mjfeito@ucm.es (M.J. Feito), vallet@ucm.es (M. Vallet-Regí), portoles@quim.ucm.es (M.T. Portolés).

International Immunopharmacology 94 (2021) 107457

Contents lists available at ScienceDirect

International Immunopharmacology

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

Effects of mesoporous SiO_2-CaO nanospheres on the murine peritoneal macrophages/*Candida albicans* interface

R. Diez-Orejas [a,*], L. Casarrubios [b], M.J. Feito [b], J.M. Rojo [c], M. Vallet-Regí [d,e], D. Arcos [d,e], M. T. Portolés [b,e,*]

[a] Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid, 28040 Madrid, Spain
[b] Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Complutense de Madrid, Instituto de Investigación Sanitaria del Hospital Clínico San Carlos (IdISSC), 28040 Madrid, Spain
[c] Departamento de Medicina Celular y Molecular, Centro de Investigaciones Biológicas, CSIC, 28040 Madrid, Spain
[d] Departamento de Química en Ciencias Farmacéuticas, Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid, Instituto de Investigación Sanitaria Hospital 12 de Octubre i+12, Plaza Ramón y Cajal s/n, 28040 Madrid, Spain
[e] CIBER de Bioingeniería, Biomateriales y Nanomedicina, CIBER-BBN, Madrid, Spain

ARTICLEINFO

Keywords:
Mesoporous nanospheres
Macrophage
Candida albicans
Immune response
Nanomaterial
Phagocytosis

ABSTRACT

The use of nanoparticles for intracellular drug delivery could reduce the toxicity and side effects of the drug but, the uptake of these nanocarriers could induce adverse effects on cells and tissues after their incorporation. Macrophages play a central role in host defense and are responsible for *in vivo* nanoparticle trafficking. Assessment of their defense capacity against pathogenic micro-organisms after nanoparticle uptake, is necessary to prevent infections associated with nanoparticle therapies. In this study, the effects of hollow mesoporous SiO_2-CaO nanospheres labeled with fluorescein isothiocyanate (FITC-NanoMBGs) on the function of peritoneal macrophages was assessed by measuring their ability to phagocytize *Candida albicans* expressing a red fluorescent protein. Two macrophage/fungus ratios (MOI 1 and MOI 5) were used and two experimental strategies were carried out: a) pretreatment of macrophages with FITC-NanoMBGs and subsequent fungal infection; b) competition assays after simultaneous addition of fungus and nanospheres. Macrophage pro-inflammatory phenotype markers (CD80 expression and interleukin 6 secretion) were also evaluated. Significant decreases of $CD80^+$ macrophage percentage and interleukin 6 secretion were observed after 30 min, indicating that the simultaneous incorporation of NanoMBG and fungus favors the macrophage non-inflammatory phenotype. The present study evidences that the uptake of these nanospheres in all the studied conditions does not alter the macrophage function. Moreover, intracellular FITC-NanoMBGs induce a transitory increase of the fungal phagocytosis by macrophages at MOI 1 and after a short time of interaction. In the competition assays, as the intracellular fungus quantity increased, the intracellular FITC-NanoMBG content decreased in a MOI- and time-dependent manner. These results have confirmed that macrophages clearly distinguish between inert material and the live yeast in a dynamic intracellular incorporation. Furthermore, macrophage phagocytosis is a critical determinant to know their functional state and a valuable parameter to study the nanomaterial / macrophages / *Candida albicans* interface.

1. Introduction

Nanoparticles are currently designed for intracellular drug delivery in order to reduce the toxicity and side effects of the loaded drug to the patient. Silica-based mesoporous nanoparticles present high loading capacity within their pores and the possibility of modifying their surface to target the damaged tissues [1]. However, depending on the characteristics of these nanocarriers, their interaction with tissues and cells could induce adverse effects [2]. Thus, recent studies evidence that micro- and nanoparticles can produce immunosuppression that initially limits early inflammation but contributes later to fibrosis, cancer, and infection [3]. Macrophages are among the first cell types which take up nanoparticles [4–8] and they are primarily responsible for their trafficking *in vivo* [9,10]. These phagocytic cells play a central role in host

* Corresponding authors.
E-mail addresses: rosaliad@farm.ucm.es (R. Diez-Orejas), portoles@quim.ucm.es (M.T. Portolés).

