

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE FARMACIA



TESIS DOCTORAL

**Diseño de biomateriales para regeneración ósea basados en
andamios y nanopartículas de vidrio mesoporoso enriquecidos
con zinc y/o osteostatina y células madre mesenquimales**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Clara Heras Rubio

Directores

Antonio Jesús Salinas Sánchez
Sandra Sánchez Salcedo

Madrid

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID



DISEÑO DE BIOMATERIALES PARA REGENERACIÓN
ÓSEA BASADOS EN ANDAMIOS Y
NANOPARTÍCULAS DE VIDRIO MESOPOROSO
ENRIQUECIDOS CON ZINC Y/O OSTEOSTATINA Y
CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES

DPTO. DE QUÍMICA EN CIENCIAS FARMACÉUTICAS

FACULTAD DE FARMACIA

CLARA HERAS RUBIO

DIRECTORES:

ANTONIO JESÚS SALINAS SÁNCHEZ

SANDRA SÁNCHEZ SALCEDO

MARZO, 2021

Agradecimientos

Recuerdo perfectamente mi primer día en el laboratorio. Llegué nerviosa, sin saber qué me iba a encontrar, pero decidida a causar una buena impresión y conseguir el trabajo que tanto deseaba.

Me enamoré de los laboratorios la primera vez que pisé uno y, aunque no sabía que esta gran aventura acabaría en una tesis, lo que sí sabía era que quería dedicarme a lo que me apasionaba: investigar.

Aquella primera entrevista de trabajo me la realizaron los que, hoy en día, son mis mentores y mi inspiración en algo tan apasionante como es la ciencia. Desde el primer día me ayudaron a hacerme las preguntas adecuadas, a no conformarme, a trabajar duro y a ir siempre un paso más allá. Sin ellos no habría superado mi primer día en el laboratorio y no sería hoy capaz de escribir estas palabras. Gracias a la Dra. Sandra Sánchez Salcedo y al Dr. Antonio Jesús Salinas Sánchez de todo corazón por acompañarme en cada paso del camino, apoyarme y ayudarme a dar lo mejor de mí. Ha habido momentos difíciles, como siempre los hay en todas las grandes historias, y puedo decir que gracias a vosotros he conseguido llegar tan lejos.

Gracias a la profesora María Vallet-Regí, ejemplo y admiración para todos los que consiguen hacerse un hueco a su lado, por confiar en mí y darme la oportunidad de formar parte de su Grupo de Investigación de un nivel tan alto como el suyo.

Gracias al proyecto FIS (Ref.: PI15/00978) por la financiación aportada, que ha hecho posible esta tesis doctoral. Al Hospital 12 de octubre por permitirme realizar mi estancia predoctoral y en concreto a las Dras. Ana Flores y Paz de la Torre por compartir conmigo este proceso con una sonrisa y por todo el apoyo y el cariño con el que me han tratado.

Como toda buena bióloga en un laboratorio químico, hoy puedo confesaros que me he sentido muchas veces como pez fuera del agua. En este punto entra a formar parte fundamental de la historia mi gran apoyo y guía científico Daniel Lozano. Gracias por hacerme emocionarme por la ciencia, por aportarle alegría a cada día y por hacerme creer en mí misma. Sin ti esto no habría sido posible.

Tras cuatro años de trabajo, puedo decir que he tenido la suerte de encontrarme con grandes compañeros y personas que han hecho mis días más agradables, me han regalado muchos momentos divertidos y también me han apoyado incondicionalmente en los momentos más difíciles.

Gracias a Javi, que llegaste más tarde y fuiste un regalo. Has sido un compañero y un amigo inigualable y gracias a ti mi día a día ha sido más

fácil. He encontrado en ti una amistad incondicional y no es algo que se pueda decir fácilmente. Gracias a Miguel Gisbert por muchos momentos ridículos que siempre hemos sido capaces de transformar en risas, conversaciones intensas sobre ciencia o cualquier otra cosa y por formar parte de mi vida todos estos años. Si existe alguien admirable en ciencia ese eres tú y siempre serás un ejemplo. Gracias a Elena por enseñarme a reírme de mi misma y hacer de cada comida o descanso para el café un momento que mantener en la memoria. Eres capaz de convertir lo cotidiano en especial y ese es un superpoder que no tienen muchos. Gracias a Manuel por ser capaz de escuchar y entender mis pensamientos y conflictos más complejos, por reflexionar juntos y hacer que eso sea fácil. Gracias a Anna por tu sonrisa perenne y toda la ayuda que me has brindado en esta etapa final tan complicada. Alegarnos la vida con donuts y dulces es un hábito que no debería perderse nunca. Gracias a Víctor por hacer de la queja un arte, por regalarme risas, música y ser una persona a la que siempre he podido acudir. Gracias a Carla por los momentos de desconexión que me has regalado mientras me dejas un huequito en la campana y por tantos cafés. Gracias a Nati por haber sido mi referente, por enseñarme con paciencia y por estar siempre dispuesta a ayudar. Gracias Miguel Manzano por todas las conversaciones que hemos compartido estos años: ciencia, familia, conflictos vitales e incluso deporte. Eres alguien que siempre consigue hacer que se disipen mis dudas. Gracias a Juan por ser la representación conque se que todo buen lugar de trabajo necesita, por tus bromas, tus consejos y tu buena compañía. Gracias a Rafa por haber sido siempre de gran ayuda en la ciencia y por involucrarte en mis problemas y necesidades de forma absoluta e incondicional. Gracias a Jose por ayudarme tanto y ser capaz de resolver cualquier problema informático (o no tan informático) que te planteara. Gracias a Ana Fontecha, Blanca, Isabel, Viki y Dani Arcos por ser siempre un punto de apoyo y ayuda, por tener paciencia conmigo y enseñarme día a día un poco más de ciencia. Gracias a Ana por ser mi compañera y confidente en el 206. Porque las horas entre bacterias han sido menos solitarias sabiendo que tu estabas ahí conmigo. Gracias a Juan Carlos Doadrio por haberme dado la bienvenida al laboratorio, por acompañarme durante largas horas triturando y tamizando vidrios y por llenar esos momentos con humor. Por último, gracias a Rebeca. Gracias a tu trabajo y tu legado yo he sido capaz de estar aquí.

Quiero también agradecer a los compañeros del Hospital 12 de octubre y del Miguel Servet su colaboración y trabajo durante todos estos años. Juntos hemos conseguido llevar a cabo un proyecto realmente bonito.

Además de contar con mi entorno laboral, mi entorno familiar ha sido imprescindible durante estos años. Podría decirse que soy una persona que no sabe vivir sin los suyos y eso debe ser por algo. Mis padres siempre me han transmitido lo importante que es dedicarte a lo que te hace feliz y han estado recordándomelo durante todos estos años. Los he visto sufrir con mis días malos, alegrarse por mis logros y compartir mis alegrías. Los he visto interesarse de forma absolutamente sincera por un campo que desconocen y escucharme hablar durante horas de pequeños detalles que, para mí, eran importantes. Me han cuestionado lo que yo tomaba por verdadero, haciendo que me replanteara cada paso e impulsándome a ser mejor. Se que tanto como en esto, como en cualquier otra cosa que decida hacer, vais a estar conmigo de corazón y eso es algo que no se puede explicar con palabras. Además, tengo la inmensa suerte de contar con la mejor amiga, compañera y confidente, mi hermana Marina. Simplemente, no podría imaginarme embarcarme en ningún tipo de aventura o proyecto sin tenerla a ella a mi lado. Es capaz de escucharme hablar durante horas de todas mis preocupaciones, miedos, celebrar los pequeños logros de cada día, venir a comer conmigo al laboratorio para conocer aquello de lo que tanto hablo o incluso de acompañarme a trabajar los fines de semana que he tenido que trabajar en algún experimento. Ella es, definitivamente, mi motivación, mi ejemplo a seguir y mi alegría diaria. Soy consciente de que hablo constantemente de ella, así que nadie va a sorprenderse al leer estas líneas.

Además de los tres grandes pilares que tengo en casa, he tenido la suerte de compartir esta experiencia con mucha otra gente maravillosa que me ha acompañado y apoyado en todo momento. Por ello, quiero dar las gracias a mis amigas, que son capaces de entender la importancia de los pequeños detalles de mi día a día, hacerme volver a confiar en mí misma siempre y creer que yo puedo conseguir lo que me proponga. A Raúl, por nuestras largas charlas sobre temas serios o sobre cualquier pequeña anécdota del día a día. Gracias por tratarme siempre con cariño y paciencia y hacer que los grandes retos parezcan fáciles. A mis tíos y mis primas Mario, Eva, Blanca y Sara, que siempre han sido y serán mi referencia, mi alegría y mi ejemplo a seguir. A mis abuelos y tías que son y serán siempre mi mayor motivación, mi alegría y las personas en las que pienso al final de un día malo. A Sira, Azu, Conchi, Carlota y Pili, habéis sido mi segunda familia y no puedo sentirme más afortunada por ello. A la maravillosa gente de bioquímica que me acogió como si llegara a casa desde el primer día y que tantas veces me han escuchado y aconsejado. Gracias a todos y cada uno de vosotros porque este logro también es vuestro.

A mis mayores: Araceli, Vicenta, Paco y Maritere.

*Sin vuestros ejemplos y vuestra lucha, yo no habría sido capaz
de poder dedicarme a lo que me gusta.*

INDICE

I. RESUMEN.....	II
II. ABSTRACT.....	V
III. ABREVIATURAS Y SIGLAS.....	VIII
IV. NOMENCLATURA, FORMA Y COMPOSICIÓN DE LOS MATERIALES OBTENIDOS	XI
1. INTRODUCCIÓN	2
1.1.El esqueleto y su importancia en el organismo	2
1.1.1. Tipos celulares del tejido óseo	5
1.1.2. Formación del tejido óseo.....	6
1.1.3. Remodelado óseo	7
1.2.Incidencia de las enfermedades óseas.....	11
1.3.Biomateriales para la regeneración de hueso	13
1.3.1. Evolución de los biomateriales en base sílice.....	15
1.3.2. Vidrios Mesoporosos Bioactivos, MBGs.....	18
1.3.3. Andamios tridimensionales de MBG	20
1.4.Procesos de infección en un escenario de regeneración ósea.....	25
1.4.1. Cepas bacterianas comunes en infección ósea	26
1.4.2. Biopelícula o biofilm: formación e importancia	28
1.5.Aumento de la capacidad terapéutica de los MBGs.....	30
1.5.1. Dopaje con iones metálicos. El zinc.....	31
1.5.2. Biomoléculas osteogénicas. La osteostatina	35
1.5.3. Células madre mesenquimales	38
1.5.4. Fármacos convencionales para tratar la infección ósea	42
1.5.5. Sustancias antibacterianas alternativas. La curcumina.....	45
1.6.Nanopartículas de Vidrio Mesoporoso	47
1.6.1. Proceso de síntesis adaptable. Método Stöber.....	48
1.6.2. Morfología y composición	50
1.6.3. Nanopartículas como transportadores	53
2. OBJETIVOS	56
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	58
3.1.Discos de Vidrio Mesoporoso Bioactivo: $\text{SiO}_2\text{-P}_2\text{O}_5\text{-CaO-ZnO}$	58
3.1.1. Síntesis y caracterización fisicoquímica.....	58

3.1.1.1.	Polvos de MBG	59
3.1.1.2.	Discos de MBG.....	64
3.1.2.	Ensayos <i>in vitro</i>	66
3.1.2.1.	Carga y liberación de osteostatina en discos de MBG	66
3.1.2.2.	Bioactividad en fluido biológico simulado, SBF	69
3.1.2.3.	Liberación de iones en medio completo	71
3.1.2.4.	Citocompatibilidad con células preosteoblásticas MC3T3–E1	72
3.1.3.	Conclusiones: discos de MBG	76
3.2.	Andamios tridimensionales de MBG para regeneración ósea	77
3.2.1.	Fabricación de los andamios	77
3.2.2.	Caracterización fisicoquímica de los andamios	79
3.2.3.	Ensayos <i>in vitro</i>	90
3.2.3.1.	Carga y liberación de osteostatina en andamios de MBG	90
3.2.3.2.	Citocompatibilidad con células madre mesenquimales	92
3.2.4.	Conclusiones: andamios de MBG para regeneración ósea	98
3.3.	Andamios tridimensionales de MBG para infección	100
3.3.1.	Síntesis y caracterización fisicoquímica de los andamios	101
3.3.2.	Ensayos <i>in vitro</i>	101
3.3.2.1.	Liberación de iones en medio de cultivo bacteriano, THB	101
3.3.2.2.	Carga de levofloxacino, vancomicina, rifampicina o gentamicina	102
3.3.2.3.	Modelado de la interacción entre los fármacos y la matriz	103
3.3.2.4.	Liberación de los fármacos	106
3.3.2.5.	Cultivos bacterianos con <i>S. aureus</i> y <i>E. coli</i>	108
3.3.3.	Conclusiones: andamios de MBG para infección	116
3.4.	Andamios tridimensionales de MBG para regeneración ósea <i>in vivo</i>.....	118
3.4.1.	Elaboración de las distintas series de materiales a implantar.....	119
3.4.2.	Modelo de defecto en fémur de conejo	121
3.4.3.	Modelo de defecto en cúbito de conejo.....	126
3.4.4.	Conclusiones: andamios de MBG <i>in vivo</i>	132
3.5.	Nanopartículas de vidrio mesoporoso	133
3.5.1.	Síntesis y caracterización fisicoquímica de las nanopartículas	134
3.5.2.	Carga y liberación de la curcumina	141
3.5.3.	Ensayos <i>in vitro</i>	143
3.5.3.1.	Citocompatibilidad.....	143

3.5.3.1.1. Células preosteoblásticas MC3T3–E1	143
3.5.3.1.2. Células madre mesenquimales	148
3.5.3.2. Cultivos bacterianos con <i>S. aureus</i>	155
3.5.4. Conclusiones: nanopartículas de vidrio mesoporoso	159
4. CONCLUSIONES	161
5. ANEXO I: Materiales y métodos	166
5.1. Biomateriales estudiados.....	166
5.1.1. Vidrios mesoporosos bioactivos.....	166
5.1.2. Nanopartículas de vidrio mesoporoso	172
5.2. Estudios <i>in vitro</i>	175
5.2.1. Discos de MBG.....	175
5.2.2. Andamios de MBG.....	180
5.2.3. Nanopartículas de vidrio mesoporoso	188
5.3. Ensayos <i>in vivo</i>	194
5.3.1. Modelo de defecto en fémur.....	195
5.3.2. Modelo de defecto en cúbito	197
6. ANEXO II: Resultados derivados de la tesis	201
7. BIBLIOGRAFÍA	204

RESUMEN

I. RESUMEN

El sistema esquelético es una parte esencial del organismo y está formado por los huesos. Cada hueso constituye un órgano en sí mismo, formado por distintos tejidos que se interrelacionan para conseguir que el sistema funcione correctamente. Cada uno de los huesos sufre un proceso constante de formación-resorción que debe mantenerse en equilibrio para el buen funcionamiento del sistema.

La integridad y funcionamiento del sistema esquelético comienza a degenerar, lenta y progresivamente a partir de los 30 años. La sociedad actual, cada vez más envejecida, presenta de forma recurrente problemas óseos, distintos tipos de patologías y/o fracturas que necesitan ser tratadas de la forma más efectiva posible. El patrón oro en el campo de los injertos óseos es el autoinjerto. Este abordaje presenta grandes ventajas, aunque también inconvenientes que es importante solventar. Por ello, la ingeniería de tejidos trabaja para encontrar nuevos modelos de sustitutos óseos que sean capaces de tratar distintas patologías y fracturas, sin la problemática asociada a los autoinjertos. Esta rama de la bioingeniería se basa en la combinación de células, métodos de ingeniería de materiales, bioquímica y fisicoquímica, para mejorar o reemplazar funciones biológicas. En los últimos años, han surgido diferentes biomateriales que parecen reunir las características necesarias para abordar este problema. Entre ellos, destacan los vidrios mesoporosos bioactivos (MBGs).

En este estudio, se proponen dos sistemas para abordar la problemática de la regeneración ósea. En ambos casos se utiliza un material base de vidrio mesoporoso en forma de andamio tridimensional meso-macroporoso o de nanopartículas. Estos se dopan con el ion metálico zinc, con propiedades osteogénicas y bactericidas, y se cargan con distintas biomoléculas como la osteostatina (OST), pentapéptido osteogénico, la curcumina, molécula antibacteriana, y/o se combinan con distintos antibióticos como levofloxacino, vancomicina, gentamicina o rifampicina.

Estos sistemas se evalúan *in vitro* con células preosteoblásticas de ratón MC3T3-E1 y con células madre mesenquimales (MSCs) humanas o de conejo, para estudiar su citocompatibilidad y capacidad osteogénica. Así

mismo, se prueban *in vitro* con distintos modelos bacterianos para comprobar su capacidad antibacteriana.

A través de estos ensayos se comprueba que cuando se combina el material dopado con zinc y la osteostatina, se genera un efecto osteogénico sinérgico capaz de promover la diferenciación de las células MC3T3–E1 y las MSCs. Por otra parte, se consigue disminuir la cantidad de fármaco empleada para inhibir el crecimiento bacteriano en los modelos de infección de *S. aureus* y *E. coli* hasta la mínima inhibitoria, ya que combinada con el zinc y actuando de forma sinérgica, es suficiente para inhibir el crecimiento de estas bacterias. Por último, se comprueba que se pueden emplear técnicas antibacterianas alternativas al tratamiento convencional con fármacos ya que, al combinar la curcumina con zinc, se genera un efecto sinérgico que consigue inhibir el crecimiento planctónico de *S. aureus*.

Además, se realizan ensayos *in vivo* con los andamios de MBG implantados en conejos de Nueva Zelanda. Los resultados muestran que los andamios de MBG, dopados con óxido de zinc al 4% (4ZN), cargados con osteostatina (4ZN–OST) y decorados con células madre mesenquimales (4ZN–OST–MSC), consiguen regenerar los defectos óseos generados, observándose una degradación paulatina del implante que es sustituido por tejido óseo de nueva formación.

Como conclusión, se puede confirmar, tanto *in vitro* como *in vivo*, la acción osteogénica de los materiales de MBG dopados con zinc, cargados con osteostatina y decorados con células madre mesenquimales. Además, se puede corroborar la acción osteogénica sinérgica entre el zinc, la osteostatina y las células madre. Por otra parte, la concentración mínima inhibitoria de los antibióticos junto con el zinc es suficiente para inhibir el crecimiento bacteriano y, además, la combinación de zinc y curcumina muestra resultados antibacterianos positivos siendo capaces de inhibir a *S. aureus*. En definitiva, los materiales estudiados muestran resultados prometedores y podrían llegar a ser una herramienta terapéutica muy potente en medicina regenerativa e ingeniería de tejidos.

ABSTRACT

II. ABSTRACT

The skeletal system is an essential part of the body and is formed by bones. Each bone constitutes an organ formed by different tissues that interrelate to make the system work properly. Each bone that makes up the organism, undergoes a constant process of formation–resorption, which must be kept in balance for the system to function properly.

The integrity and functioning of the skeletal system begin to degenerate, slowly and progressively from the age of 30. Today's society, which is becoming progressively older, presents bone problems, in an increasingly recurring manner, such as different types of pathologies and/or fractures, which need to be treated as effectively as possible.

The gold standard in the field of bone grafting is autografting. This approach has great advantages, but also important disadvantages which are important to solve. For this reason, tissue engineering works with the aim of finding the appropriate bone substitute, which can treat different pathologies and fractures, without the problem of autografting. In recent years, different biomaterials have emerged that seem to have the necessary characteristics to solve this problem. Among them, some stand out such as mesoporous bioactive glasses.

In this study, two different systems are proposed to address the problem of bone regeneration. In both, a base of mesoporous glass, in form of three-dimensional mesomacroporous scaffolds or nanoparticles, is doped with the metal ion zinc, which provides osteogenic and bactericidal properties to the material, and is charged with different biomolecules as osteostatin (OST), osteogenic pentapeptide, curcumin, with antibacterial properties, and/or different antibiotics like levofloxacin, vancomycin, gentamicin or rifampicin.

These systems were tested *in vitro* with different cell types, such as MC3T3–E1 preosteoblastic cells or human or rabbit mesenchymal stem cells (MSCs), to study its cytocompatibility and osteogenic capacity. Systems were also tested *in vitro* to study its antibacterial capacity with the model strains *S. aureus* and *E. coli*.

Finally, it is proven that the combination of zinc and osteostatin develops synergistic osteogenic effect able to promote differentiation of MC3T3-E1 cells and MSCs. In addition, the amount of antibiotic loaded into the scaffolds to inhibit bacterial growth in *S. aureus* and *E. coli* infection models is reduced to the minimum inhibitory, since combined with zinc it is sufficient to inhibit the growth of these bacteria. Finally, it has been observed that alternative techniques to conventional treatment with antibiotics can be used, since the inhibitory power of curcumin loaded into the nanoparticles has been proven, which, in combination with zinc, also manages to inhibit the planktonic growth of *S. aureus*.

Moreover, several *in vivo* studies were carried out with the MBG scaffolds in New Zealand rabbits to test their osteogenic capacity. *In vivo* results showed that mesoporous bioactive glass scaffolds, doped with 4% ZnO (4ZN), charged with osteostatin (4ZN-OST) and decorated with mesenchymal stem cells (4ZN-OST-MSC), manage to regenerate the generated bone defects, observing a gradual degradation of the implant that is replaced by newly formed bone tissue.

In conclusion, the osteogenic effect of zinc-doped materials, loaded with osteostatin and decorated with mesenchymal stem cells, can be confirmed *in vitro* and *in vivo*. In addition, it can be confirmed that a synergistic relationship is established between zinc, osteostatin and stem cells, so that when combined the osteogenic action is significantly superior. Moreover, the minimum inhibitory concentration of the antibiotics together with zinc was sufficient to inhibit bacterial growth. In addition, the combination of zinc and curcumin in the nanoparticles, showed positive osteogenic effect and antibacterial results being able to inhibit *S. aureus*.

In short, the materials studied throughout this thesis show very promising results and could become a powerful therapeutic tool in the field of regenerative medicine and tissue engineering.

ABREVIATURAS Y SIGLAS

III. ABREVIATURAS Y SIGLAS

- ACP: fosfato de calcio amorfo
- agr: gen accesorio regulador
- α -MEM: Gibco Minimum Essential Media
- ALP: fosfatasa alcalina
- APTS: 3-aminopropiltietoxisilano
- BET: método Brunauer-Emmett-Teller
- bFGF: RNAm del factor de crecimiento de fibroblastos básicos
- BJH: método Barrett-Joyner-Halenda
- BLI: imágenes de bioluminiscencia
- BMP2: proteína morfogénica ósea 2
- BSA: albúmina de suero bovino
- BV / TV: volumen óseo formado por volumen total de hueso en %
- CFUs: unidades formadoras de colonias
- cmc: concentración micelar crítica
- CHN: análisis elemental de carbono hidrógeno y nitrógeno
- CTAB: bromuro de hexadecil trimetilamonio
- CXCR4: receptor de quimiocinas tipo 4
- DAPI: dihidrocloruro de 2-(4-amidinofenil)-6-indolecarbamidina
- DCM: diclorometano
- DLS: dispersión de luz dinámica
- DMEM: medio de cultivo Dulbecco's Modified Eagle's
- DMO: densidad mineral ósea
- DNA: ácido desoxirribonucleico
- cDNA: ácido desoxirribonucleico complementario
- D_p: diámetro de poro
- DXA: absorciometría de rayos X de doble energía
- *E. coli*: *Escherichia coli*
- EDX: espectroscopía de dispersión de rayos X
- EISA: autoensamblaje por evaporación inducida
- ERK: vía de señalización extracelular regulada por quinasas
- ESCs: células madre embrionarias
- ExPEC: *E. coli* patogénicas extraintestinales

- **FTIR:** la espectroscopía infrarroja transformada de Fourier
- **GENTA:** gentamicina
- **GVHD:** enfermedad de injerto contra huésped
- **HCA:** hidroxicarbonatoapatita
- **ICM:** masa celular interna
- **ICP–OES:** espectroscopía de masas de plasmas
- **(IGF)–1:** factor de crecimiento similar a la insulina
- **iPSCs:** células madre pluripotentes inducidas
- **IRS:** receptor de insulina
- **LDH:** lactato deshidrogenasa
- **LEVO:** levofloxacino
- **MBGs:** vidrios mesoporosos bioactivos
- **MC3T3–E1:** línea celular de células preosteoblásticas de ratón
- **MGNs:** nanopartículas de vidrio mesoporoso
- **MIC:** concentración mínima inhibitoria
- **mLIF:** factor inhibidor de la leucemia murina
- **MMP:** metaloproteasas de la matriz celular
- **MSCs:** células madre mesenquimales
- **MSCBM:** medio basal para células madre mesenquimales
- **NBO:** oxígenos no enlazantes
- **NMR:** resonancia magnética nuclear
- **OMS:** Organización Mundial de la Salud
- **OPG:** osteoprotegerina
- **OST:** osteostatina
- **OSX:** osterix
- **PCL:** policaprolactona
- **PET:** tomografía de emisión de positrones
- **PTH:** parathormona
- **PTHr1:** receptor 1 de la parathormona
- **PTHrP:** proteína relacionada con la parathormona
- **RANK:** receptor activador para el factor nuclear κ B
- **RANKL:** ligando de receptor activador para el factor nuclear κ B
- **RIFAM:** rifampicina
- **RNA:** ácido ribonucleico

- **RNA_m**: ácido ribonucleico mensajero
- **rpoB**: gen para la subunidad β de la RNA polimerasa bacteriana
- **Runx2**: factor de transcripción 2 relacionado con RUNT
- ***S. aureus***: *Staphylococcus aureus*
- **SA-XRD**: difracción de rayos X de bajo ángulo
- **S_{BET}**: área de superficie específica
- **SBF**: fluido biológico simulado
- **SEM**: microscopía electrónica de barrido
- **SPECT**: tomografía de emisión de fotón único
- **TEM**: microscopía electrónica de transmisión
- **TEOS**: tetraetil ortosilicato
- **TEP**: trietil fosfato
- **TG**: tricromo de Masson–Goldner
- **TGA**: termogravimetría
- **TGF- β** : factor de transcripción β
- **THB**: medio de cultivo bacteriano Todd Hewitt Broth
- **TMS**: tetrametilsilano
- **TRAP**: fosfatasa ácida resistente al tartrato
- **UMRs**: unidades multicelulares de remodelado óseo
- **VEGF**: factor de crecimiento endotelial vascular
- **VEGFR-2**: receptor 2 del VEGF
- **VANCO**: vancomicina
- **V_p**: volumen de poros
- **VK**: Von Kossa
- **ZnO**: óxido de zinc

Se ha optado por siglas y abreviaturas en inglés, a pesar de que la tesis está escrita en español, para facilitar la comprensión de algunos términos que se utilizan, de forma habitual, en inglés.

IV. NOMENCLATURA, FORMA Y COMPOSICIÓN DE LOS MATERIALES OBTENIDOS

Tabla I. Materiales sintetizados a lo largo de la tesis, forma, composición, biomoléculas cargadas y sección de la tesis en la que se encuentran.

Material	Forma	Composición (%)	Biomoléculas cargadas	Sección de la tesis
BL	Polvo/disco	80SiO ₂ -15P ₂ O ₅ -5CaO	Osteostatina	3.1
4ZN	Polvo/disco	77SiO ₂ -14.4P ₂ O ₅ -4.8CaO-4ZnO	Osteostatina	3.1
5ZN	Polvo/disco	76SiO ₂ -14.3P ₂ O ₅ -4.8CaO-5ZnO	Osteostatina	3.1
BL-GE	Andamio meso-macroporoso recubierto con gelatina	80SiO ₂ -15P ₂ O ₅ -5CaO	Osteostatina	3.2/3.4
4ZN-GE	Andamio meso-macroporoso recubierto con gelatina	77SiO ₂ -14.4P ₂ O ₅ -4.8CaO-4ZnO	Osteostatina	3.2/3.4
5ZN-GE	Andamio meso-macroporoso recubierto con gelatina	76SiO ₂ -14.3P ₂ O ₅ -4.8CaO-5ZnO	Osteostatina	3.2
BL-GE	Andamio meso-macroporoso recubierto con gelatina	80SiO ₂ -15P ₂ O ₅ -5CaO	levofloxacino, vancomicina, rifampicina o gentamicina	3.3
4ZN-GE	Andamio meso-macroporoso recubierto con gelatina	77SiO ₂ -14.4P ₂ O ₅ -4.8CaO-4ZnO	levofloxacino, vancomicina, rifampicina o gentamicina	3.3
MGN ₁	Nanopartícula	60SiO ₂ -4P ₂ O ₅ -36CaO	Curcumina	3.5
MGN ₁ -2ZN	Nanopartícula	60SiO ₂ -4P ₂ O ₅ -33.5CaO-2.5ZnO	Curcumina	3.5
MGN ₁ -4ZN	Nanopartícula	60SiO ₂ -4P ₂ O ₅ -32CaO-4ZnO	Curcumina	3.5
MGN ₂	Nanopartícula	79.5SiO ₂ -2.5P ₂ O ₅ -18CaO	Curcumina	3.5
MGN ₂ -2ZN	Nanopartícula	79.5SiO ₂ -2.5P ₂ O ₅ -15.5CaO-2.5ZnO	Curcumina	3.5
MGN ₂ -4ZN	Nanopartícula	79SiO ₂ -2.5P ₂ O ₅ -14CaO-4ZnO	Curcumina	3.5

INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

1.1. El esqueleto y su importancia en el organismo

El esqueleto es un sistema dinámico formado por huesos. Cada hueso que conforma el esqueleto es un órgano en sí mismo, formado por distintos tejidos: óseo, cartilaginoso, conectivo, epitelial, médula ósea, adiposo y nervioso [1].

El sistema esquelético cumple una serie de funciones esenciales para el organismo:

- **Mecánica o de soporte**, siendo el lugar donde se localizan las inserciones musculares gracias a las cuales puede llevarse a cabo la locomoción.
- **Protectora** de órganos internos vitales y médula ósea.
- **Metabólica**, actuando como reserva de iones. El fósforo y el calcio son dos de los iones más importantes. A través del sistema esquelético se mantiene la homeostasis del organismo, esencial para la vida.
- **Producción de células** sanguíneas en la médula ósea roja a través de la hematopoyesis.
- **Almacenamiento de triglicéridos** mediante el reemplazamiento de médula ósea roja por médula ósea amarilla con alto contenido de adipocitos.

El hueso está compuesto de una matriz extracelular que es capaz de mineralizarse y producir células especializadas [1]. La matriz ósea posee una fase orgánica y una fase inorgánica. La fase orgánica (figura 1), que representa en torno al 20% de la masa ósea, está compuesta principalmente por colágeno de tipo I, que constituye un 90 % de las proteínas totales, y un 10% restante de proteínas no colágenas como la fibronectina o los proteoglicanos. Entre estas proteínas no colágenas destacan algunas con funciones metabólicas importantes como la osteocalcina, marcador de maduración osteoblástica, y la osteopontina, implicada en los procesos de mineralización y resorción de la matriz ósea, así como en la adherencia de los osteoclastos al hueso. Esta fase es sintetizada por las células formadoras de hueso (osteoblastos) y proporciona flexibilidad al hueso.

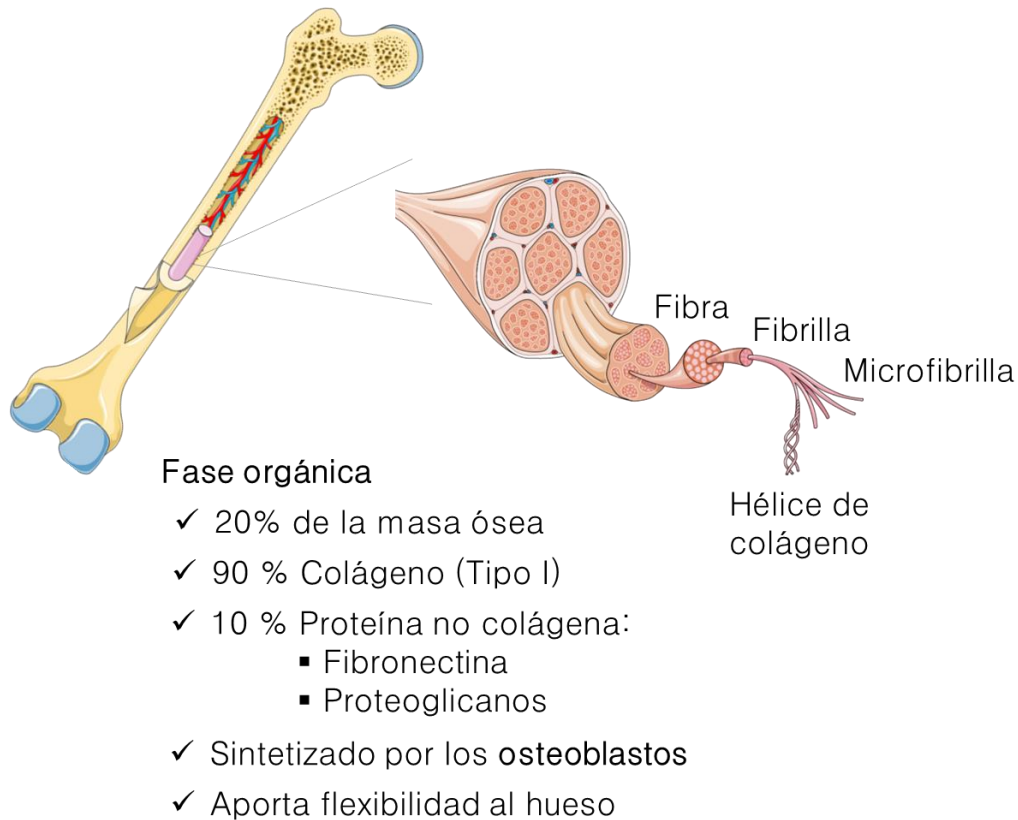


Figura 1. Esquema de la composición de la fase orgánica del hueso.

La fase inorgánica (figura 2), que representa aproximadamente un 70% de la masa ósea, constituye la principal reserva mineral del organismo. La fase mineral más abundante es la carbonatohidroxiapatita nanocristalina, que se puede representar como $\text{Ca}_{10-x}(\text{PO}_4)_{6-x}(\text{HPO}_4, \text{CO}_3)_x(\text{OH})_2$. Como puede observarse en la figura 2, la fase apatita de los huesos es muy diferente a la hidroxiapatita estequiométrica ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$), la cual presenta gran tamaño de cristal y una relación molar Ca/P de 1.67. Frente a ello, la apatita del hueso es nanocristalina (25 nm), deficiente en calcio (ratio de $\text{Ca}/\text{P} < 1.67$) [2], contiene iones HPO_4^{2-} y CO_3^{2-} en una proporción superior al 4%, por lo que juegan un importante papel en su solubilidad, e incluye otras sustituciones de iones tales como Na^+ , Mg^{2+} , F^- y vacantes (representado por $\square$) en su estequiometría [3].

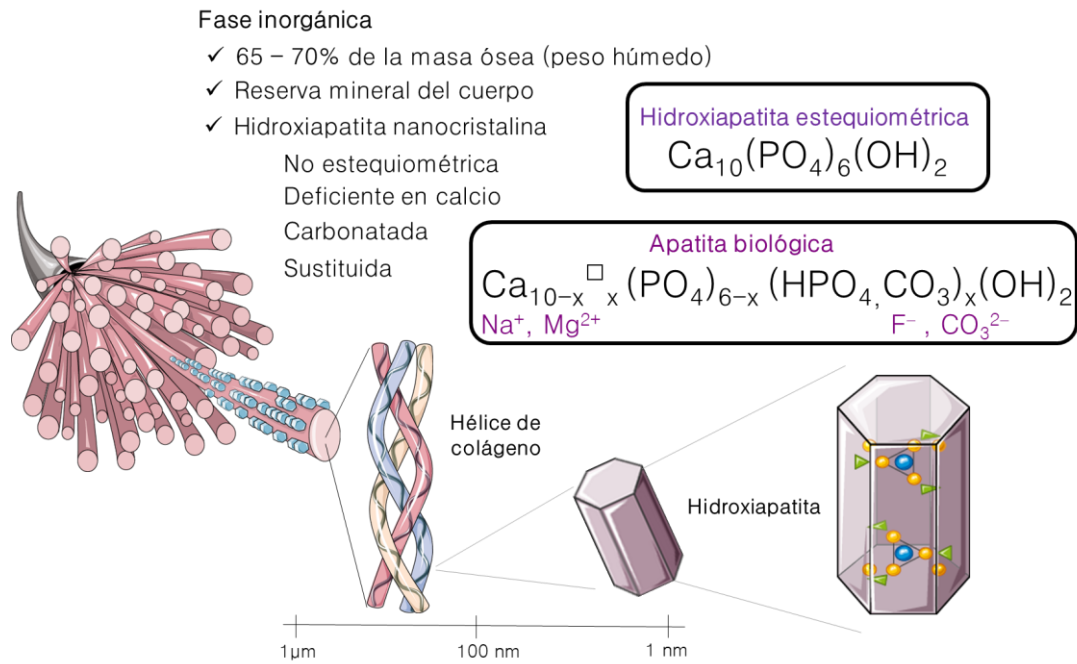


Figura 2. Esquema de la composición de la fase inorgánica del hueso.

Existen dos tipos de hueso, diferenciados en base a la disposición espacial de sus cristales y sus fibras de colágeno (figura 3). El **hueso lamelar o compacto**, formado por unidades de seis fibras de colágeno antiparalelas, mineralizadas y con gran resistencia mecánica. El **hueso no lamelar o esponjoso**, formado por fibras de colágeno menos organizadas [4].

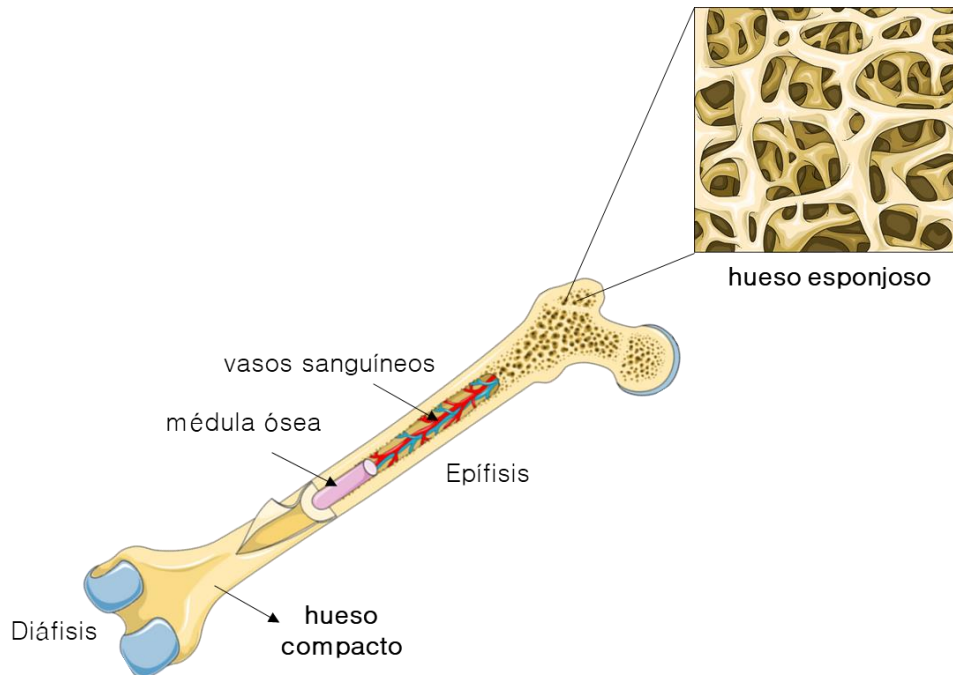


Figura 3. Esquema morfológico de hueso largo en el que se observa hueso esponjoso y compacto, así como la médula ósea y la vascularización presente en el tejido óseo.

Ambos tipos de hueso están compuestos por los mismos tipos celulares y los mismos elementos de matriz. Sin embargo, presentan diferencias en cuanto a su estructura y función (figura 4). El hueso compacto está calcificado entre un 80 y un 90%, desempeñando funciones mecánicas, mientras que el hueso esponjoso presenta únicamente de un 15 a un 25% de calcificación, desempeñando funciones metabólicas. El resto del tejido óseo está constituido por médula ósea, vasos sanguíneos y tejido conjuntivo [3].

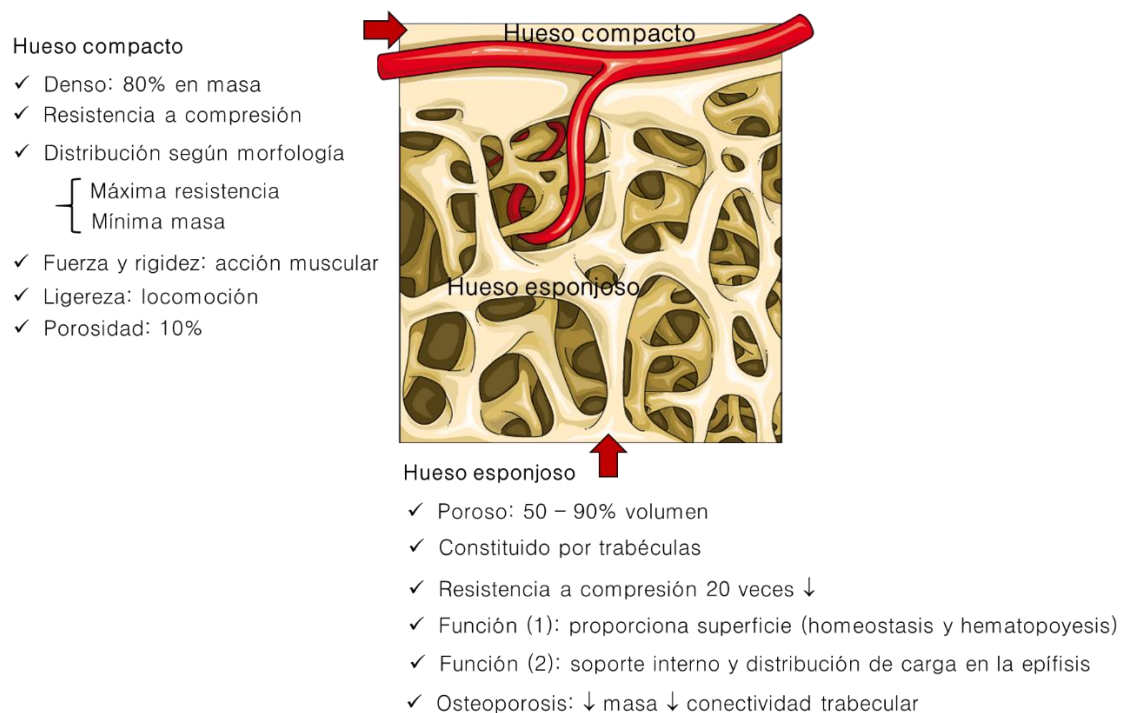


Figura 4. Estructura y funciones del tejido óseo según sea compacto o esponjoso.

Cuando se produce una lesión en el tejido óseo, el proceso de reparación comienza con la formación de tejido óseo esponjoso que, posteriormente, es sustituido por tejido óseo compacto.

1.1.1. Tipos celulares del tejido óseo

Es importante conocer la histología del tejido óseo para saber cómo funcionan ciertos procesos, como su crecimiento y reparación. El tejido óseo está formado por distintos tipos de células, cada una con una función específica.

- **Osteoclastos:** procedentes de precursores del linaje celular monocito macrófago. Son células multinucleadas que se encargan de resorber el hueso, tanto la matriz como la parte mineral. Mediante microscopía electrónica se observa su morfología irregular, con citoplasma acidófilo, zona perimetral estriada por la que se unen al hueso y tinción positiva para la fosfatasa ácida resistente al tartrato (TRAP) [5].
- **Osteoblastos:** son células de origen mesenquimal que se encargan de sintetizar proteínas de la matriz (principalmente colágeno tipo I y fosfatasa alcalina, que es una enzima implicada en procesos de mineralización), así como multitud de factores de crecimiento y citoquinas que se acumulan en la matriz. Se localizan en las zonas de resorción y cuando no son activos metabólicamente se asocian a la superficie ósea actuando como células de revestimiento [6].
- **Osteocitos:** células de la línea osteoblástica que se organizan en el interior de pequeñas lagunas de la matriz mineralizada. Son el tipo celular óseo más abundante en el hueso maduro. Presentan prolongaciones citoplasmáticas que se extienden a través de canalículos formando una red interconectada mediante uniones intercelulares GAP o en hendidura que se extienden por la superficie ósea. Estas son las células responsables de la producción de esclerostina, proteína implicada en la regulación de la formación ósea [7].