International Journal of
Molecular Sciences

MDPI

Article

An Immunological Approach to the Biocompatibility of Mesoporous SiO_2-CaO Nanospheres

María Montes-Casado [1], Adrian Sanvicente [2], Laura Casarrubios [2], María José Feito [2], José M. Rojo [3], María Vallet-Regí [4,5], Daniel Arcos [4,5], Pilar Portolés [1,6,*] and María Teresa Portolés [2,*]

1 Centro Nacional de Microbiología, Instituto de Salud Carlos III, Majadahonda, 28220 Madrid, Spain; mmontes@isciii.es
2 Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Complutense de Madrid. Instituto de Investigación Sanitaria del Hospital Clínico San Carlos (IdISSC), 28040 Madrid, Spain; adriansanvicenteg@gmail.com (A.S.); laura.casarrubios.molina@gmail.com (L.C.); mjfeito@ucm.es (M.J.F.)
3 Departamento de Medicina Celular y Molecular, Centro de Investigaciones Biológicas, CSIC, 28040 Madrid, Spain; jmrojo@cib.csic.es
4 Departamento de Química en Ciencias Farmacéuticas, Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid, Instituto de Investigación Sanitaria Hospital 12 de Octubre i+12, Plaza Ramón y Cajal s/n, 28040 Madrid, Spain; vallet@ucm.es (M.V.-R.); arcosd@ucm.es (D.A.)
5 CIBER de Bioingeniería, Biomateriales y Nanomedicina, CIBER-BBN, 28040 Madrid, Spain
6 Presidencia, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, 28006 Madrid, Spain
* Correspondence: pportols@isciii.es (P.P.); portoles@quim.ucm.es (M.T.P.)

Received: 17 October 2020; Accepted: 3 November 2020; Published: 5 November 2020



Abstract: Mesoporous bioactive glass nanospheres (NanoMBGs) have high potential for clinical applications. However, the impact of these nanoparticles on the immune system needs to be addressed. In this study, the biocompatibility of SiO_2-CaO NanoMBGs was evaluated on different mouse immune cells, including spleen cells subsets, bone marrow-derived dendritic cells (BMDCs), or cell lines like SR.D10 Th2 $CD4^+$ lymphocytes and DC2.4 dendritic cells. Flow cytometry and confocal microscopy show that the nanoparticles were rapidly and efficiently taken up in vitro by T and B lymphocytes or by specialized antigen-presenting cells (APCs) like dendritic cells (DCs). Nanoparticles were not cytotoxic and had no effect on cell viability or proliferation under T-cell (anti-CD3) or B cell (LPS) stimuli. Besides, NanoMBGs did not affect the balance of spleen cell subsets, or the production of intracellular or secreted pro- and anti-inflammatory cytokines (TNF-α, IFN-γ, IL-2, IL-6, IL-10) by activated T, B, and dendritic cells (DC), as determined by flow cytometry and ELISA. T cell activation surface markers (CD25, CD69 and Induced Costimulator, ICOS) were not altered by NanoMBGs. Maturation of BMDCs or DC2.4 cells in vitro was not altered by NanoMBGs, as shown by expression of Major Histocompatibility Complex (MHC) and costimulatory molecules (CD40, CD80, CD86), or IL-6 secretion. The effect of wortmannin and chlorpromazine indicate a role for phosphoinositide 3-kinase (PI3K), actin and clathrin-dependent pathways in NanoMBG internalization. We thus demonstrate that these NanoMBGs are both non-toxic and non-inflammagenic for murine lymphoid cells and myeloid DCs despite their efficient intake by the cells.