1.1.2. Formación del tejido óseo

Existen dos procesos distintos que se llevan a cabo en el crecimiento y desarrollo del hueso. El proceso de osificación intramembranosa que se produce en huesos planos y huesos largos, y el proceso de osificación endocondral, que ocurre únicamente en huesos largos.

- **Osificación intramembranosa:** bajo la influencia de factores de crecimiento locales, las células mesenquimales se condensan en zonas vascularizadas de tejido conjuntivo embrionario, donde proliferan y se diferencian a preosteoblastos y osteoblastos.
- **Osificación endocondral:** se produce a partir de las células mesenquimales que se diferencian formando cartílago rudimentario sin vasos sanguíneos. Posteriormente, bajo la influencia del factor de

crecimiento endotelial vascular (VEGF), los vasos sanguíneos penetran en el tejido cartilaginoso proporcionando riego sanguíneo y provocando que se genere la médula ósea hematopoyética. Entonces, los condrocitos hipertróficos se degradan por la acción de los condrocitos, se reemplazan por médula ósea y, posteriormente, por hueso mineralizado. A medida que avanza este proceso en las proximidades de los extremos del hueso (epífisis), se va formando una zona de cartílago proliferante conocido como placa de crecimiento metafisaria. A lo largo del proceso, se forman bandas de tejido cartilaginoso que funcionan como molde temporal para los depósitos de hueso mineralizado, facilitando su crecimiento longitudinal controlado [8].

Tanto en el proceso de desarrollo del hueso como en su remodelado, la microvasculatura juega un papel esencial. En ambos procesos de formación ósea (intermembranosa y endocondral) se produce vascularización previa a la osteogénesis [9]. Además, la pérdida de hueso trabecular relacionada con la edad o distintas patologías como la osteoporosis, se asocia a una reducción del flujo sanguíneo en el tejido óseo. Por otra parte, cabe destacar que, en un proceso de reparación de una fractura ósea, la formación del callo (formado por osteoblastos y condroblastos incluidos en una matriz de colágeno) depende de la vascularización adecuada de la zona de la fractura [10].

1.1.3. Remodelado óseo

El hueso es un sistema que se está remodelando continuamente para mantener una homeostasis adecuada, la integridad estructural ósea y su resistencia [1,11]. Este remodelado se lleva a cabo mediante la actuación coordinada de todas las células que conforman el hueso (figura 5). Cada una de ellas cumple una función concreta y esencial que, si no se desarrolla correctamente, provoca un desajuste del proceso. Los osteoclastos resorben la matriz mineralizada mientras que los osteoblastos forman hueso nuevo siguiendo una serie de pasos coordinados. Son necesarios diferentes sistemas de regulación, tanto sistémicos como locales, para controlar que el proceso se desarrolle correctamente. Si estos sistemas de regulación

fallan, se produce un desequilibrio de este balance que puede provocar patologías óseas como la osteoporosis.

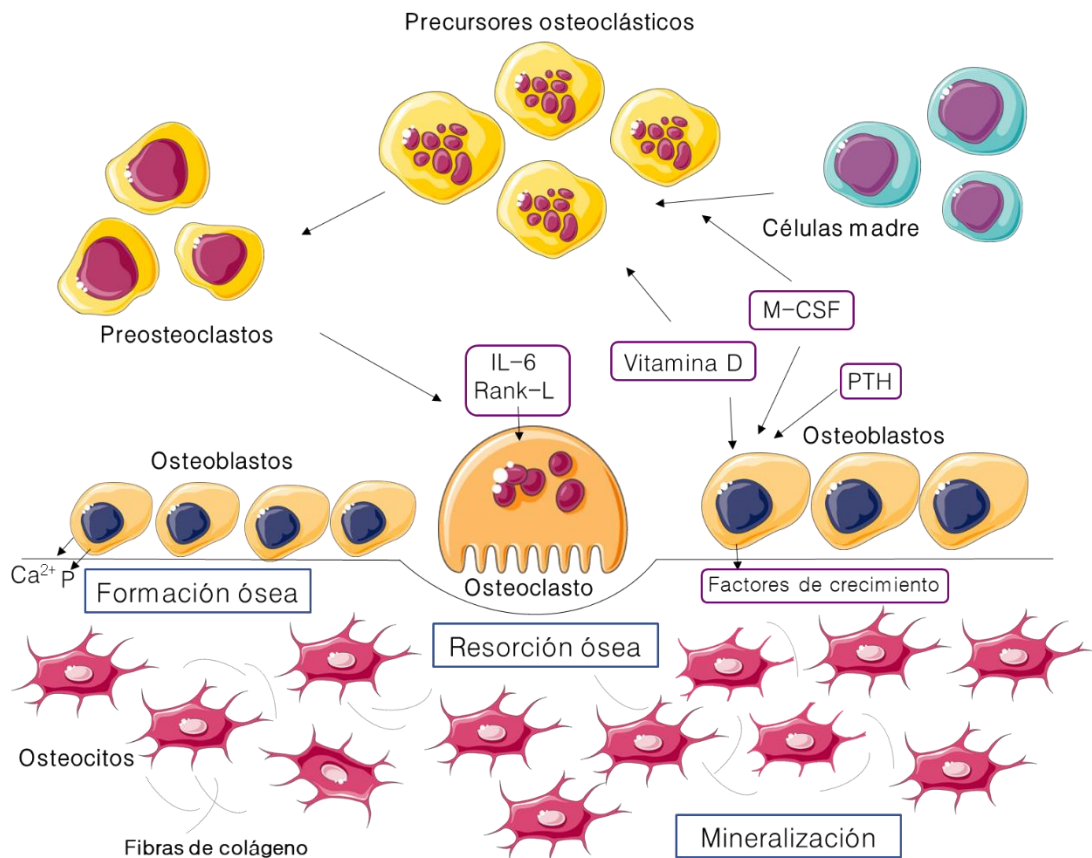


Figura 5. Esquema del remodelado óseo y el papel de cada una de las células implicadas.

El proceso de remodelado óseo consta de tres fases conocidas como fase de activación, de resorción y de formación (figura 6) que ocurren secuencialmente y de forma cíclica [12]. El proceso comienza con la retracción de los osteoblastos que se encuentran recubriendo la superficie mineralizada del hueso. A continuación, la superficie ósea queda al descubierto y los osteoclastos pueden colonizar y penetrar la zona, dando comienzo a la fase de activación. Dicho proceso comienza cuando los osteocitos responden a un estímulo mecánico (microfracturas o falta de carga mecánica) o señales endocrinas que actúan directa o indirectamente sobre los mismos o las células del revestimiento. Después, se produce un reclutamiento de los osteoclastos que se polarizan y reorganizan su citoesqueleto formando un anillo de actina. Este anillo, junto con la acción de integrinas de la superficie celular, hace que los osteoclastos se adhieran a la matriz ósea, formando una capa sellada entre la membrana celular y el

hueso mineralizado denominada laguna de resorción o de Howship. Posteriormente, la membrana plasmática de estas células forma un ribete con forma de cepillo denominado podosoma que, mediante H^+ -ATPasas, acidifican el medio de las lagunas solubilizando los cristales de hidroxiapatita. De forma paralela, secretan TRAP a las lagunas que desfosforilan ciertas proteínas de la matriz, así como enzimas lisosomales (metaloproteasas, catepsina K), que degradan la matriz de colágeno, constituyendo la fase de resorción. Mientras se desarrolla este proceso, los osteoclastos se desplazan por la superficie del hueso libre de células de revestimiento. Finalmente, los osteoclastos promueven el reclutamiento y diferenciación de precursores osteoblásticos y entran en apoptosis dando comienzo a la fase de formación. Los precursores osteoblásticos comienzan a diferenciarse adoptando forma cuboidal, desarrollando un retículo endoplasmático rugoso y un aparato de golgi abundantes y se polarizan hacia la zona de osteosíntesis. El proceso de diferenciación está regulado con diferentes factores de transcripción. Entre ellos, hay que destacar al factor de transcripción 2 relacionado con RUNT (Runx2) y osterix (OSX) que son marcadores tempranos de diferenciación osteoblástica. En la fase de formación, lo primero que se sintetiza es el osteoide, formado en mayor medida por colágeno tipo I. Después, se produce la mineralización de estas células mediada por la fosfatasa alcalina que hidroliza el fosfato orgánico produciendo fosfato inorgánico, necesario para la mineralización de la matriz. Cuando el proceso finaliza, el 10–30 % de los osteoblastos están atrapados en la matriz mineralizada formando osteocitos [13], otros sobre la nueva superficie ósea funcionando como células de revestimiento y la mayoría de ellos entran en apoptosis.

En el hueso maduro sano, el balance del remodelado óseo es neutro, es decir, se forma la misma cantidad de hueso que se elimina. Además, el hueso es un sistema con capacidad de autoreparación, lo que implica que cuando sufre alguna clase de daño, es capaz de regenerarse por sí mismo.

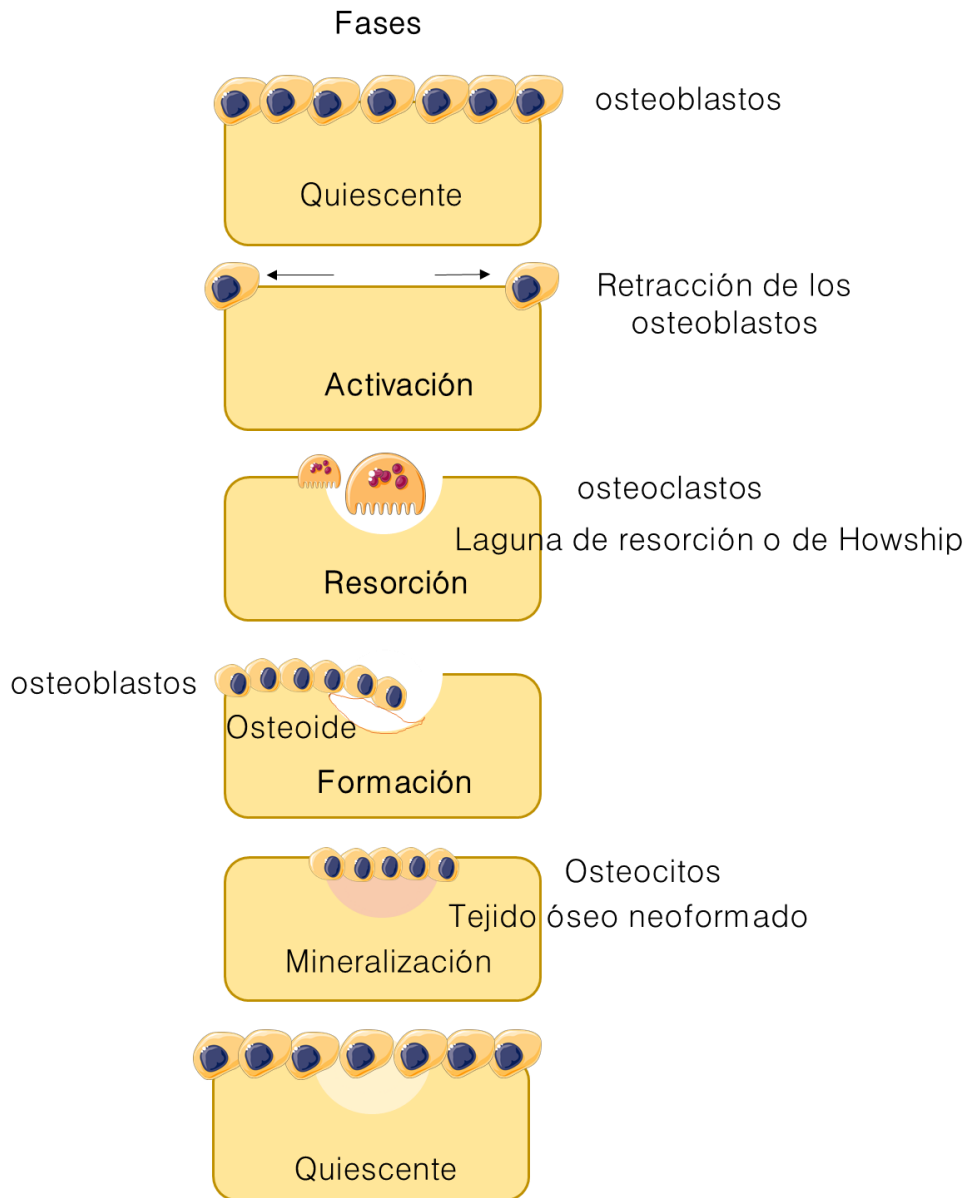


Figura 6. Fases y procesos del remodelado óseo.

Sin embargo, existen situaciones específicas en las que esta capacidad no es suficiente para reparar por completo el tejido dañado, por ejemplo, si las condiciones generales o locales del organismo no son óptimas, si se producen complicaciones paralelas como procesos de infección o si la cantidad de tejido a reparar es demasiado grande. Para solventar estas circunstancias, la ingeniería de tejidos trabaja para desarrollar modelos de implante que sustituyan al tejido óseo dañado, proporcionando soporte al hueso sano y fomentando, al mismo tiempo, la regeneración ósea. En este sentido, los vidrios mesoporosos bioactivos emergen como un biomaterial

de gran interés, capaz de realizar todas estas funciones. Este punto de desarrollará en profundidad en el apartado **1.3.2.** de la tesis.

Entre los factores que controlan el remodelado óseo destaca el sistema constituido por OPG (osteoprotegerina, proteína soluble similar a otros miembros de la superfamilia del factor de necrosis tumoral que actúa como receptor de RANKL) y RANKL (ligando de receptor activador para el factor nuclear κ B). Las señales entre los osteoblastos y los osteoclastos están bien descritas. Las más importantes son M-CSF y RANKL, ambas esenciales y suficientes para inducir la osteoclastogénesis [14]. RANK es una proteína de membrana secretada por los osteoclastos, perteneciente a la familia del TNF-alfa. Esta proteína se une a RANKL, presente en los precursores osteoclásticos, estimulando su diferenciación y maduración a osteoclastos [15]. La activación de RANKL está regulada por OPG, ya que al unirse a RANKL evita que interaccione con RANK.

Por otro lado, los osteocitos producen el ligando LRP5, o proteína relacionada con el receptor de las lipoproteínas de baja intensidad, denominado esclerostina. Este ligando previene la activación de la formación ósea vía Wnt/ β -catenina [16]. La ausencia de este ligando está asociado a enfermedades como Van Buchem y esclerosteosis, caracterizadas por la existencia de una elevada masa ósea [14]. Se ha comprobado que la estimulación mecánica y otros factores reducen la expresión de la esclerostina provocando un aumento de la formación ósea [17].

1.2. Incidencia de las enfermedades óseas

La población actual ha aumentado considerablemente su esperanza de vida, y con ello, han surgido y se han agravado ciertas enfermedades. Entre 2000 y 2050, la proporción de los habitantes del planeta mayores de 60 años se duplicará, pasando del 11% al 22%. En números absolutos, este grupo de edad pasará de 605 millones a 2000 millones en el transcurso de medio siglo [18]. A partir de esta edad, muchas de estas personas necesitarán implantes óseos con el fin de recuperar la estructura y funcionalidad de su esqueleto debido a la degradación progresiva que sucede de forma

espontánea a partir de los 30 años, conduciendo a enfermedades como artrosis u osteoporosis.

En 1993, la Organización Mundial de la Salud (OMS), definió la osteoporosis como “Enfermedad sistémica caracterizada por una disminución de la masa ósea y un deterioro de la microarquitectura del tejido óseo que incrementa la fragilidad de este, con el consecuente aumento del riesgo de fractura”. Es decir, la osteoporosis, es una enfermedad del hueso caracterizada por la disminución de la masa ósea, en la que los huesos se vuelven más porosos, aumentando el número de cavidades que existen en su interior, incrementándose su fragilidad y probabilidad a sufrir una fractura [19].

Esta patología es considerada como una “epidemia silenciosa” ya que no se producen síntomas específicos previos a la fractura del hueso. Se estima que, actualmente, 200 millones de personas padecen esta enfermedad a nivel mundial y 3.5 millones de personas en España [20,21]. Cifras que aumentarán con el paso de los años debido al envejecimiento de la población y el aumento de la esperanza de vida en la sociedad actual. La forma más sencilla de determinar esta enfermedad es a través de la medida de la densidad mineral ósea (DMO) mediante absorciometría de rayos X de doble energía (DXA). La OMS considera que una persona padece osteoporosis cuando este dato se desvía, al menos, un 2.5 de la media para una mujer caucásica joven sana. Cuando este valor está comprendido entre 1 y 2.5 se determina como osteopenia [20].

Las fracturas asociadas a la osteoporosis son muy comunes y están relacionadas con factores físico, sociales y económicos [22]. En 1990, el número de fracturas de cadera fue de 2 millones, alcanzando actualmente los 9 millones de fracturas. Este tipo de fracturas requieren la hospitalización del paciente, siendo mortales en un 20% de los casos y produciendo una discapacidad permanente en el 50% de los pacientes. Esto genera altos costes sanitarios, los cuales ascienden a los 3500 millones de euros en la Unión Europea [23,24].

En la osteoporosis se produce una alteración del proceso de remodelado óseo debida a causas asociadas a un aumento de las unidades multicelulares de remodelado óseo y al predominio de la resorción frente a

la formación del hueso. El origen de la pérdida de masa ósea responde a multitud de factores como la edad, la menopausia, tratamientos prolongados con ciertos fármacos, factores de riesgo como síndromes endocrinos, etcétera [24]. La osteoporosis provoca tasas considerablemente elevadas de morbilidad, mortalidad y gran utilización de recursos sanitarios en países desarrollados. En estos países su importancia es relativamente bien conocida, sin embargo, existe gran desinformación sobre su impacto en países en desarrollo [25].

1.3. Biomateriales para la regeneración de hueso

Para abordar estas circunstancias, la ingeniería de tejidos ha desarrollado distintos modelos de implantes que puedan sustituir al tejido óseo dañado. El éxito de un implante se basa en la respuesta que genera en el tejido donde se incluye. Para que la respuesta pueda considerarse como satisfactoria, se ha de generar una unión estable con el tejido receptor y condiciones mecánicas suficientemente buenas como para sostener el tejido dañado. Todo material que se implanta en un tejido vivo provoca una respuesta biológica. Por ello, los materiales escogidos no deben presentar toxicidad, de forma que no provoque la muerte del tejido circundante y que no se liberen sustancias que puedan provocar daño sistémico al paciente. Una de las respuestas del organismo más habituales cuando se le incorpora un implante, es la formación de una cápsula fibrosa, cuya función es aislar el implante para eliminarlo como cuerpo extraño para el organismo. Este mecanismo de defensa puede dar lugar al rechazo del implante.

Actualmente, el patrón oro para esta clase de implantes es el autoinjerto [26]. El autoinjerto o injerto de hueso autólogo, consiste en la utilización de hueso obtenido a partir del mismo individuo que recibe el injerto. Este se puede extraer de los conocidos como huesos “no esenciales” como la cresta ilíaca, la barbilla, el peroné, las costillas e incluso el cráneo. Cuando se ha de realizar un injerto, el hueso autólogo reúne mejores características y disminuye drásticamente el riesgo de rechazo al tratarse de hueso del propio paciente [26].

Sin embargo, su uso tiene limitaciones que complican su aplicación y que deberían ser solventadas. Entre estas limitaciones está la cantidad de tejido que hay que extraer, la morbilidad que se genera en la zona de extracción, los posibles procesos de infección resultantes, el aumento del riesgo de la operación, las prolongadas estancias hospitalarias y, como consecuencia, los costes asociados [26]. Para abordar estas limitaciones, en los últimos años se han estado desarrollando equivalentes tisulares capaces de generar soporte para el hueso dañado que, a la vez, fomentan la regeneración de la zona afectada y previenen y/o tratan los procesos de infección que puedan surgir a raíz de la intervención quirúrgica [26].

Para solventar estas limitaciones se ha fomentado el desarrollo de materiales de origen sintético que reemplacen el tejido óseo dañado: **los biomateriales**. Actualmente la ingeniería de tejidos trabaja desde una perspectiva multifactorial en el desarrollo de un sistema basado en un biomaterial sustitutivo que pueda doparse, cargarse y/o combinarse con diversos tipos de iones, biomoléculas, células o fármacos, con el objetivo de potenciar sus capacidades [27]. Este apartado se desarrollará en profundidad en la sección 1.5.

Los biomateriales pueden definirse como materiales implantables que desarrollan su función en contacto con tejidos vivos [28]. La reactividad de un material empieza en su superficie, hecho de vital importancia que hay que tener en cuenta. Este proceso comienza cuando el biomaterial entra en contacto con un medio acuoso, en presencia de células y diferentes proteínas. En el proceso de desarrollo de cualquier biomaterial han de tenerse en cuenta dos conceptos clave: **biocompatibilidad y biofuncionalidad**. El primero describe la necesidad del material de ser aceptado por el medio en el que se le implanta, de forma que no se produzcan reacciones adversas en la interfaz tejido-material. El segundo se refiere a la necesidad de asegurar una buena transmisión de cargas y distribución de fuerzas por parte del biomaterial hacia el hueso.

Los materiales artificiales empleados en ortopedia incluyen metales, polímeros y cerámicas. Los metales presentan problemas de corrosión y toxicidad, aunque sus características mecánicas son óptimas [29]. Los

polímeros presentan gran bioactividad, lo que se refiere a su capacidad de integrarse en el tejido óseo [28,30]. Por último, las cerámicas poseen mejor bioactividad que ninguno de los anteriores, además de ser bioestables, bioactivas y bioreabsorbibles [29,30]. Estas también presentan ciertas limitaciones como cierta fragilidad y la posible reabsorción parcial por parte del organismo. Las cerámicas más utilizadas en la clínica son aquellas con propiedades bioactivas y osteoconductoras, como los fosfatos cálcicos o los vidrios.

1.3.1. Evolución de los biomateriales en base sílice

Las primeras biocerámicas que se diseñaron fueron las denominadas de **primera generación (década 1960)** [28]. Estas biocerámicas son de naturaleza inerte, por lo que su función se limita a sustituir al tejido óseo sin presentar ningún tipo de capacidad regenerativa [31]. Poseen gran resistencia a la fricción y estabilidad química, por lo que siguen usándose para la fabricación de ciertas prótesis. Posteriormente, se observó la necesidad de que los implantes fueran bioactivos y biodegradables, por lo que se pasó al desarrollo de las **biocerámicas de segunda generación (década 1970)** [28]. Estas tienen la capacidad de integrarse en el tejido sin provocar la formación de encapsulaciones, inflamación o generar toxicidad. Se clasifican en biocerámicas bioactivas y reabsorbibles, dependiendo del tipo de respuesta que generen. Las bioactivas provocan una respuesta biológica específica en el interfaz tejido-material generando enlaces entre ambos [32]. Existen dos clases, las de la clase A que provocan osteointegración (formación de enlaces fuertes y estables entre el material y el hueso), osteoinducción (guían el crecimiento del hueso) y reabsorción del material [33], y las de la clase B que únicamente son osteoinductoras [34,35]. Además, todos los implantes bioactivos provocan la formación de una fase de hidroxycarbonatoapatita (HCA) en su superficie, con composición y estructura similares a las del hueso [36,37]. Las biocerámicas reabsorbibles son capaces de degradarse gradualmente a la vez que fomentan la formación del tejido óseo que las reemplaza.

En el contexto de la presente tesis doctoral, pasamos a describir las **biocerámicas de tercera generación (década 1990)** [28]. Estas biocerámicas son capaces de integrarse en el tejido óseo y degradarse gradualmente, al mismo tiempo que fomentan la regeneración del tejido óseo circundante que las reemplaza. Entre ellas destacan los **vidrios mesoporosos bioactivos (MBGs)**, lo cuales reúnen las condiciones necesarias para constituir los implantes óseos del futuro. Estos vidrios son además osteoinductores, es decir, fomentan la diferenciación de las células madre presentes en el hueso a células óseas. Estos materiales favorecen la proliferación y diferenciación celular, así como la producción de matriz extracelular. Fueron descubiertos por el profesor L. L. Hench en 1971 y se sintetizan a través del método de fusión y enfriamiento rápido [38] de una mezcla de SiO_2 , P_2O_5 , CaO y Na_2O . El SiO_2 y P_2O_5 forman la red del vidrio mientras que la presencia del CaO y el Na_2O reduce la temperatura de fusión de los componentes y aumenta la reactividad química del vidrio mediante la incorporación de defectos químicos en la red preformada [39]. A través de su descubrimiento, se comprobó la capacidad de ciertos materiales basados en óxido de silicio (SiO_2) para formar enlaces mecánicamente estables y químicamente fuertes con el tejido óseo. Para que estos materiales se unan al hueso, se necesita que se forme una fase intermedia implante–hueso de apatita, la cual aparece cuando estos materiales entran en contacto con fluidos biológicos [40].

Al principio de la década de los 90 se llevaron a cabo avances importantes en este campo, pasando de los materiales de fusión a la química sol–gel, mediante la cual se desarrollaron nuevos materiales bioactivos con base sílice. Estos nuevos materiales, presentaban mayor bioactividad como consecuencia del aumento de su área superficial y su porosidad. El aumento de estos parámetros provocó que hubiera mayor superficie en contacto con el medio biológico, mejorando el intercambio de iones y, por lo tanto, su reactividad [41]. Al principio de la década de los 2000, el grupo de investigación del profesor Zhao, combinó los avances de la química sol–gel con la química supramolecular de surfactantes que se venía utilizando para la preparación de vidrios mesoporosos, obteniendo vidrios multicomponentes [42]. Estos vidrios de composición SiO_2 – CaO – P_2O_5

presentaban características texturales y bioactivas no observadas previamente en ningún otro material [43]. Estas propiedades respondían a su naturaleza multicomponente, así como a su elevada porosidad y superficie específica que les permitían un mayor contacto con los fluidos biológicos, un aumento de su intercambio iónico y, por lo tanto, un aumento de su bioactividad. En base a lo explicado anteriormente, surgió una nueva generación de biocerámicas, conocidas como MBGs [28].

Durante el desarrollo de las tres generaciones de biocerámicas, han ido apareciendo distintos materiales con distintas capacidades. En este sentido, uno de los parámetros más importantes que ha ido evolucionando a lo largo de este proceso es la bioactividad. La bioactividad de un material depende de distintos factores como su composición o sus propiedades texturales y estructurales. Es bien conocido que la presencia de grupos silanol (Si-OH) en la superficie de los materiales determina, en buena medida, su reactividad en contacto con fluidos biológicos y, por lo tanto su bioactividad [44]. Los grupos silanol funcionan como lugares de nucleación para la formación de la capa de HCA, lo que constituye un factor determinante de la bioactividad de un biomaterial [44]. De esta forma, se pueden clasificar los materiales más importantes que se han estudiado a lo largo de los últimos años (tabla 1) [44].

Tabla 1. Evolución de la bioactividad de los distintos materiales de matriz mesoporosa con base silicio [44].

Matriz mesoporosa	Bioactividad	Tiempo en SBF
MCM-41	No	60 días
MCM-48	Sí	60 días
SBA-15	Sí	30 días
1%P-MCM-41	Sí	15 días
Bio-vidrios sol-gel	Sí	3 días
10%Vidrio-90%MCM-41	Sí	1 día
Vidrios Mesoporosos	Sí	1 h

De este modo, el MCM-41 (Mobil Composition of Mater-41), presenta menor concentración de grupos silanol en su superficie que el resto de los materiales, lo que explica la ausencia de bioactividad en este material [44].

Las propiedades texturales y estructurales también son factores importantes que tener en cuenta. El SBA-15 (Santa Barbara Amorphous-15) posee diámetros de poro mayores que el MCM-48 y microporos interconectados, lo que permite mejor difusión iónica hacia el interior de sus poros, aumentando su bioactividad [44]. Además, se han desarrollado distintas técnicas para aumentar la bioactividad de los materiales. La primera que se consideró fue el dopaje con fósforo al 1% (1%P-MCM-41), lo que acelera la respuesta biológica del material, observándose la formación de la capa de HCA en su superficie a los 15 días [44]. La segunda estrategia se basa en la adición de pequeñas cantidades de vidrio bioactivo (10%Vidrio-90%MCM-41), lo que acelera este proceso a 1 día de ensayo [44]. Siguiendo esta tendencia, el desafío real fue obtener MBGs ordenados, que combinan las cualidades de las matrices mesoporosas con el comportamiento bioactivo de los vidrios sol-gel convencionales. Este proceso se llevó a cabo combinando la síntesis de los vidrios sol-gel con la síntesis de los materiales mesoporosos ordenados en base sílice [44]. El método de autoensamblaje inducido por evaporación (EISA) utiliza surfactantes como agentes directores de la estructura del material. Con este método, se consiguió obtener los MBGs ordenados, los cuales presentan una bioactividad mejorada, en comparación con los materiales convencionales [44].

1.3.2. Vidrios Mesoporosos Bioactivos, MBGs

Estos materiales se sintetizan a través de la combinación de la química supramolecular y el método EISA (figura 7), descrito por primera vez por el Prof. J. C. Brinker en 1999. Este método se basa en la formación de estructuras mesoporosas a través de la evaporación de disolventes volátiles sin necesidad de condiciones hidrotermales [45]. Se lleva a cabo en tres etapas bien diferenciadas:

a) Química supramolecular: la química supramolecular es la rama de la química que estudia el reconocimiento molecular, las interacciones entre moléculas y la formación de agregados supramoleculares, permitiendo comprender el mundo biológico, los sistemas complejos y la nanotecnología. Puede definirse como la química de los enlaces

intermoleculares, cubriendo las estructuras y funciones de las entidades formadas por asociación de dos o más especies químicas [46]. También puede definirse como la química más allá de la molécula, una química de interacciones intermoleculares diseñadas [47]. Los agregados supramoleculares pueden ser muy diversos, pudiendo abarcar desde sistemas biológicos donde intervienen un número elevado de moléculas que se organizan espontáneamente formando estructuras más grandes como monocapas, bicapas, micelas, complejos enzimáticos y lipoproteínas, hasta conjuntos de pocas moléculas que sufren un fenómeno de autoensamblaje molecular.

b) Autoensamblaje por evaporación: cuando la temperatura de la disolución de los precursores junto con el disolvente aumenta, este se va evaporando lentamente provocando que la concentración de los precursores y el surfactante aumente. Una vez se alcanza la cmc (concentración micelar crítica), se produce la organización espontánea de las moléculas de surfactante por interacciones no covalentes (enlaces de hidrógeno, fuerzas de Van der Waals, fuerzas electrostáticas). Posteriormente, se produce la interacción entre los precursores y el surfactante a través de restos hidrofílicos de este último, obteniéndose mesofases ordenadas [45].

c) Eliminación del surfactante: para conseguir el producto poroso final, se ha de eliminar el surfactante. Esta eliminación se consigue mediante la calcinación del material, obteniéndose redes inorgánicas porosas.

La obtención de los MBGs mediante la combinación de la química supramolecular y el método EISA, se basa en la adición de los precursores de SiO_2 , CaO y P_2O_5 , normalmente en forma de tetraetil ortosilicato (TEOS), $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ y trietil fosfato (TEP). Los tres deben hidrolizarse perfectamente para poder ordenarse en torno al surfactante. Estos se van añadiendo en intervalos de varias horas para asegurar la hidrólisis del TEOS y del TEP (formadores de red) antes de añadir el precursor del CaO que actúa deformando la red.

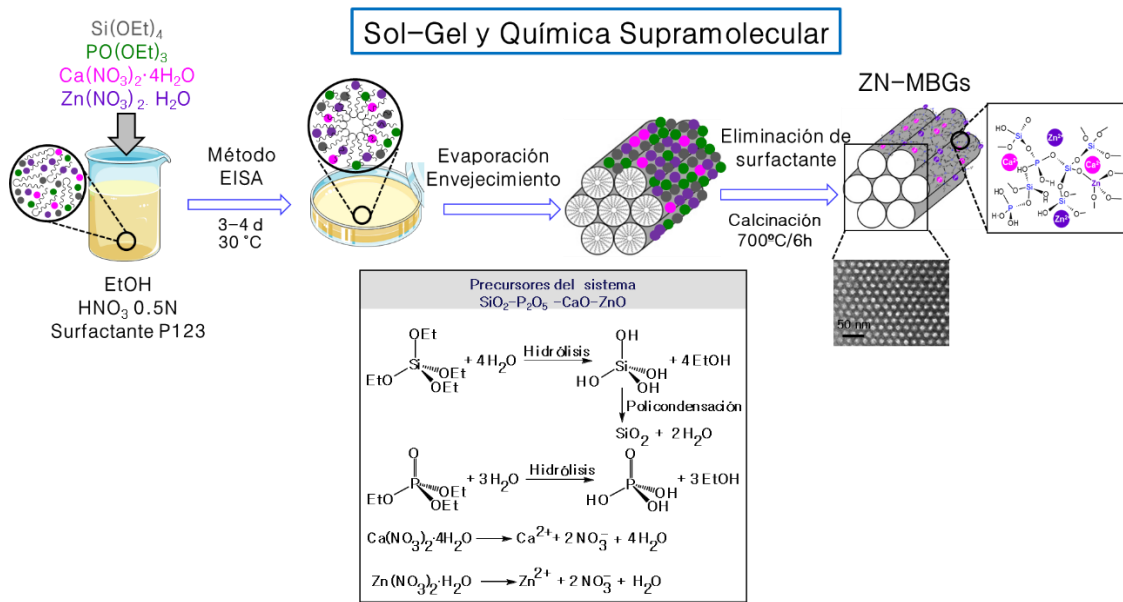


Figura 7. Proceso de síntesis de los MBGs combinando la química supramolecular, el método EISA y la eliminación final del surfactante.

Una vez que se ha obtenido el MBG y el surfactante se ha eliminado mediante calcinación, se ha de tener en cuenta que el soporte ideal ha de ser capaz de funcionar como soporte estructural del hueso dañado, ha de ser capaz de fomentar la regeneración de este, así como de evitar procesos de infección [45].

1.3.3. Andamios tridimensionales de MBG

A través de la fabricación de andamios meso-macroporosos, es posible generar implantes que imiten la estructura porosa y las funciones de la matriz ósea[48]. De esta forma, es posible generar el microambiente adecuado para fomentar el crecimiento y vascularización del tejido óseo de nueva formación [49,50]. Además, estos andamios pueden servir de plantilla estructural para el crecimiento y proliferación de las células [51].

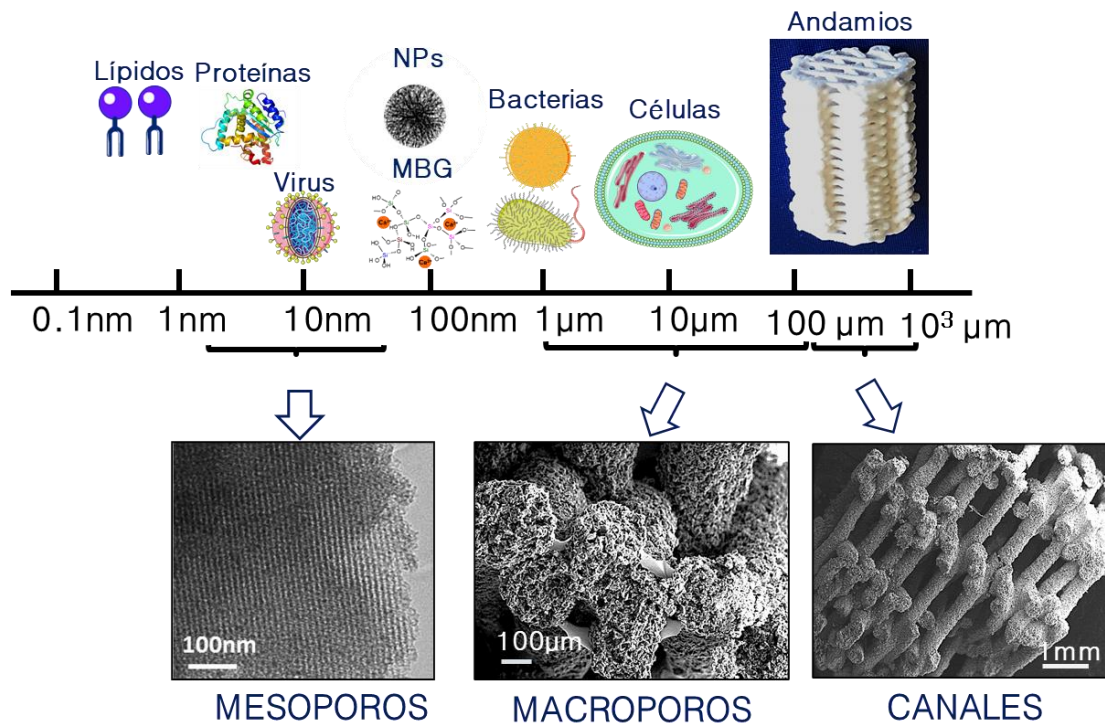


Figura 8. Distribución de los distintos tamaños que se pueden encontrar dentro de los andamios tridimensionales de MBG meso-macroporoso y componentes biológicos correspondientes a cada una de las dimensiones.

Durante el proceso de diseño del material, hay que tener en cuenta una serie de factores que permitan imitar al tejido óseo: composición química, micro y macroestructura, interconectividad (figura 8), propiedades superficiales y propiedades mecánicas [37]. Existen una serie de requisitos básicos (tabla 2) que estos andamios deben reunir para poder ser utilizados [52].

El tejido óseo puede describirse como un compuesto, constituido por varias fases: fase orgánica (básicamente colágeno tipo I) y fase inorgánica (carbonatohidroxiapatita). El colágeno es una proteína que proporciona resistencia y elasticidad mientras que la carbonatohidroxiapatita confiere rigidez y resistencia a la compresión [53].

Con el objetivo de simular esta estructura, se están diseñando andamios formados con un material cerámico y un polímero.

Tabla 2. Requisitos básicos que los andamios de MBG deben presentar

Características de los andamios	Capacidades deseadas
Biocompatibilidad	• Productos de liberación no tóxicos • Ausencia de respuesta inflamatoria, evitando reacciones inmunológicas adversas
Biodegradabilidad	• Degradación controlada que permita el crecimiento del tejido manteniendo un soporte adecuado • Degradación por procesos enzimáticos o biológicos del huésped • Posibilita que las células invasoras del huésped produzcan matriz extracelular
Bioactividad	• Materiales que permitan interactuar con el tejido huésped y unirse a él • Propiedades osteoconductoras y osteoinductoras • Inclusión de señales biológicas y factores de crecimiento para estimular el crecimiento, la adhesión y la diferenciación de las células
Arquitectura del andamio	• Poros interconectados que permitan la difusión y la migración celular • Microporosidad para obtener gran superficie e interacciones células-andamios • Macroporosidad para permitir la migración celular y la invasión de la vasculatura • Tamaño de los poros adaptado al tejido y a las células • Suficiente porosidad para facilitar el crecimiento celular sin debilitar las propiedades mecánicas • Canales vasculares incorporados para mejorar la angiogénesis <i>in vivo</i>
Propiedades mecánicas	• Resistencia a la compresión elástica y a la fatiga comparable a la del tejido anfitrión, para que se produzca mecanorregulación celular y que se mantenga la integridad estructural <i>in vivo</i> • Material de andamiaje que pueda manipularse en un entorno clínico para defectos óseos de forma personalizada

Este abordaje presenta dos ventajas esenciales:

- Mejora de las propiedades mecánicas: cerámica como fase discreta (resistencia mecánica) y polímero como fase continua (flexibilidad) [53].
- Mejorar las propiedades viscoelásticas de la mezcla de forma que deposición por capas sea posible [53].

Existen múltiples técnicas para diseñar y construir los andamios tridimensionales. Están los métodos convencionales, entre los que se encuentran técnicas como la evaporación de disolventes, la liofilización, la réplicas de moldes en gel o la lixiviación de partículas [54]. También existen tecnologías más sofisticadas como el prototipado rápido o el electrospinning, que posibilitan controlar de forma más precisa la estructura macroporosa de los andamios [55]. Entre las técnicas de prototipado rápido, destacan la impresión 3D directa, la bioimpresión asistida por láser,

la estereolitografía, el robocasting y el modelo de deposición fundida [56]. Estos métodos posibilitan diseñar un archivo tipo CAD (Computer Asisted Design) para reproducir el defecto óseo concreto que se desea construir, así como estructuras macroporosas interconectadas que favorecen la vascularización del tejido [57].

Cuando hablamos de andamios formados por un cerámico y un polímero, el robocasting es la técnica más utilizada. Esta técnica se basa en la deposición, capa sobre capa, de una pasta inyectable que contiene la mezcla de cerámico-polímero (figura 9). El compuesto se introduce en un cartucho, que funciona a modo de jeringa, por la que va saliendo la mezcla a través de una boquilla similar a una aguja. La mezcla va saliendo en forma de filamento continuo que se utiliza para pintar, siguiendo un patrón previamente diseñado con un archivo CAD, la primera capa. Posteriormente se depositará la siguiente capa sobre la primera y así sucesivamente. Este tipo de construcción capa por capa, posibilita controlar la arquitectura de los andamios de forma muy precisa, ya que el movimiento de la boquilla es de alta precisión y permite reproducir la forma, el tamaño y la porosidad previamente diseñados.

Esta técnica requiere de una serie de condiciones para que la impresión pueda llevarse a cabo. Es esencial conseguir mezclas con propiedades reológicas adecuadas para que puedan fluir correctamente a través de la boquilla y alcanzar la rigidez necesaria para soportar la impresión de las siguientes capas, que se depositarán por encima, sin que la estructura colapse. En la construcción de estos andamios, el proceso de evaporación del disolvente debe producirse antes de que se deposite la siguiente capa, de lo contrario, la estructura interna de los andamios colapsaría total o parcialmente, perdiendo la estructura porosa deseada. Una vez se consigue cumplir toda esta serie de requisitos, esta técnica es capaz de proporcionar estructuras macroporosas tridimensionales altamente reproducibles, con porosidad definida, regular y jerárquicamente organizada.

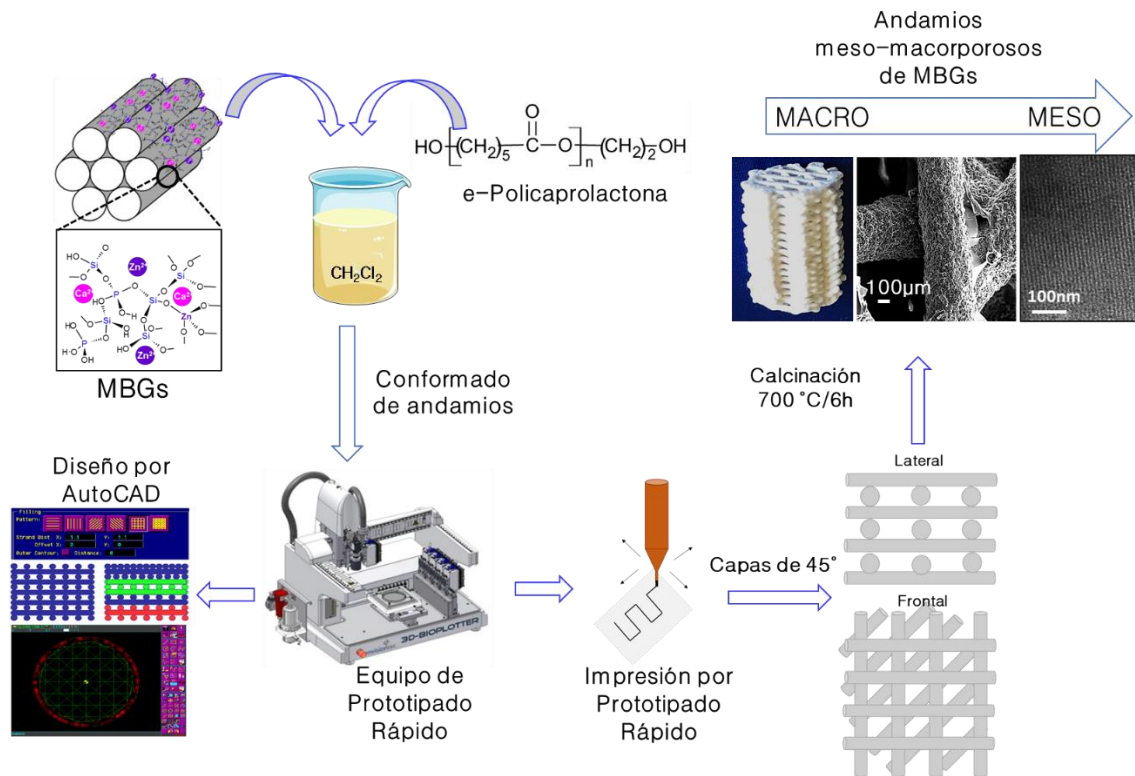


Figura 9. Esquema del proceso de formación de los andamios tridimensionales por prototipado rápido.

La versatilidad de este método ha permitido introducir diversas modificaciones, como por ejemplo incluir células en los andamios durante su impresión [58].

1.3.3.1. Andamios 3D de MBG como sistemas de liberación

Los andamios tridimensionales de MBG, están diseñados no solo para generar soporte y regenerar el tejido óseo dañado, sino también como sistemas que permitan la carga y liberación de distintas sustancias biológicamente activas [59–62]. Durante los últimos años se han desarrollado distintos sistemas capaces de llevar a cabo esta función, permitiendo el tratamiento localizado de distintas patologías [63–65].

De esta forma, es posible minimizar el número de intervenciones quirúrgicas ya que el mismo sistema que proporciona soporte y regenera el hueso, es capaz de tratar otra serie de complicaciones, como por ejemplo un proceso de infección o cargar fármacos específicos [63,66,67] para tratar patologías asociadas como la osteoporosis [68,69]. De esta forma, es

posible combinar el efecto de dos o más sustancias terapéuticas con distinta actividad farmacológica [63,70,71].

Además de fármacos, es posible cargar otro tipo de sustancias como sustancias osteogénicas [72], factores de crecimiento [72,73] o factores angiogénicos [74].

1.4. Procesos de infección en un escenario de regeneración ósea

Los procesos de infección asociados a una cirugía constituyen uno de los problemas más importantes derivados del uso de un implante óseo. Estos procesos pueden producirse durante la cirugía y/o después de la intervención quirúrgica, constituyendo un problema que provoca millones de muertes en todo el mundo con graves implicaciones clínicas y socioeconómicas [75,76]. El proceso de infección suele comenzar con la adherencia bacteriana al implante óseo, seguido de la colonización de su superficie. La adhesión bacteriana y su posterior crecimiento, suele provocar la formación de una biopelícula o biofilm en la superficie del implante [77]. De hecho, se ha estimado que el 65–80% de las infecciones bacterianas tratadas en clínica, son provocadas por microorganismos creciendo en forma de biofilm[77]. Habitualmente, se generan cavidades de tamaño microscópico entre el implante y el tejido óseo hospedador, que pueden funcionar como reservorio de microorganismos [78]. Las bacterias tienden a crecer en estas cavidades para posteriormente colonizar el tejido óseo circundante, impidiendo la osteointegración del implante [78]. Las infecciones son procesos inflamatorios que provocan la destrucción del tejido que colonizan, proceso también conocido como osteólisis [79,80]. En este sentido, el proceso de infección continua con la penetración bacteriana hacia zonas más profundas del implante, así como hacia tejidos más internos del hueso hospedador [78]. Una vez colonizan la parte interna, se multiplican y expanden provocando la inflamación del tejido y la pérdida de tejido óseo sano, así como la degradación y el rechazo del implante.

1.4.1. Cepas bacterianas comunes en infección ósea

Existen varias cepas bacterianas que están relacionadas con procesos de infección ósea. Las más comunes se recogen en la tabla 3, indicando también los procesos que generan [81].

Tabla 3. Bacterias más comunes en infección ósea y procesos que generan [81].

Microorganismo	Osteomielitis	Infección ósea asociada a un implante	Artritis articular
<i>Staphylococcus aureus</i>	•	•	•
<i>Streptococcus pyogenes</i>	•	•	•
<i>Streptococcus agalactiae</i>	•	•	•
<i>Haemophilus influenzae</i>	•		•
<i>Enterococcus species</i>	•	•	•
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	•	•	
<i>Serratia marcescens</i>	•		
<i>Propionibacterium aches</i>	•	•	
<i>Finegoldia magna</i>		•	
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>			•
<i>Kingella kingae</i>			•
<i>Streptococcus pneumoniae</i>		•	•

Una de las cepas bacterianas más frecuentes en infección ósea es *Staphylococcus aureus* o *S. aureus*, conocido como estafilococo áureo o dorado. Es una bacteria anaerobia facultativa Gram+, inmóvil y no esporulada. *S. aureus* es un coco inmóvil, de 0,5 a 1 µm de diámetro [82] que se divide en tres planos para formar grupos de células irregulares semejantes a una estructura en forma de racimos de uvas. Se han observado cepas de *S. aureus* recubiertas por una capa externa de polisacáridos, denominada *slime* o cápsula mucoide, que incrementa su capacidad de adherencia a las células del huésped y a materiales protésicos, evita que sean reconocidas y refuerza el efecto antifagocítico. Su producción está

influida por factores como la composición del medio y las condiciones de desarrollo [82,83]. *S. aureus* presenta tiempos cortos de crecimiento, desarrollándose rápidamente en todos los medios. Su metabolismo es anaerobio facultativo y se basa en la fermentación de carbohidratos. La actividad proteolítica varía mucho de una cepa a otra [83,84].

S. aureus posee un cromosoma circular de aproximadamente 2800 kilopares de bases, sin contar el material genético de prófagos, plásmidos y transposones [85]. Los factores de virulencia de la bacteria están contenidos en todos estos vehículos. Estos genes pueden transferirse entre diferentes cepas de estafilococos, entre distintas especies y entre bacterias Gram+ a través de vectores [86]. La expresión de los factores de virulencia estafilocócicos está regulada por varios sistemas que detectan cambios en el medio. El gen *agr* (*accessory gene regulator*) controla la expresión preferente de adhesinas de superficie, así como la producción de toxinas. El silenciamiento de este gen causa una marcada disminución de la virulencia de *S. aureus* [87]. Los estafilococos producen varias enzimas (proteasas, lipasas e hialuronidasas) que provocan la destrucción de los tejidos y facilitan la diseminación de la infección a los tejidos adyacentes.

S. aureus se encuentra ampliamente distribuida, estimándose que una de cada tres personas está colonizada, aunque no infectada por ella [83,86]. En la actualidad, este microorganismo se identifica como el principal causante de enfermedades nosocomiales, habitando tanto en las mucosas como en la piel, lo que permite que, a través de las heridas quirúrgicas, pueda penetrar en el torrente sanguíneo del paciente [86]. Las cepas más habituales de *S. aureus* son resistentes a la penicilina, por lo que los antibióticos más eficaces van a ser los aminoglucósidos, la oxacilina o la nafcilina [85].

Otra de las cepas bacterianas más comunes es *Escherichia coli* o *E. coli*, que nos sirve como modelo de bacteria Gram-. *E. coli* es una bacteria catalasa positiva, anaerobia facultativa, quimorganotrófica, con temperatura preferente de crecimiento de 37 °C (mesófila), fimbriada, normalmente móvil por flagelos peritricos, no formadora de esporas y perteneciente a la familia de las enterobacterias [88,89]. Esta bacteria forma parte de la

microbiota del tracto gastrointestinal de organismos homeotermos, como por ejemplo el ser humano [90].

En humanos *E. coli* coloniza el tracto gastrointestinal de los neonatos adhiriéndose a las mucosidades del intestino grueso a las pocas horas de haber nacido [91]. Desde entonces permanece en una relación de mutuo beneficio. En individuos sanos y si la bacteria no adquiere elementos genéticos que codifiquen factores virulentos, actúa como comensal formando parte de la microbiota intestinal y fomentando la absorción de nutrientes. Las cepas patógenas de *E. coli*, por el contrario, pueden producir infecciones intestinales y extraintestinales generalmente graves, como infecciones del aparato excretor, vías urinarias, cistitis, uretritis, meningitis, peritonitis, mastitis, septicemia y neumonía Gram– y, en menor medida, infección ósea siendo por ello una bacteria de mayor interés en la práctica clínica [92]. Las cepas asociadas a infecciones gastrointestinales se denominan *E. coli* diarreogénicas o intestinales, mientras que las asociadas a infecciones en otros aparatos y sistemas, como por ejemplo el tracto urinario, sanguíneo y nervioso, son denominadas *E. coli* patogénicas extraintestinales (ExPEC). La alta morbilidad, así como la variedad en síndromes y cuadros clínicos asociados a infecciones de *E. coli*, hacen de esta bacteria uno de patógenos más versátiles y de mayor relevancia para el ser humano.

1.4.2. Biopelícula o biofilm: formación e importancia

La formación del biofilm comienza con la adherencia de los microorganismos a la superficie en la que se va a generar esta estructura (figura 10). En bacterias Gram– (*Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, etc.), se ha visto que los flagelos, las fimbrias de tipo I, IV y los curli son importantes para la etapa de adherencia primaria [93]. Parece que la motilidad ayuda a la bacteria a alcanzar la superficie y contrarrestar las repulsiones hidrofóbicas. Sin embargo, aunque la motilidad ayuda al proceso no parece ser un requisito esencial, pues muchas bacterias Gram+ inmóviles como estafilococos, estreptococos y micobacterias son capaces de formar biofilms. En el caso de las bacterias Gram+, se ha descrito la

participación de proteínas de superficie (AtlE, Bap, Esp) en esta primera etapa de adherencia [94,95]. Una vez que la bacteria se ha adherido a la superficie, comienza a dividirse y las células hijas se extienden alrededor del sitio de unión, formando una microcolonia (figura 10) de forma similar al proceso de formación de colonias en placas de agar. En una etapa posterior, la bacteria comienza a secretar un exopolisacárido que constituye la matriz del biofilm. La composición del exopolisacárido es diferente en cada bacteria. Estudios recientes han puesto de manifiesto que incluso una misma bacteria, dependiendo de las condiciones ambientales en las que se encuentre, puede producir distintos exopolisacáridos como componentes de la matriz del biofilm. Finalmente, algunas bacterias de la matriz del biofilm se liberan del mismo para poder colonizar nuevas superficies cerrando el proceso de desarrollo de formación de este (figura 10).

En el interior de esta matriz, las bacterias son capaces de desarrollar resistencia a los fármacos que se les administra [96–99] y de evitar al sistema inmune del hospedador [100,101]. El uso de antibióticos es una técnica ampliamente extendida para tratar esta clase de procesos de infección.

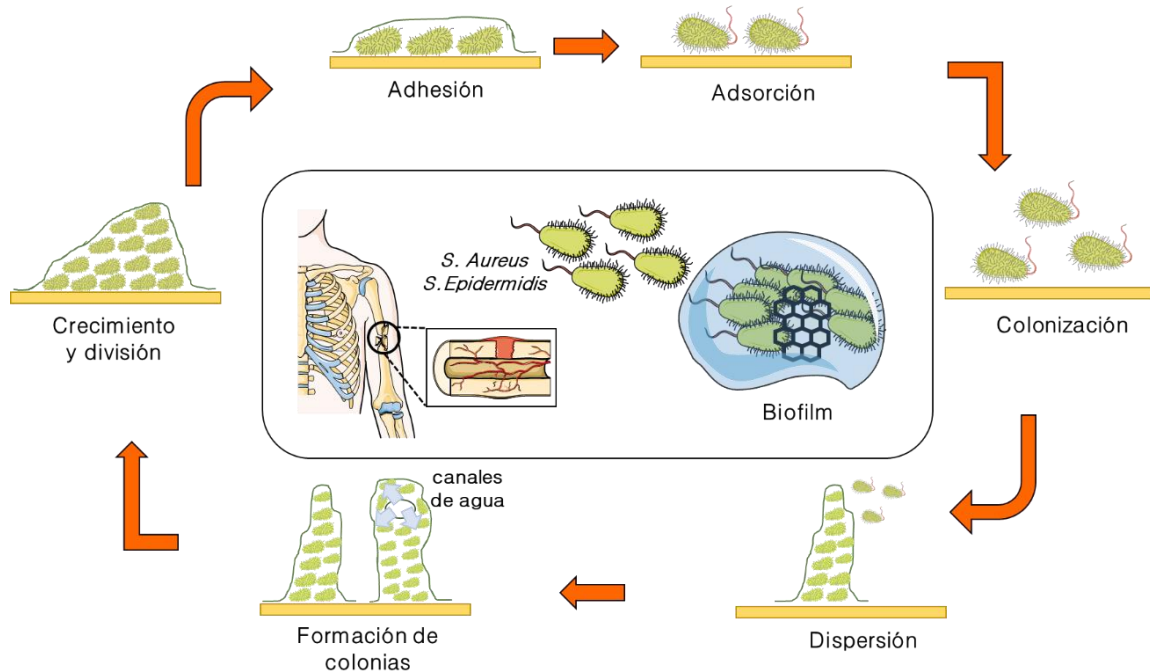


Figura 10. Esquema de las etapas de formación y expansión del biofilm bacteriano.

Tanto *S. aureus* como *E. coli* son cepas bacterianas capaces de desarrollar biopelículas o biofilms. Los biofilms se definen como comunidades de microorganismos que crecen embebidos en una matriz de exopolisacáridos, que los aísla y protege del medio externo, adheridos a una superficie inerte o un tejido vivo [102]. Dentro de esta matriz las bacterias crecen protegidas de las condiciones desfavorables y del estrés que pueda desarrollarse en el medio externo. El crecimiento en forma de biofilm representa la forma más habitual de crecimiento bacteriano en la naturaleza. La capacidad de formación de biofilms no parece estar restringida a ningún grupo específico de microorganismos y hoy se considera que, bajo condiciones ambientales adecuadas, todos los microorganismos son capaces de formar biofilms [102]. Aunque la composición del biofilm es variable en función del sistema a estudio, en general, el componente mayoritario es agua y puede representar hasta un 97% del contenido total. Además, una parte esencial del biofilm es la matriz extracelular, formada principalmente por exopolisacáridos. En menor cantidad se encuentran otras macromoléculas como proteínas, ácido desoxirribonucleico (DNA) y productos procedentes de la lisis de las bacterias [102]. En los primeros estudios sobre la estructura del biofilm, una de las cuestiones más recurrentes era el mecanismo por el cual las bacterias tenían acceso a nutrientes y oxígeno en el interior de esta estructura. Estudios recientes realizados mediante microscopía confocal han mostrado que la arquitectura de la matriz del biofilm no es sólida y presenta canales que permiten el flujo de agua, nutrientes y oxígeno incluso hasta las zonas más profundas del biofilm [102]. La existencia de estos canales no evita, sin embargo, que dentro del biofilm podamos encontrarnos con ambientes diferentes en los que la concentración de nutrientes, pH u oxígeno varía [102]. Esta circunstancia aumenta la heterogeneidad del estado fisiológico en el que se encuentra la bacteria dentro del biofilm y dificulta su estudio.

1.5. Aumento de la capacidad terapéutica de los MBGs

Existen ciertas sustancias como iones o biomoléculas que, incorporadas al biomaterial, tienen la capacidad de incrementar algunas de sus capacidades o, incluso, añadirle otras nuevas. En el caso de la ingeniería de tejidos para

la regeneración ósea, la propiedad fundamental que se requiere en un biomaterial es que sea capaz de regenerar el tejido óseo dañado (capacidad osteogénica) y que, al mismo tiempo, pueda prevenir y/o tratar los procesos de infección que comúnmente surgen a raíz de la intervención quirúrgica (capacidad antibacteriana).

1.5.1. Dopaje con iones metálicos. El zinc

En los últimos años se ha observado que el dopaje con ciertos iones metálicos fomenta la capacidad osteogénica de los MBGs [103]. Hay muchos iones metálicos con propiedades osteogénicas descritas en la bibliografía, como el cobre, el estroncio, el galio, el cerio, el magnesio o el zinc. Este abordaje ha destacado por su simplicidad, estabilidad y seguridad para su uso en la clínica. Se ha observado que, cuando se dopa un material con alguno de estos iones, se produce una liberación de éstos al medio a medida que el material se biodegrada. Esto provoca que aumente su concentración en el medio y se fomente el desarrollo de ciertas vías metabólicas que provocan un aumento de la expresión génica en células osteoprogenitoras y, como consecuencia, de la formación ósea [104]. El zinc, además de presentar características osteogénicas, también tiene propiedades angiogénicas y bactericidas [105]. Para llevar a cabo este dopaje, se ha de llegar a un compromiso entre alcanzar las capacidades que el zinc nos ofrece sin que el material llegue a ser citotóxico.

Una de las propiedades más importantes descritas para el zinc, es su poder antibacteriano. El óxido de zinc (ZnO) es conocido por ser un potente agente antimicrobiano que actúa a través de diferentes mecanismos [105]. Actualmente se han descrito tres mecanismos de acción a través de los cuales actúa el zinc (figura 11):

- **Producción de especies reactivas de oxígeno (ROS)** a través de las propiedades semiconductoras del ZnO [106]. Las especies reactivas de oxígeno comprenden a los aniones superóxido (O_2^-), el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), y el hidróxido (OH^-). La toxicidad de estas especies se basa en su capacidad de destrucción de componentes celulares como DNA, RNA, proteínas y lípidos. Los superóxidos y radicales

hidroxilos no son capaces de penetrar en la membrana debido a su carga negativa [107]. Por lo que estas especies se encuentran en la superficie exterior de las bacterias. Por el contrario, las moléculas de H_2O_2 son capaces de traspasar la pared celular bacteriana, provocar lesiones y desencadenar la muerte celular [108].

- **Desestabilización de las membranas celulares** de las bacterias mediante contacto directo con el ZnO [109]. Cuando el ZnO entra en contacto directo con la membrana plasmática bacteriana, se produce un aumento de la permeabilidad de la misma que provoca su desestabilización y, como consecuencia, la muerte de la bacteria [81].
- **Propiedades antibacterianas intrínsecas de los iones Zn^{2+}** que se liberan cuando el ZnO entra en contacto con un medio acuoso [110]. Cuando el ZnO entra en contacto con medios acuosos, se produce una disolución parcial del mismo liberándose al medio los iones Zn^{2+} . Estos tienen un efecto significativo en la inhibición del transporte activo, así como en el metabolismo de los aminoácidos y la alteración del sistema enzimático. La actividad antibacteriana del $\text{ZnO}/\text{Zn}^{2+}$ depende de ciertos parámetros como la concentración, el tiempo de contacto el tamaño de partícula y la forma [81].

El zinc es un elemento esencial para los microorganismos y organismos de mayor tamaño ya que está involucrado en multitud de reacciones celulares esenciales estando presente, a concentraciones bajas, en el medio endógeno [111,112]. La concentración de zinc en sangre es de 10^{-4} M [113], siendo necesario que este cofactor se encuentre a concentraciones óptimas en el organismo para que se puedan llevar a cabo ciertas actividades estructurales y catalíticas [113,114]. La concentración del zinc en condiciones fisiológicas está regulada mediante distintos transportadores [114,115] siendo los iones de Zn^{2+} esencialmente no tóxicos en grandes organismos [116]. Mediante el proceso de homeostasis se regula la cantidad de zinc presente en el interior celular, sin embargo, la cantidad de este ion que se absorbe a través de las membranas celulares no está regulada. El aumento de la concentración de los iones Zn^{2+} por encima de

las concentraciones óptimas en el interior celular (normalmente entre 10^{-7} y 10^{-5} M dependiendo de la cepa [117]) perturba la homeostasis del Zn^{2+} y permite la entrada de estos iones al interior celular. El zinc comienza a ser citotóxico en el interior de la célula procariota a concentraciones mayores de 10^{-4} M [117,118]. Por lo tanto, los iones de zinc pueden presentar actividad antimicrobiana y antifúngica cuando están presentes por encima de determinadas concentraciones [119,120]. Tal y como se ha comentado, parte del poder antibacteriano del zinc se basa en la capacidad que poseen sus compuestos de escindirse parcialmente cuando entran en contacto con medios acuosos [121]. Cuando esto sucede, se liberan los iones de Zn^{2+} que potencian sus propiedades antimicrobianas [110,122]. Estos iones actúan de forma dosis-dependiente contra *Escherichia coli* [123,124], *Staphylococcus aureus*, así como contra otras cepas bacterianas [111].

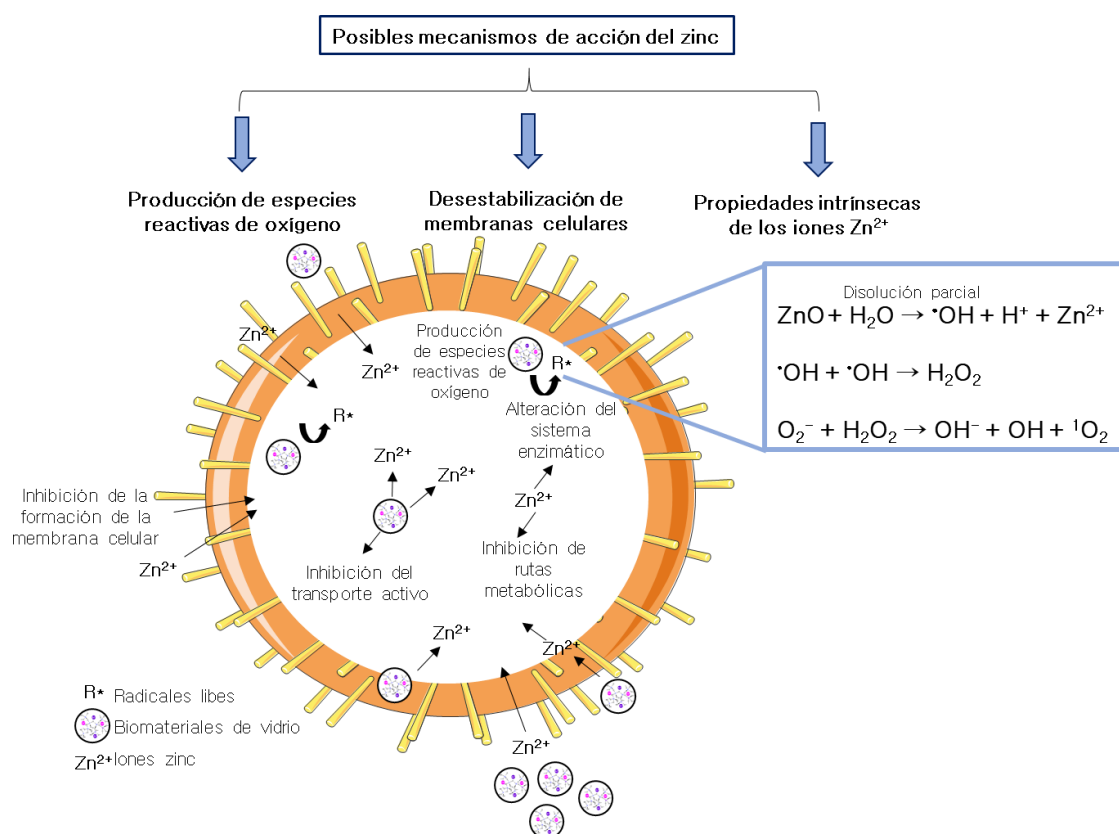


Figura 11. Posibles mecanismos de acción antibacteriana del zinc.

A lo largo de los últimos años se han elaborado múltiples vidrios dopados con zinc a distintas concentraciones y se han obtenido resultados muy prometedores recogidos en la tabla 4.

Tabla 4. Vidrios dopados con zinc: composición, formato y resultados principales.

MBGs dopados con zinc	Forma	Resultados principales	Referencia
(15-x)CaO-MO- 80SiO ₂ -5P ₂ O ₅ (M = 1 o 1.5 ZnO) %mol	Composite	Bioactividad a tiempos largos. Aumento de la proliferación y expresión de ALP en MSCs	X. Li et al. J. of Mat. Chem. 2008 , 18, 4103
73.7SiO ₂ -25.3CaO- 1ZnO 74SiO ₂ -21.2CaO- 4.8ZnO (wt%)	Polvo	Incremento del área superficial, favorece la formación de la capa de HA	L. Courthecoux et al. J. Phys. Chem. C. 2008 , 112, 13663
(38-x) CaO-xZnO- 58SiO ₂ - 4P ₂ O ₅ (mol%) (x = 0-20)	Placas y polvo	Zinc como intermediario de red del vidrio. Variación en la formación la capa de HA al añadir zinc	V. Aina et al. Acta Bio. 2009 , 5, 1211
37SiO ₂ -18CaO- 4P ₂ O ₅ -18Na ₂ O-20ZnO (%mol)	Polvo	Disminución del ratio de proliferación de células endoteliales	V.Aina et al. Acta Bio. 2009 , 5, 1211
67SiO ₂ -17CaO- 5P ₂ O ₅ -11ZnO 64SiO ₂ -26CaO- 5P ₂ O ₅ -5ZnO (% mol)	Polvo	Reducción de la producción de TNF y efecto inflamatorio profiláctico	E.A.Varmette, et L. J Biomed Mater Res A 2009 , 90, 317
(80-x)SiO ₂ -15CaO- 5P ₂ O ₅ (7% ZnO)	Polvo	Alta bioactividad y disminución de las propiedades fisicoquímicas al añadir zinc	A.J. Salinas et al. Acta Biomaterialia 2011 , 7, 3452
(80-x)SiO ₂ -15CaO- 5P ₂ O ₅ (X=2 o 4 ZnO) %mol	Andamios	El material con 2%ZnO presenta alta bioactividad y potencial osteogénico	S. Shruti et al. Acta Bio., 9, 2013 , 4836
xZnO-(22.4-x) Na ₂ O- 46.1SiO ₂ -26.9CaO ₂ - 6P ₂ O ₅ -2MgO	Polvo	Formación de la capa de HA <i>in vitro</i> . Gran capacidad de liberación de fármacos	V. Anand et al. J. of Non-Crystalline Solids, 2014 , 406, 88
60SiO ₂ -(36-x)CaO- 4P ₂ O ₅ 60SiO ₂ -(25-x) CaO-11Na ₂ O-4P ₂ O ₅ (1,5 o 10 ZnO) %mol	Polvo	No se forma la capa de HA, citocompatibilidad con células SaOS-2 que disminuye cuando el % de zinc aumenta	J. Bejarano et al. Biomed. Mat. 2015 , 10, 025001
70SiO ₂ -(26-X)CaO- 4P ₂ O ₅ (X=0,3 o 5 ZnO) %mol	Andamios	Efecto antibacteriano con <i>B. Subtillis</i> y <i>P. aureginosa</i> con el material con 5%ZnO	S. Kargozar et al. Acta Bio. 2018 , 81, 1
(80-x)SiO ₂ -15CaO- 5P ₂ O ₅ (X=4 o 7 ZnO) %mol	Andamios	Efecto antibacteriano con <i>S. aureus</i> y ausencia de citotoxicidad con el 4% ZnO	S. Kargozar et al. Acta Bio. 2018 , 81, 1
70SiO ₂ -25CaO- 5ZnO (mol%)	Nanopartículas	Liberación baja y continua de zinc. Diferenciación en células MG-63	Z.Neščáková et al. Bioact. Mat. 2019 , 4, 312
xZnO-60SiO ₂ -4P ₂ O ₅ - (36-x)CaO (x = 2 and 4% mol)	Polvo	No citotóxico en células G292. Expresión de ALP con el 2% ZnO. Efecto antibacteriano con <i>E. coli</i>	M.S.N. Shahrababak et al. Silicon, 2019 , 11, 2741

1.5.2. Biomoléculas osteogénicas. La osteostatina

Existen diferentes sustancias biológicas con capacidad de aumentar la actividad osteogénica de un implante, como las proteínas morfogénicas óseas (BMPs), el ácido ribonucleico de interferencia (RNAi), etcétera [125]. En este sentido, destaca la proteína relacionada la parathormona (PTHrP), que se identificó por vez primera por su papel patogénico en la hipercalcemia tumoral de origen humoral [126]. El extremo N-terminal de la PTHrP tiene similitud con la parathormona (PTH). Se sabe que tanto la PTHrP como el receptor tipo 1 (PTHrP1), común para la PTH y la PTHrP, se expresan en multitud de tejidos, malignos y no malignos, donde la PTHrP tiene efectos auto/paracrinos e intracrinos [127]. En el tejido óseo la PTHrP, sintetizada por osteoblastos y condrocitos, desempeña un papel muy importante en el desarrollo del hueso endocondral y como reguladora del metabolismo del tejido óseo adulto [128]. Si lo enfocamos desde un punto de vista evolutivo, la PTHrP, proviene de un ancestro común a la PTH con la que mantiene una gran homología estructural.

El gen de la PTHrP humana, se encuentra localizado en el brazo corto del cromosoma 12. Este gen presenta 9 exones y, al menos, 3 promotores y un silenciador de la región 5'. Por procesamiento alternativo de la región 3' se generan tres variedades de RNA mensajero (RNAm) que dan lugar a tres isoformas proteicas distintas de 139, 141 y 173 aminoácidos [126]. Cada una de estas isoformas, codifica una secuencia N-terminal común de 36 aminoácidos que contienen la región homóloga (aminoácidos entre 1 y 13). La conformación espacial de la región 14-34, aunque no su secuencia, es similar en las proteínas de la PTH y en la PTHrP, permitiendo su interacción con el receptor PTHrP1. La región que va desde el aminoácido 35 al 111 de la PTHrP está muy conservada en las distintas especies (humanos y roedores solo difieren en 2 aminoácidos). En su procesamiento postraduccional [129] la PTHrP puede generar:

- Un fragmento 1-36 en el extremo N-terminal
- Un fragmento medio cuyo extremo C-terminal podría estar entre los aminoácidos 90-100.

- Un posible fragmento C-terminal a partir del aminoácido 107, hasta el 139. Este último fragmento contiene el pentapéptido 107-111, conocido como osteostatina (figura 12).

Actualmente la proteína PTHrP se considera una proteína multifuncional, capaz de desempeñar distintas funciones, asociadas a sus distintos fragmentos. Presenta acciones endocrinas, similares a las de la PTH, como la estimulación de la resorción ósea y la inhibición de la reabsorción renal del fosfato. Estas acciones se deben a la interacción del fragmento N-terminal con el receptor PTHR1 en hueso y riñón respectivamente [126,127,130]. Recientemente se ha sugerido la existencia de distintos receptores PTHR1 tanto para la PTHrP (1-36) como para otros dominios de la PTHrP en varios tipos celulares [131-133]. Aunque la PTHrP y la PTH interacciones con el receptor PTHR1 a través de su extremo N-terminal, el tipo de interacción y, como consecuencia, las vías celulares que se activan a través de cada una de estas proteínas podrían ser distintas [134]. Si bien el fragmento 1-36 de la PTHrP ejerce acciones anabólicas en el hueso estimulando la formación ósea [135,136] los posibles mecanismos de acción asociados a esta osteogénesis son poco conocidos.

La región media de la PTHrP (aminoácidos 38 y 106) posee una función y tamaño desconocidos. Esta región posee secuencias de localización nuclear o NLS entre los aminoácidos 87 y 106, ejerciendo así acciones intracrinas.

El dominio C-terminal de la PTHrP, fragmentos 107-112 y 107-139, presenta dos fragmentos limitados por aminoácidos básicos que podrían ser reconocidos por endopeptidasas [137] las cuales son potentes inhibidores de la actividad osteoclástica [131,138-140]. El pentapéptido 107-111 de la PTHrP presenta una potente actividad antiresorptiva *in vitro* e *in vivo*, lo que llevó a denominarlo **osteostatina** [137]. Se ha comprobado que este dominio C-terminal de la PTHrP también influye en la diferenciación y supervivencia osteoblásticas, mediante la activación de la PKC [141]. Aún no se ha logrado aislar un receptor para la región C-terminal de la PTHrP, pero estudios recientes han demostrado su relación con la transactivación

del receptor 2 del VEGF (VEGFR-2) cuyas acciones están asociadas a la función osteoblástica [141,142].

Por otro lado, varios estudios han demostrado que la osteostatina induce la expresión de diferentes genes osteogénicos como la fosfatasa alcalina, la osteocalcina, el colágeno, la OPG, así como la activación del RANKL y el factor de crecimiento endotelial en células osteoblásticas [143]. Se ha comprobado que cuando se administra el extremo N-terminal de la PTHrP de forma intermitente y sistémica en humanos y roedores aumenta el anabolismo óseo [144–146]. Además de las propiedades antiresorptivas de la osteostatina [131], también se han descrito sus propiedades osteogénicas en modelos *in vitro* e *in vivo* [140,142,147,148]. Asimismo, se ha demostrado que la osteostatina cargada en diferentes biocerámicas, y otros biomateriales, acelera la curación y regeneración ósea de defectos críticos y no críticos en huesos largos en modelos *in vivo* en conejos y ratas adultas sanas y osteoporóticas [149–151]. Recientemente se ha comprobado que la osteostatina cargada en nanopartículas mesoporosas de sílice junto con un RNAsi de SOST, induce un aumento de la expresión de genes osteogénicos clásicos *in vitro* e *in vivo* [152], mejorando el efecto del RNAsi por sí solo. En este sentido, la osteostatina presenta algunas ventajas importantes en comparación con otras proteínas osteogénicas, como por ejemplo las BMP (proteínas morfogénicas óseas) [25]. Este péptido ha demostrado tener actividad antiresorptiva y también propiedades osteogénicas tanto *in vitro* como *in vivo*. Las BMP también poseen propiedades osteogénicas, pero pueden pasar a comportarse como adipogénicas cuando se administran en dosis altas. Estos efectos positivos de la osteostatina son específicos para células óseas y queratinocitos, mientras que los efectos de las BMP son pleiotrópicos, actuando sobre muchos tejidos y provocando la activación del sistema inmunológico [25]. La osteostatina es un pequeño pentapéptido, fácil de inmovilizar en diferentes biomateriales, activo a bajas concentraciones (<nM) y, por ello, de gran importancia para aplicaciones locales. Por el contrario, las BMP poseen un mayor peso molecular, lo que dificulta su inmovilización en los materiales, requiriendo concentraciones más altas (>nM) para inducir efectos osteogénicos [25].

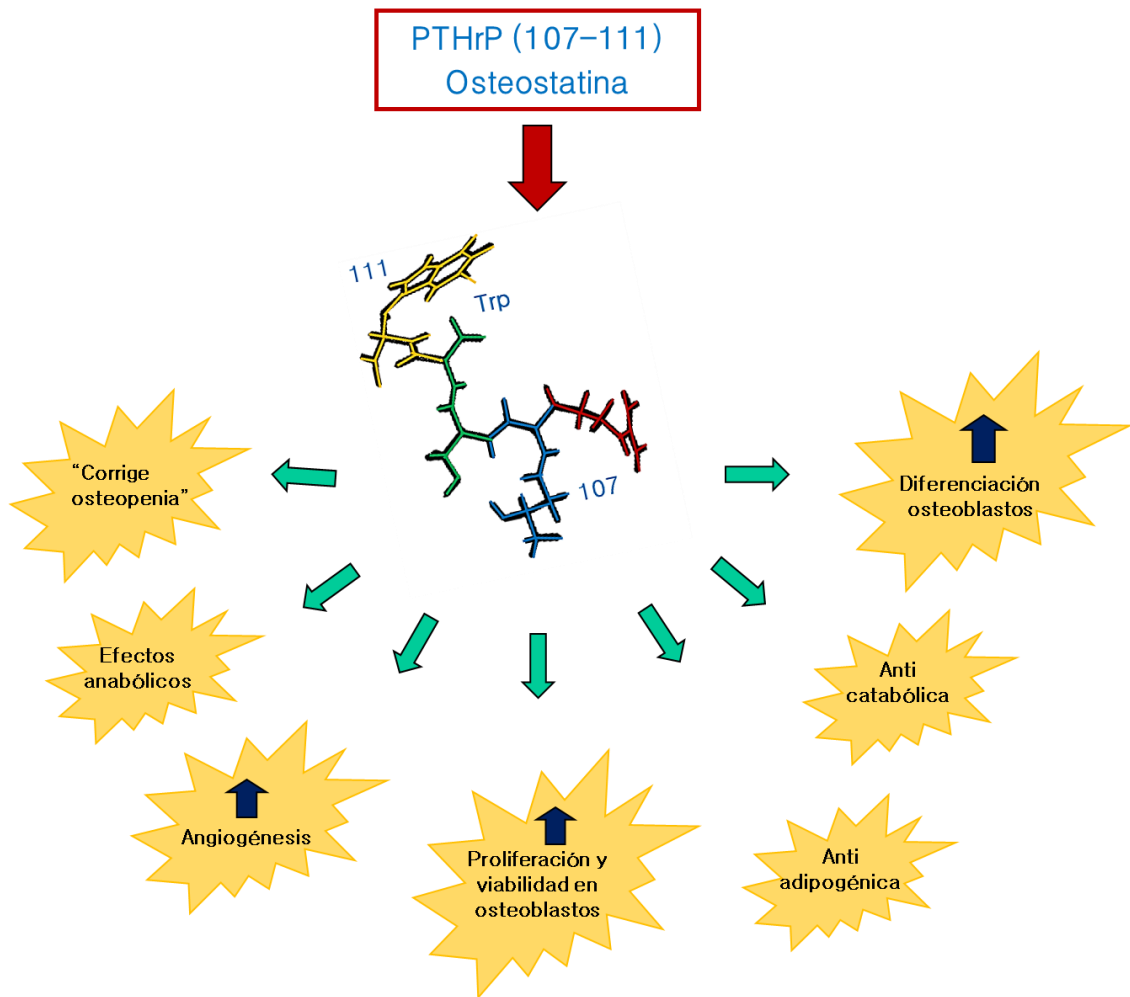


Figura 12. Esquema resumen de la osteostatina, mostrando sus propiedades y su estructura.

1.5.3. Células madre mesenquimales

Las células madre son células indiferenciadas con capacidad de autorrenovación y de diferenciarse en células de múltiples linajes [153]. Los diferentes tipos de células madre se pueden clasificar en:

- **Células madre embrionarias (ESCs)** que son células madre pluripotentes aisladas, normalmente, de la masa celular interna (ICM) del blastocisto preimplantado. Las ESCs son capaces de generar cualquier célula madura de las tres líneas germinales [154] y poseen estabilidad genómica. Su uso está restringido debido a limitaciones éticas y complicaciones en el momento de la obtención.

– **Células madre pluripotentes inducidas (iPSCs)** que se generan a través de la sobreexpresión de cuatro factores de transcripción en células adultas: Oct4/3, Sox2, Klf4 y c-Myc [155]. Las iPSCs son muy similares a las ESCs, ya que poseen capacidad de autorrenovación, potencial de diferenciación y la capacidad de producir quimeras competentes en la línea germinal. A pesar de estos hechos, su estabilidad genómica sigue cuestionándose.

A la hora de escoger una línea celular para emplear en terapia regenerativa, es necesario que cumpla una serie de requisitos. Entre ellos, la línea celular debe ser estable, fácil de extraer y presentar un potencial regenerador alto. Se llevaron a cabo diversos ensayos en los que se aislaron células de la médula ósea de ratón que presentaban capacidad de adherirse al plástico y que crecían formando colonias en forma de huso. Estas células se denominaron fibroblastos unitarios formadores de colonias [156]. Debido a su origen mesodérmico y su capacidad para diferenciarse en células especializadas, pasaron a llamarse células madre mesenquimales.

– **Células madre mesenquimales (MSCs)** son células madre multipotentes adultas que se extraen de distintas fuentes humanas y animales. Tienen capacidad de autorrenovación, son de fácil acceso, presentan una estabilidad genómica excepcional, son fáciles de cultivar *in vitro* y no presentan problemas éticos asociados, lo que marca su importancia como candidatas en la terapia celular, medicina regenerativa e ingeniería de tejidos [157].

Las primeras células madre humanas (MSCs) se aislaron de la médula ósea [158], desde entonces, se han conseguido aislar de casi todos los tejidos, incluida el área perivascular [159]. A pesar de que aún no exista una definición única ni un ensayo cuantitativo para identificar las MSCs en una población celular mixta [157], la Sociedad Internacional de Terapia Celular ha propuesto unos criterios mínimos para diferenciar estas células. Las MSCs deben ser capaces de adherirse al plástico, deben presentar un conjunto específico de marcadores de superficie que funcionan como grupo de diferenciación CD73, D90, CD105 y carecen de la expresión de CD14, CD34, CD45 y el antígeno leucocitario humano DR (HLA-DR) y, además,

tienen la capacidad de diferenciarse *in vitro* en adipocitos, condrocitos y osteoblastos [160]. Estas características son válidas para todas las MSCs aunque existen pocas diferencias entre las MSCs aisladas de diferentes tipos de tejido.

Las MSCs tienen la capacidad de diferenciarse *in vitro* en los tres linajes celulares: ectodermo, mesodermo y endodermo, mediante el uso de medios adecuados y suplementos de crecimiento que inician el proceso de diferenciación hacia un linaje específico [161]. La diferenciación de MSCs es inducida por suplementos añadidos al medio de cultivo que provocan la activación de los factores de transcripción (genes) responsables de la adipogénesis, osteogénesis o condrogénesis. El método clásico para diferenciar las MSCs en osteocitos es cultivar las células con ácido ascórbico, β -glicerol fosfato y dexametasona durante 3 semanas en medio de cultivo condicionado. La inducción osteogénica de las MSCs comienza con procesos de agregación mineral en los que aumenta la actividad de la fosfatasa alcalina [158]. Estos nódulos mineralizados son positivos para las tinciones con rojo de alizarina y von Kossa. El proceso de osteogénesis comienza con la diferenciación de una célula osteoprogenitora en preosteocito que posteriormente se diferencia a osteoblasto maduro [162].

Por otro lado, cabe destacar que las MSCs poseen capacidad inmunomoduladora, secretan citoquinas, factores de crecimiento e inmunoreceptores que regulan el microambiente del tejido donde se las implanta. Su capacidad de diferenciarse en distintos linajes celulares, su capacidad inmunomoduladora y la secreción de moléculas antiinflamatorias, así como factores de crecimiento hacen de las MSCs una herramienta terapéutica muy eficaz para el tratamiento de distintas enfermedades [163]. Las MSCs no solo tienen la capacidad de fomentar la regeneración tisular por sí mismas, sino que, además, son capaces de influir en el ambiente en el que se las implanta fomentando la regeneración del tejido circundante, modificando la respuesta inmune y regulando los procesos de inflamación. Actualmente se las considera una potente herramienta para tratar enfermedades autoinmunes, inflamatorias y degenerativas [164–166].

Existe un término conocido como *homing* de MSCs que se utiliza cuando las células son capaces de integrarse en el lugar de la lesión, proceso que sigue siendo un desafío en el campo de la terapia celular. La mayoría de las veces, el suministro local de las MSCs es beneficioso debido a la interacción que se produce entre ellas y los tejidos del huésped. Este proceso se produce acompañado de la secreción de factores tróficos [167]. Hay una serie de factores como la edad de las células, las condiciones de cultivo, el número de pase celular y el método de administración, que influyen en la capacidad de búsqueda del sitio lesionado [168]. Un pase más alto disminuye la eficacia del injerto de las MSCs y se ha demostrado que las MSCs recién aisladas tienen una mayor eficacia respecto a las células que ya han sido cultivadas. Además, la fuente de la que se aíslan también influye en sus capacidades. Por otra parte, se ha demostrado que la cantidad de oxígeno que se les administra al cultivarlas, así como la disponibilidad de suplementos, como factores de crecimiento o la presencia de citoquinas, desencadena una serie de procesos importantes que es necesario tener en cuenta a la hora de obtener las MSCs [169].

Hoy en día se desconoce el mecanismo exacto a través del cual las MSCs migran y se dirigen al lugar de la lesión, aunque se cree que ciertas quimiocinas y sus receptores están involucrados en el proceso [170]. Las MSCs expresan multitud de receptores moleculares de adhesión que fomentan el proceso de migración. El receptor de quimiocinas tipo 4 (CXCR4) y su proteína de unión al factor derivado del estroma 1- α (SDF-1 α) juegan un papel vital en este proceso [170].

Las MSCs presentan un futuro muy prometedor como herramienta terapéutica [171]. El número de ensayos clínicos y preclínicos con MSCs ha aumentado considerablemente en la última década [163]. En 2015 había 463 ensayos clínicos registrados, en diferentes fases, en todo el mundo que evaluaban la terapia celular basada en MSCs [172]. Aunque el progreso de los estudios clínicos es lento (solo existen siete estudios con resultados finales), el uso eficiente de MSCs en grandes ensayos clínicos con resultados prometedores ha demostrado que las MSCs pueden ser una herramienta excelente para la medicina regenerativa.

1.5.4. Fármacos convencionales para tratar la infección ósea

Existen multitud de fármacos que pueden ser empleados para tratar un proceso de infección de forma efectiva. Estos pueden emplearse una concentración bacteriostática: concentración de fármaco requerida para que no se produzca proliferación bacteriana. Concentración bactericida: concentración de fármaco requerida para conseguir la muerte bacteriana. Los fármacos están clasificados en diferentes familias, dentro de las cuales encontramos fármacos con distintas propiedades y características (tabla 5).