Keywords: mesoporous bioactive glass; nanomaterial; T cell; B cell; dendritic cell; dendritic cell maturation; phosphoinositide 3-kinase PI3-K; ICOS; endocytosis

pharmaceutics

MDPI

Article

Effective Actions of Ion Release from Mesoporous Bioactive Glass and Macrophage Mediators on the Differentiation of Osteoprogenitor and Endothelial Progenitor Cells

Alberto Polo-Montalvo [1], Laura Casarrubios [1], María Concepción Serrano [2], Adrián Sanvicente [1], María José Feito [1], Daniel Arcos [3,4,*] and María Teresa Portolés [1,4,*]

[1] Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Complutense de Madrid, Instituto de Investigación Sanitaria del Hospital Clínico San Carlos (IdISSC), 28040 Madrid, Spain; albpolo@ucm.es (A.P.-M.); laura.casarrubios.molina@gmail.com (L.C.); adriansanvicenteg@gmail.com (A.S.); mjfeito@ucm.es (M.J.F.)

[2] Instituto de Ciencia de Materiales de Madrid (ICMM), Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), 28049 Madrid, Spain; mc.terradas@csic.es

[3] Departamento de Química en Ciencias Farmacéuticas, Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid, Instituto de Investigación Sanitaria Hospital 12 de Octubre i+12, Plaza Ramón y Cajal s/n, 28040 Madrid, Spain

[4] CIBER de Bioingeniería, Biomateriales y Nanomedicina, CIBER-BBN, 28040 Madrid, Spain

* Correspondence: arcosd@ucm.es (D.A.); portoles@quim.ucm.es (M.T.P.)

check ror updates

Citation: Polo-Montalvo, A.; Casarrubios, L.; Serrano, M.C.; Sanvicente, A.; Feito, M.J.; Arcos, D.; Portolés, M.T. Effective Actions of Ion Release from Mesoporous Bioactive Glass and Macrophage Mediators on the Differentiation of Osteoprogenitor and Endothelial Progenitor Cells. *Pharmaceutics* **2021**, *13*, 1152. https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13081152

Academic Editor: Patrizia Paolicelli

Received: 20 May 2021
Accepted: 23 July 2021
Published: 27 July 2021

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

Abstract: Due to their specific mesoporous structure and large surface area, mesoporous bioactive glasses (MBGs) possess both drug-delivery ability and effective ionic release to promote bone regeneration by stimulating osteogenesis and angiogenesis. Macrophages secrete mediators that can affect both processes, depending on their phenotype. In this work, the action of ion release from MBG-75S, with a molar composition of $75SiO_2$-$20CaO$-$5P_2O_5$, on osteogenesis and angiogenesis and the modulatory role of macrophages have been assessed in vitro with MC3T3-E1 pre-osteoblasts and endothelial progenitor cells (EPCs) in monoculture and in coculture with RAW 264.7 macrophages. Ca^{2+}, phosphorous, and silicon ions released from MBG-75S were measured in the culture medium during both differentiation processes. Alkaline phosphatase activity and matrix mineralization were quantified as the key markers of osteogenic differentiation in MC3T3-E1 cells. The expression of CD31, CD34, VEGFR2, eNOS, and vWF was evaluated to characterize the EPC differentiation into mature endothelial cells. Other cellular parameters analyzed included the cell size and complexity, intracellular calcium, and intracellular content of the reactive oxygen species. The results obtained indicate that the ions released by MBG-75S promote osteogenesis and angiogenesis in vitro, evidencing a macrophage inhibitory role in these processes and demonstrating the high potential of MBG-75S for the preparation of implants for bone regeneration.

Keywords: mesoporous bioactive glass; osteogenesis; angiogenesis; endothelial progenitor cells; pre-osteoblasts; macrophages

1. Introduction

Mesoporous bioactive glasses (MBGs) are bioceramics mainly designed for bone tissue repair because of their ability to mimic bone mineralization processes in contact with biological fluids, which allows them to bind to adjacent bone tissue [1]. Furthermore, the possibility of introducing drugs into the pores of these mesoporous materials, proved in pioneer work by Professor María Vallet-Regí 20 years ago, and the ability to tailor pore structure and textural properties at the nanoscale, results in a very precise control of the loading and release capabilities of different pharmaceuticals, such as anti-osteoporotic, antimicrobial, or antitumoral agents [2–4]. Since early studies by authors such as Vallet