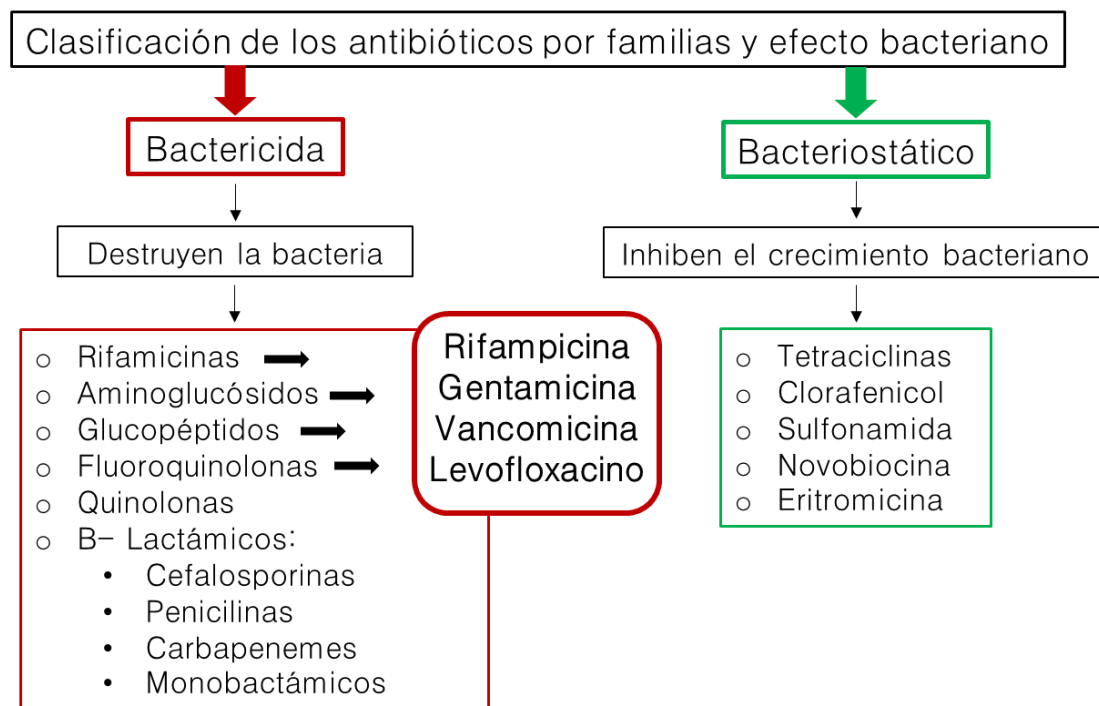


Tabla 5. Clasificación de los fármacos por familias y el efecto que provoca en las bacterias.

Dentro de estas familias, algunos de los fármacos más empleados para tratar procesos de infección en hueso son:

- El **levofloxacino**, es una fluoroquinolona con propiedades antibacterianas. Efectivo contra organismos aerobios Gram+ y Gram–, muestra también actividad moderada contra los anaerobios [173]. La penetración del fármaco en tejidos y fluidos corporales es rápida y generalizada después de su administración, normalmente, vía oral [173]. El levofloxacino ha demostrado eficacia antibacteriana contra

distintos tipos de infecciones, incluyendo las provocadas en las vías respiratorias, genitourinarias, obstétricas, ginecológicas, la piel y los tejidos blandos [173]. Por lo tanto, se considera al levofloxacino un fármaco antibacteriano de amplio espectro, capaz de tratar una amplia variedad de infecciones. El mecanismo de acción del levofloxacino, como el de otras fluoroquinolonas, implica la inhibición de la enzima DNA girasa bacteriana, una topoisomerasa de tipo II [173].

- **La vancomicina** es un glucopéptido de estructura compleja que se sintetiza de modo natural por *Nocardia orientalis*. Ejerce su efecto bactericida inhibiendo la síntesis de la pared celular bacteriana, ya que posee gran afinidad por los terminales D-alanil-D-alanina de las unidades precursoras de la pared celular [174]. Estas unidades están compuestas por ácido N-acetilmurámico, N-acetilglucosamina y un pentapéptido, y forman parte de la estructura de peptidoglucano de la pared celular. La vancomicina inhibe el proceso de la transglicosilación de estos precursores, impidiendo su unión a las capas de peptidoglucano, y afectando la estabilidad de la pared bacteriana [174]. También inhibe la siguiente etapa de formación de la pared celular, la transpeptidación, a través de efecto estérico. Presenta alta efectividad contra bacterias Gram+, mientras que no es eficaz contra las Gram- debido a su gran tamaño e incapacidad para atravesar su membrana [174].
- **La gentamicina** es un aminoglucósido, producido por la *Micromonospora purpurea*. Es utilizado como antibiótico de amplio espectro y acción bactericida para el tratamiento de infecciones causadas bacterias Gram-, como *Escherichia coli*. También es activo, en menor medida, para bacterias Gram+. Como todos los antibióticos aminoglucósidos, el mecanismo de acción de la gentamicina se basa en su unión a la subunidad S30 del ribosoma bacteriano, impidiendo la transcripción del DNA de la bacteria y, por tanto, la síntesis de proteínas en los microorganismos susceptibles.

- **La rifampicina** es un antibiótico bactericida del grupo de las rifamicinas. Es un componente semisintético derivado de rifamicina (previamente conocido como *Amycolatopsis mediterranei* y *Streptomyces mediterranei*). Las rifamicinas son antibióticos macrocíclicos caracterizados por un grupo naftohidroquinona cromóforo, separado por un largo puente alifático, con un grupo acetilo en C25. La rifampicina se une a la subunidad β de la polimerasa de RNA (porción de la RNA polimerasa bacteriana que contiene el centro activo de la enzima y encargada de unirse al DNA para comenzar la transcripción) que depende de DNA (rpoB) (gen que codifica para la subunidad β de la RNA polimerasa bacteriana), formando un complejo estable fármaco-enzima. La unión del fármaco a la enzima suprime la formación de cadenas en la síntesis de RNA. La rifampicina inhibe el crecimiento de muchas bacterias Gram+ y otras Gram- como *Escherichia coli*, *Pseudomonas*, *Proteus indolpositivos* e *indolnegativos* y *Klebsiella*. Es un fármaco muy activo contra *Staphylococcus aureus* y estafilococos coagulasa-negativos. También muestra gran actividad contra *Neisseria meningitidis* y *Haemophilus influenzae*.

Uno de los grandes retos a los que tiene que enfrentarse la medicina actual a nivel mundial tiene que ver con el tratamiento y control de infecciones producidas por bacterias. Se ha comprobado que el uso de antibióticos convencionales provoca que las cepas más tratadas en clínica desarrollen mecanismos de resistencia o multiresistencia [175]. Este mecanismo de resistencia constituye un problema creciente de salud pública con gran importancia en la actualidad por las implicaciones socioeconómicas que presenta. Ante esta situación, es conveniente fomentar la búsqueda de terapias alternativas que puedan, de la misma forma, prevenir y tratar procesos de infección. La búsqueda de nuevos compuestos con actividad antibacteriana representa un factor determinante para la erradicación de las infecciones producidas por bacterias.

1.5.5. Sustancias antibacterianas alternativas. La curcumina

Entre los distintos compuestos con propiedades antibacterianas que se están estudiando en la actualidad, se encuentra la cúrcuma. La *Curcuma longa*, de nombre común, cúrcuma, es el rizoma de una herbácea de la familia de las zingiberáceas, nativa del suroeste de la India. Los componentes químicos más importantes de la cúrcuma son los conocidos curcuminoides: curcumina (diferuloylmethane), demethoxycurcumin, bis-demethoxycurcumin. La curcumina, con fórmula química (1,7-bis(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-1,6-heptadiene-3,5-dione) [176], es el componente que le otorga el color anaranjado y es el curcuminóide mejor descrito, presente en un 3.14% en peso en la cúrcuma. La cúrcuma se utiliza ampliamente en la industria alimentaria como colorante y como aditivo [177]. Además, presenta una larga lista de propiedades relacionadas con su uso en la clínica como capacidad antibacteriana, antiinflamatoria, anticancerígena y un largo etcétera [178]. La propiedad de la cúrcuma más estudiada en los últimos 10 años es su efecto anticancerígeno [179]. Sin embargo, el primer trabajo publicado sobre los efectos terapéuticos de la cúrcuma fue sobre sus capacidades antibacterianas contra varias cepas como *S. aureus*, *Trichophyton gypsum*, *Salmonella paratyphi*, y *Mycobacterium tuberculosis* [180]. Actualmente se están publicando numerosos estudios que documentan la capacidad antibacteriana de la cúrcuma contra un amplio rango de cepas bacterianas [178,181]. Otras publicaciones demuestran que la cúrcuma inhibe activamente el crecimiento de cepas resistentes a antibióticos [182,183]. Gracias a estas evidencias y sabiendo que su administración en humanos es muy segura, incluso a dosis altas (12 g/día), se ha empezado a considerar a la cúrcuma como un agente terapéutico de gran interés. Una de sus aplicaciones más interesantes podría ser como agente antibacteriano, de forma que se pudiera evitar el uso de antibióticos clásicos y sus limitaciones asociadas. Además, entre muchas otras cepas bacterianas, se ha comprobado la eficacia de la cúrcuma en *S. aureus*, una de las bacterias más comunes en infección de hueso [184].

Dado que la curcumina es uno de los componentes principales de la cúrcuma, y está ampliamente descrita como biomolécula antibacteriana natural [182], se establece a esta biomolécula como un compuesto de alto

interés que añadir a los materiales para proporcionarles capacidad antibacteriana. Algunos de los mecanismos de acción que se consideran como posibles en cuanto a la acción antibacteriana de la curcumina (figura 13) son [182]:

- Unión a proteínas FtsZ: estudios previos [185] han demostrado que la curcumina es capaz de interactuar con las proteínas FtsZ (homólogas procariotas de la proteína citoesquelética eucariótica tubulina) *in vitro*. Se cree que la curcumina interactúa con ellas impidiendo que se produzca el ensamblaje de los protofilamentos, por lo que suprime la formación del anillo Z que conduce a la inhibición de la citocinesis y, por lo tanto, imposibilita la proliferación bacteriana.
- Unión a peptidoglicanos: se ha demostrado que la curcumina es capaz de unirse al peptidoglicano (PNG) de la pared celular bacteriana. La unión entre la curcumina y el peptidoglicano de la pared celular bacteriana podría desencadenar daños en la pared celular y en la membrana, lo que llevaría a la lisis bacteriana[182]. Por otra parte, otros estudios [181] muestran que concentraciones crecientes del peptidoglicano PNG bloquean la acción antibacteriana de la curcumina.
- Inhibición del gen *mecA*: además, se ha demostrado que la curcumina puede inhibir la transcripción del gen *mecA*, lo que se traduce en una disminución de la expresión de las proteínas PBP2 α . Esta proteína es responsable de conferir resistencia a los antibióticos β -lactámicos, por lo que si su expresión disminuye la bacteria se sensibilizaría a la acción de los antibióticos β -lactámicos como la penicilina y la meticiclina cuyo objetivo es la pared celular bacteriana [186].

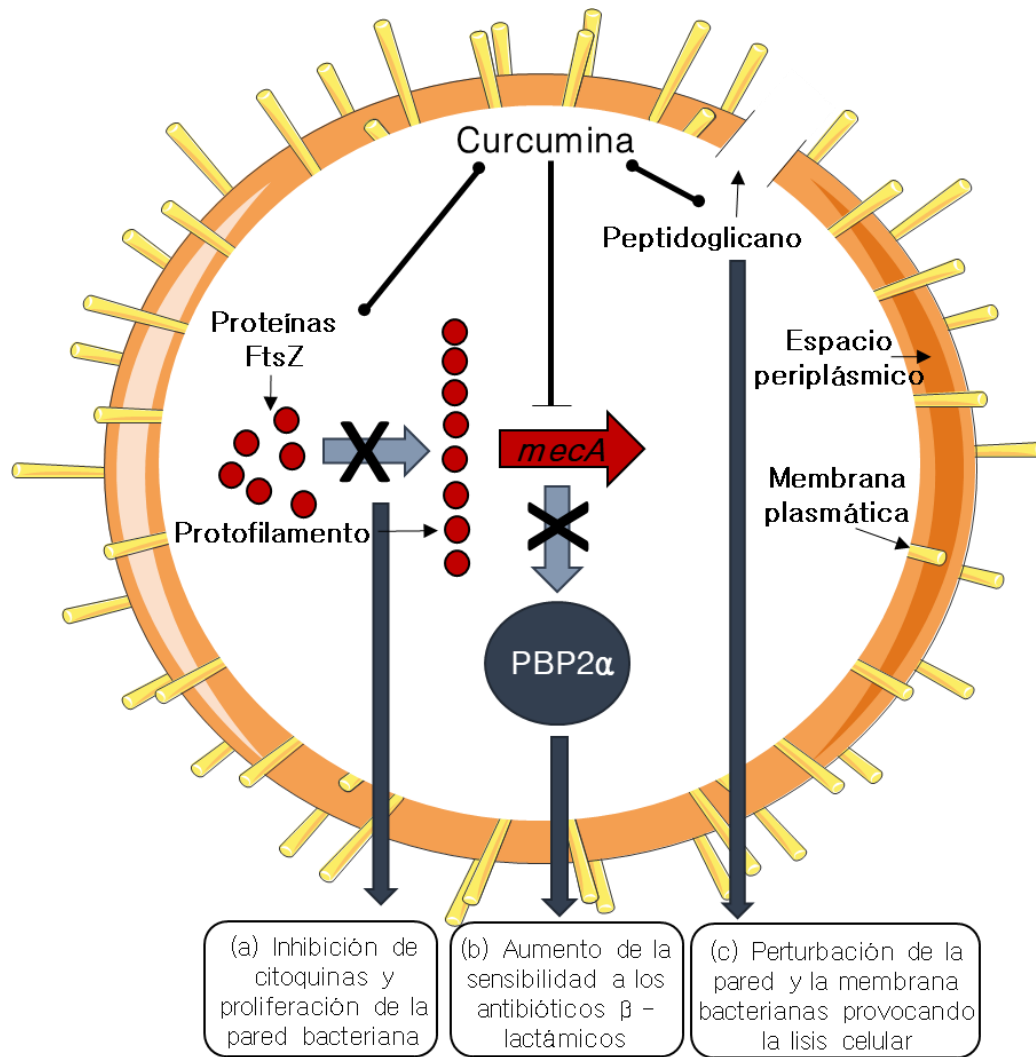


Figura 13. Mecanismos de acción de la curcumina en el interior celular que incrementan la acción antibacteriana.

1.6. Nanopartículas de Vidrio Mesoporoso

Con el paso de los años, se han ido diseñando nuevos biomateriales con capacidades mejoradas para la regeneración de tejidos y que funcionan como transportadores locales de todas las sustancias que se han descrito previamente. Después de realizar un estudio de los biomateriales disponibles actualmente en el campo de la medicina regenerativa y con la experiencia previa del uso de andamios tridimensionales de MBG, se puede determinar que las nanopartículas de vidrio mesoporoso (MGNs) constituyen un material con excelentes características para estudiar nuestro sistema. Las MGNs son uno de los sistemas inorgánicos para la administración de sustancias más prometedores que existe en la actualidad [187]. Las MGNs son materiales

sólidos, con tamaños de entre 20 y 150 nm, compuestos de una estructura porosa que puede absorber o encapsular grandes cantidades de moléculas bioactivas [188]. Las cualidades principales de las MGNs son: su gran capacidad de carga de distintas biomoléculas debido a la elevada área superficial que poseen y su gran volumen de poro [189,190]. Así como la capacidad de ajustar su tamaño de poro (2–50 nm), el cual varía en función del surfactante que se utilice [57], la capacidad de modificar su forma, la conectividad de sus poros, la capacidad de funcionalizar su superficie [191], su biodegradabilidad en distintos ambientes biológicos [192,193], su gran biocompatibilidad *in vitro* e *in vivo* [194] y sus altos niveles de excreción [195].

1.6.1. Proceso de síntesis adaptable. Método Stöber.

Además de presentar excelentes propiedades para actuar como nanotransportadores de distintas sustancias, las MGNs, así como otros tipos de nanopartículas híbridas, son buenas candidatas para la incorporación de la mayoría de los nuevos avances en nanotecnología. De hecho, la sílice mesoporosa, lejos de ser un material simple para la síntesis de nanopartículas, se ha convertido en un material ampliamente utilizado para conectar distintas unidades y construir un nanocompuesto multifuncional y biodegradable [196]. Además, las MGNs pueden fabricarse, relativamente, a gran escala, pudiendo adquirir una amplia variedad de morfologías y funciones que les proporcionan la capacidad de ser utilizadas en múltiples aplicaciones biomédicas. En general, las MGNs se sintetizan de forma sencilla mediante el método Stöber modificado. Este método está basado en la química sol–gel, incorporando algunas modificaciones. A partir de este método se obtienen MGNs empleando como precursores tetraetilortosilicato (TEOS), precursores de iones metálicos que se añaden normalmente a una disolución en base agua, etanol e hidróxido de amonio. Ajustando la relación entre estos parámetros (TEOS/H₂O, pH, tipos de precursores) [197] es posible modificar el tamaño y la morfología de las MGNs. Uno de los puntos clave de este método se basa en la presencia de los grupos hidroxilo (OH–

) en la superficie de las MGNs, lo que produce fuerzas repulsivas entre las MGNs, facilitando la formación de estructuras esféricas dispersas [197].

Como se ha comentado anteriormente, este método necesita precursores de iones metálicos que se incorporen en la estructura de las nanopartículas y funcionen como modificadores de red. Este proceso ha de llevarse a cabo de forma controlada ya que, de no ser así, podría llegar a tener consecuencias negativas en la homogeneidad de tamaños [198], formas regulares [199], disgregación [200] y crecimiento de estas. Hay que tener en cuenta que el fósforo también se suele incorporar a las MGNs en forma de ortofosfatos (PO_4^{3-}). Este compensa su carga con los iones calcio que se añaden en forma de nitratos y funcionan como modificadores de red [201]. Existe cierta proporción de iones de calcio e iones metálicos que se pueden incorporar a las MGNs, de forma que se mantengan estables sus parámetros, ya que estos también afectan a la morfología, la composición y la dispersión de las MGNs resultantes [202].

Además, el método Stöber utiliza normalmente un agente tensioactivo catiónico, que suele ser bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB), que actúa como agente director de la estructura de las MGNs, consiguiendo que se genere la ya mencionada estructura porosa [201]. Los precursores de iones metálicos (generalmente sales de nitrato) son propensos a interactuar con surfactantes catiónicos, lo que puede causar la pérdida de la mesoporosidad ordenada [203,204].

El TEOS hidrolizado y los iones metálicos en solución, tienen la capacidad de ensamblarse alrededor de micelas para formar partículas compuestas con diferentes morfologías. La forma y el tamaño de las MGNs puede modificarse ajustando la concentración del agente tensioactivo empleado. Además, hay que tener en cuenta que la eliminación de este afecta a la estructura interna de las MGNs [205,206]. Por ejemplo, la eliminación del CTAB provoca la formación de mesoporos en las MGNs [201]. Este tipo de síntesis permite incorporar especies orgánicas que actúan como agentes directores de la estructura o como barreras estéricas que mejoran la dispersión de las partículas [207]. Además, estas especies orgánicas

también pueden facilitar la creación de morfologías más complejas, como podrían ser estructuras huecas.

A través de este método, se pueden obtener distintos tipos de nanopartículas con tamaño, mesoporosidad y formas variables [208]. En este sentido, surge la posibilidad de sintetizar nanopartículas con porosidad central o radial y estructura tridimensional mesoporosa con alto grado de accesibilidad [209], así como nanopartículas con estructura hexagonal 2D con poros paralelos longitudinalmente (estructura tipo panal). Además, su tamaño nos permite usarlas como nanotransportadores intercelulares de las sustancias que carguemos en su interior, ya que estas nanopartículas, son capaces de atravesar la membrana celular y liberar su contenido en el interior de la célula.

1.6.2. Morfología y composición

Las nanopartículas constituyen un tipo de biomaterial de gran interés para multitud de aplicaciones biomédicas debido a su pequeño tamaño, gran superficie específica y relación superficie-volumen [210]. El tamaño que poseen facilita procesos biológicos como la endocitosis, de gran interés para ciertas aplicaciones. La composición de las MGNs también desempeña un papel fundamental ya que influye en su capacidad de disolución, bioactividad, así como en procesos tan importantes como la formación de la apatita [211]. Además, los iones biológicamente activos, incorporados al material, pueden incorporar ciertas propiedades al material e inducir respuestas celulares concretas según el tipo de ion y la concentración a la que se incorpore. De esta manera, existen una serie de parámetros que hay que tener en cuenta a la hora de diseñar las nanopartículas que se desea sintetizar (figura 14) y que son esenciales para determinar el comportamiento y las propiedades que las nanopartículas van a presentar.

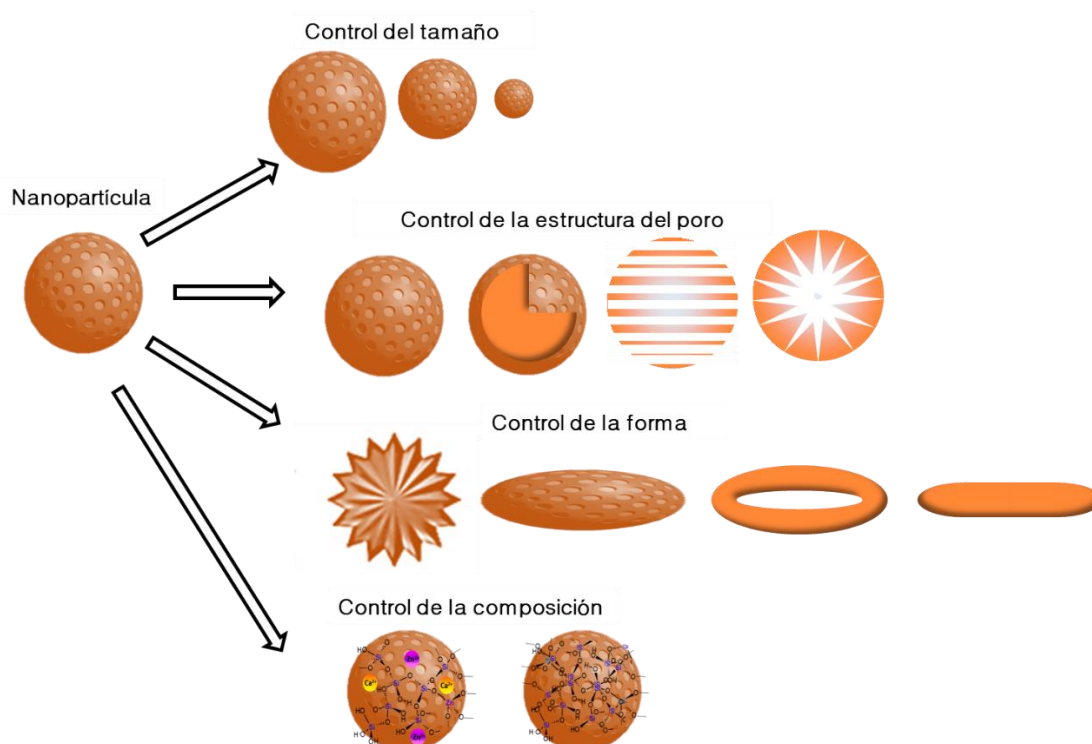


Figura 14. Esquema resumen de los parámetros que son necesarios controlar al sintetizar las nanopartículas de vidrio mesoporoso.

1.6.2.1. Control del tamaño, forma y estructura del mesoporo

Desde un punto de vista muy básico, las MGNs pueden considerarse sistemas de base sílice, dopadas con iones metálicos (Ca, Zn, etc.) o no metálicos (P). De esta forma, en los métodos de síntesis basados en el método Stöber, las concentraciones de amoníaco, agua y TEOS afectan significativamente al tamaño de estas, tal y como han demostrado distintos estudios [212,213]. Se ha observado que el tamaño de las MGNs se ve afectado por la concentración, así como por el momento en el que se agregan los precursores de iones metálicos durante el proceso de síntesis [214]. Es necesario tener en cuenta que la adición de sales metálicas puede llegar a deteriorar la estabilidad de las MGNs [215]. Por ello, actualmente se emplean especies poliméricas que actúan como barreras, impidiendo la agregación de las MGNs [216].

Actualmente, el CTAB es el surfactante que se usa de forma más habitual para dar forma a las MGNs, tal y como se describe en estudios previos [204]. Se ha comprobado que cuando se utiliza a bajas concentraciones se consigue obtener materiales esféricos. La forma esférica suscita gran interés

ya que proporciona propiedades de flujo favorables para utilizar estos materiales en fluidos biológicos y, además, se sabe que esta forma posibilita que las MGNs internalicen en las células con mayor facilidad [217].

Las MGNs presentan poros gracias al uso de surfactantes durante el proceso de síntesis. El tamaño y distribución de los poros que se generan depende de la concentración de surfactante empleada y la temperatura a la que se lleva a cabo la reacción [218]. Las MGNs sintetizadas a través de métodos basados en el Stöber, suelen presentar tamaños de poro inferiores a 5nm [205,219]. Esto puede limitar su capacidad de carga de biomoléculas u otros factores. Empleando la técnica de microembulsión, se puede conseguir que estas nanoesferas presenten poros de mayor diámetro (~ 7 nm) [220]. Por ello, se suelen introducir ciertas modificaciones en este método, incrementando las capacidades de las MGNs resultantes.

1.6.2.2. Control de la composición

La composición de las MGNs también es un factor a tener en cuenta durante su desarrollo ya que determina las propiedades de las MGNs resultantes. Su composición puede modificarse incorporando una serie de sustancias, como por ejemplo iones biológicamente activos [221]. El calcio es un elemento esencial en las MGNs, ya que desempeña un papel crítico en el proceso de formación de la apatita, así como en la diferenciación osteogénica de las células. Su incorporación a concentraciones altas ($> 20\%$ mol) sin afectar a la dispersión de las MGNs sigue siendo un desafío. En los procesos de síntesis basados en la química de formación de un gel a través de reacciones ácido/base, se pueden incorporar cantidades superiores a un 20% mol a expensas de la dispersión de las nanoesferas [215]. Además, generalmente se forma una brecha entre la composición nominal y la experimental, lo que afecta en al control preciso de la composición de las MGNs. Esta brecha puede reducirse controlando de forma muy exacta las condiciones de pH o utilizando especies orgánicas como aditivos [222]. El control de los distintos parámetros durante la síntesis de las nanopartículas constituye un factor determinante que aún es necesario estudiar en mayor profundidad. Es necesario llevar a cabo más

ensayos para poder establecer de forma precisa como varía la composición de las MGNs, al variar su composición e incorporar elementos adicionales.

1.6.3. Nanopartículas como transportadores

Las nanopartículas se emplean ampliamente en la actualidad para tratar distintos tipos de patologías como cáncer, infección u osteoporosis [223–225]. Una de las grandes propiedades de las nanopartículas es su capacidad de cargar distintos fármacos, biomoléculas u otras sustancias en el interior de sus poros [224]. Esto despliega grandes posibilidades para tratar distintas patologías de forma localizada. Cuando se administra un fármaco de forma sistémica, éste pasa al torrente sanguíneo a través del cual es transportado, llegando de esta forma a la zona a tratar. Sin embargo, esta forma de administración presenta grandes limitaciones, sobre todo en el tratamiento de patologías óseas. El hueso es un tejido con menos vascularización, en comparación con otros tejidos, por lo que la vía sistémica no es la más adecuada para tratar las distintas complicaciones que puedan surgir en el [223]. El uso de nanopartículas nos permite cargar en su interior la sustancia que queramos administrar y dirigirla de forma específica al lugar concreto de la lesión [224]. La superficie de las MGNs presenta gran cantidad de grupos –OH que permiten funcionalizarlas. Mediante esta técnica, es posible dirigir las nanopartículas de forma específica hasta la diana establecida y liberar, una vez hayan llegado allí, su contenido de forma controlada [224]. Existen múltiples técnicas para funcionalizar la superficie de las nanopartículas y provocar que se dirijan, exclusivamente, a un tipo celular o a una diana concreta [224]. Además, existen multitud de mecanismos que permiten la liberación específica del contenido de las nanopartículas en la diana establecida [224]. Esto supone un gran avance en medicina ya que la administración específica del tratamiento permite disminuir las dosis empleadas, minimizar o evitar efectos secundarios y aumentar su efectividad.

A pesar de que a lo largo de los últimos años se han desarrollado multitud de biomateriales, aún no se ha llegado a encontrar el biomaterial ideal, capaz de regenerar el tejido óseo dañado, a la vez prevenir y/o combatir los

Introducción

procesos de infección que puedan desarrollarse en el tejido dañado. Precisamente, este ha sido el objetivo de la presente tesis que se desarrolla a lo largo de los siguientes apartados.

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

El **objetivo general** de la tesis es diseñar, sintetizar, caracterizar y evaluar *in vitro* e *in vivo*, un biomaterial capaz de inducir la regeneración del hueso, combatir posibles procesos de infección y que tenga mejores propiedades que los que se están utilizando en regeneración ósea.

Este objetivo se subdivide en los siguientes **objetivos concretos**:

1. Sintetizar vidrios mesoporosos bioactivos (MBGs) biocompatibles basados en el vidrio $85\text{SiO}_2\text{--}10\text{CaO--}5\text{P}_2\text{O}_5$ (%-mol) dopados con ZnO, que presenten propiedades osteogénicas y bactericidas.
2. Caracterizar los polvos de MBG antes y después de conformarlos en discos que se utilizarán en ensayos *in vitro* de: bioactividad en SBF, carga y liberación de osteostatina y determinación del contenido óptimo de ZnO para osteogénesis en cultivo de preosteoblastos MC3T3-E1.
3. Fabricar andamios 3D meso-macroporosos de MBGs, caracterizarlos y evaluarlos *in vitro*: liberación de iones, carga y liberación de osteostatina y determinación del contenido óptimo de ZnO para osteogénesis en cultivos de células madre mesenquimales (MSCs).
4. Sintetizar y caracterizar andamios de MBG/ZnO-osteostatina-células para evaluar su capacidad osteogénica *in vivo*.
5. Evaluar la capacidad antibacteriana *in vitro* en cepas de *S. aureus* y *E. coli* de andamios porosos de MBG/ZnO cargados con fármacos.
6. Diseñar y caracterizar nanopartículas de vidrio mesoporoso (MGNs) dopadas con ZnO, como nueva herramienta terapéutica.
7. Extraer, purificar y expandir células madre mesenquimales (MSCs) de conejo obtenidas a partir de aspirado de médula ósea.
8. Evaluar la capacidad osteogénica *in vitro* de las MGNs con MC3T3-E1 y MSCs optimizando el contenido en ZnO y la concentración de MGNs.
9. Estudiar la capacidad antibacteriana *in vitro* con la cepa *S. aureus* de las MGN cargadas con ZnO y curcumina como sustancia antibacteriana.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Discos de Vidrio Mesoporoso Bioactivo: SiO_2 - P_2O_5 - CaO - ZnO

A través de este estudio se comparó un MBG de composición (mol%) 80% SiO_2 -15% CaO -5% P_2O_5 (control, BL) con dos vidrios análogos dopados con un 4% (4ZN) y un 5% (5ZN) de zinc, elegido por las propiedades osteogénicas y bactericidas que posee. Además, los tres vidrios se cargaron con osteostatina (OST), pentapéptido osteogénico, con el objetivo de comparar los efectos de la adición de estos factores. Para ello, se llevó a cabo la caracterización fisicoquímica de los MBGs, estudios de bioactividad en fluido biológico simulado y de citocompatibilidad y diferenciación osteogénica en cultivos celulares preosteoblásticos MC3T3-E1 (figura 15).

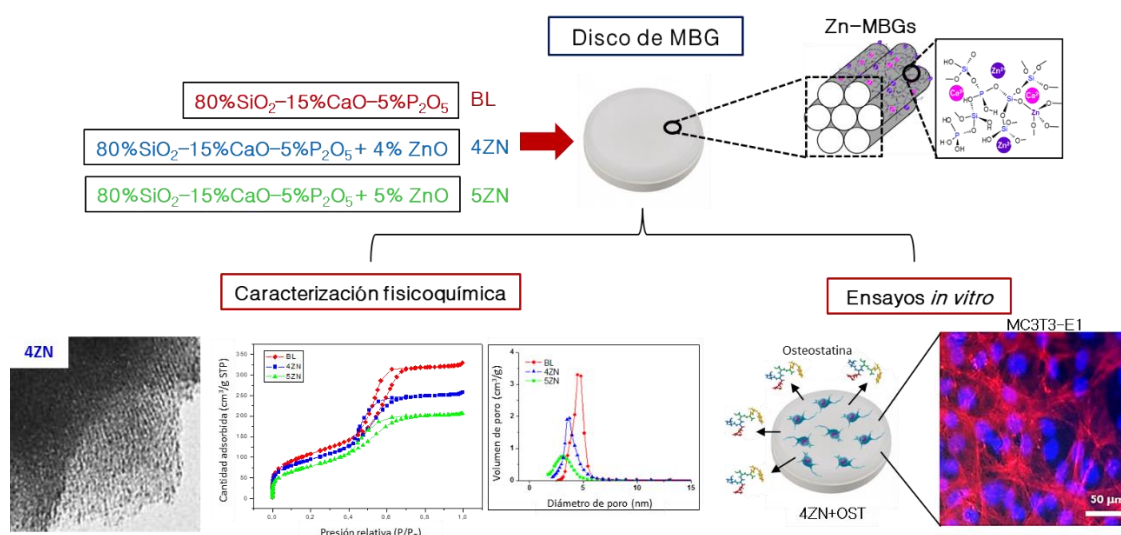


Figura 15. Esquema general del ensayo que muestra las partes que este comprende.

3.1.1. Síntesis y caracterización fisicoquímica

Los distintos MBGs se sintetizaron a través del método EISA (Evaporation-Induced Self Assembly) basado en el autoensamblaje del vidrio inducido por evaporación del disolvente. Se utilizaron tetraetil ortosilicato (TEOS), tetraetil ortofosfato (TEP), nitrato de calcio y nitrato de zinc como fuentes de SiO_2 , P_2O_5 , CaO y ZnO , respectivamente y Pluronic® 123 como surfactante o agente director de la estructura del vidrio. Se sintetizaron tres tipos distintos de MBG dopados con zinc al 0%, nombrado como BL, al 4% nombrado

como 4ZN y al 5% nombrado como 5ZN. Estos MBGs se calcinaron (700 °C), se trituraron y se pasaron por tamices con un tamaño máximo de poro de 40 μm obteniéndose, como resultado, un polvo fino de cada tipo de MBG que se utilizó para llevar a cabo los siguientes pasos del proceso.

3.1.1.1. Polvos de MBG

Los polvos de MBG se caracterizaron a través de distintas técnicas experimentales. Se llevo a cabo un análisis elemental de carbono hidrógeno y nitrógeno (CHN), un análisis por termogravimetría (TGA) y espectroscopía infrarroja transformada de Fourier (FTIR). Estas técnicas proporcionaron más información sobre el proceso de síntesis de los MBGs, confirmando la eliminación completa de los grupos tensoactivos y nitratos provenientes de las fuentes de Ca^{2+} y Zn^{2+} , así como la estabilización de los MBGs en condiciones ambientales después del proceso de calcinación. Además, los MBGs se caracterizaron por difracción de rayos-X de bajo ángulo (SA-XRD) y microscopía electrónica de transmisión (TEM), para evaluar si presentaban mesoporosidad ordenada. También se analizaron mediante porosimetría de adsorción de nitrógeno para determinar sus propiedades texturales (área superficial específica, volumen y tamaño de poro).

La figura 16 A muestra los patrones de SA-XRD de las muestras de MBG en polvo denominadas BL, 4ZN y 5ZN. Tal y como se puede observar, los MBGs no dopados con zinc nombrados como BL, exhiben un estrecho máximo de difracción aguda en 1.3, indicativo del orden mesoporoso, y un hombro en torno a 2.0 en 2θ . En base a estudios anteriores, este máximo se asigna a la reflexión (10) de una fase hexagonal 2D formada por la disposición de los mesoporos y el hombro se debe a las reflexiones de baja intensidad (11) y (20) de esta fase [226]. Por otro lado, los patrones de los materiales dopados con zinc 4ZN y 5ZN, solo muestran un máximo difuso y hombros de aproximadamente 1.3 en 2θ . Este tipo de patrón está presente generalmente en muestras con un orden de canales tipo gusano [227].

Los MBGs se caracterizaron a través de porosimetría de adsorción de nitrógeno para evaluar si la incorporación de los iones Zn^{2+} , además de disminuir el orden mesoporoso, provocaba una variación significativa en las

propiedades texturales de los materiales. La figura 16 B muestra las isotermas de las tres muestras que fueron, en todos los casos, de tipo IV. Estas isotermas son características de los materiales mesoporosos. Además, las curvas mostraron ciclos de histéresis tipo H1, indicativos de presencia de poros cilíndricos abiertos en ambos extremos. Por lo tanto, los materiales BL, 4ZN y 5ZN mostraron características análogas en cuanto al tipo y la forma de los poros. Las propiedades de texturales de estos materiales se calcularon a partir de las isotermas. Tal y como muestra la figura 16 B, se produjo una disminución moderada de las propiedades texturales de los materiales como consecuencia de la inclusión de iones Zn^{2+} en el vidrio. El área de superficie específica de $372 \text{ m}^2/\text{g}$ para el vidrio BL disminuyó ligeramente a 362 y $340 \text{ m}^2/\text{g}$ para los materiales 4ZN y 5ZN, respectivamente. El volumen de poro también experimentó una disminución moderada pasando de $0.47 \text{ cm}^3/\text{g}$ para el vidrio BL a 0.38 y $0.39 \text{ cm}^3/\text{g}$ para los materiales 4ZN y 5ZN respectivamente. El diámetro de poro promedio pasó de 4.7 nm a 4.2 y 4.3 nm , respectivamente, para vidrios 4ZN y 5ZN.

La figura 16 C muestra las imágenes de TEM de los MBGs en alta resolución. Las micrografías correspondientes a los materiales BL y 4ZN muestran áreas que, en su gran mayoría, confirman la presencia de una estructura mesoporosa ordenada. Estas muestras también presentan pequeñas regiones con estructura de canales tipo gusano. Las micrografías de TEM del material 5ZN muestran, en su gran mayoría, un orden de canales tipo gusano. Por lo tanto, los resultados de obtenidos mediante TEM confirmaron los resultados de SA-XRD, mostrando que el orden de los mesoporos disminuye a medida que se añade el Zn^{2+} a la red del vidrio.

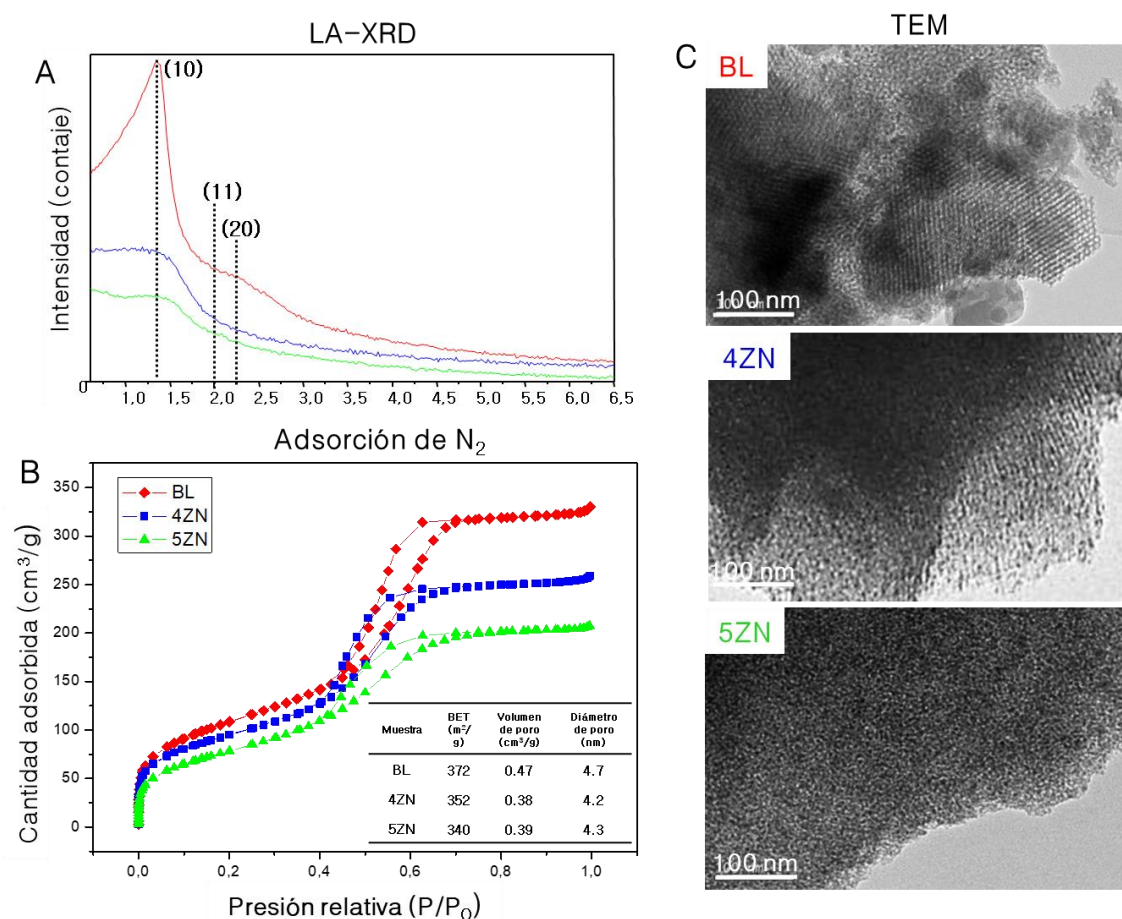


Figura 16. Caracterización fisicoquímica de los MBGs sin Zn²⁺ (BL) y dopados con Zn²⁺ (4ZN y 5ZN) mediante: **(A)** LA-XRD; **(B)** Porosimetría de adsorción de nitrógeno junto con tabla de inserción: propiedades de textura de los MBGs: área de superficie específica (S_{BET}), volumen de poro (V_P) y diámetro de poro (D_P); y **(C)** Microscopía electrónica de transmisión (TEM).

Se llevaron a cabo medidas de resonancia magnética nuclear (NMR) de estado sólido del ²⁹Si y ³¹P para investigar los entornos atómicos de las especies formadoras y modificadoras de la red de los MBGs (figura 17 A). Los resultados de NMR se relacionarán posteriormente, en los ensayos *in vitro* con células, con la liberación de iones Zn²⁺ por parte de los vidrios. En la figura 17, Q², Q³ y Q⁴ representan, respectivamente, los átomos de silicio (denotado Si*) en (NBO)₂ Si*-(OSi)₂, (NBO)Si*-(OSi)₃ y Si*(OSi)₄ (NBO = oxígenos no enlazantes) [228], mientras que Q⁰ y Q¹, representan respectivamente los átomos de fósforo (denominados P*) en las especies PO₄³⁻, (NBO)₃P*-(OP) y (NBO)₂-P*-(OP)₂ (NBO en relación con otro átomo de P). Los cambios químicos, las áreas deconvolucionadas y la conectividad

de la red de sílice $\langle Q_n \rangle$ para cada una de las composiciones de vidrio se recogen en la tabla 6.

Tabla 6: Desplazamientos químicos (CS) y áreas relativas de los MBGs obtenidas mediante resonancia magnética nuclear del ^{29}Si y ^{31}P . El área de las unidades Q_n se calculó por deconvolución gaussiana, las poblaciones relativas se expresaron en % y también se incluyó la anchura a media altura (FWHM).

	^{29}Si									^{31}P						
	Q^4			Q^3			Q^2			Q^0	Q^1					
	CS ppm	área (%)	FWHM pm	CS ppm	área (%)	FWHM pm	CS ppm	área (%)	FWHM pm	$\langle Q^n \rangle$	CS ppm	área (%)	FWH ppm	CS ppm	área (%)	FWHM ppm
BL	-112	61.7	8.04	-103	33.8	9.4	-92	4.4	18.5	3.57	1.5	91.2	5.7	-5.3	8.8	13.0
4ZN	-112	68	10.6	-102	18.9	6.0	-94	12.9	10.3	3.55	2.0	93.7	7.7	-6.9	6.3	6.1
5ZN	-110	75.7	11.8	-103	15.4	4.3	-93.5	8.92	11.6	3.67	2.4	92.9	5.8	-7.5	7.0	7.4

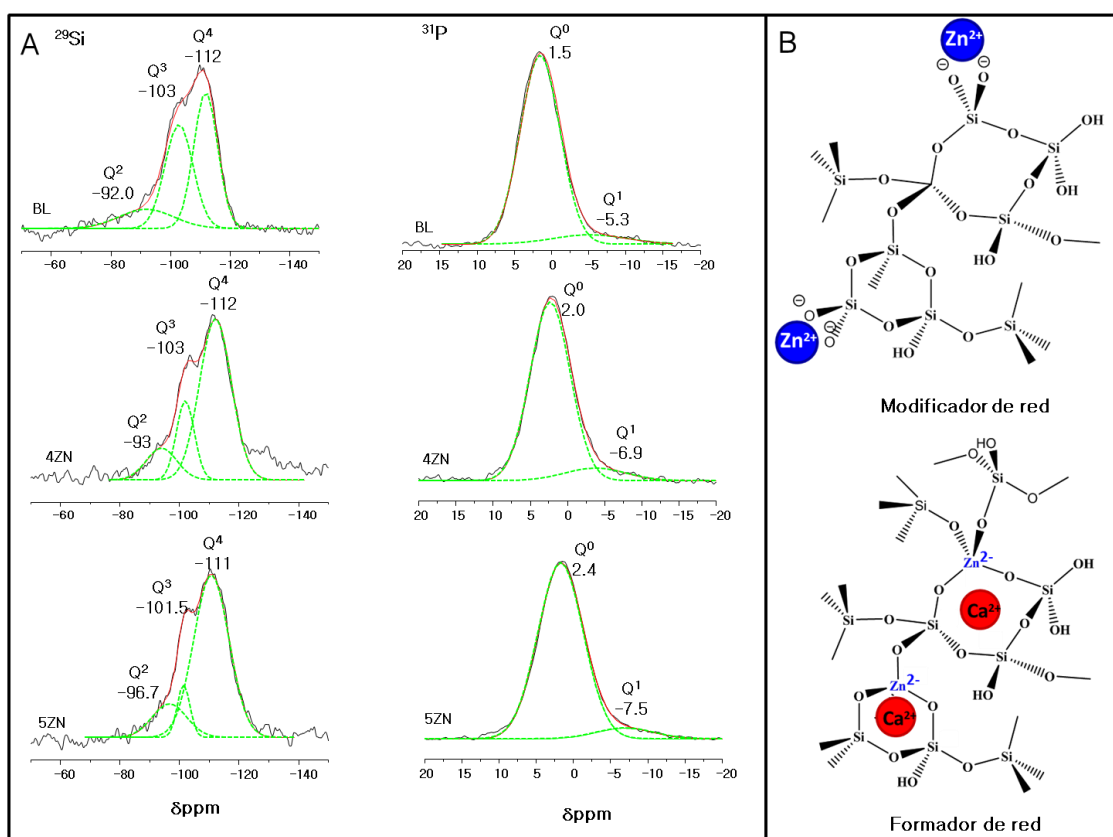


Figura 17. (A) Espectros de resonancia magnética nuclear de pulso simple en estado sólido del ^{29}Si y ^{31}P de BL, 4ZN y 5ZN. Las áreas de la unidad Q_n se calcularon mediante deconvolución gaussiana lineal y se muestran en verde; **(B)** Esquema de la estructura del vidrio cuaternario asignando al zinc como modificador y formador de red.

En los espectros de NMR del ^{29}Si , las señales en la región que va desde -110 a -112 ppm se asignaron a Q^4 ; de -101 a -103 ppm a Q^3 ; y de -92 ppm a -96 ppm a Q^2 . La muestra BL se caracteriza por un alto porcentaje de especies Q^4 y Q^3 , y una conectividad de red, $\langle Q_n \rangle$, de 3.57 para esta muestra. Este valor es inferior al que normalmente se obtiene para vidrios sol-gel de composición idéntica que suele ser de 3.75 [227]. Los valores de $\langle Q_n \rangle$ que presentan los MBGs pueden explicar la rápida bioactividad *in vitro* que presenta esta familia de vidrios.

Tal y como muestra la tabla 6, la inclusión de 5% de zinc en el material (5ZN) provocó un aumento del valor de $\langle Q_n \rangle$ que fue de 3.67, en comparación con BL, mientras que en el caso del 4% de zinc (4ZN), se observó una ligera disminución, mostrando valores de 3.55. Estos resultados se explicaron considerando que, cuando se agrega un 4% de ZnO, los iones Zn^{2+} se comportan como formadores de red con coordinación tetraédrica $[\text{ZnO}_4]$ y exhiben carga negativa (2-). Estos tetraedros atraen iones Ca^{2+} que, en consecuencia, se comportan como compensadores de carga en lugar de como modificadores de red (figura 17 B). El material 5ZN presenta un mayor porcentaje de especies Q^4 , lo que indica una disminución en el número de NBO. Esto supone una mayor contribución de iones Zn^{2+} en comparación con el material 4ZN, explicando el valor más alto de $\langle Q_n \rangle$ para 5ZN. Sin embargo, las cantidades de ZnO no fueron lo suficientemente altas como para provocar una despolimerización sustancial de la red en 4ZN y 5ZN con respecto a BL, explicando los valores similares de $\langle Q_n \rangle$ en las tres muestras (tabla 6), lo que concuerda con los valores mostrados previamente para BL y 4ZN [229]. El aumento de los valores de FWHM se debe a una mayor distribución de los valores isotrópicos de cambio químico, causada por un orden decreciente de la estructura macroscópica de corto alcance [230]. La simetría tetraédrica de las unidades Q^4 de la muestra BL con respecto a las muestras 4ZN y 5ZN, indica la existencia de una estructura isotrópica cuando los MBGs no contienen zinc. Por otra parte, la cristalinidad de Q^3 y Q^2 fue ligeramente mayor cuando las muestras se doparon con zinc.

Por otro lado, los espectros de resonancia magnética nuclear del ^{31}P mostraron un máximo de ≈ 2 ppm asignado al entorno Q^0 de ortofosfato amorfo (figura 17 A), así como una segunda señal débil de entre -5.2 ppm y -7.5 ppm cuando aumenta el porcentaje de ZnO en los MBGs [231]. La resonancia decrece en el rango de tetraedros Q^1 , lo que puede asignarse a entornos P-O-Si como se ha descrito anteriormente [232,233]. Por lo tanto, el fósforo (P) está presente inicialmente como unidades de ortofosfato. La inclusión de Zn^{2+} produce una ligera disminución del porcentaje de unidades Q^1 , provocando un cambio químico que pasa de -5.2 ppm para materiales BL a -7.5 ppm para materiales 5ZN. Esto sugiere una conversión parcial de unidades P-O-Si en unidades P-O-Zn debido a la acción de los iones Zn^{2+} que actúan como formadores de red generando una mayor estructura anisotrópica que los Q^1 de la muestra BL. De esta forma, se propuso la formación de unidades P-O-Zn en vidrios bioactivos donde se detectó un cambio hacia valores de ppm más bajos cuando aumentaba el% de ZnO [234].

En resumen, a través de la caracterización fisicoquímica de los MBGs se observa una disminución del orden mesoporoso de los materiales cuando aumenta el porcentaje ZnO. Sin embargo, las propiedades texturales de los MBG dopados ZnO (4ZN y 5ZN) se mantienen similares a los MBG no dopados con zinc (BL), con valores de área superficial y tamaño y volumen de poro más altos que los vidrios sol-gel convencionales [235]. Además, los resultados de NMR permitieron comprender el perfil de liberación de iones Zn^{2+} lo que influye en los ensayos *in vitro* celulares.

3.1.1.2. Discos de MBG

Los discos empleados para los ensayos *in vitro* se elaboraron mediante compactación (5 MPa) del MBG en polvo. Una vez se obtuvieron, fue necesario caracterizarlos mediante porosimetría de adsorción de nitrógeno para evaluar sus propiedades texturales en forma de disco denso. Este análisis se llevó a cabo antes y después de cargar los discos con osteostatina, con el objetivo de analizar si la carga de esta molécula influía en las mismas.

Como se observa en la parte izquierda de la figura 18, las isothermas obtenidas fueron idénticas a las de los polvos de MBG (figura 16 B). Además, en la parte derecha de la figura 18, se observan los tamaños de poro correspondientes a los distintos discos de MBG. En la parte inferior de la figura se muestran los mismos parámetros (isothermas y distribución de tamaños de poro) de los discos de MBG cargados con osteostatina, para poder comparar la variación de las propiedades texturales tras la carga del péptido.

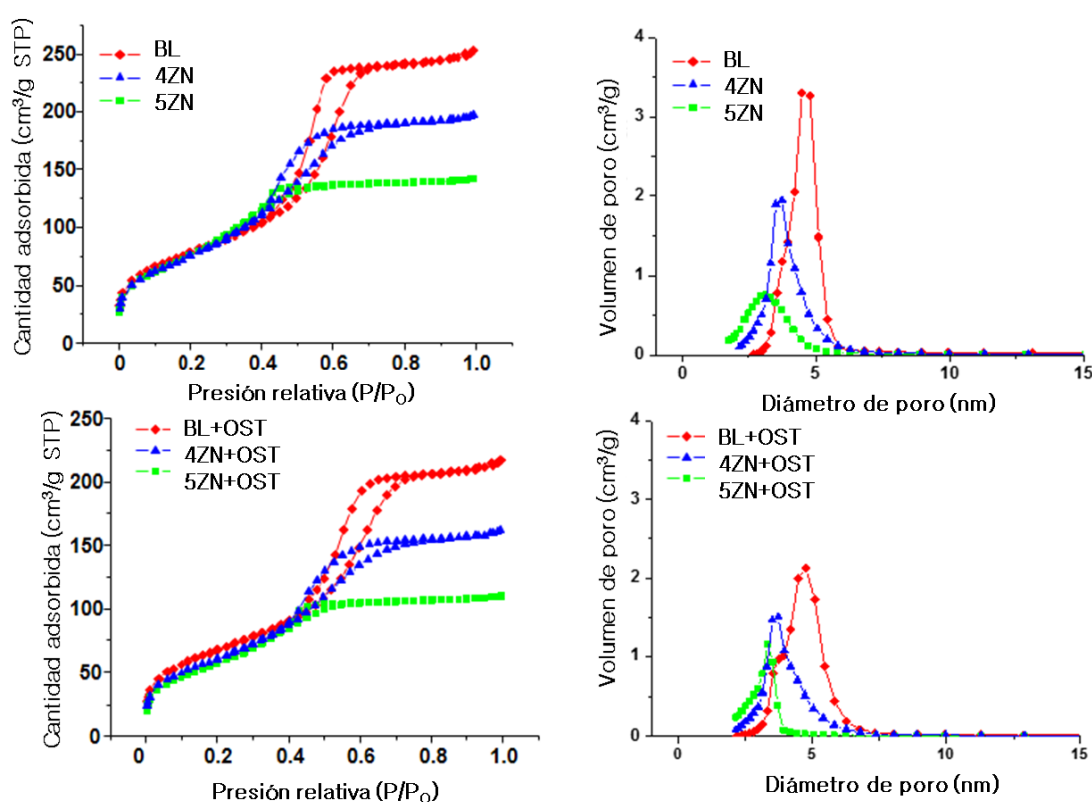


Figura 18. Isothermas de adsorción-desorción de N_2 (izquierda) y distribución del tamaño de poro (derecha) de los discos BL, 4ZN y 5ZN antes (paneles superiores) y después (paneles inferiores) de cargar con osteostatina.

La tabla 7 permite comparar las propiedades texturales de los MBG en forma de polvo y en forma de disco. Como se puede observar, los discos mostraron una moderada disminución de sus propiedades texturales, en comparación con los valores que mostraron los polvos de MBG. Los valores de S_{BET} , de entre 372 y 340 m^2/g en el polvo, disminuyeron a valores

comprendidos en el rango de 287–280 m²/g en los discos. El volumen de poro también disminuyó de 0.47–0.38 cm³/g en los polvos a 0.38– 0,22 cm³/g en los discos. Por lo tanto, se puede decir que, aunque se observó una disminución de las propiedades texturales de los MBG al elaborar los discos, las propiedades texturales de estos se mantuvieron lo suficientemente altas como para poder albergar distintos tipos de biomoléculas, como la osteostatina. Además, se analizaron las propiedades texturales de los discos tras la carga con osteostatina (tabla 7). Se detectaron disminuciones adicionales del área superficial específica y del volumen de poro, confirmando de esta forma la carga satisfactoria de osteostatina en los discos MBG. Finalmente, se determinó la composición de los discos mediante espectroscopía de dispersión de rayos-X (EDX), obteniéndose los valores reflejados en la parte derecha de la tabla 7. Estos valores muestran buena concordancia con la composición nominal de los vidrios, incluida entre paréntesis.

Tabla 7. Propiedades texturales de los MBGs en forma de polvo, discos y discos cargados con osteostatina. (S_{BET} : área superficial específica; V_T : volumen de poro; D_p : diámetro de poro). A la derecha, se muestran los valores correspondientes a la composición experimental de las muestras, determinada por EDX, y los valores correspondientes a la composición nominal se indican entre paréntesis.

	Polvos			Discos			Discos+ Osteostatina			Composición (EDX) % Atómico			
	S_{BET} (m ² /g)	V_T (m ³ /g)	D_p (nm)	S_{BET} (m ² /g)	V_T (m ³ /g)	D_p (nm)	S_{BET} (m ² /g)	V_T (m ³ /g)	D_p (nm)	SiO ₂	CaO	P ₂ O ₅	ZnO
BL	372	0.47	4.7	287	0.38	4.7	244	0.32	4.6	77.0 (80)	6.1 (5)	16.8 (15)	--
4ZN	352	0.38	4.2	280	0.30	3.7	221	0.24	3.6	74.3 (77)	7.0 (4.8)	14.3 (14.4)	4.2 (4)
5ZN	340	0.39	4.3	285	0.22	3.3	208	0.17	3.1	68.1 (76)	9.2 (4.8)	17.3 (14.3)	5.3 (5)

3.1.2. Ensayos *in vitro*

3.1.2.1. Carga y liberación de osteostatina en discos de MBG

Después de incluir los discos de MBG en una solución de osteostatina (100 nM) en PBS durante 24 h, la absorción media del péptido fue 63% (BL),

70% (4ZN) y 71% (5ZN) (figura 19 A), lo que equivale a 0.8, 0.9 y 0.95 $\mu\text{g/g}$ de osteostatina por tipo de disco, respectivamente.

Por otro lado, la osteostatina liberada al medio tras 1 h en PBS fue del 73% (BL), 67% (4ZN) y 68% (5ZN). Tras 24 h, fue del 95% (BL) o del 90% (4ZN y 5 ZN) y prácticamente del 100% para los tres tipos de discos de MGB a las 96 h (figura 19 B). Es necesario mencionar que cantidades mínimas de este péptido (incluso en el rango sub-nM) son eficientes para inducir actividad osteogénica [11–13].

Como se ha mencionado anteriormente, se determinó el efecto de la carga de la osteostatina en las propiedades texturales de los discos. La figura 18 muestra las isotermas de adsorción de N_2 (abajo a la izquierda), así como las distribuciones de tamaño de poro (abajo a la derecha) de los discos cargados con osteostatina. Como se muestra en la tabla 7, el área superficial y la porosidad en los discos de MBG, disminuyen ligeramente como consecuencia de la carga de osteostatina. Estos resultados sugieren que una parte de la carga de péptidos tuvo lugar dentro de los poros, sin afectar al orden de los canales mesoporosos.

Si suponemos que el mecanismo de liberación de la osteostatina fue la difusión a través de los mesoporos y consideramos la baja solubilidad de los vidrios a pH fisiológico (7.4), la liberación del péptido podría describirse a través de la desviación del comportamiento teórico de la ecuación de primer orden de Noyes–Whitney como describe (1) [14,15]:

$$W_t / W_0 = A (1 - \exp^{-k_1 \cdot t}) \quad (1)$$

donde W_t representa la masa peptídica liberada en el tiempo t ; W_0 representa la masa inicial máxima del péptido dentro de los poros; A es la cantidad máxima de péptido liberado; y k_1 es la constante de velocidad de liberación, la cual es independiente de la concentración del péptido y proporciona información sobre la accesibilidad del disolvente y el coeficiente de difusión a través de los canales mesoporosos.

Este modelo se aplicó con éxito para la liberación de diferentes fármacos de matrices mesoporosas insolubles con una estructura similar [14]. Según este modelo, la liberación de los péptidos es más rápida en las primeras 24

h, alcanzando una fase estacionaria después de 48 h. Esta desviación podría deberse a varios factores, como el volumen del péptido, la distorsión de los canales del mesoporo y/o la liberación de moléculas de péptido adsorbidas en la superficie externa de las matrices.

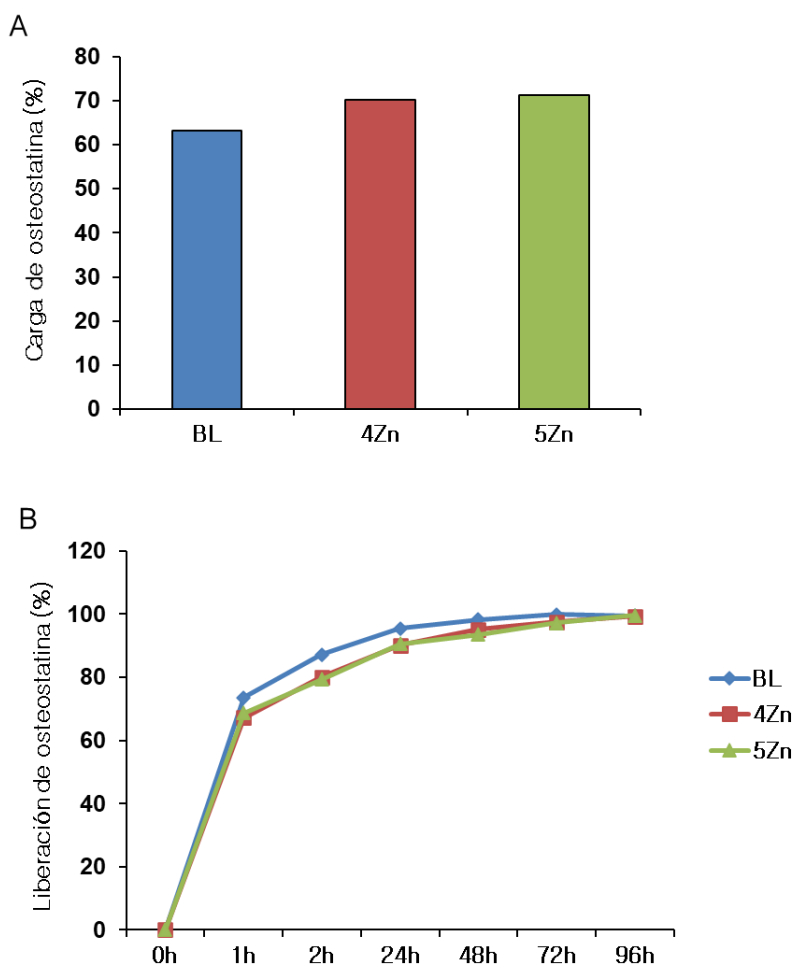


Figura 19. Captación de osteostatina a las 24 h **(A)**, y perfiles de liberación de la osteostatina por los discos BL, 4ZN y 5ZN **(B)**. Los puntos que trazan la curva corresponden a las medias de tres experimentos.

Esta divergencia se ha tratado mediante la introducción de un factor empírico de no idealidad δ en la ecuación (2) [16]:

$$W_t / W_0 = A (1 - \exp^{-k_1 \cdot t})^\delta \quad (2)$$

Los valores de este factor de no idealidad δ , oscilan entre 0 y 1 para materiales que siguen una cinética de primer orden o liberan inicialmente las moléculas peptídicas ubicadas en la superficie externa de las matrices. Los

datos obtenidos se ajustaron utilizando este modelo semiempírico de primer orden, mostrándose los parámetros de liberación en la tabla 8. Según este modelo, δ proporciona una idea del grado de fidelidad de esta aproximación. En todas las matrices de MBG testadas, el valor de δ fue bajo y similar, lo que indica que un porcentaje relativamente grande de moléculas de osteostatina se liberan de la superficie externa de los MBG. Además, el porcentaje de osteostatina liberada fue máximo, lo que indica que prácticamente no hay retención prolongada de osteostatina por parte de los MBG.

Tabla 8. Parámetros cinéticos de la liberación de osteostatina de los discos BL, 4ZN y 5ZN. (w_0 : masa cargada inicial: $\mu\text{g OST/g}$ en el disco de MBG; A: cantidad máxima de péptido liberado; k_1 : velocidad de liberación constante; δ : factor de no idealidad cinética; R: bondad de ajuste.

	$w_0(\text{g/g})$	A (%)	$k_1(*10^3) (\text{h}^{-1})$	δ	R
BL	0.80	99.3 ± 3.3	37.7 ± 3	0.14 ± 0.04	0.996
4ZN	0.90	99.7 ± 3.9	31.5 ± 3	0.13 ± 0.04	0.998
5ZN	0.95	99.6 ± 3.9	31.5 ± 4	0.12 ± 0.07	0.996

3.1.2.2. Bioactividad en fluido biológico simulado, SBF

Los distintos discos de MBG se caracterizaron mediante FTIR antes y después de ser sumergidos en Fluido Biológico Simulado (SBF). Mediante esta técnica, se analiza la formación de la capa de fosfato de calcio amorfo (ACP) en la superficie de los materiales, así como su posterior cristalización en forma de HCA como resultado de entrar en contacto con el SBF. Este proceso se evalúa midiendo los espectros de la región de 600 cm^{-1} . La presencia de una banda en esta región es característica de la ACP, y la división de esta banda en dos bandas de 560 y 603 cm^{-1} , es indicativa del fosfato en un entorno cristalino como el de la nano-HCA [17].

Como se observa en la figura 20, el comportamiento de los discos BL en SBF fue diferente del de los discos 4ZN y 5ZN. En los materiales libres de zinc (BL) la banda a 600 cm^{-1} era visible a las 6 h de incubación, y las bandas de HCA se detectaron el día 1. A tiempos más largos (3 días), los

espectros de FTIR de los discos BL no sufrieron cambios adicionales. Sin embargo, para los discos 4ZN y 5ZN, se observó la banda de ACP después de 7 días y las dos bandas de HCA no se detectaron en ningún momento, aunque las muestras llegaron a permanecer en SBF hasta 21 días. Estos resultados ya se habían descrito previamente para MBGs dopados con zinc, en los que el ZnO impedía la formación de HCA cuando estos se sumergían en SBF [1]. Esto podría deberse a la formación inicial de fosfato de calcio y zinc amorfo, que es incapaz de cristalizar como HCA. Se analizó la reactividad de los materiales (patrones de formación de ACP o HCA) tras cargarse con osteostatina y sumergirse en SBF y no se observó ningún cambio con respecto a los resultados anteriores.

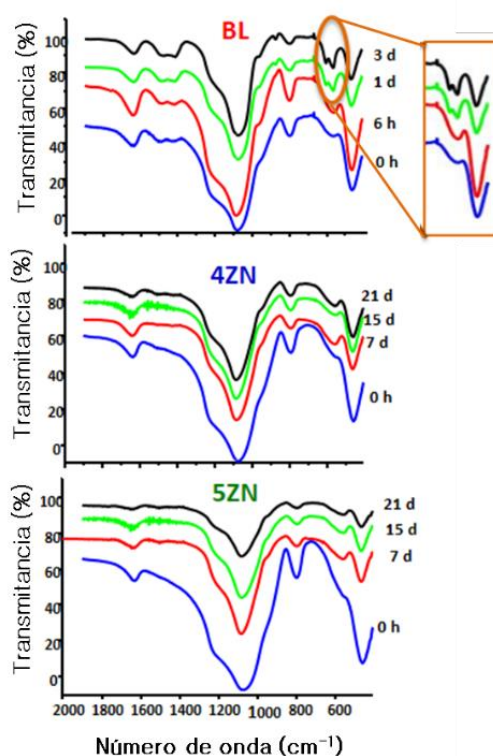


Figura 20. Espectros de FTIR de los discos BL, 4ZN y 5ZN después de sumergirse durante diferentes tiempos en SBF con 100 nM de osteostatina. La elipse resalta las bandas de fosfato en un entorno cristalino.

El análisis mediante microscopía electrónica de barrido (SEM) confirmó los resultados de FTIR. La figura 21 muestra las micrografías SEM de los discos BL, 4ZN y 5ZN, antes y después de incluirse en SBF durante 7 días. Este ensayo muestra que únicamente los discos BL aparecieron recubiertos por una capa de partículas esféricas con morfología característica de la HCA,

similar a la que presenta el hueso. Esta morfología se desarrolló a partir de la ACP inicial floculante. En los discos 4ZN y 5ZN, no se formó la capa de HCA tras 7 días en SBF. Sin embargo, si se observó la formación de un nuevo material en la superficie de los discos 4ZN. Se observaron máximos de alta intensidad, correspondientes al calcio y al fósforo en los espectros EDX del material BL, en comparación con los materiales 4ZN y 5ZN, lo que respalda la idea de que la capa de HCA se forma preferentemente en las muestras BL. Estos resultados fueron análogos a los reportados previamente para MBG dopados con zinc y testados en SBF en los que se apreció un efecto inhibitor de los iones Zn^{2+} en el proceso de cristalización de la capa de HCA [1]. En este estudio, se obtuvieron resultados idénticos que muestran el efecto nulo de la adición de osteostatina en los ensayos en SBF acelular (tal y como se observa en la figura 21), a pesar del efecto demostrado que la osteostatina ejerce en presencia de células.

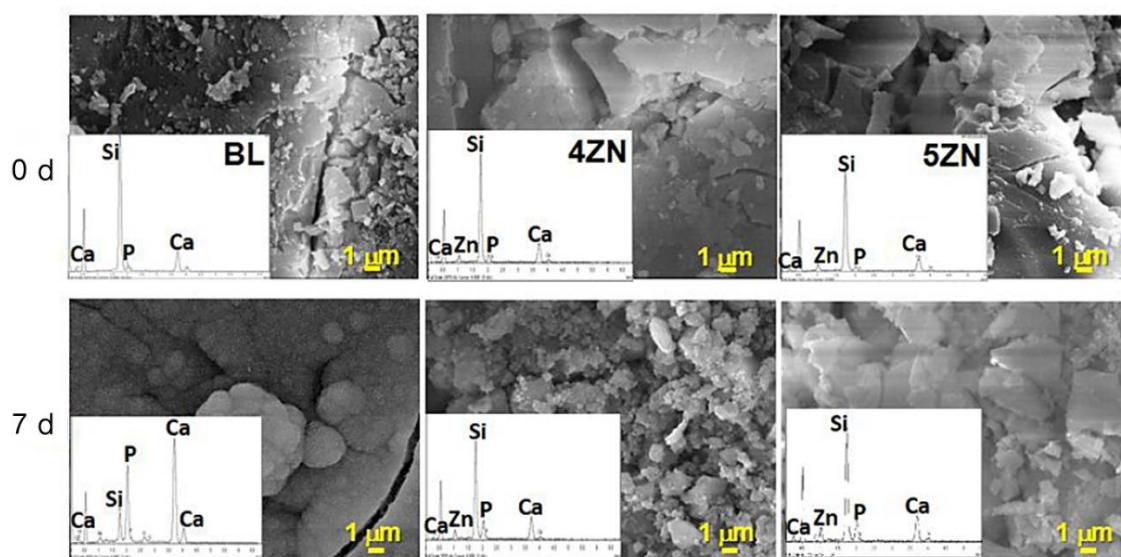


Figura 21. Micrografías SEM y espectros EDX de los discos MBG BL, 4ZN y 5ZN, antes y después de estar incluidas durante 7 días en SBF.

3.1.2.3. Liberación de iones en medio completo

Para comprender mejor los resultados de citocompatibilidad de los discos de MBG, se midió la liberación de iones de calcio, fósforo y zinc de los discos cargados con osteostatina en medio completo durante 120 h. Como muestra en la figura 22, en los discos BL las concentraciones de calcio y

fósforo liberadas fueron ligeramente menores que en los discos 4ZN y 5ZN, lo que puede explicarse por la formación de la capa de HCA en BL. Además, los valores que se obtienen encajan con la formación de la capa de ACP durante este intervalo de tiempo. Asimismo, la concentración de Zn^{2+} liberado al medio por parte de los materiales 4ZN y 5ZN aumentó hasta el día 5, alcanzando valores de 4.6 y 5.3 ppm, respectivamente. Estos datos son consistentes con los valores de conectividad de la red de sílice que son ligeramente más altos en el material 5ZN en comparación con 4ZN, liberando así una menor cantidad de Zn^{2+} al medio.

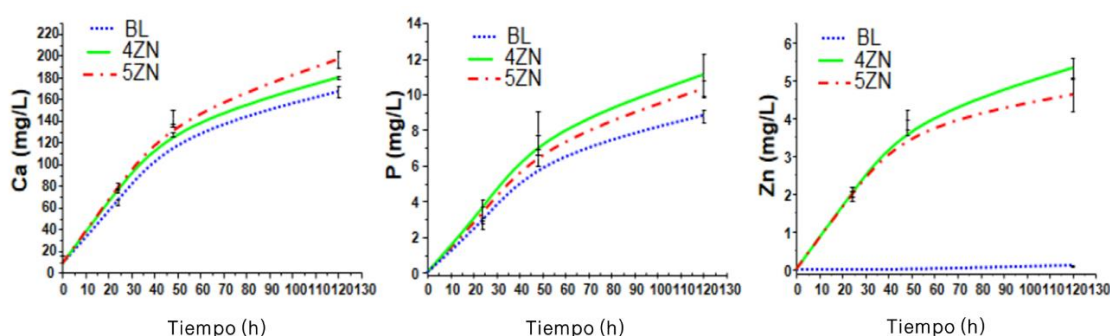
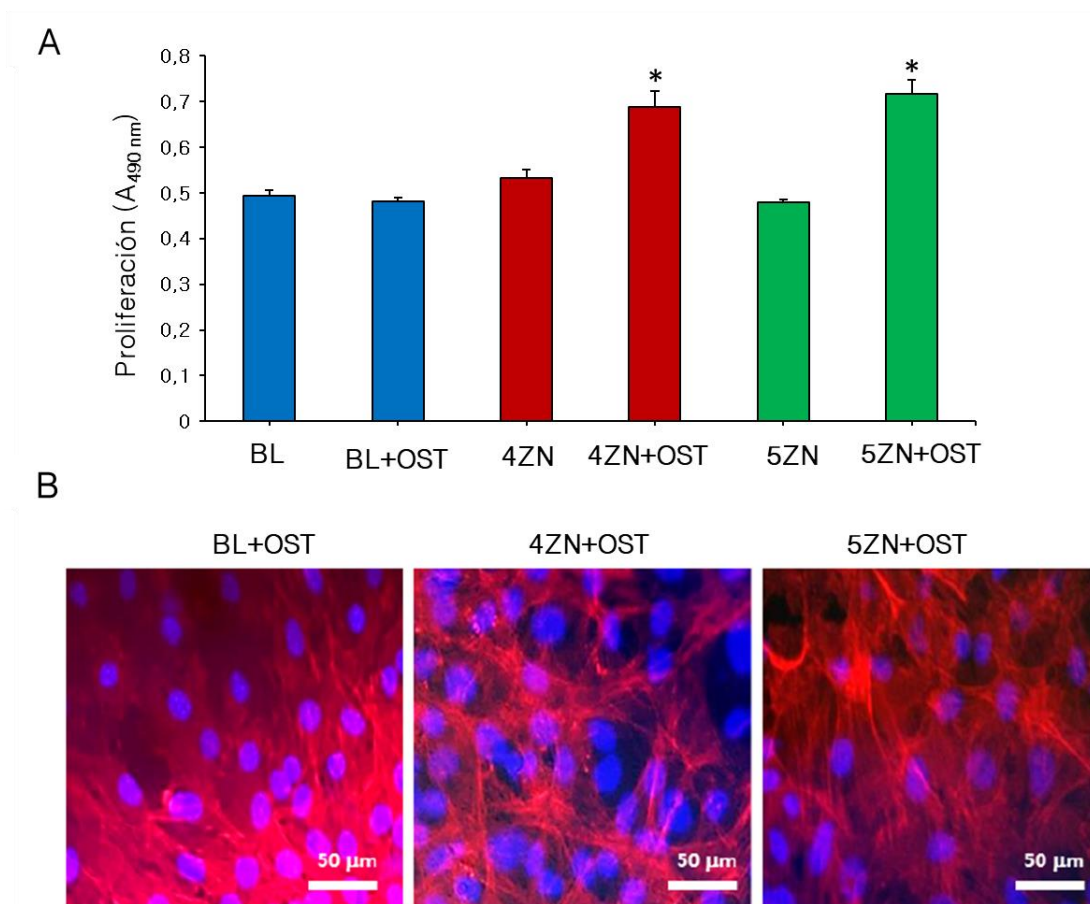


Figura 22. Evolución de la concentración de calcio, fósforo y zinc, representada de forma acumulativa, liberada por los discos de MBG cargados con osteostatina en función del tiempo en medio completo.

3.1.2.4. Citocompatibilidad con células preosteoblásticas MC3T3-E1

Se evaluó el potencial osteogénico del Zn^{2+} y la osteostatina en los distintos discos de MBGs, empleando para ello células MC3T3-E1 (línea celular establecida de células preosteoblásticas de ratón). Para empezar, se observó que el número de células presentes en la superficie de los discos a las 10 h de cultivo era superior en los materiales 4ZN y 5ZN cargados con osteostatina (figura 23 A). Se analizó la morfología celular mediante una tinción con dihidrocloruro de 2-(4-amidinofenil)-6-indolecarbamidina (DAPI), que tiñe los núcleos celulares, y faloidina que tiñe los filamentos de actina, después de 5 días de cultivo. Se observó que la morfología celular no varía en presencia de ninguno de los materiales (figura 23 B). Se comprobó que la carga de osteostatina en los materiales 4ZN y 5ZN provocó un aumento significativo en el número de células después de 5 días de cultivo (figura 24 B). Estos datos coinciden con un aumento en la cantidad

de Zn^{2+} liberado al medio (figura 22). Por lo tanto, aunque la osteostatina cargada en el material BL mostró una tendencia (no significativa) a aumentar la viabilidad celular con respecto a un control sin osteostatina (figura 23 A, B), el incremento significativo de la población celular solo se registró en los vidrios dopados con zinc (4ZN y 5ZN) y cargados con el péptido. Por lo tanto, se puede decir que se observa un efecto sinérgico entre el zinc y la osteostatina respecto a la viabilidad celular. Ninguno de los materiales produjo citotoxicidad significativa (entorno al 1%), lo que se evaluó mediante exclusión de azul de tripán, en los cultivos celulares (figura 23 C).



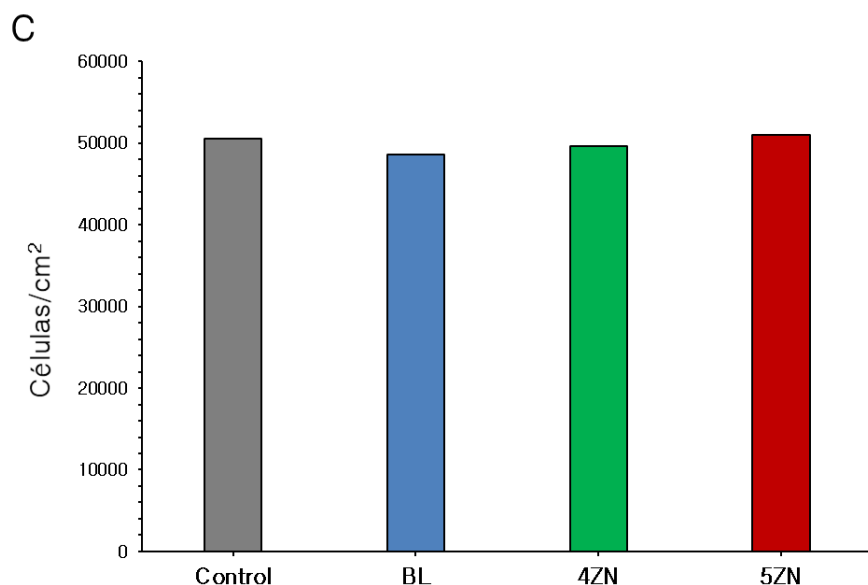


Figura 23. Número de células MC3T3-E1 en los discos de MBG a las 10 h de cultivo. **(A)** Resultados de absorbancia (490 nm) expresados como medias $\pm$ SEM realizadas por triplicado (* $p < 0.05$ vs controles sin osteostatina). Morfología celular a día 5 de cultivo realizada por microscopía óptica. **(B)** Tinción con DAPI (azul) para los núcleos y faloidina-565 (roja) para filamentos de F-actina. **(C)** Estudio de citotoxicidad mediante azul tripán.

Posteriormente, se evaluó la capacidad de estos MBG para inducir la diferenciación de las células preosteoblásticas. La expresión del marcador de diferenciación temprana de osteoblastos Runx2 aumento en presencia de la osteostatina en cada uno de los tipos de discos de MBG, medido el día 5 del cultivo celular (figura 24 C). Por otra parte, mientras que los discos 4ZN o 5ZN tuvieron un efecto mínimo sobre la actividad de ALP o la mineralización de estas células (figura 24 D, E), estos mismos materiales cargados con osteostatina provocaron un aumento de estos parámetros de diferenciación, siendo más elevado en el material 4ZN.

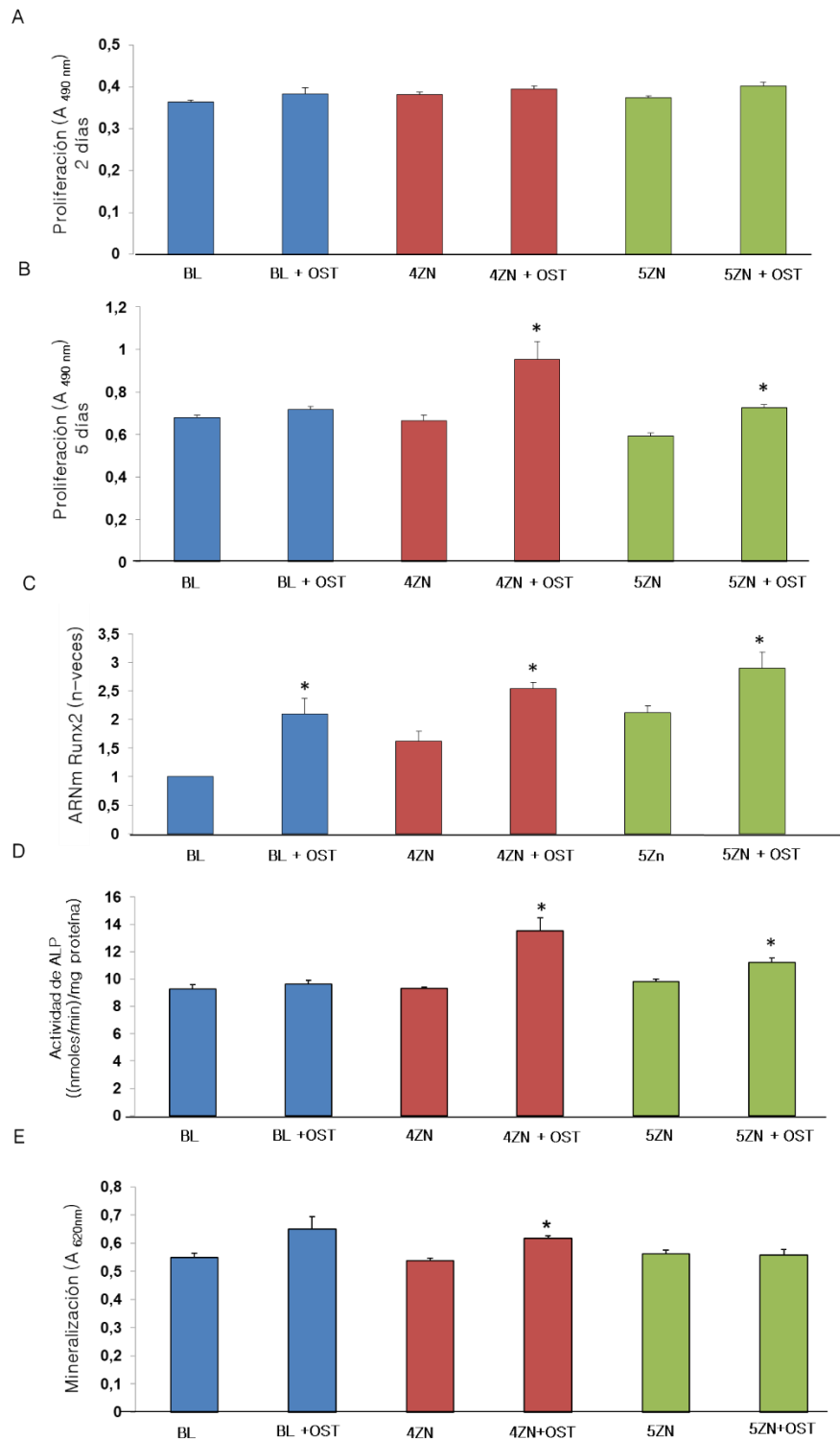


Figura 24. Número de células MC3T3-E1 presentes en los discos de MBG, cargados o no con osteostatina, después de 2 (**A**) y 5 días (**B**) de cultivo. Absorbancia medida a 490 nm, proporcional al número de células vivas. Niveles de RNAm de Runx2 medidos por PCR a tiempo real (**C**), actividad de ALP (**D**) y mineralización medida por tinción de rojo de alizarina (**E**) en células MC3T3-E1 a los 5 (**C**, **D**) y 12 días (**E**) de cultivo. Mineralización medida por absorbancia (620 nm). Resultados (medias $\pm$ SEM) realizados por triplicado (* $p < 0.05$ vs controles sin osteostatina)

3.1.3. Conclusiones: discos de MBG

En conclusión, los estudios *in vitro* demostraron que los discos MBG pueden cargarse con osteostatina y que ésta se libera casi totalmente en las primeras 24 h. La carga con osteostatina provocó un aumento de la citocompatibilidad de los MBGs dopados con zinc al mejorar la proliferación y diferenciación preosteoblástica sin afectar a su capacidad de formación de HCA. Los resultados obtenidos en este estudio proporcionan una perspectiva novedosa e interesante del campo de los vidrios mesoporosos bioactivos para la regeneración ósea. Además, los discos de MBG dopados con un 4 o 5% de zinc y cargados con osteostatina, mejoran la proliferación preosteoblástica, así como su diferenciación. Se ha demostrado por primera vez que la osteostatina mejora la capacidad osteogénica *in vitro* de los MBGs enriquecidos con zinc, lo que sugiere el potencial de este abordaje en aplicaciones de ingeniería regenerativa de hueso.

3.2. Andamios tridimensionales de MBG para regeneración ósea

Una vez se caracterizaron los discos de MBG y se llevaron a cabo los ensayos celulares con células MC3T3-E1, se pasó a elaborar un nuevo material, igualmente basado en MBG, de mayor complejidad. Para ello, se emplearon los tres tipos de MBG utilizados previamente: 80%SiO₂–15%CaO–5%P₂O₅ (mol-%) nombrado como (BL) y dos vidrios análogos dopado con zinc al 4% ZnO (4ZN) y 5% ZnO (5ZN) para fabricar andamios tridimensionales meso–macro porosos de porosidad jerarquizada mediante prototipado rápido. La estructura de estos andamios se aproxima más a la estructura natural del hueso, además de presentar una serie de ventajas que se analizarán posteriormente en profundidad. Los andamios se cargaron con osteostatina, péptido osteoinductor, y se estudió su comportamiento y capacidad osteogénica *in vitro* con células madre mesenquimales (MSCs) humanas. Estas células no están diferenciadas y poseen capacidad de diferenciación a distintos linajes celulares entre los que se incluye el linaje óseo. De esta forma se pretendió dar un paso más en el diseño y estudio de un nuevo biomaterial para llegar a obtener mejores capacidades y resultados (figura 25).

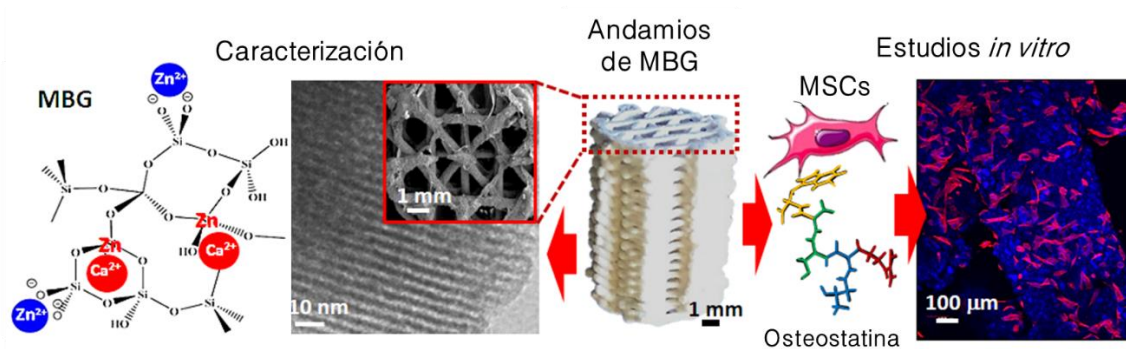


Figura 25. Esquema resumen: andamios meso–macroporosos de 4ZN cargados con osteostatina y MSCs.

3.2.1. Fabricación de los andamios

Los materiales mesoporosos ternarios, SiO₂–CaO–P₂O₅, se prepararon a través del método de autoensamblaje inducido por evaporación (EISA) en un medio hidroalcohólico y condiciones ácidas, mediante la utilización de

un surfactante no iónico (Pluronic® F123), que actúa como agente director de la estructura, tal y como se ha descrito en capítulos anteriores. El TEOS, TEP, nitrato de calcio y nitrato de zinc, se emplearon como fuentes de SiO₂, P₂O₅, CaO y ZnO, respectivamente (tabla 9). Los andamios tridimensionales se obtuvieron a través de un equipo de prototipado rápido (3D Bioplotter™ EnvisionTEC, Gladbeck, Alemania) que consiste en un software de diseño asistido por ordenador acoplado a un inyector robótico [229]. Para ello, se cargó una pasta elaborada a base de MBG y policaprolactona (PCL), polímero que posibilita la obtención la viscosidad adecuada, en un cartucho de polietileno y se utilizó una punta metálica de 0.55 mm de diámetro con ajuste de separación entre barras de 1.5 mm. Cada una de las capas dispensadas se generó con un ángulo de 45 grados con respecto a la anterior, dibujándose canales romboidales de dos tamaños. La velocidad de la punta se ajustó a 300 o 50 mm/min en el plano horizontal o vertical, respectivamente. Como resultado, se obtuvieron cilindros de 7 mm de diámetro y 5 mm de altura. Se llevó a cabo un análisis de TGA que mostró que los andamios, recién impresos, contenían un 40 % en peso de PCL. Tras calcinar estos materiales a 700 °C durante 6 h y eliminar la PCL, fue necesario encontrar algún tipo de recubrimiento que incrementara sus propiedades mecánicas y su manejabilidad. En este estudio, se eligió la gelatina como polímero para dicho propósito. La gelatina es un polímero natural muy hidrofílico y degradable en medio acuoso. Sin embargo, al entrecruzarse con glutaraldehído, disminuye su degradabilidad [236,237]. La gelatina es una forma hidrolizada de colágeno, uno de los principales componentes de la matriz extracelular de la mayoría de los tejidos [238], proteína biocompatible, de baja antigenicidad y de alta bioabsorción [239,240]. Los andamios se recubrieron con la gelatina mediante inmersión en una solución de 2.4% de gelatina entrecruzada con glutaraldehído al 0.05% w/v obteniéndose los andamios finales denominados BL-GE, 4ZN-GE y 5ZN-GE. Posteriormente se cargaron con osteostatina (100 nM en PBS) y se llevaron a cabo los distintos ensayos de caracterización fisicoquímica.

Tabla 9. Cantidades de reactivos utilizados para las síntesis de los MBGs a través de los métodos sol-gel y EISA.

Muestra	Pluronic® 123 (g)	Etanol (mL)	HNO ₃ (g)	TEOS (mL)	TEP (mL)	CaNO ₃ ·4H ₂ O (g)	ZnNO ₃ ·H ₂ O (g)
BL	4.5	67.5	1.12	8.90	0.71	1.10	–
4ZN	4.5	67.5	1.12	8.90	0.71	1.10	0.60
5ZN	4.5	67.5	1.12	8.90	0.71	1.10	0.75

3.2.2. Caracterización fisicoquímica de los andamios

La figura 26 muestra los resultados de porosimetría de adsorción de nitrógeno que comprenden las isothermas de adsorción-desorción y la distribución de tamaño de poro de los andamios BL, 4ZN y 5ZN, recubiertos y no recubiertos con gelatina y cargados y no cargados con osteostatina. Todas las isothermas se identifican como de tipo IV, características de los materiales mesoporosos. Además, presentan ciclos de histéresis H1 en el rango mesoporoso, característicos de materiales con poros cilíndricos abiertos en ambos extremos. Las distribuciones de tamaño de poro de los distintos materiales también están reflejadas en esta figura. No se observaron cambios significativos en la forma de las isothermas al recubrir los andamios con gelatina o cargarlos con osteostatina. La tabla 10 recoge los valores correspondientes a las propiedades texturales de los materiales, es decir, el área superficial, el volumen de poro y el diámetro de poro. En general se observaron valores más altos en los andamios calcinados no recubiertos (BL, 4ZN y 5ZN). Los andamios BL-GE, 4ZN-GE y 5ZN-GE mostraron una ligera disminución de estos valores debido al recubrimiento con gelatina, manteniendo unas propiedades texturales suficientemente altas como para albergar el péptido osteostatina. Se observó un decrecimiento adicional en los andamios cargados con osteostatina BL-GE+OST, 4ZN-GE+OST y 5ZN-GE+OST, confirmando la eficacia del proceso de carga del péptido. Es importante resaltar que según se fueron dopando los andamios con cantidades crecientes de zinc, el orden mesoporoso fue disminuyendo. Como resultado, el área superficial y el

volumen de poro decrecieron en los materiales 4ZN y 5ZN con respecto a BL [229].

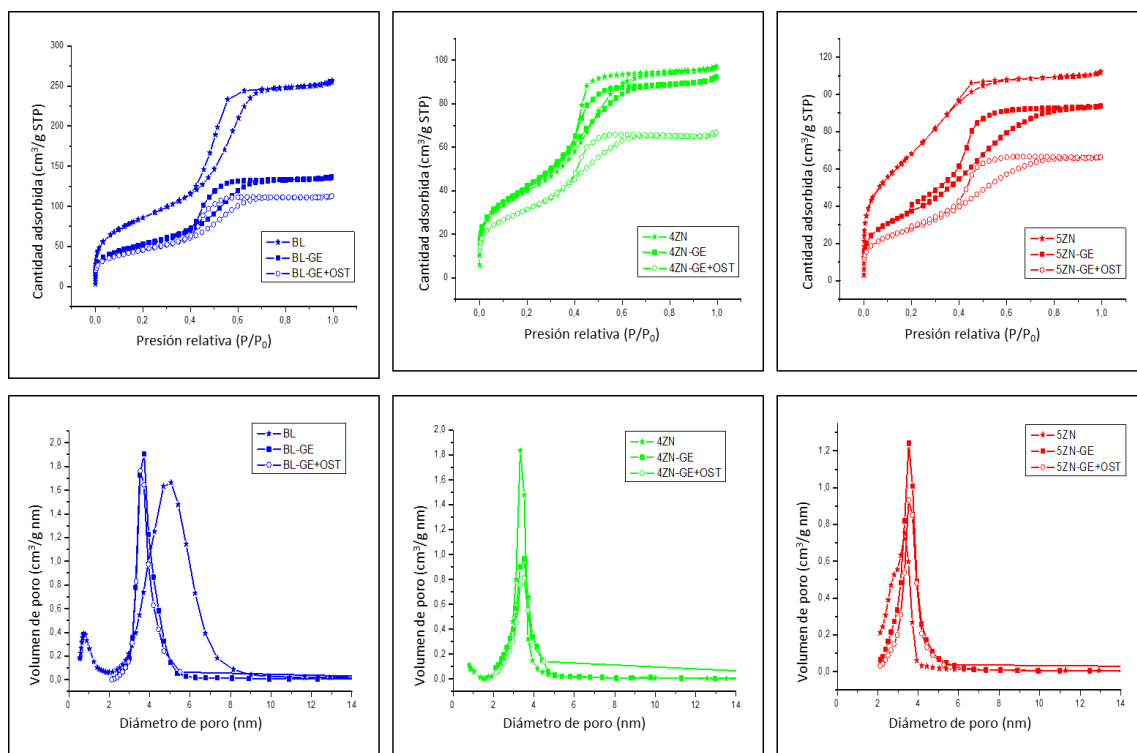


Figura. 26. Isothermas de adsorción-desorción de nitrógeno y la distribución de tamaños de poro correspondientes de los andamios calcinados antes y después de recubrirse con gelatina (GE) y tras cargarse con osteostatina (OST).

Se llevaron a cabo análisis de TGA para estudiar el porcentaje residual de PCL en los andamios tras la calcinación y para determinar el contenido real de gelatina después del recubrimiento. Por último, el porcentaje en peso de Si, P, Ca y Zn en los andamios BL, 4ZN y 5ZN calcinados se determinó por EDX. Los valores experimentales guardan alta correspondencia con los nominales mostrados entre paréntesis (tabla 10).

Tabla 10: Propiedades texturales de los andamios donde S_{BET} es el área superficial, V_p el volumen de poro y D_p el diámetro de poro. Determinación del porcentaje de PCL y gelatina mediante TGA. Análisis EDX que proporciona el porcentaje en peso de Si, P, Ca y Zn. Los valores nominales se muestran entre paréntesis. Los errores estándar y los valores medios (coeficiente de variación de cada medida del <7%) se omiten por simplificación.

Muestra	S_{BET} (m^2/g)	V_p (m^3/g)	D_p (nm)	%PCL (TGA)	%GE (TGA)	Composición atómica% (EDS)			
						Si	P	Ca	Zn
BL	343	0.40	5.1	0.5 (0)	–	84.5 (80)	3.1 (5)	12.5 (15)	
BL-GE	188	0.21	3.7	–	7				
BL-OST	164	0.17	3.5	–	–				
4ZN	238	0.40	3.3	1.0 (0)	–	82.7 (77)	3.3 (4.8)	10.3 (14.4)	4.2 (4)
4ZN-GE	151	0.14	3.5	–	6				
4ZN-OST	113	0.10	3.5	–	–				
5ZN	188	0.14	3.3	1.0 (0)	–	82.5 (76)	3.8 (4.8)	8.9 (14.3)	4.8 (5)
5ZN-GE	136	0.14	3.5	–	6				
5ZN-OST	101	0.10	3.5	–	–				

Los andamios recubiertos con gelatina se pulverizaron, obteniéndose un material en forma de polvo que se caracterizó por SA-XRD. La presencia de un máximo de difracción en esta región (figura 27 A) es indicativo de orden mesoporoso. Sin embargo, se observaron diferencias entre muestras a causa del dopaje con zinc. Así, el material BL-GE mostró un máximo de difracción a 2θ en la región $1.0\text{--}1.4^\circ$ asignado a la reflexión (10) y máximos de menor intensidad alrededor de 2.0 que pueden asignarse a la reflexión (11). Estos máximos se referenciaron en base a una estructura hexagonal bidimensional (2D) ordenada (grupo de plano $p6mm$) [241,242]. La intensidad del máximo (10) disminuyó en el resto de las muestras, asociándose a un aumento en el contenido de ZnO, lo que indica un deterioro progresivo de la estructura mesoporosa en los materiales 4ZN-GE y 5ZN-GE a causa del dopaje con zinc.

Para estudiar la efectividad y homogeneidad del recubrimiento, se analizaron los materiales mediante FTIR y estudios de TGA. El espectro FTIR de los andamios recubiertos y no recubiertos con gelatina se muestran en la figura 27 B. El espectro de los andamios sin recubrir mostró bandas intensas de

absorción a 1040 y 479 cm^{-1} , lo que corresponde a la vibración asimétrica de flexión del enlace Si-O-Si, así como una banda a 800 cm^{-1} atribuida a la vibración simétrica de estiramiento del enlace Si-O [243]. El hidrogel de gelatina entrecruzada contiene grupos $-\text{CH}_2-$ y $-\text{NH}_2$ mostrando bandas entre 3190 y 3440 cm^{-1} que corresponden a los enlaces C-H y N-H respectivamente. Las bandas de vibración a 1600 – 1700 cm^{-1} y 1500 – 1560 cm^{-1} se asignaron a los enlaces C=O (Amida I) y N-C=O (Amida II), respectivamente. La banda de deformación a 1460 – 1600 cm^{-1} se asignó al enlace N-H, mientras que las bandas a 1510 y 1440 cm^{-1} corresponden al enlace COO- [244,245]. La banda C=N a 1535 cm^{-1} corresponde al enlace de entrecruzamiento de la gelatina y el resto de las bandas a los grupos carboxilo y amino del hidrogel.

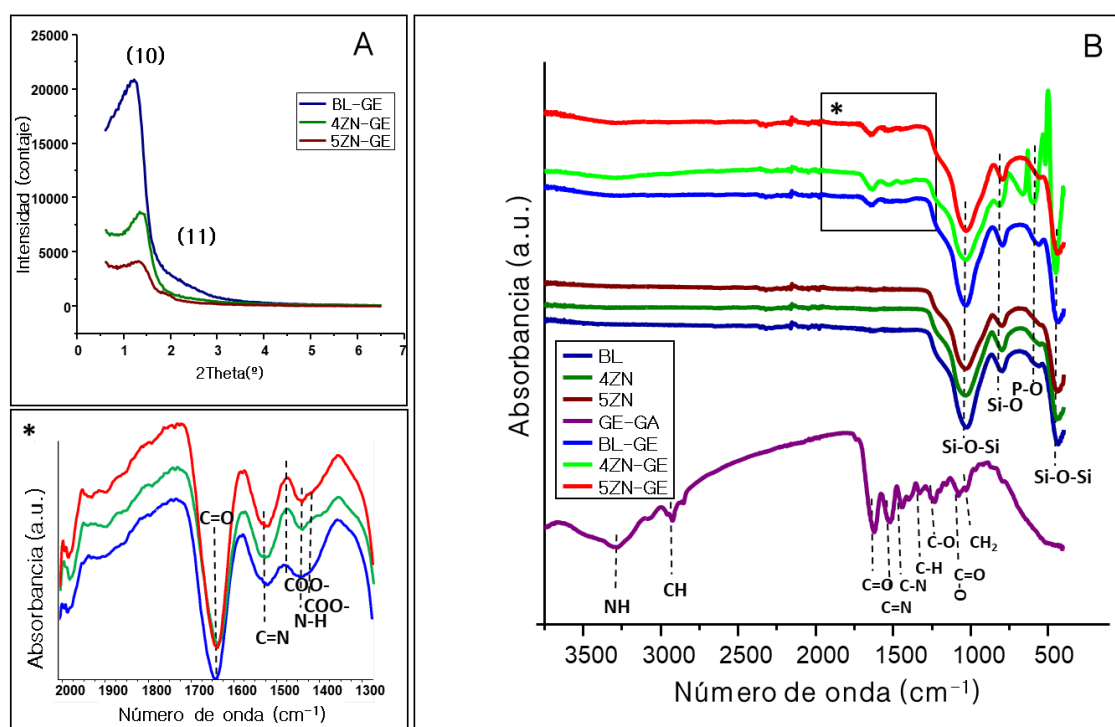


Figura 27. Patrones de SA-XRD (A) y espectro (B) de los andamios BL y dopados con zinc (4ZN y 5ZN) antes y después de ser recubiertos con gelatina (GE). *magnificación de (B).

La cantidad de gelatina entrecruzada presente en los andamios BL-GE, 4ZN-GE and 5ZN-GE se estudió mediante TGA. Los resultados muestran que los tres tipos de materiales presentan cantidades similares de gelatina observándose pérdidas de peso de $6 \pm 0.5\%$ (tabla 10). Los análisis de TEM confirmaron los resultados de SA-XRD. La figura 28 muestra las

micrografías de TEM correspondientes a las muestras BL, 4ZN y 5ZN obtenidas mediante la emisión de un haz de electrones en paralelo a los canales mesoporosos. Las micrografías de los andamios BL y 4ZN muestran mesoestructuras bien ordenadas con patrón hexagonal, mientras que la muestra 5ZN presenta una estructura de canales de gusano [246].

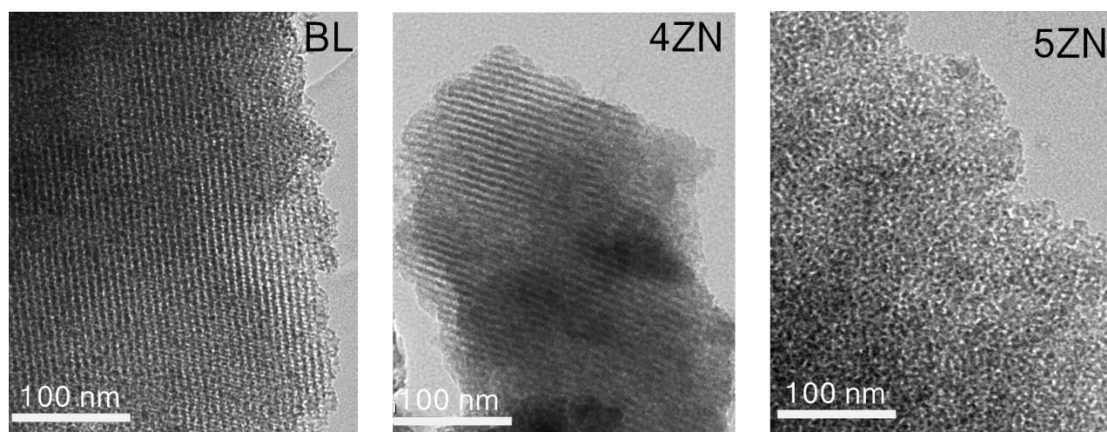


Figura 28. Micrografías TEM de los andamios BL, 4ZN y 5ZN mostrando la estructura mesoporosa hexagonal y estructura de tipo gusano.

Las micrografías de SEM de la superficie de los andamios 4ZN y 4ZN-GE, así como de una fractura de estos, se muestran en la figura 29. El plano perpendicular de la superficie muestra dos tipos de canales con diámetros de entre 700–1000 μm y 1000–1500 μm , respectivamente. Además, la arquitectura de los materiales muestra poros gigantes de 400 μm en la fractura transversal tras el recubrimiento con gelatina. En los materiales 4ZN-GE fue posible apreciar la capa de gelatina recubriendo la superficie del material. En la micrografía donde se aporta una mayor magnificación de la misma sección, se observan macroporos interconectados de entre 1–10 μm , tal y como se observó mediante porosimetría de adsorción de mercurio. Se realizó un análisis EDX del polvo resultante de moler los andamios que mostró la presencia de Si, Ca, P y Zn en ambas muestras (4ZN y 4ZN-GE) (figura 29). Los andamios recubiertos con gelatina también mostraron carbono proveniente del hidrogel. El contenido experimental de SiO_2 , CaO , P_2O_5 y ZnO en estos materiales, obtenido mediante EDX, corresponde de forma bastante fiel a los datos nominales (tabla 10).

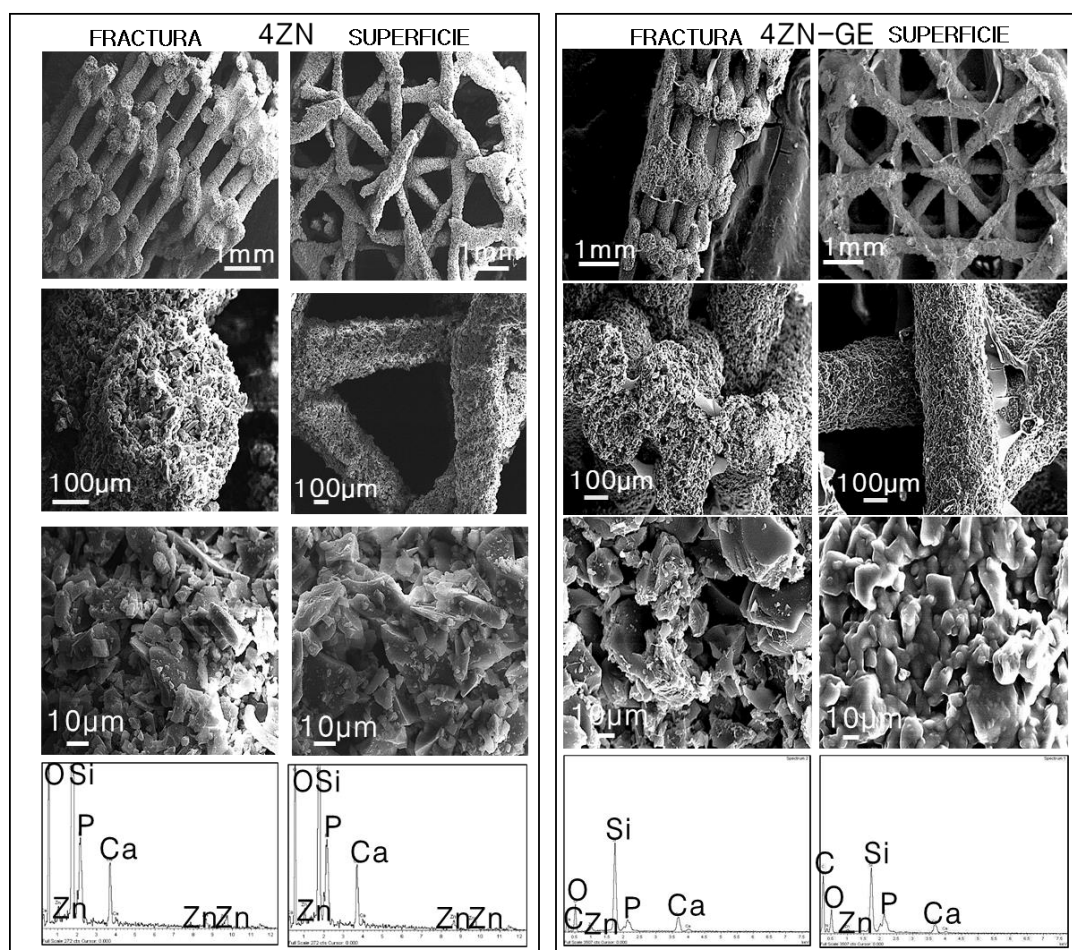


Figura 29. Micrográficas SEM de la superficie y de una fractura de los andamios 4ZN y 4ZN-GE. Espectro EDX de las piezas mostrado en la parte baja de la imagen.

La figura 30 muestra la intrusión acumulativa (A) y la distribución de tamaños de poro (B) que se obtuvieron mediante porosimetría de adsorción de mercurio llevada a cabo en los polvos de MBG, así como en los andamios secos e hidratados. Los andamios secos BL-GE, 4ZN-GE y 5ZN-GE se introdujeron en agua durante 24 h y posteriormente se liofilizaron mediante un liofilizador Lyo-Quest Telstar (Tarrasa, España). Este procedimiento posibilita medir la porosidad que el material recubierto adquiere al entrar en contacto con un medio acuoso. Es una forma de simular las condiciones en las que se encontrarían los andamios *in vitro* e *in vivo*.

De esta manera, al entrar en contacto con un medio acuoso, el hidrogel de gelatina podría fomentar la entrada de fluidos en el andamio, lo que podría suponer un incremento en la bioactividad del material. Los análisis de porosimetría de adsorción de mercurio mostraron un aumento de la

porosidad de los andamios tras su hidratación. En este sentido, las curvas de intrusión acumulativa (figura 30 A) mostraron unos valores de porosidad total de 38, 30 y 34%, para los andamios liofilizados BL-GE, 4ZN-GE y 5ZN-GE, respectivamente, lo que supone un aumento del tamaño de poro del 57, 51 y 42%, respectivamente, con respecto a los andamios secos. Este incremento de porosidad se produjo principalmente en el rango de poro desde los 15 a los 600 μm : 8% para BL-GE, 18% para 4ZN-GE y 10% para 5ZN-GE (figura 30 B).

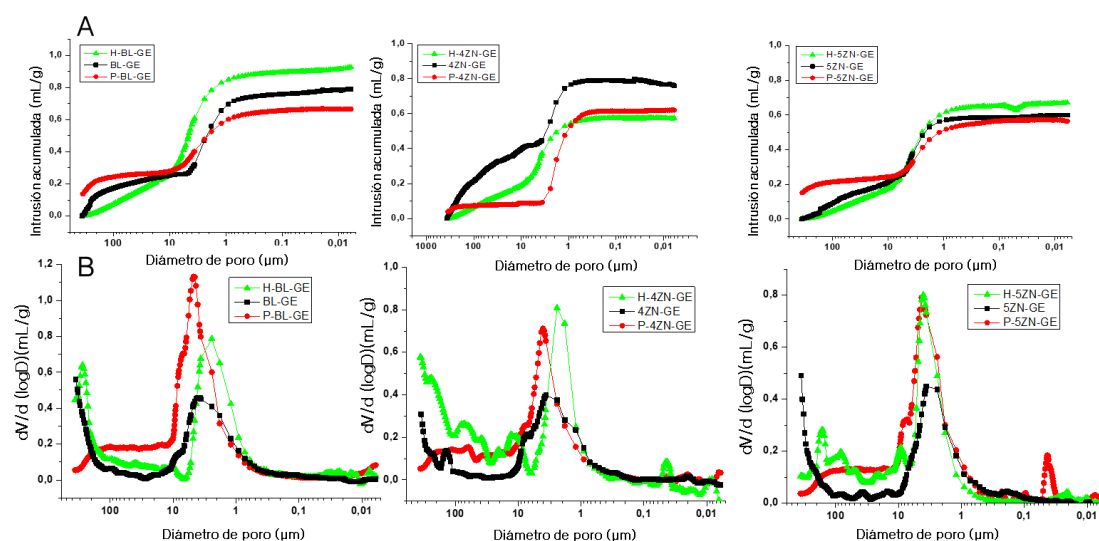


Figura 30. (A) Volumen acumulativo en función del diámetro de poro medido por intrusión de Hg. (B) Distribución de tamaños de poro de los materiales BL-GE, 4ZN-GE and 5ZN-GE en forma de polvo (P-), andamios secos e hidratados (H-).

Se llevaron a cabo estudios de resonancia magnética nuclear de masas (MAS-NMR) en estado sólido del ^{29}Si (figura 31 A) y del ^{31}P (figura 31 B) para investigar las especies formadoras de red de los diferentes andamios a nivel atómico. Q^2 , Q^3 y Q^4 representan los átomos de silicio denominados como Si^* en las moléculas de $(\text{NBO})_2\text{Si}^*(\text{OSi})_2$, $(\text{NBO})\text{Si}^*(\text{OSi})_3$, y $\text{Si}^*(\text{OSi})_4$ respectivamente. La tabla 11 muestra los desplazamientos químicos, las áreas de deconvolución y la conectividad de la red, obtenida mediante espectroscopia NMR del ^{29}Si , y del ^{31}P de cada composición de MBG. Las señales en la región comprendida entre -110 ppm y -112 ppm, y las que se observan entre -100 ppm y 103 ppm, corresponden a Q^4 y Q^3 , respectivamente. La resonancia de aproximadamente -92 ppm proviene de

Q^2 [232]. Mediante la espectroscopia NMR del ^{29}Si , se caracterizaron los andamios de MBG como materiales con alto porcentaje en especies Q^4 y Q^3 , con una conectividad de red de 3.62. Estos datos son consistentes con estudios previos realizados en este tipo de materiales de MBG [229]. La estructura principal en los andamios 4ZN es un tetraedro $[\text{ZnO}_4]$. Este tetraedro presenta carga (2-), lo que justifica la atracción de los iones Ca^{2+} y Zn^{2+} que actúan como deformadores de red y no como modificadores de red. De acuerdo con esto, los NBO disminuyen con el aumento del porcentaje de las especies Q^4 y la disminución de las especies Q^3 (figura 31 A y tabla 11). Es importante resaltar que los andamios de MBG, los cuales presentan mayor porcentaje de especies Q^3 y menor porcentaje de especies Q^2 en comparación con los discos de MBG, se sometieron a dos calcinaciones a 700 °C mientras que los discos únicamente se someten a una [14]. Esta distribución de red debería influir en el comportamiento *in vitro* de los andamios en comparación con los discos. Además, la conectividad de red de los andamios 4ZN-GE y 5ZN-GE aumenta levemente, en comparación con los discos, alcanzando valores similares a los que presentan los andamios BL-GE (tabla 11). Estos datos entran en contraposición con el incremento de la conectividad de la red, observada previamente en MBGs con ZnO al 7% [229]. La simetría de las unidades tetraédricas Q^4 en los andamios BL, con respecto a los dopados con zinc, muestra una estructura más isotrópica que es evidente gracias al incremento de la anchura a media altura (FWHM) (tabla 11). Además, se observó que la cristalinidad de Q^3 y Q^2 era ligeramente mayor cuando las muestras contenían zinc. Q^0 y Q^1 representan a los átomos de fósforo, denominados como P^* en las especies PO_4^{3-} de las moléculas $(\text{NBO})_3P^*-(\text{OP})$, $(\text{NBO})_2-P^*-(\text{OP})_2$ (NBO correspondientes a los oxígenos no enlazantes relativos a otro átomo de P) [247]. En la figura 31 B, el espectro del ^{31}P de MAS-NMR de los distintos materiales mostró un máximo a ~ 2 ppm que se asigna al entorno de Q^0 , típico de fosfatos amorfos. Además de la señal de los ortofosfatos principales, se observó una resonancia menor del ^{31}P en todo el espectro. Se observó que esta última señal se desplaza desde -8.0 ppm hasta -8.7 ppm cuando incrementa el porcentaje de ZnO en los MBGs. Esta señal de resonancia corresponde a los tetraedros Q^1 y se puede asignar al

entorno de P–O–Si como se ha descrito anteriormente [245,246]. Es interesante resaltar que la introducción progresiva de ZnO, provocó un ligero decrecimiento del porcentaje de las unidades Q^1 , aunque se produjo un aumento del desplazamiento químico en los materiales 4ZN y 5ZN. Esto sugiere una conversión parcial de las unidades de P–O–Si en unidades P–O–Zn. La formación de unidades P–O–Zn ha sido previamente descrita por Vallet–Regí et al. en otros MBGs con composiciones análogas [229,233,247].

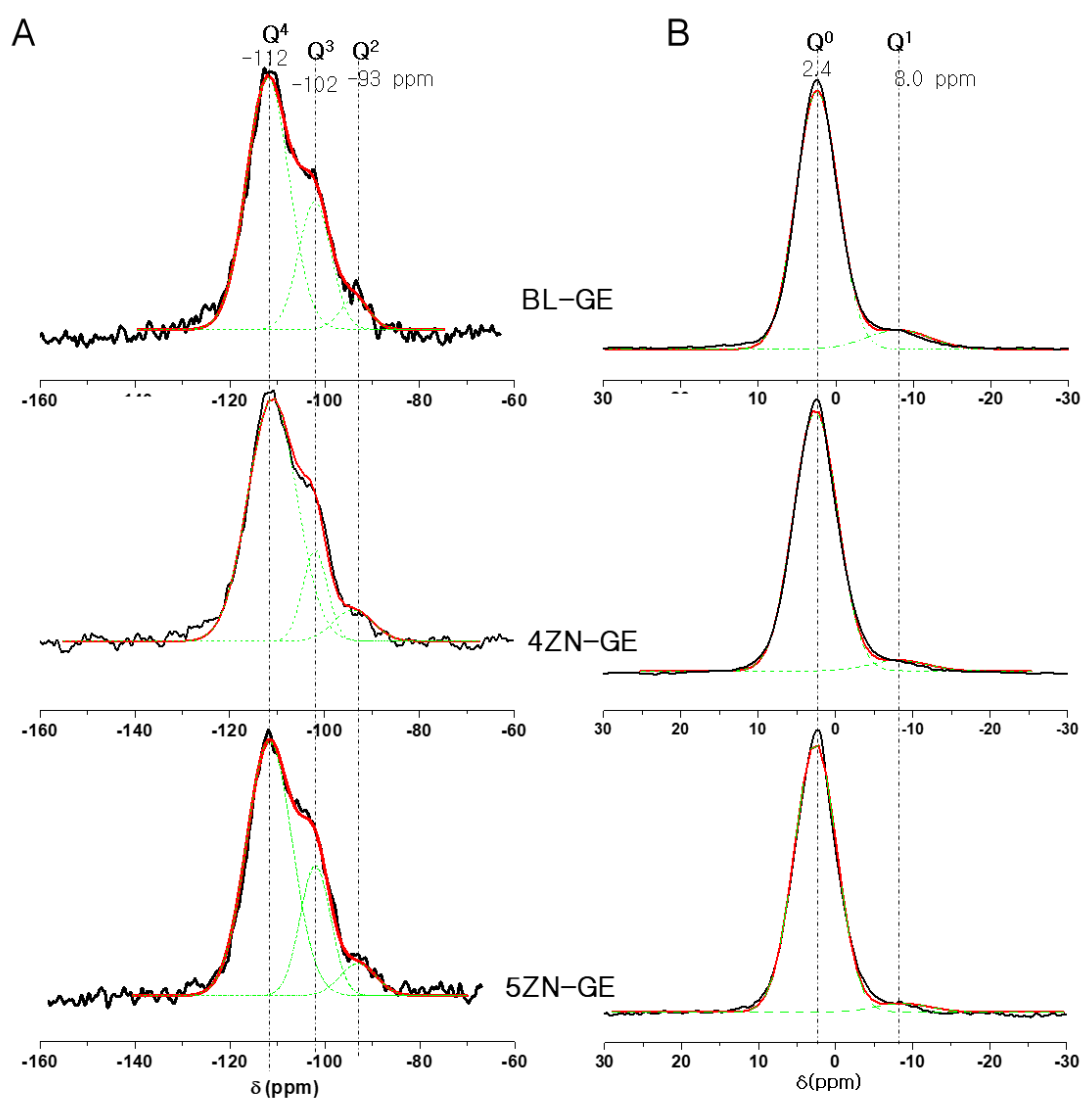


Figura 31. Espectro MAS–NMR en estado sólido de (A) ^{29}Si y (B) ^{31}P de los andamios BL–GE, 4ZN–GE y 5ZN–GE. Unidades de área Q_n calculadas mediante deconvolución lineal Gaussiana mostradas en verde.

Tabla 11. Transiciones químicas y áreas relativas obtenidas mediante espectroscopía MAS-NMR en estado sólido de ^{29}Si y ^{31}P . Las unidades de área Q_n fueron calculadas mediante deconvolución lineal Gaussiana y sus poblaciones relativas se expresan en %.

Muestra ²⁹ Si										<Q ⁿ > ^a	³¹ P					
Q4			Q3			Q2					Q0			Q1		
	CS ppm	Área (%)	fwhm ppm	CS ppm	Área (%)	fwhm ppm	CS ppm	Área (%)	fwhm ppm		CS ppm	Área (%)	fwhm ppm	CS ppm	Área (%)	fwhm ppm
BL-GE	-112	63.3	8.9	-102	33.8	6.8	-92	3.0	6.0	3.60	2.4	90	5.3	8.0	10.0	8.0
4ZN-GE	-111	67.4	10	-102	28.7	5.0	-92	3.8	8.3	3.63	2.6	95	5.7	8.2	5.0	7.3
5ZN-GE	-111	69.4	9.6	-102	23.7	6.4	-93	6.9	7.6	3.62	2.6	96	5.5	8.7	4.0	7.2

Los iones Ca^{2+} , P(V) y Zn^{2+} , liberados por los andamios, se midieron introduciendo las piezas en medio basal para células madre mesenquimales (MSCBM) donde posteriormente se llevarán a cabo los ensayos de citocompatibilidad (figura 32). En todos los casos los iones de Ca^{2+} y P(V) incrementaron en el medio de cultivo con el tiempo. En los andamios BL-GE la baja concentración de iones Ca^{2+} se atribuye a su alta bioactividad *in vitro*. Parte de los iones Ca^{2+} liberados precipitan como carbonato-hidroxiapatita (HCA) en la superficie del material, por lo que no están presentes en el medio. Los andamios 4ZN y 5ZN presentan una respuesta bioactiva más lenta, por lo que la mayoría de los iones Ca^{2+} que se liberan, permanecen en el MSCBM. En cuanto a los iones P(V) , los andamios 4ZN y 5ZN muestran una concentración más baja en el medio por la precipitación de fosfatos de calcio y zinc [229,246]. Por el contrario, la liberación de iones Zn^{2+} fue prácticamente constante (1 ppm/día) durante los primeros 5 días, siendo mayor en el material 5ZN que en el 4ZN debido a su mayor porcentaje de zinc. Estos resultados confirman la accesibilidad del medio de cultivo a la parte interna de los andamios recubiertos con gelatina. Además, la rápida hidratación del hidrogel (30 min) provocó un aumento de liberación de iones Ca^{2+} , P(V) y Zn^{2+} en comparación con los andamios no recubiertos [229]. Esto ocurre porque la hidratación del hidrogel permite el intercambio de fluidos y por lo tanto la liberación de iones al medio. No se observó variación del comportamiento al cargar los andamios con osteostatina. Además, la liberación de zinc en estos materiales fue superior a la que liberaron los mismos MBGs pero en formato disco [247].

Esto puede deberse a la alta conectividad de red que poseen los discos densos en las que los iones se comportan, básicamente, como formadores

de red, por lo que su liberación al medio es más complicada. La macroporosidad abierta e interconectada y el recubrimiento de gelatina de los andamios facilitan la liberación de iones en comparación con los discos. Estas características hacen de los andamios un material mejorado para aplicaciones biológicas.

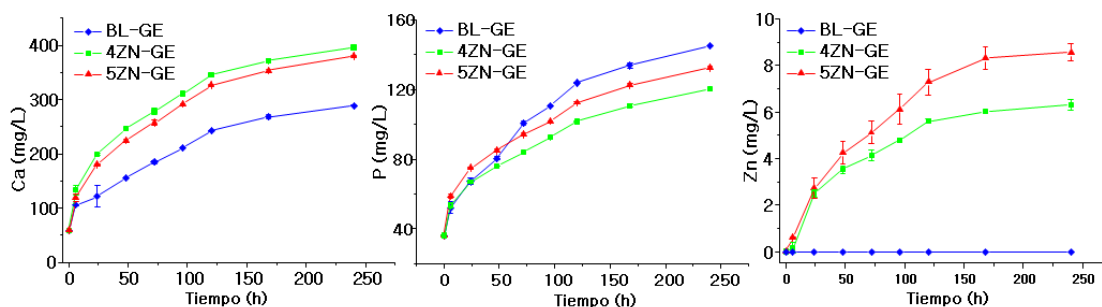


Figura 32. Liberación de iones calcio, fósforo y zinc por parte de los andamios BL-GE, 4ZN-GE y 5ZN-GE inmersos en medio completo entre 6 h y 10 días.

Se evaluó el comportamiento de los andamios recubiertos con gelatina en medio acuoso, para conocer su comportamiento *in vitro* e *in vivo*. La gelatina es un polímero hidrofílico y absorbente, constituido por grupos polares [233,234]. Para estudiar el comportamiento de los andamios recubiertos con gelatina en fluidos biológicos, se llevó a cabo un ensayo de rehidratación. La figura 33 A muestra el hinchamiento de los distintos andamios en el tiempo. Las curvas de %W muestran un aumento rápido de la absorción de agua en los primeros 15 min, seguido de un ligero incremento del contenido de agua en las siguientes 24 h. Los andamios BL-GE, 4ZN-GE y 5ZN-GE absorben entre un 120 y un 140 wt-% de agua con respecto a su masa inicial en seco. Este alto grado de hidratación se puede explicar por la presencia de gelatina entrecruzada con glutaraldehído en un 6–7 wt% (tabla 10), y su elevada macroporosidad interconectada (figuras 29 y 30). La capacidad de absorción de agua, así como el aumento de tamaño de sus poros en solución acuosa, fue similar en todos los materiales debido a que muestran una distribución macroporosa y conectividad de poros muy similar [248,249].

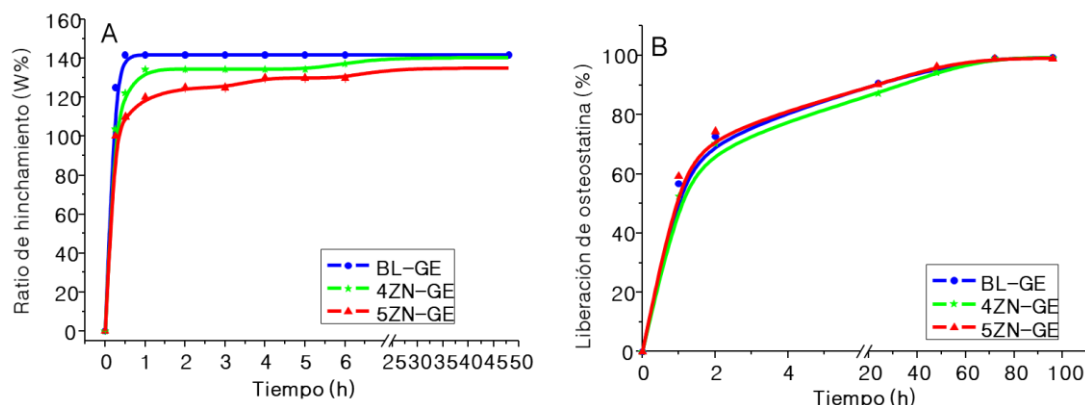


Figura 33. (A) Ratio de hinchamiento (%W) de los andamios BL-GE, 4ZN-GE y 5ZN-GE como función del tiempo de incubación. (B) Liberación de osteostatina de los andamios de MBG tras su inmersión en PBS entre 1 h y 4 días. Los puntos indicados corresponden a la media de tres valores tomados de forma independiente por periodo de tiempo. Los valores SEM (representados como coeficiente de variación del <5% por cada tiempo) se omiten por simplificación de la figura.

3.2.3. Ensayos *in vitro*

3.2.3.1. Carga y liberación de osteostatina en andamios de MBG

Tras 24 h de carga con osteostatina, la retención del péptido por cada tipo de andamio fue del 47% (BL-GE+OST), 52% (4ZN-GE+OST) y 52% (5ZN-GE+OST), lo que equivale a 0.52, 0.71 y 0.62 μg osteostatina/g andamio, respectivamente. Estos materiales liberaron de media 56% (BL-GE+OST), 52% (4ZN-GE+OST) y 59% (5ZN-GE+OST) del péptido al medio circundante en 1h; 90% (BL-GE+OST), 87% (4ZN-GE+OST) y 90% (5ZN-GE+OST) después de 24 h; y 100% en todos los materiales después de 96 h (figura 33 B). Estos datos muestran que los materiales retienen una mínima cantidad de osteostatina. La carga de osteostatina por parte de los andamios en μg , fue superior a la observada en los discos de MBG [151,247], debido a razones que se explicarán posteriormente. En este sentido, cabe destacar que nuestro grupo ha demostrado en estudios anteriores que cantidades de osteostatina en el rango sub- μg , fueron eficientes en el incremento de la función osteoblástica *in vitro* [143,150,250]. Así mismo, cabe suponer que el mecanismo de liberación de la osteostatina se produce mediante difusión a través de los mesoporos [251]. Por lo tanto,

y teniendo en cuenta que la matriz de sílice es insoluble a pH 7.4, la liberación de este péptido puede describirse mediante una desviación del comportamiento de la ecuación de primer orden de Noyes–Whitney con la introducción de un factor empírico de no idealidad δ [252,253]:

$$W_t/W_0 = A (1 - \exp^{-k_1 \cdot t})^\delta$$

Siendo W_t la masa peptídica liberada a tiempo t ; W_0 la masa máxima inicial de péptido en el interior de los poros; A es la cantidad máxima de péptido liberado y K_1 es la constante de liberación que es independiente de la concentración de péptido y proporciona información sobre la accesibilidad del disolvente y el coeficiente de difusión a través de los canales mesoporosos. El perfil de liberación del péptido muestra una desviación del comportamiento teórico de primer orden, descrito en la ecuación anterior (figura 33 B). Esta figura muestra una liberación más rápida durante las primeras 24 h, alcanzando una fase estacionaria a las 48 h. Esta desviación podría deberse a distintos factores como el volumen del péptido, la distorsión de los canales mesoporosos o/y la liberación de moléculas del péptido absorbidas por la superficie del material o la matriz de este. Esta divergencia se trató mediante la incorporación de factor empírico de no idealidad δ . Este factor muestra valores de entre 1, para materiales que siguen la cinética de primer orden, y 0 para aquellos que muestran una liberación rápida de las moléculas albergadas en las entradas de los poros. La tabla 12 muestra los parámetros de liberación obtenidos mediante la introducción de nuestros datos en el modelo de primer orden semiempírico. De acuerdo con este modelo, el valor δ proporciona una idea de la precisión de esta aproximación. Este parámetro fue similar para todos los andamios estudiados indicando que las moléculas de osteostatina se liberan tanto del interior como de la superficie de la estructura mesoporosa de cada uno de los andamios (tabla 12). Es importante remarcar que la cantidad de péptido cargado fue superior en los andamios tridimensionales que en los discos de MBG [247] debido a la mayor accesibilidad de la estructura mesoporosa, la organización jerárquica de los canales y la macroporosidad de estos materiales.

Tabla 12: Valores de la cinética de liberación de osteostatina de los andamios BL-GE, 4ZN-GE y 5ZN-GE. W_0 : masa inicial cargada ($\mu\text{g OST/g MBG}$); A: cantidad máxima de liberación relativa de osteostatina; k_1 : constante de liberación; δ : factor de no idealidad; R: exactitud de la aproximación.

Muestra	W_0 ($\mu\text{g/g}$)	A	$K_1(\times 10^3)$ (h^{-1})	δ	R
BL-GE	56	96.2 ± 3.4	40.9 ± 2	0.48 ± 0.02	0.996
4ZN-GE	52	98.2 ± 3.1	37.2 ± 1	0.50 ± 0.03	0.998
5ZN-GE	59	98.9 ± 3.0	40.9 ± 4	0.47 ± 0.04	0.996

3.2.3.2. Citocompatibilidad con células madre mesenquimales

Viabilidad

El mecanismo de acción a través del cual actúan de forma sinérgica el zinc y la osteostatina, tanto sobre el crecimiento como sobre la diferenciación celular, es aún desconocido. El zinc tiene un papel decisivo en la transducción de señales celulares, la expresión génica y como componente catalítico de gran variedad de enzimas en mamíferos. Sin embargo, su efecto putativo en MSCs no está muy descrito [254]. Un estudio previo con gránulos de vidrio bioactivo sol-gel, dopados con zinc entre un 2 y un 5%, muestra una estimulación por parte de este catión en la diferenciación osteogénica, basándose en la actividad de la ALP, en células madre mesenquimales de ratas adultas [255].

T. Wang et al. demostraron que los iones de zinc a sub o supra concentraciones en nM, inhibían la diferenciación osteogénica en MSCs de ratón [108]. También se ha publicado que el transportador ZnT7, miembro de la familia de transportadores de zinc SLC30A, puede actuar como inhibidor durante la diferenciación de MSCs de rata inducida por dexametasona. Este efecto parece ser dependiente, al menos en parte, de la vía de señalización extracelular regulada por quinasas (ERK) [256]. Además, una variedad de ensayos *in vitro* e *in vivo*, demuestran el efecto

osteogénico de la osteostatina [25,147,257]. De hecho, uno de estos estudios ha demostrado que la osteostatina interacciona sinérgicamente con el factor-2 de crecimiento de fibroblastos acoplado a Si-HA, induciendo la mineralización de las células ALP en células MC3T3-E1 y osteoblastos humanos primarios mediante un mecanismo dependiente de ERK [250]. Por todo ello, nace la hipótesis de que los iones zinc y la osteostatina podrían interaccionar mediante la activación de ERK u otros mecanismos de acción intracelulares.

Se sabe que el linaje osteoblástico está regulado a través de la acción de distintas moléculas, incluyendo factores peptídicos sistémicos y locales. En algunos tejidos, los péptidos pueden actuar como mediadores celulares. Así, las peptidasas de superficie celular son también capaces de modular su actividad. En este sentido, las neprilisinas zinc metalopeptidasas, peptidasas de superficie celular presentes en todas las células del linaje osteoblástico (preosteoblastos, osteoblastos maduros y osteocitos), están sobreexpresadas en MSCs durante la diferenciación osteogénica [258]. Es importante resaltar que la zinc-metalopeptidasa puede adherirse a distintos péptidos osteogénicos, incluyendo la PTHrP (107–139) nativa que contiene la molécula de osteostatina PTHrP (107–111). En este escenario se podría especular con que la PTHrP endógena, la cual incrementa la diferenciación osteoblástica [144,145], pueda colaborar con los iones Zn^{2+} para promover dicha diferenciación. A pesar de que sean necesarios estudios adicionales para confirmar esta hipótesis, el efecto sinérgico observado en los andamios de MBG dopados con zinc y la osteostatina, constituye una razón de peso con la que fundamentar esta hipótesis.

Este estudio proporciona la primera evidencia de que la combinación de zinc y osteostatina en los andamios de MBG, promueve la proliferación y diferenciación celular en células madre mesenquimales humanas sin factores de diferenciación clásicos. Estos datos muestran el potencial de este abordaje para aplicaciones de ingeniería de tejidos.

Morfología

Se evaluó la morfología de las MSCs, tras ser sembradas en los andamios tridimensionales, mediante microscopía confocal (figura 34 A). Se analizó el centro geométrico de cada uno de los andamios cilíndricos (7 x 5 mm) con el objetivo de determinar la morfología que presentaban las células allí alojadas tras 5 días de cultivo. Para ello, se llevó a cabo una tinción celular con faloidina que tiñe los filamentos de actina del citoesqueleto. En este caso no se empleó DAPI porque este también tiñe el recubrimiento de gelatina de los andamios impidiendo que se aprecien las células correctamente. La actina es el filamento de interconexión más importante del citoesqueleto y lleva a cabo distintas funciones, incluyendo el mantenimiento de la forma de la célula, el movimiento celular y el transporte intracelular [259]. Se comprobó que las MSCs presentaban su morfología típica en forma de huso, mostrando una colonización y esparcimiento óptimos en todos los andamios, lo que muestra la biocompatibilidad de las piezas testadas. Además, se observaron poblaciones celulares interconectadas a distintas profundidades de los andamios, mostrando una buena internalización y comunicación celular. Estos parámetros fueron mejores en los andamios dopados con zinc y cargados con osteostatina (figura 34 A).

Posteriormente, se analizó y comparó la proliferación de las MSCs inducida por la combinación de zinc y osteostatina en los andamios de MBG. El crecimiento de las MSCs aumentó en los andamios dopados con zinc (4ZN y 5ZN) en comparación con los andamios sin zinc (BL) a los 5 y 7 días de cultivo. Este efecto fue significativamente más alto en los andamios con zinc y además con osteostatina (4ZN-GE+OST y 5ZN-GE+OST) en ambos tiempos (figura 34 B), indicando el efecto sinérgico que se establece entre ambos factores en este contexto.

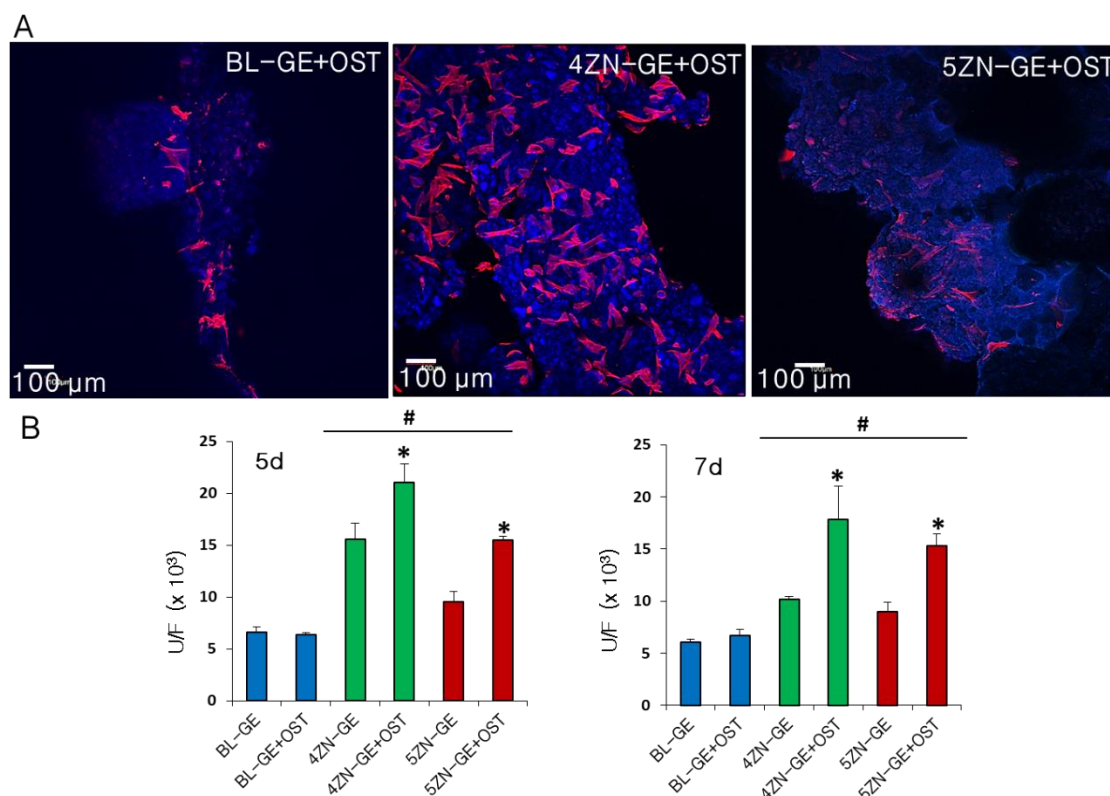


Figura 34. (A) MSCs cultivadas en los andamios de MBG cargados con osteostatina observadas mediante microscopía confocal tras 5 días de cultivo. Tinción con faloidina para determinar la morfología celular a través de la visualización de los filamentos de actina del citoesqueleto (B) Proliferación de las células MSCs en los andamios de MBG con y sin osteostatina después de 5d y 7d de cultivo. * $p < 0.05$ vs su control sin osteostatina. # $p < 0.05$ vs andamios BL sin zinc.

Citotoxicidad

La citotoxicidad se determinó midiendo la liberación de la enzima lactato deshidrogenasa (LDH) por parte de las células, comprobándose que ninguno de los materiales indujo una muerte celular significativa. Sin embargo, el material 5ZN mostró una ligera tendencia positiva (no significativa) en la liberación de la LDH que fue contrarrestada por el efecto de la osteostatina en el día 10 de cultivo (figura 35). Esto podría deberse a una mayor degradación de los andamios 5ZN en comparación con el resto, lo que podría explicar que el crecimiento celular en estas piezas sea menor a los 7 días de cultivo. Lozano et al. [143] demostraron previamente *in vitro* que la exposición de las células MC3T3-E1 a un material (discos de SBA-15 con mesoporosidad ordenada) cargado con osteostatina, provocaba un aumento del crecimiento celular y diferenciación osteoblástica. Estudios

posteriores muestran que las cerámicas basadas en SBA-15 cargadas con osteostatina son biocompatibles e inducen el reclutamiento y activación de osteoprogenitores promoviendo la regeneración ósea en conejos osteoporóticos [242]. Por otro lado, estudios previos han mostrado que, el 5%, parece ser la cantidad máxima de ZnO que puede ser incorporada en vidrios bioactivos si provocar citotoxicidad y promoviendo el crecimiento celular [260–262]. En la misma línea, el grupo de María Vallet-Regí ha demostrado recientemente que los MBGs dopados con zinc al 7% provocaban citotoxicidad en las células MC3T3-E1 [229].

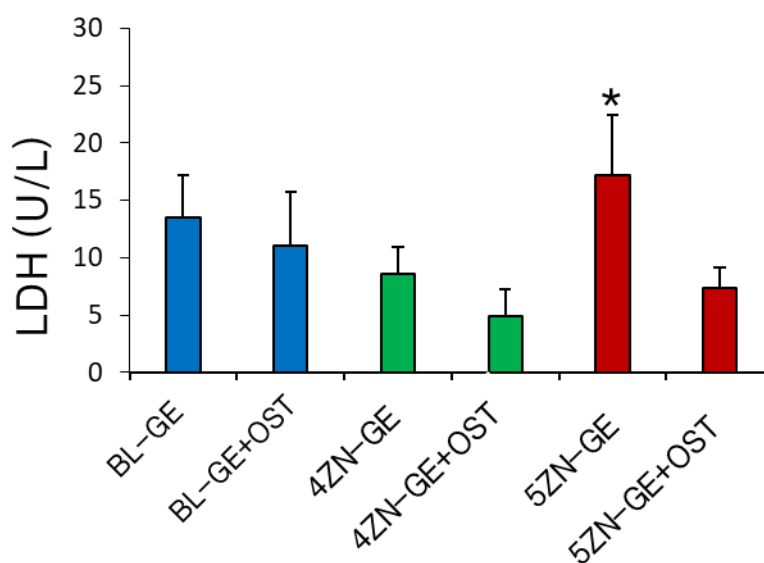


Figura 35. Producción de LDH por parte de las MSCs cultivadas en los andamios de MBG cargados o no con osteostatina después de 10 días de cultivo celular. Los resultados se expresan como valor medio $\pm$ SEM de tres medidas de cada muestra. * $p < 0.05$ vs andamios sin zinc.

Diferenciación

Se evaluó la capacidad de estos andamios, cargados o no con osteostatina, de fomentar la diferenciación de las MSCs. El estudio se basa en la medida de dos marcadores de diferenciación osteoblástica: Runx2 y ALP. Runx2 es un marcador de diferenciación temprana que provoca que las células osteoprogenitoras pasen a pertenecer al linaje osteoblástico [263]. Se observó que la incorporación de zinc en los andamios (4ZN-GE y 5ZN-GE) no bastaba para afectar a la expresión del gen Runx2 en el día 7 de cultivo. Sin embargo, la carga con osteostatina incrementaba considerablemente la

expresión de este gen, medido al mismo tiempo de cultivo (figura 36 A). ALP es considerado un marcador bioquímico clave en la diferenciación osteogénica que actúa escindiendo grupos fosfato de diferentes sustratos durante la osteogénesis [264]. Se comprobó que los andamios 4ZN-GE+OST y 5ZN-GE+OST incrementaban significativamente la expresión de ALP, medida el día 7 de cultivo, empleando como control los andamios sin osteostatina (figura 36 B). Estudios previos han sugerido que los supuestos beneficios de agregar iones Zn^{2+} a un vidrio bioactivo se verían afectados por la degradación del material promovida por la presencia de dichos iones. De hecho, hasta la fecha no se habían encontrado grandes evidencias que confirmaran el efecto osteogénico del zinc añadido a los vidrios bioactivos con base silicio [221,265]. En estudios recientes del grupo [247], la carga con osteostatina parece conferir a los vidrios mesoporosos bioactivos dopados con zinc la capacidad de estimular la actividad de ALP, así como la mineralización celular en cultivos de preosteoblastos. En este estudio, la combinación de zinc y osteostatina en los andamios 4ZN-GE+OST y 5ZN-GE+OST incrementa significativamente el crecimiento celular y por lo tanto la colonización de los andamios en comparación con el material control BL-GE. Además, el zinc y la osteostatina en conjunto y no de forma independiente, han conseguido inducir la expresión génica de dos marcadores de diferenciación osteoblástica Runx2 y ALP en MSCs en ausencia de medio de diferenciación (figura 36).

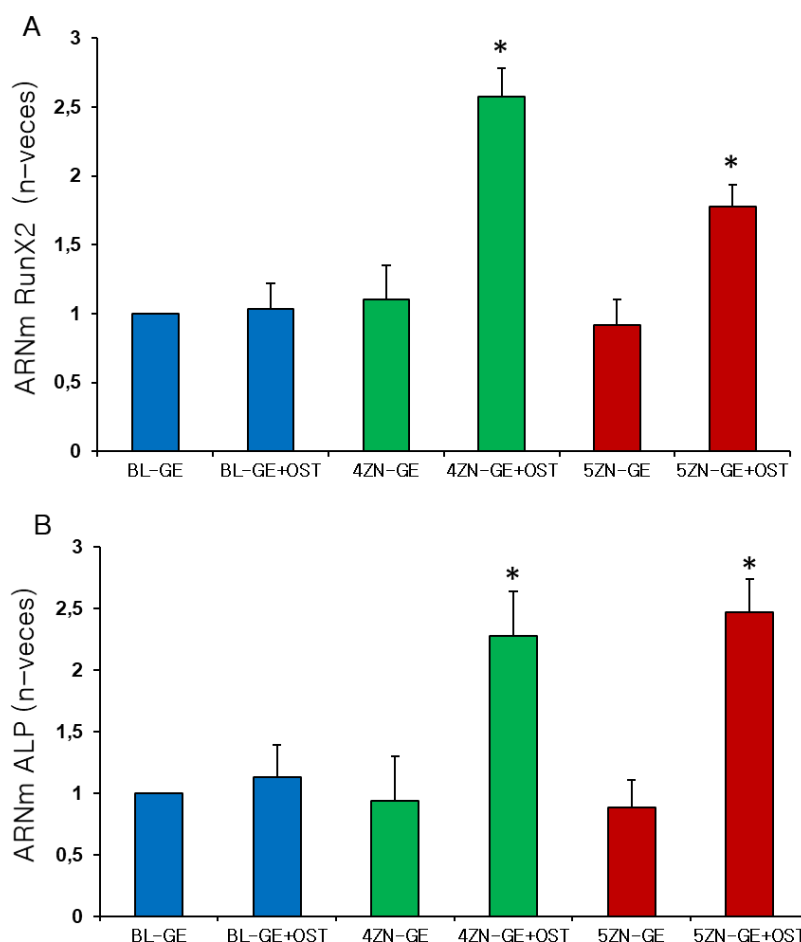


Figura 36. Niveles de RNAm de los genes Runx2 **(A)** y ALP **(B)** medidos mediante PCR a tiempo real de las MSCs en presencia de los andamios de MBG cargados o no con osteostatina a los 7 días de cultivo. Los resultados se expresan como los valores medios $\pm$ SEM ($n = 5$). * $p < 0.05$ vs los andamios correspondientes sin zinc.

3.2.4. Conclusiones: andamios de MBG para regeneración ósea

En conclusión, este estudio se basa en el diseño, síntesis, conformado y caracterización de andamios tridimensionales meso–macroporosos de vidrio mesoporoso bioactivo enriquecido con zinc, fabricados mediante prototipado rápido. Los andamios se recubren con gelatina entrecruzada con glutaraldehído con el objetivo de mejorar sus propiedades mecánicas y su manejabilidad y se cargan con osteostatina (pentapéptido osteoinductor). Estos andamios presentan macroporosidad interconectada jerárquicamente en las tres dimensiones, mostrando una excelente internalización celular. Las MSCs humanas sembradas en los andamios, presentan una respuesta excelente en términos de adhesión, crecimiento y diferenciación

osteogénica. El recubrimiento con gelatina entrecruzada facilita la liberación controlada tanto de zinc como de osteostatina y afecta positivamente al desarrollo de las MSCs y su proceso de diferenciación en ausencia de los inductores clásicos que se suelen emplear para ello. Este sistema nos permitió comprobar, por primera vez, el efecto sinérgico entre zinc y la osteostatina en la mejora del crecimiento de las MSCs y su diferenciación osteogénica, lo que muestra su potencial como herramienta para la ingeniería de tejidos aplicada a hueso.

3.3. Andamios tridimensionales de MBG para infección

Tras llevar a cabo la síntesis, caracterización fisicoquímica y pruebas *in vitro* de los andamios tridimensionales de MBG, dopados con zinc, cargados con osteostatina y decorados con MSCs, se quiso analizar su capacidad antibacteriana. Los problemas derivados de la infección en relación con el uso de implantes y prótesis son de relativa importancia. Por ello, se quiso dar un paso más en el desarrollo del biomaterial con el objetivo de que éste, además de presentar capacidades osteogénicas, fuera capaz de prevenir y eliminar los procesos de infección que pudieran surgir durante la cirugía. Con este objetivo, los andamios de MBG (BL-GE) 80%SiO₂-15%CaO-5%P₂O₅ (mol-%) se doparon con 4% zinc (4ZN-GE), ya que fue la concentración que proporcionó mejores resultados en los ensayos realizados previamente. Estos andamios se cargaron con concentraciones saturadas y con la concentración mínima inhibitoria (MIC) de los fármacos antibacterianos levofloxacino (LEVO), vancomicina (VANCO), rifampicina (RIFAM) o gentamicina (GENTA). Se estudió la capacidad antibacteriana del sistema *in vitro* mediante distintos ensayos con las cepas modelo *S. aureus* y *E. coli* (figura 37).

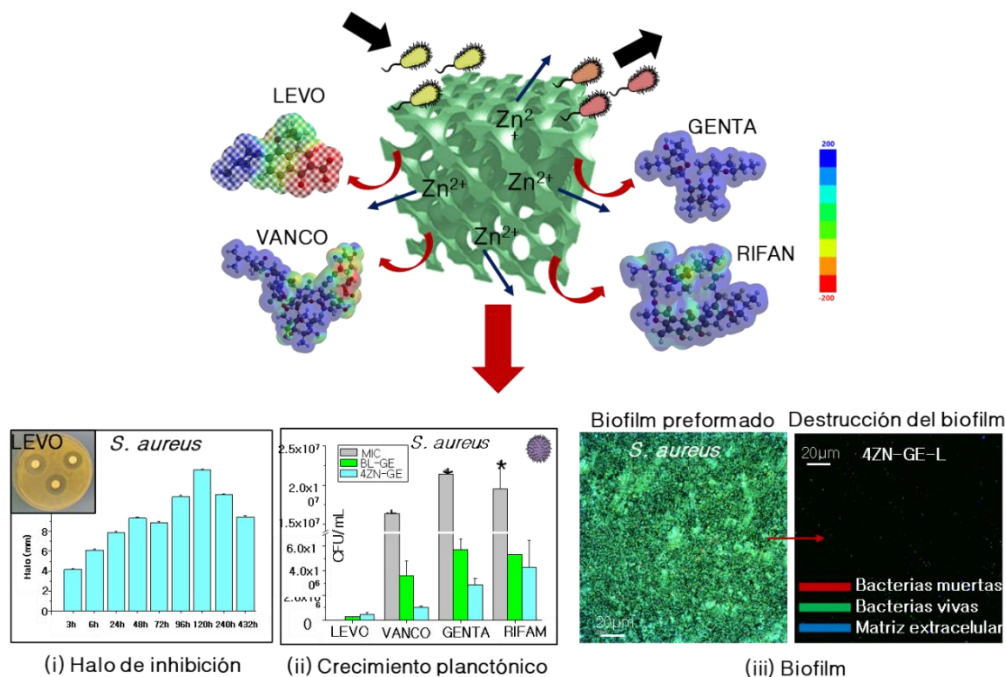


Figura 37. Esquema resumen del efecto antibacteriano de los andamios meso-macroporosos 4ZN-GE sobre las bacterias *S. aureus*.

3.3.1. Síntesis y caracterización fisicoquímica de los andamios

Los resultados correspondientes a la síntesis de los vidrios mesoporosos bioactivos, su dopaje con zinc, la fabricación de los andamios tridimensionales meso-macroporosos y la caracterización fisicoquímica de los mismos, han sido descritos en los apartados 3.1.1 y 3.2.1.

3.3.2. Ensayos *in vitro*

3.3.2.1. Liberación de iones en medio de cultivo bacteriano, THB

Con el objetivo de analizar la posible actividad antibacteriana de los andamios tridimensionales de MBG dopados con zinc, se llevó a cabo un estudio de liberación de los iones calcio, fósforo y zinc, en medio de cultivo bacteriano THB (figura 38). En el caso de los andamios BL-GE, se observó una liberación baja de iones Ca^{2+} , en comparación con los andamios 4ZN-GE, lo que se atribuye a la alta bioactividad del primer tipo de andamios. Parte de los iones Ca^{2+} liberados al medio por parte de los andamios BL-GE, precipitan en forma de carbonato-hidroxiapatita (CHA) en la superficie de estos, por lo que no están presentes en el medio. Por otro lado, los andamios 4ZN-GE, mostraron concentraciones inferiores de P(V), atribuidas a la precipitación de fosfatos de calcio y fosfatos de zinc [81,266]. Por último, la concentración acumulada de zinc aumento 1.5 ppm/día en las primeras 48 h, observándose una disminución a tiempos más largos bajo las mismas condiciones.

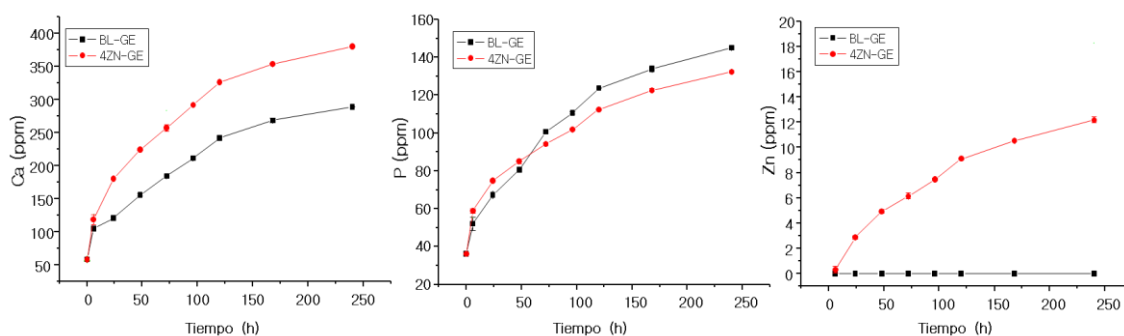


Figura. 38. Evolución de la liberación de iones Ca^{2+} , P(V) y Zn^{2+} por los andamios de MBG, inmersos en medio de cultivo bacteriano Todd Hewitt Broth (THB), en función del tiempo.

3.3.2.2. Carga de levofloxacin, vancomicina, rifampicina o gentamicina

La carga de los antibióticos se llevó a cabo a dos concentraciones distintas: saturada y la concentración mínima inhibitoria (MIC) para cada uno de los antibióticos para cada cepa bacteriana. La cantidad de fármaco cargada en los andamios se determinó por TGA (tabla 13). Mediante esta prueba, se observa la carga de los fármacos correspondiente a la pérdida de masa de las muestras al someterlas a este análisis.

También se llevó a cabo un análisis de porosimetría de adsorción de nitrógeno de los andamios BL-GE y 4ZN-GE cargados y sin cargar con los fármacos con el objetivo de estudiar sus propiedades texturales antes y después del proceso de carga (figura 39). Todas las isotermas obtenidas a través de este análisis pueden considerarse de tipo IV, las cuales son características de materiales mesoporosos (figura 39 A). Además, se observan ciclos de histéresis tipo H1 en el rango mesoporoso, característicos de poros cilíndricos con apertura a ambos lados. La figura 39 B corresponde a la distribución de los tamaños de poro de los andamios analizados. Se detectaron variaciones en cuanto al área superficial y al tamaño de poro tras el proceso de carga. La tabla 13 muestra las propiedades texturales, siendo S_{BET} el área superficial, calculada por el método Brunauer-Emmett-Teller (BET), D_p el diámetro de poro, calculado por el método Barrett-Joyner-Halenda (BJH) a través de la rama de adsorción de la isoterma, y V_p el volumen de poro, calculado por el método t-plot, de los andamios cargados y sin cargar. Los andamios cargados mostraron una pequeña disminución en el tamaño de ambos parámetros confirmando la carga de los fármacos en los mesoporos. Por lo que, mediante este proceso, además de estudiar las propiedades texturales, también se confirma la carga de los fármacos en los andamios.

Tabla 13. Valores de porosimetría de adsorción de nitrógeno de los andamios de MBG cargados y sin cargar con cada uno de los antibióticos (L, V, G o R). S_{BET} : área superficial; V_T : volumen de poro total; D_p : diámetro de poro. La cantidad de antibiótico cargada en condiciones de saturación se determinó mediante TGA.

Material	BL-GE	BL-GE-L	BL-GE-V	BL-GE-G	BL-GE-R	4ZN-GE	4ZN-GE-L	4ZN-GE-V	4ZN-GE-G	4ZN-GE-R
S_{BET} (m ² /g)	188	146.5	180.4	180.7	126.5	151.4	111.3	1107.5	124.5	142.2
V_T (m ³ /g)	0.21	0.15	0.21	0.21	0.12	0.14	0.06	0.11	0.11	0.13
D_p (nm)	3.7	3.5	3.7	3.7	3.4	3.5	3.3	3.5	3.4	3.5
mol fármaco/ mg andamio	0	1.3×10^{-4}	1.1×10^{-5}	1.3×10^{-5}	8.4×10^{-6}	0	1.3×10^{-4}	1.1×10^{-5}	1.3×10^{-5}	8.4×10^{-6}

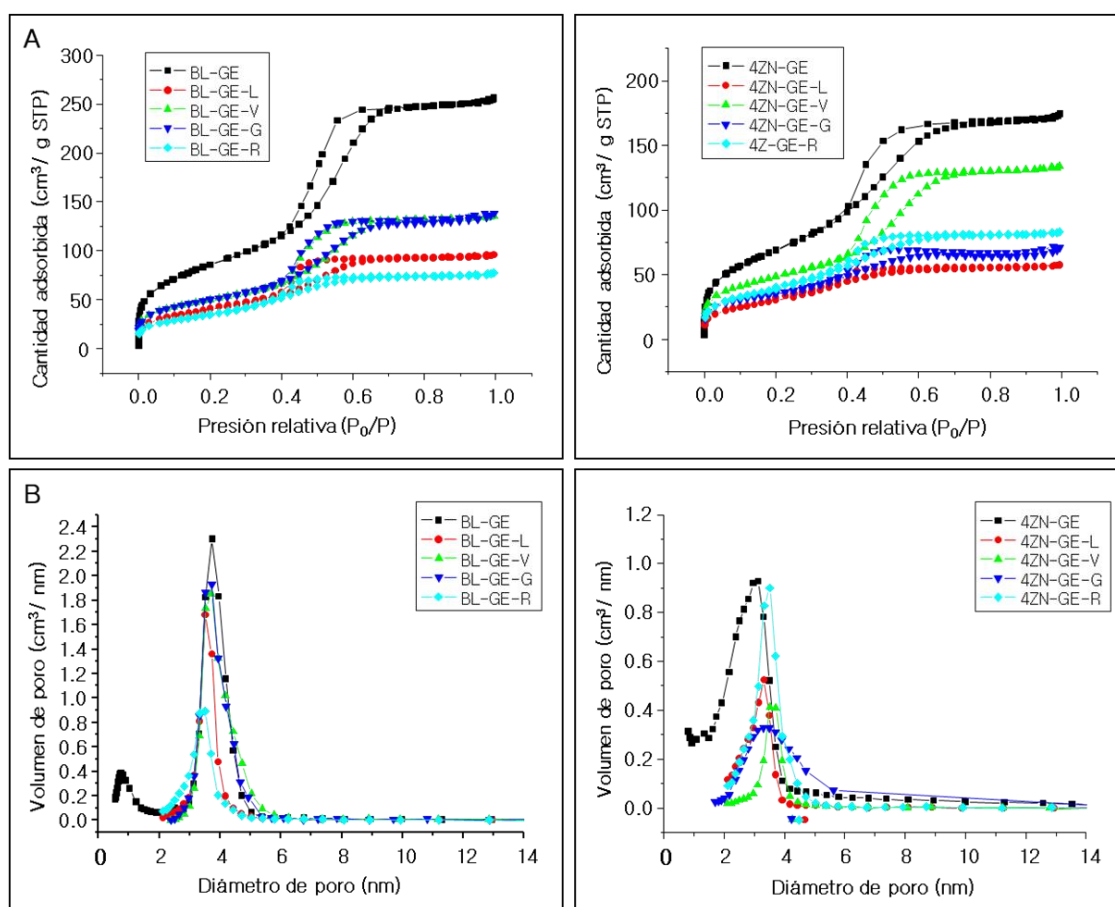


Figura. 39. Isothermas de adsorción (A) y distribución de los tamaños de poro (B) de los distintos andamios dopados (4ZN) y no dopados (BL) con zinc y cargados con los distintos antibióticos.

3.3.2.3. Modelado de la interacción entre los fármacos y la matriz

Los MBGs presentan una fórmula química de $\text{SiO}_2\text{-CaO-P}_2\text{O}_5$ (BL) o $\text{SiO}_2\text{-CaO-P}_2\text{O}_5\text{-ZnO}$ (4ZN), dependiendo del material. El silicio y el fósforo en forma de SiO_2 y P_2O_5 , actúan como formadores de red: unidades tetraédricas unidas por enlaces covalentes a través de sus átomos de

oxígeno. El calcio (CaO) actúa presuntamente como modificador de red, unido a través de interacciones iónicas con los átomos de oxígeno. Sin embargo, nuestro grupo de investigación ha demostrado a través de NMR del ^{29}Si , que los andamios 4ZN-GE contienen unidades tetraédicas $[\text{ZnO}_4]$. Estas unidades tetraédricas presentan carga negativa (2^-) lo que explica su atracción por los cationes Ca^{2+} y Zn^{2+} que actúan, a su vez, como compensadores de red y no como modificadores. Por ello, el número de NBO decrece con el aumento de especies Q^4 y disminución de especies Q^3 [267]. Además, estos MBGs presentan grupos silanol ionizados Si-OH en su superficie, lo que provoca que posean carga negativa que, a su vez, interacciona con los fármacos en el proceso de carga. La carga con LEVO VANCO, GENTA, y RIFAM se calculó mediante el software Hex 8.0 (figura 40 A). El análisis molecular indica que VANCO y GENTA presentan carga positiva mientras que LEVO y RIFAM son de naturaleza zwitteriónica (figura 40 B). Además, el análisis mostró la presencia de 6 y 4 enlaces de hidrógeno en VANCO (-295.7 kcal/mol) y GENTA (-250.1 kcal/mol), respectivamente. En el caso de RIFAM (-226.1 kcal/mol) y LEVO (-368.7 kcal/mol) el análisis indicó 2 y 0 enlaces de hidrógeno respectivamente. A pesar de que VANCO tiene 6 enlaces de hidrógeno que reaccionan favorablemente con la superficie de los andamios 4ZN-GE, es una molécula de gran tamaño (1450.3 uma), lo que provoca que su carga sea baja. LEVO es una molécula zwitteriónica por lo que no presenta ningún enlace de hidrógeno, pero posee un tamaño muy reducido (823.9 uma) que permite la formación de un complejo estable, cargándose en grandes cantidades en el interior de los andamios de MBG.

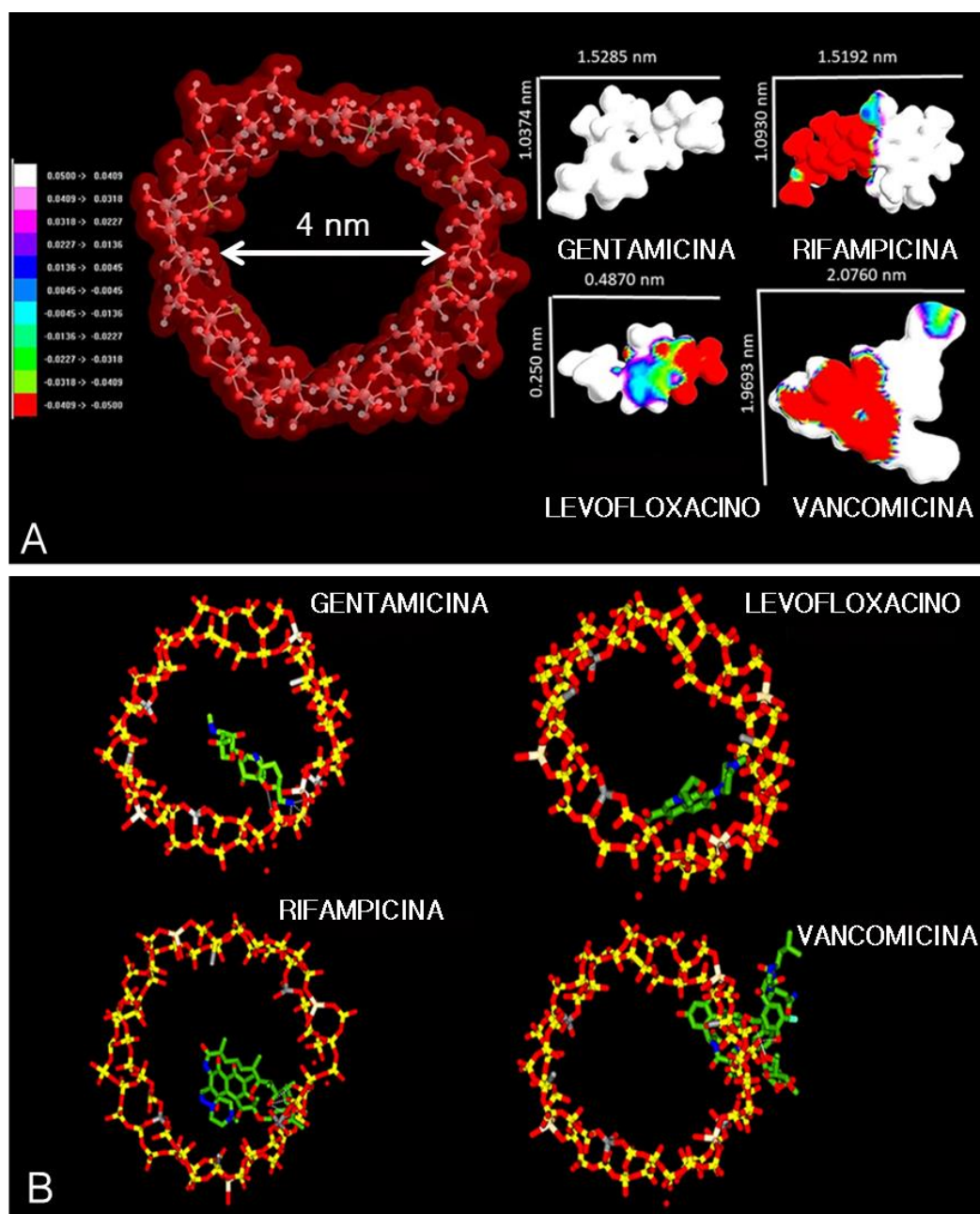


Figura. 40 (A) Acoplamiento molecular obtenido mediante el software acelerado Hex 8.0 y CUDA 5.0 Nvidia GPU utilizando el algoritmo FFT (transformada rápida de Fourier) y correlación Shape+electro+DARS (como estado de referencia). Los andamios 4ZN-GE se utilizaron como receptores y la gentamicina 5+, levofloxacino zwitterionico, rifampicina zwitterionica y vancomicina 1+ como ligandos. Los enlaces de H- se representan mediante línea de puntos. **(B)** Mapeado de densidad de potencial electrostático para el MCM-41 modificado con Zn-Ca y gentamicina 5+, levofloxacino zwitterionico, rifampicina zwitterionica o vancomicina 1+ del software Hex 8.0. La energía se optimizó mediante el método Hamiltoniano AM1.

3.3.2.4. Liberación de los fármacos

La liberación de los fármacos se llevó a cabo en PBS a pH 7.4, que corresponde con pH fisiológico y a pH 6.5, que corresponde con el que se genera en el entorno de una infección. La figura 41 muestra el perfil de liberación de los distintos fármacos por parte de los andamios 4ZN-GE en el tiempo. La cinética de liberación de los antibióticos se evaluó de acuerdo con un modelo de cinética de orden cero y de primer orden.

Cinética de orden cero:

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

Donde Q_t es la cantidad de fármaco que permanece en estado sólido a tiempo t . Q_0 es la cantidad inicial de antibiótico en dosis farmacéutica y K_0 es la constante de liberación de orden 0. Como se puede observar en la figura 41, LEVO presenta un perfil de liberación que se mantiene en el tiempo, incluso tras 15 días de liberación. Se ha de tomar en consideración que LEVO presenta naturaleza zwitteriónica (pKs 6.1–8.2) [268], presentando una carga total neutra, pero siendo capaz de establecer interacciones electrostáticas con los grupos silanol de la matriz del MBG y proporcionando una liberación mantenida, favorecida por su alta capacidad de carga y solubilidad [268]. Sin embargo, en el caso de RIFAM, VANCO y GENTA, los datos de liberación mostrados en la figura 41 se correlacionan con una cinética de liberación de primer orden con un factor empírico de no idealidad (δ) [269].

$$w_t / w_0 = (w_t / w_0)_{\max} (1 - e^{-k_1 t})^\delta \quad (2)$$

Donde w_t/w_0 es el porcentaje de antibiótico liberado a tiempo t , $(w_t/w_0)_{\max}$ es la cantidad máxima de antibiótico liberado en tanto por ciento, y K_1 es la constante de liberación. Los valores de δ son 1 para materiales con cinéticas de primer orden y 0 para materiales que liberan el fármaco en tiempos muy cortos. RIFAM, VANCO y GENTA presentan carga 0 y positiva de 6+ y 6+, respectivamente, en el pH al que se lleva a cabo la liberación.

El valor δ muestra el grado de fidelidad del modelo propuesto (tabla 14). Cuando δ es cercano a 1, la aproximación que mejor se ajusta a lo que ocurre experimentalmente es una liberación de acuerdo con una cinética de primer orden, de forma que la liberación se produce de forma mantenida sin liberación brusca inicial (en inglés “burst”). Este efecto se atribuye normalmente a una carga del fármaco en el interior de los mesoporos. Como se observa en la tabla 14, los valores de δ son de 0.83 para RIFAM, 0.45 para VANCO y 0.27 para GENTA. La figura 41 muestra una liberación mantenida para RIFAM debido a que reacciona de forma estable con la superficie de los andamios de MBG y que posee una solubilidad limitada. Sin embargo, VANCO presenta una interacción menos estable y GENTA mayor solubilidad por lo que la liberación es más rápida en ambos casos.

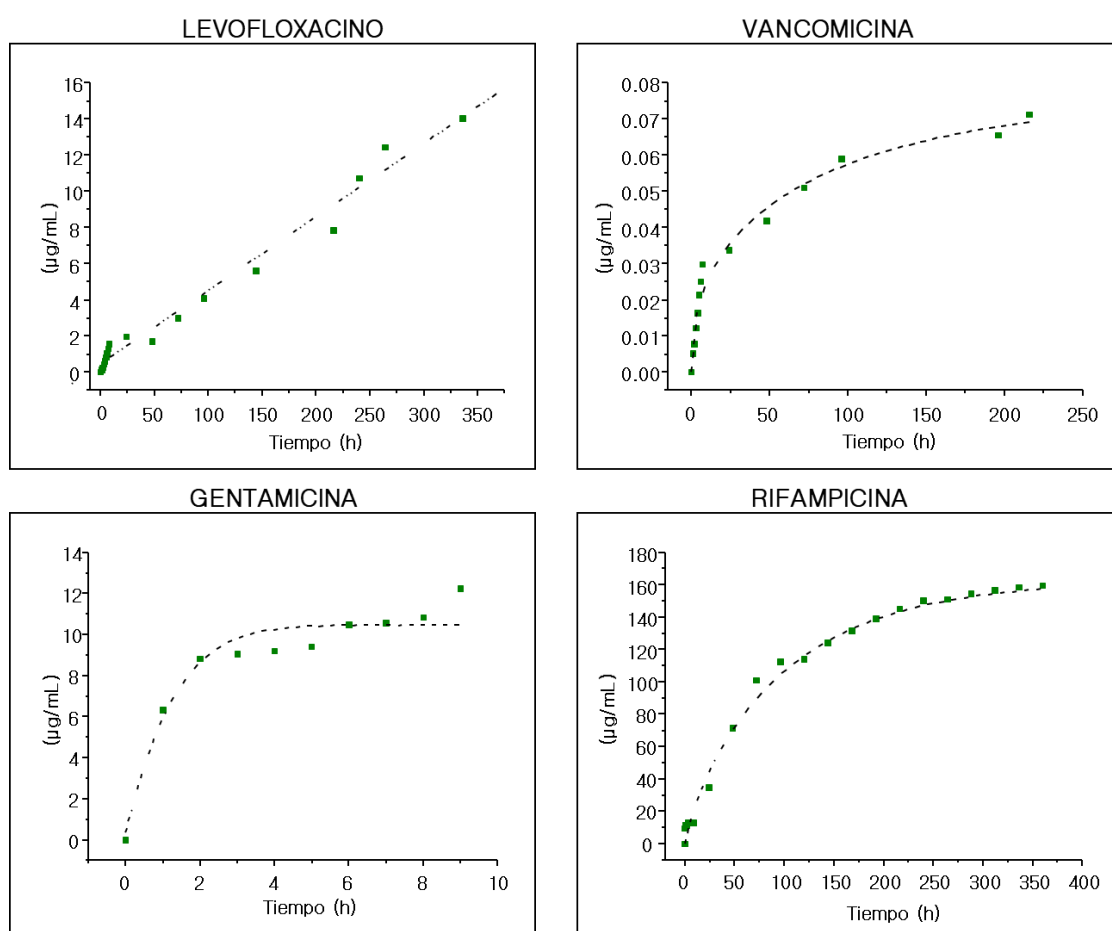


Figura. 41. Liberación de los antibióticos de los andamios 4ZN-GE a pH fisiológico.

A pH 7.4 o 6.5, la interacción entre los fármacos y la capa de gelatina que recubre los andamios no se considera, ya que sus grupos ionizables NH_2 y COOH presentan pKs de $\text{pK}_b \sim 6.5$ y $\text{pK}_a \sim 4.7$ respectivamente, por lo que no son capaces de establecer interacciones electrostáticas con los fármacos. Las pKs no varían a los pHs establecidos. No se observaron diferencias significativas en la liberación de los fármacos entre ambos pHs por lo que la figura 41 muestra únicamente los datos de liberación a pH 7.4, siendo estos representativos para ambos pHs.

Tabla 14. Parámetros correspondientes a la cinética de liberación de los fármacos de los andamios 4ZN-GE. W_0 : masa inicial cargada (% antibiótico cargado); $(w_t/w_0)_{\max}$: carga máxima relativa; K_1 : constante del modelo de liberación de Chapman y K_0 constante del modelo de liberación de cinética 0 para LEVO; δ : factor de no idealidad para el modelo de Chapman; R : bondad del ajuste.

Muestra	pH	W ₀ (%)	(w _t / w ₀) max (%)	K ₁ (×10 ³ h ⁻¹) K ₀ LEVO	δ	R
4ZN-GE-L	7.4	6	71	0.05	–	0.99
4ZN-GE-V	7.4	1	87	10.5	0.45	0.97
4ZN-GE-G	7.4	2	99	8.0	0.27	0.97
4ZN-GE-R	7.4	4	78	9.5	0.83	0.99

3.3.2.5. Cultivos bacterianos con *S. aureus* y *E. coli*

– Halo de inhibición

A) *S. aureus*

Los andamios 4ZN-GE se cargaron por separado con los fármacos LEVO, VANCO y RIFAM, ya que están descritos como efectivos contra *S. aureus* (figura 42 1–3) [270–272]. Los andamios cargados con los antibióticos se nombraron como 4ZN-GE-L, 4ZN-GE-V y 4ZN-GE-R, respectivamente. Estos andamios se incluyeron en THB a pH 7.4 y 6.5, donde se llevó a cabo la liberación de los fármacos cargados y de los iones presentes en el material. Se fueron extrayendo alícuotas del medio, en cada tiempo de

liberación establecido, que se cargaron (20 µL) en esponjitas en forma de disco. Estas esponjitas cargadas, se pusieron en contacto con placas de agar pre-sembradas con *S. aureus*. Los andamios 4ZN-GE-L inhibieron el crecimiento de *S. aureus* durante 18 días (figura 42 1) alcanzando su máximo de inhibición del crecimiento bacteriano a los 5 días mostrando un halo de 14 mm. Los andamios 4ZN-GE-V inhibieron el crecimiento de *S. aureus* durante 5 días alcanzando su máximo de inhibición a las 6 h y mostrando un 18 % de inhibición con respecto a LEVO (figura 42 2). Los andamios 4ZN-GE-R inhibieron el crecimiento de *S. aureus* durante 10 días alcanzando su máximo de inhibición a las 48 h y mostrando una inhibición de 57 % con respecto a LEVO (figura 42 3). No se observaron diferencias significativas entre pHs.

A) *E. coli*

Los andamios 4ZN-GE se cargaron por separado con LEVO, GENTA y RIFAM, antibióticos activos frente a *E. coli* (figura 42 4-6) [270,273,274]. Los andamios cargados se nombraron como 4ZN-GE-L, 4ZN-GE-G y 4ZN-GE-R, respectivamente. Los ensayos de halo de inhibición se llevaron a cabo de la misma forma que se ha descrito para *S. aureus*. Los andamios 4ZN-GE-L inhibieron el crecimiento de *E. coli* durante 18 días (figura 42 4), alcanzando su máximo de inhibición a las 72 h y mostrando un halo de 15 mm. Los andamios 4ZN-GE-G inhibieron el crecimiento de *E. coli* durante 72 h, alcanzando su máximo de inhibición a las 6 h, mostrando un 20% de inhibición respecto a LEVO (figura 42 5). Los andamios 4ZN-GE-R inhibieron el crecimiento de *E. coli* durante 120 min, alcanzando su máximo de inhibición a los 48 min y mostrando un 4 % de inhibición con respecto a LEVO (figura 42 6). Tal y como se observa en la figura 42, los antibióticos que mostraron más efectividad contra *E. coli* fueron LEVO y GENTA. La inhibición que alcanza RIFAM con respecto a LEVO solo del 4%. No se observaron diferencias significativas entre pHs.

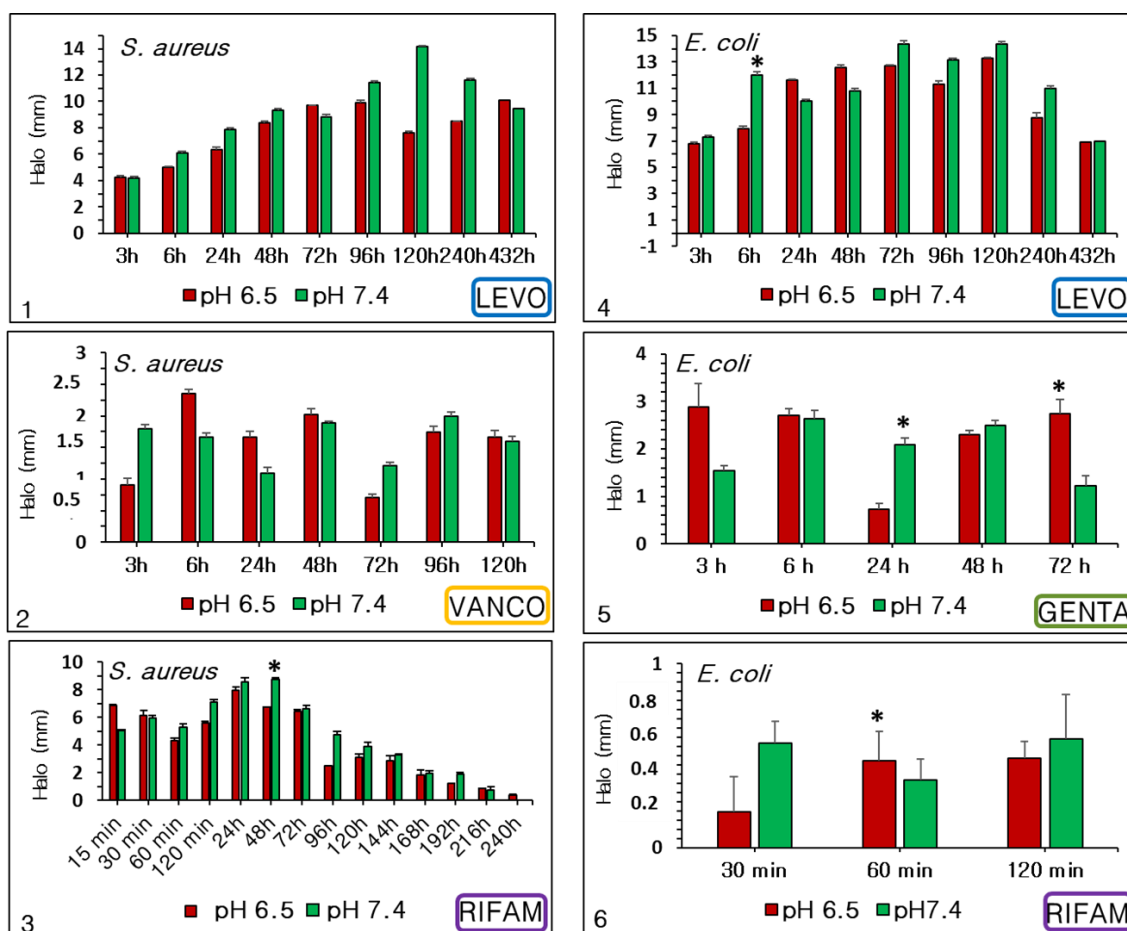


Figura. 42. Halos de inhibición generados por los andamios 4ZN-GE-L (1), 4ZN-GE-V (2) y 4ZN-GE-R (3) contra *S. aureus*, y halos de inhibición generados por los andamios 4ZN-GE-L (4), 4ZN-GE-G (5) y 4ZN-GE-R (6) contra *E. coli* a distintos tiempos y pH 7.4 y pH 6.5. * $p < 0.05$ pH 6.5 vs 7.4.

– Crecimiento planctónico

Concentración saturada de fármaco

Los distintos andamios se cargaron con una concentración saturada de cada fármaco por separado. Posteriormente se cuantificó la cantidad de fármaco que se había cargado en cada caso (tabla 13). El efecto antibiótico de los andamios BL-GE y 4ZN-GE, cargados o sin cargar con los distintos fármacos se evaluó entre las 2 y 48 horas de cultivo mediante el conteo de las unidades formadoras de colonias (CFUs) por mililitro. La figura 43 muestra el conteo de las CFUs/mL de las dos cepas bacterianas (*S. aureus* y *E. coli*) y ambos materiales (BL-GE y 4ZN-GE), cargados y sin cargar con los antibióticos.

En los cultivos de *S. aureus* el crecimiento bacteriano, en contacto con los andamios BL-GE y 4ZN-GE, cargados con VANCO, LEVO y RIFAM, fue inhibido en un 99.9%. Los andamios 4ZN-GE libres de fármacos, inhibieron el crecimiento bacteriano en un 50% tras 48 h de cultivo, en comparación con los andamios BL-GE también sin cargar. Este efecto puede atribuirse a la liberación de zinc al medio de cultivo, alcanzando una concentración de 5.5 ppm de Zn^{2+} a las 48 h, cantidad suficiente de Zn^{2+} para inhibir el crecimiento de *S. aureus* (figura 43) [229].

En los cultivos de *E. coli*, los andamios 4ZN-GE, libres de fármacos, inhibieron el crecimiento bacteriano un 75% tras 2h de cultivo en comparación con los andamios BL-GE, como consecuencia de la liberación de calcio y zinc. Para los andamios BL-GE y 4ZN-GE cargados con LEVO y GENTA, se alcanzó una inhibición del crecimiento bacteriano prácticamente del 100%. RIFAM no se probó contra *E. coli* ya que no se han descrito como efectiva contra esta bacteria [275]. Tal y como muestra la figura 43, los mismos antibióticos que fueron capaces de generar un halo de inhibición del crecimiento de cada cepa bacteriana, inhibieron el crecimiento en estado planctónico de cada una de ellas.

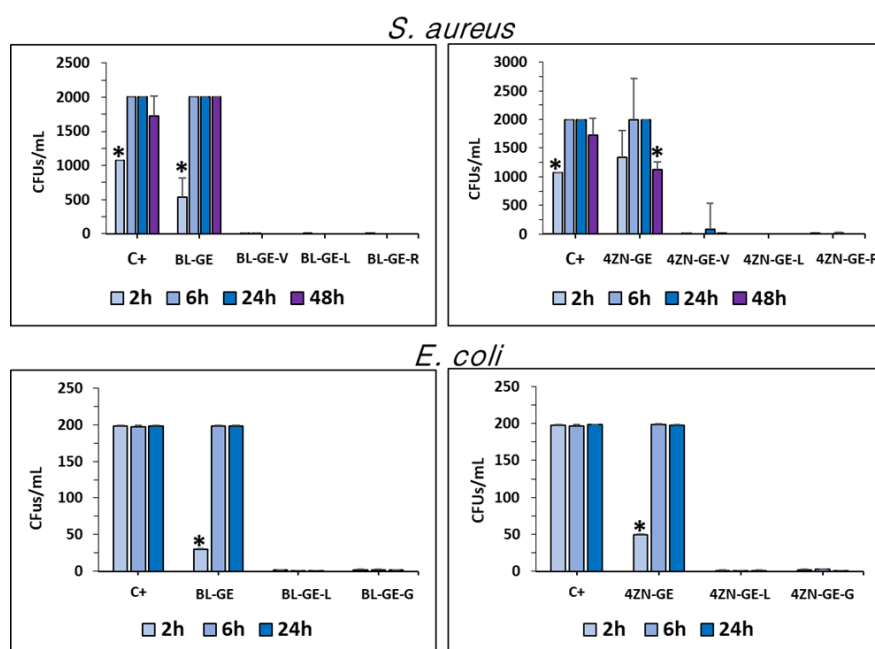


Figura. 43. Crecimiento planctónico de *S. aureus* y *E. coli* a las 2, 6, 24 y 48 h de cultivo bacteriano en contacto con los andamios dopados (4ZN-GE) y sin dopar con zinc (BL-GE), cargados y sin cargar con los distintos fármacos: Levofloxacino (L), Vancomicina (V), Gentamicina (G) y Rifampicina (R). * muestra diferencias significativas entre las 2, 6, 24 y 48 h. Significación estadística: *p < 0.05 vs control a cada tiempo.

Concentración Mínima Inhibitoria (MIC)

Los ensayos previos de inhibición del crecimiento planctónico no mostraron diferencias significativas entre la capacidad antibacteriana de los andamios cargados dopados y sin dopar con zinc. Los antibióticos resultaron ser muy efectivos contra ambas cepas y efecto antibacteriano del zinc no fue apreciable. Por ello, se consideró necesario llevar a cabo ensayos complementarios en los que testar el poder antibacteriano del zinc. Para realizar estos ensayos y comprobar si el zinc establecía un efecto sinérgico con los distintos fármacos, se redujo la cantidad de carga de los antibióticos para que la concentración que se liberara al medio y entrar en contacto con el cultivo bacteriano fuera la mínima inhibitoria (MIC=50%) para cada uno de los fármacos empleados y cada una de las cepas de estudio (figura 44).

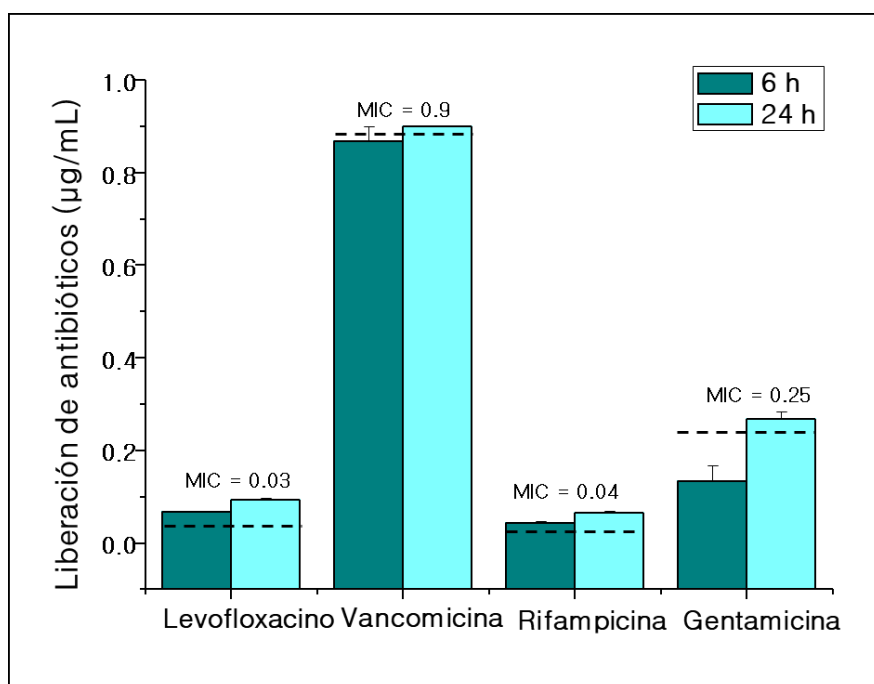


Figura. 44. Liberación de los fármacos de los andamios 4ZN-GE a las 6 y 24 h en medio de cultivo bacteriano (THB) a pH 7.4 con comparación con la MIC de cada uno de ellos. La liberación de los fármacos de los andamios BL-GE fue análoga a la que mostraron los andamios 4ZN-GE por lo que solo que no se muestra.

Se emplearon dos concentraciones diferentes de material (27 mg/mL y 80 mg/mL) de los andamios de MBG BL-GE y 4ZN-GE. Estos se cargaron con cada uno de los antibióticos con el objetivo de que, tras el proceso de liberación de los antibióticos al médico, la concentración de fármaco que

entrara en contacto con las bacterias fuera la MIC de cada fármaco para cada cepa bacteriana. Ambas cepas se cultivaron durante 24 h con los andamios, con zinc (4ZN-GE) o sin zinc (BL-GE), cargados con cada uno de los fármacos, empleando como control pocillos donde las bacterias se cultivaron en contacto con la MIC de cada fármaco para cada cepa sin andamio. En todos los casos se observó una mayor inhibición del crecimiento bacteriano en los pocillos con andamios cargados en comparación con el control de bacterias + MIC [276].

En los ensayos con *S. aureus* (figura 45) y concentración de material de 80 mg andamio/mL, los andamios 4ZN-GE cargados con los antibióticos consiguieron una mayor inhibición del crecimiento bacteriano a las 24 h (excepto en el caso de LEVO) que los andamios BL-GE también cargados. Esto se atribuye al efecto antibacteriano sinérgico de los iones de zinc junto con el fármaco liberados al medio. Por otro lado, cuando la concentración del material fue de 27 mg andamio/mL se observó efecto sinérgico entre el zinc y VANCO o LEVO.

En los ensayos de *E. coli* (figura 45) para las concentraciones de 27 y 80 mg andamio/mL, los andamios 4ZN-GE y BL-GE cargados con LEVO mostraron una inhibición total del crecimiento bacteriano a las 24 h. Este hecho podría deberse a que el LEVO presenta una capacidad antibacteriana absoluta no permitiendo que el efecto del zinc llegue a observarse. Sin embargo, los andamios 4ZN-GE cargados con GENTA mostraron un efecto inhibitorio mayor que los andamios BL-GE observándose el efecto sinérgico entre GENTA y el zinc.

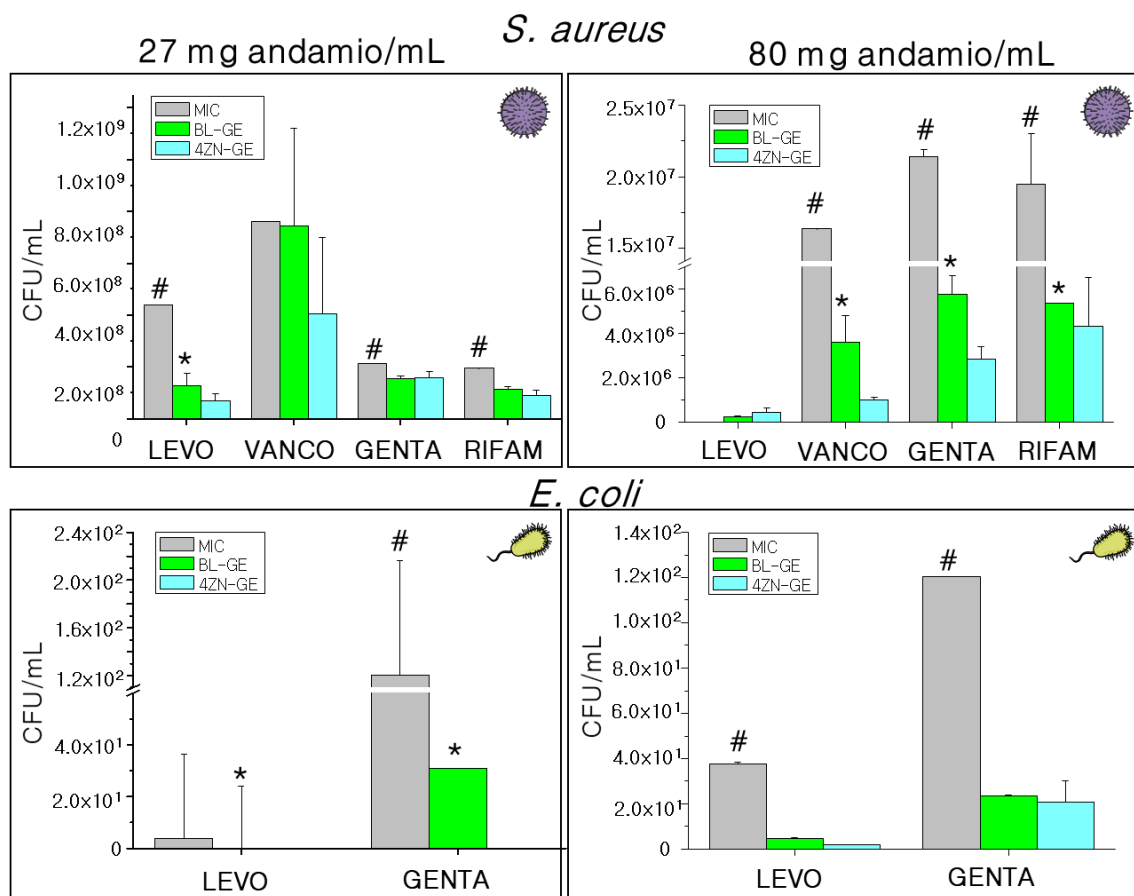


Figura. 45. Contaje de las CFUs/mL de las cepas *S. aureus* y *E. coli* que crecen en contacto con una concentración de material 4ZN-GE y BL-GE de 27 y 80 mg andamio/mL cargados con la MIC de los distintos fármacos tras 24 h de cultivo. * $p < 0.05$ BL-GE vs 4ZN-GE, # $p < 0.05$ MIC vs BL-GE.

– Biopelícula o biofilm

Se investigó la capacidad antimicrobiana de los andamios BL-GE y 4ZN-GE, cargados y sin cargar con los distintos fármacos *in vitro* en un entorno simulado de biofilm de *S. aureus* y *E. coli*. En la figura 46 es posible apreciar la típica estructura de biofilm preformado, que se utilizó como control para cada una de las cepas, mostrando colonias de bacterias vivas teñida en verde con yoduro de propidio (PI), recubiertas por una cubierta protectora de mucopolisacáridos teñida en azul con calcofluor.

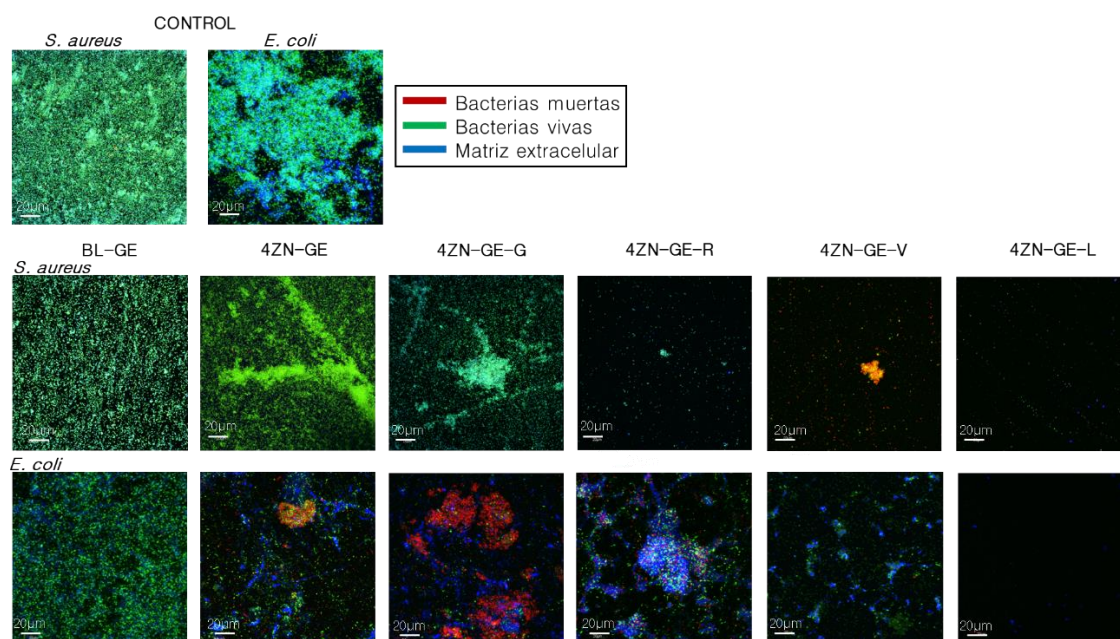


Figura. 46. Micrografías de microscopía confocal de los biofilms de *S. aureus* y *E. coli* antes (control) y después de 24 h en contacto con los andamios BL-GE, 4ZN-GE y 4ZN-GE cargados con cada uno de los antibióticos.

Tras entrar en contacto con los distintos andamios, se pudieron observar grandes diferencias entre biofilms. Los biofilms se destruyeron parcial o totalmente, dependiendo de cada caso, mostrando la matriz extracelular en azul (calcofluor), las bacterias vivas en verde (PI) y las muertas en rojo (SYTO 9). En los ensayos de *S. aureus*, los andamios BL-GE, 4ZN-GE y 4ZN-GE-G consiguieron una destrucción parcial del biofilm tras 24 h. Los andamios cargados con RIFAM, VANCO y LEVO obtuvieron una destrucción completa del biofilm, observándose colonias de bacterias muertas sin la presencia de la capa protectora de mucopolisacáridos. En los ensayos de *E. coli*, los andamios BL-GE, 4ZN-GE, 4ZN-GE-V y 4ZN-GE-R consiguieron una destrucción parcial del biofilm tras 24 h. Por otro lado, los andamios 4ZN-GE cargados con LEVO y GENTA obtuvieron una destrucción completa del biofilm. Estos resultados muestran que los sistemas que combinan zinc + GENTA o LEVO para *E. coli* y zinc + RIFAM, VANCO o LEVO para *S. aureus*, presentan alta efectividad en la destrucción del biofilm preformado de estas cepas bacterianas tras 24 h de incubación. Estos resultados coinciden con los obtenidos en los ensayos de halo de inhibición (figura 42) y los ensayos de inhibición de crecimiento en planctónico (figura 43), por lo que es posible

confirmar la eficacia antibacteriana de los mismos antibióticos para la misma cepa bacteriana [270–274]. Cuando los biofilms se mantuvieron en contacto con los andamios 4ZN–GE sin cargar, se observó una destrucción parcial del biofilm en ambas cepas comprobándose el efecto antibacteriano del zinc por sí mismo.

3.3.3. Conclusiones: andamios de MBG para infección

En resumen, la combinación de zinc y antibióticos en los andamios de MBG, incrementó la eficacia del sistema. Los estudios *in vitro* de los andamios BL–GE y 4ZN–GE cargados con los distintos antibióticos contra las cepas bacterianas *S. aureus* y *E. coli*, muestran un efecto antibacteriano sinérgico entre el zinc y los antibióticos testados.

En los estudios de halo de inhibición, se obtuvo una inhibición del crecimiento de *S. aureus* durante 18, 9 y 5 días con los andamios 4ZN–GE cargados con LEVO, RIFAM y VANCO, respectivamente. Sin embargo, en los cultivos de *E. coli*, la inhibición del crecimiento se mantuvo durante 18 y 3 días con los andamios 4ZN–GE cargados con LEVO y GENTA.

En los ensayos en planctónico, los andamios BL–GE y 4ZN–GE, cargados con una concentración saturada de cada uno de los fármacos mostraron una inhibición total del crecimiento de *S. aureus* y *E. coli* a las 2 h de cultivo. Sin embargo, cuando los andamios se cargaron con la MIC de cada uno de los antibióticos, los iones de zinc presentes en los andamios 4ZN–GE mostraron un efecto sinérgico con LEVO y VANCO inhibiendo el crecimiento de *S. aureus* y con LEVO y GENTA en la inhibición del crecimiento de *E. coli*.

Se obtuvo una destrucción parcial del biofilm de *S. aureus* al ponerse en contacto con los andamios 4ZNY 4ZN–GE y una destrucción total del mismo con los andamios 4ZN–GE–V/L/R. Por otro lado, se obtuvo una destrucción parcial del biofilm de *E. coli* al entrar en contacto con los andamios 4ZN–GE y 4ZN–GE–V/R, y una destrucción total con los andamios 4ZN–GE–L/G.

Por lo tanto, se demostró que los iones zinc en combinación con la MIC de cada uno de los antibióticos, consiguen inhibir el crecimiento planctónico, así como destruir los biofilms preformados de las cepas bacterianas

estudiadas. Además, se observó que los mismos fármacos fueron efectivos para la misma cepa en todos los ensayos realizados y que su efecto se potenció con la presencia del zinc. Este abordaje reduce la cantidad de antibiótico empleada de forma que se minimicen las respuestas bacterianas de resistencia a antibióticos. Estos resultados proporcionan avances significativos en el diseño de nuevos implantes óseos capaces de desempeñar simultáneamente un doble papel en un escenario de regeneración ósea.

3.4. Andamios tridimensionales de MBG para regeneración ósea *in vivo*

Tras llevar a cabo la síntesis, caracterización fisicoquímica y pruebas *in vitro* de los andamios tridimensionales de MBG, dopados con zinc, cargados con osteostatina y decorados con MSCs, se quiso dar un paso más y analizar el comportamiento *in vivo* de los mismos. Para ello, se generaron dos modelos de defecto óseo en conejos de Nueva Zelanda con el objetivo de estudiar la capacidad regenerativa del sistema en estos dos escenarios. Los defectos óseos críticos son aquellos que tienen un tamaño tal (2 cm o más del 50% del diámetro del hueso) que su reparación no puede llevarse a cabo por mecanismos naturales, siendo un proceso que no llegaría a completarse. Debido a su tamaño, no pueden consolidarse por falta de vascularización y estabilidad. Se ha establecido el tamaño que un defecto debe tener para considerarse crítico en función del animal objeto de estudio (15 mm en conejos). Además, existen ciertos matices en cuanto a lo que se considera como defecto óseo crítico en función del hueso en el que se encuentre (esponjoso o cortical), relación con el hueso que le rodea (los defectos cavitarios permiten la continuidad del hueso adyacente mientras que los segmentarios no) y la zona del hueso (epifisarios, metafisarios o diafisarios). En base a estos hechos se realizaron dos defectos óseos. Uno en fémur (7.5 x 12 mm), en la epífisis femoral distal, y otro en cúbito (7.5 x 15 mm). En el caso de los conejos, el cúbito y el radio están unidos formando una sinostosis, por lo que el radio proporciona estabilidad al defecto evitando la necesidad de fijación a través de dispositivos externos, placas o yesos. Estos defectos se utilizaron para estudiar la capacidad osteogénica de los modelos de andamio establecidos: andamios dopados con zinc (4ZN-GE), cargados con osteostatina (4ZN-GE+OST), decorados con MSCs (4ZN-GE+MSC) y/o la combinación de ambas (4ZN-GE+MSC+OST). Los distintos modelos se implantaron en los defectos óseos y se analizaron los procesos de regeneración acontecidos tras 3 meses de seguimiento, en el caso del modelo en fémur, y 1.5 o 3 meses, en el caso del modelo en cúbito (figura 47). Estos estudios permitieron determinar la capacidad regenerativa de nuestro sistema en modelos *in vivo*, avanzando significativamente en el estudio del biomaterial y demostrando su potencial interés en la clínica.

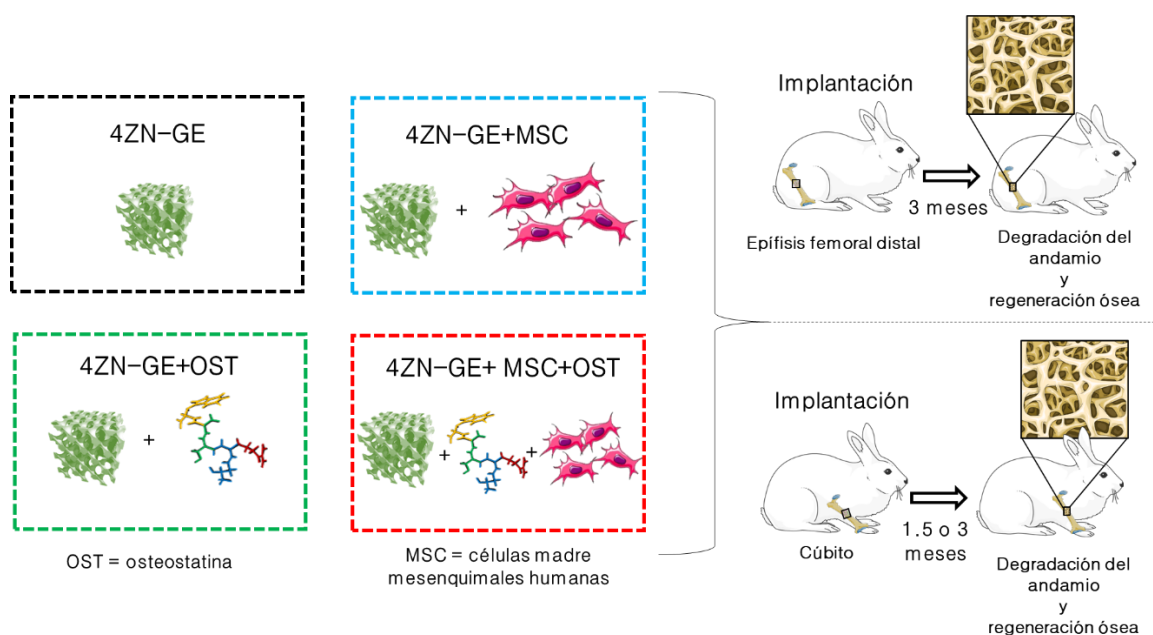


Figura 47. Esquema resumen de los distintos modelos de andamios implantados en los modelos *in vivo* en conejos de Nueva Zelanda.

La síntesis y caracterización de los andamios empleados en el estudio *in vivo* se han descrito en detalle previamente los apartados 4.1 y 4.2.

3.4.1. Elaboración de las distintas series de materiales a implantar

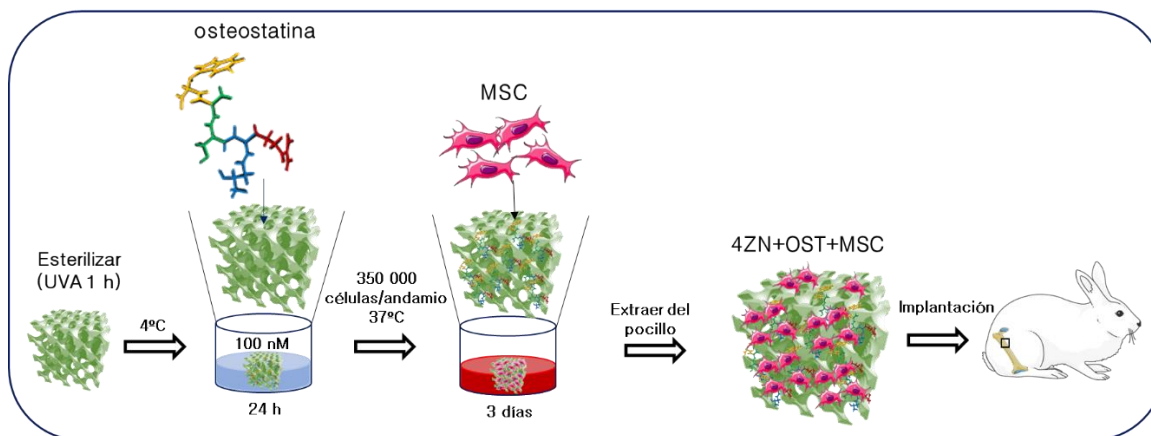


Figura 48. Proceso de carga de la osteostatina, siembra de las MSCs e implantación en el animal.

Los andamios de MBG dopados con zinc al 4% (4ZN-GE) empleados para el estudio se esterilizaron con luz ultravioleta (1 h). Posteriormente se cargaron con osteostatina (OST) durante 24 h a una concentración 100 nM

en PBS (4ZN-GE+OST). Después, se sembraron las MSCs a una concentración de 350.000 células/andamio. El cultivo se mantuvo durante 3 días para que las células pudieran adherirse y colonizar el andamio (figura 48).

La figura 49 muestra las micrografías correspondientes a la microscopía confocal y a las pruebas de viabilidad realizadas en los andamios, para comprobar que se había conseguido una colonización, crecimiento y expansión óptimas de las MSCs previamente a su implantación. Posteriormente, se trasladaron al Hospital Miguel Servet de Zaragoza, en el caso del modelo en fémur, y al Hospital 12 de octubre de Madrid, en el caso del modelo en cúbito, donde fueron implantados en los defectos óseos como parte de las tesis doctorales de Andrés Gómez y Beatriz Bravo, respectivamente.

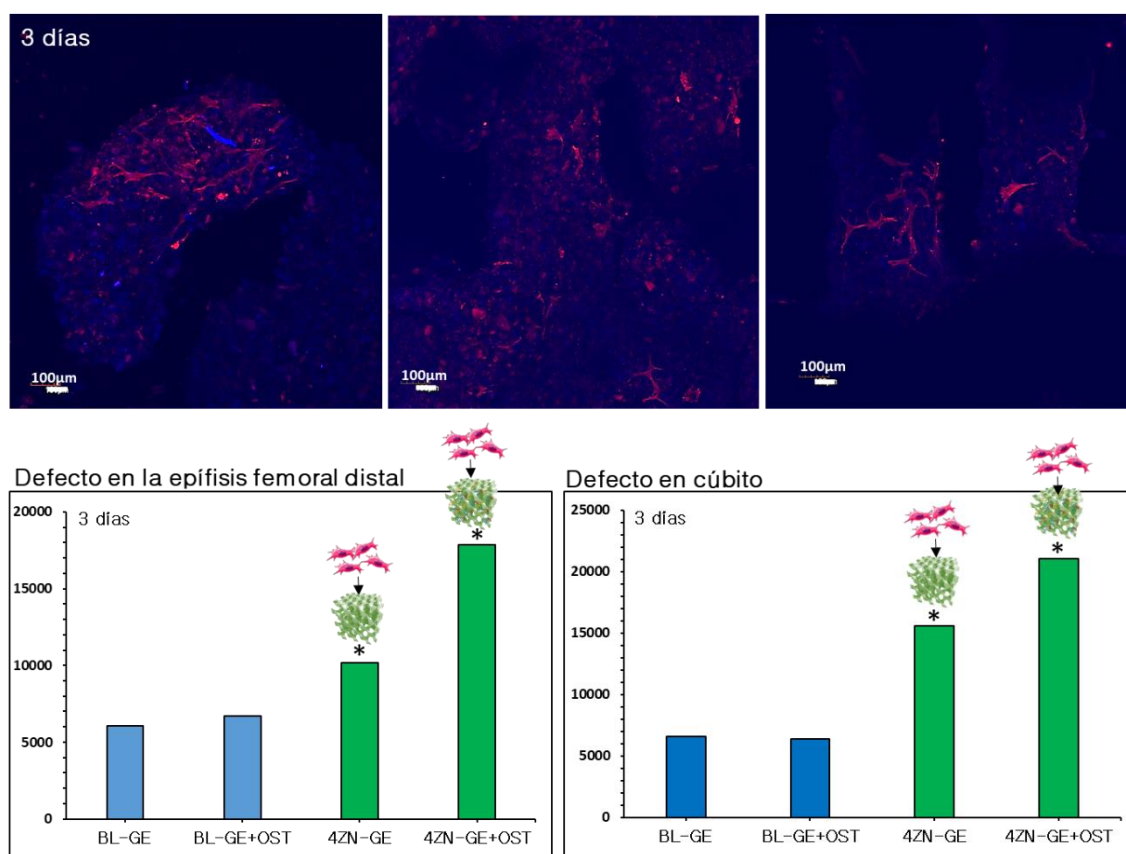


Figura 49. Imágenes de microscopía confocal y ensayos de viabilidad correspondientes a las MSCs sembradas en los andamios tras 3 días de cultivo previo a su implantación en los dos modelos animales: epífisis femoral distal y cúbito * $p < 0.05$ vs controles BL-GE.

3.4.2. Modelo de defecto en fémur de conejo

3.4.2.1. Implantación de los andamios en el defecto óseo

Se generó un defecto óseo (7.5 x 12 mm) en la epífisis distal del fémur de los conejos. La implantación e impregnación sanguínea de los andamios se observa en la figura 50 A. También se llevó a cabo un seguimiento radioscópico para evaluar la colocación del implante (figura 50 B).

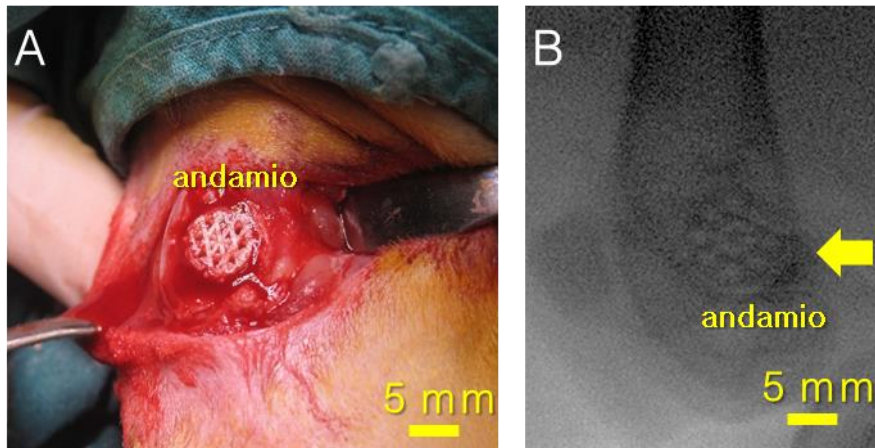


Figura 50. (A) Imagen digital de la implantación quirúrgica de los andamios y su impregnación sanguínea en el lecho óseo receptor. (B) Imagen de rayos-X del defecto antes y después de implantar el andamio en la epífisis femoral.

3.4.2.2. Estudio de necropsia

Los distintos especímenes se analizaron macroscópicamente una vez concluidos los 3 meses de seguimiento (figura 51).

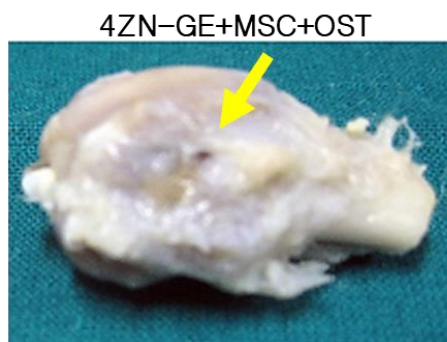


Figura 51. Ejemplo de la apariencia macroscópica del fémur tras 3 meses de implantación del material 4ZN-GE+MSC+OST después de la necropsia. La flecha indica el lugar que ocupaba el implante.

Todos los fémures implantados mostraron hueso de nueva formación rellenando el defecto. En algunos casos el área circular de implantación, cubierta por hueso nuevo, se encontró delimitada por una zona de color marronáceo. Así mismo, no se detectaron restos macroscópicos de los andamios en ninguno de los grupos.

3.4.2.3. Evaluación histológica

Los implantes, o sus límites, no fueron reconocibles en las secciones histológicas, probablemente a causa de la degradación centrípeta (proceso de desgaste de la parte central de las piezas) que se observó en los especímenes tratados. Así mismo, se observaron restos de porciones de los andamios no reabsorbidas delimitadas por una cápsula fibrosa. Esta cápsula disminuye en los animales tratados con piezas 4ZN-GE+MSC, 4ZN-GE+OST y 4ZN-GE+MSC+OST en comparación con 4ZN-GE gracias a la presencia de las MSCs y/o de la osteostatina ya que, tal y como se observa, promueven la proliferación de precursores osteoblásticos y la formación de tejido conectivo. Además, se apreciaron espículas de hueso compacto sugiriendo neoformación ósea en las porciones remanentes del material. Así mismo, las secciones del grupo 4ZN-GE+MSC+OST mostraron que la combinación de los andamios 4ZN-GE con osteostatina y MSCs indujo la neoformación de hueso trabecular en contacto íntimo con el material lo que sugiere osteointegración (figura 52). No se observaron signos de inflamación u otras reacciones adversas.

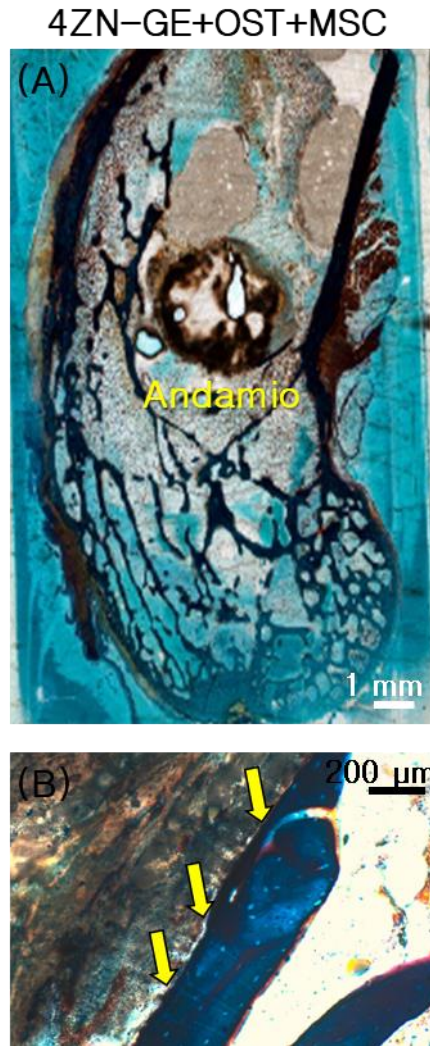


Figura 52. Imágenes de microscopía correspondientes a la tinción de Tricrómico de Masson–Goldnar de las secciones sagitales del área circundante a los andamios 4ZN–GE+MSC+OST. Se observa hueso de nueva formación tras 3 meses de seguimiento (A), mostrándose en detalle del hueso trabecular (B) creciendo en íntimo contacto con el material ya degradado, lo que sugiere osteointegración (flechas).

3.4.2.4. Evaluación por microtomografía computerizada (μ CT)

Posteriormente, se examinó por μ CT la regeneración ósea en la zona de interfase andamio–tejido y en el área perimetral de los implantes (figura 53 A). Los especímenes tratados con andamios 4ZN–GE y 4ZN–GE+OST mostraron un área central de degradación del andamio rodeada por otra área de menor de densidad radiológica (probablemente debido a la resorción periférica) y trabéculas óseas rodeando el implante. Los especímenes tratados con andamios 4ZN–GE+MSC mostraron restos de los implantes biodegradados distribuidos de forma más homogénea que los

grupos anteriores y estructuras óseas rodeando la zona de degradación de los implantes. En los especímenes tratados con andamios 4ZN-GE+MSC+OST, la degradación fue mayor que en los grupos anteriores y se observaron bandas de radiodensidad, que corresponden a hueso de nueva formación, delimitadas por un marco óseo. Estos resultados muestran el efecto osteoinductor y osteoconductor de la osteostatina y/o las MSCs en combinación con los andamios 4ZN-GE. Este efecto se comprobó a través de la cuantificación del % de volumen óseo con respecto al volumen total (BV/TV). La presencia de osteostatina y/o de MSCs en los andamios, incrementó significativamente el %BV/TV en comparación con los andamios 4ZN-GE. Este efecto positivo fue aún más evidente cuando los andamios combinaron osteostatina y MSCs (figura 53 B).

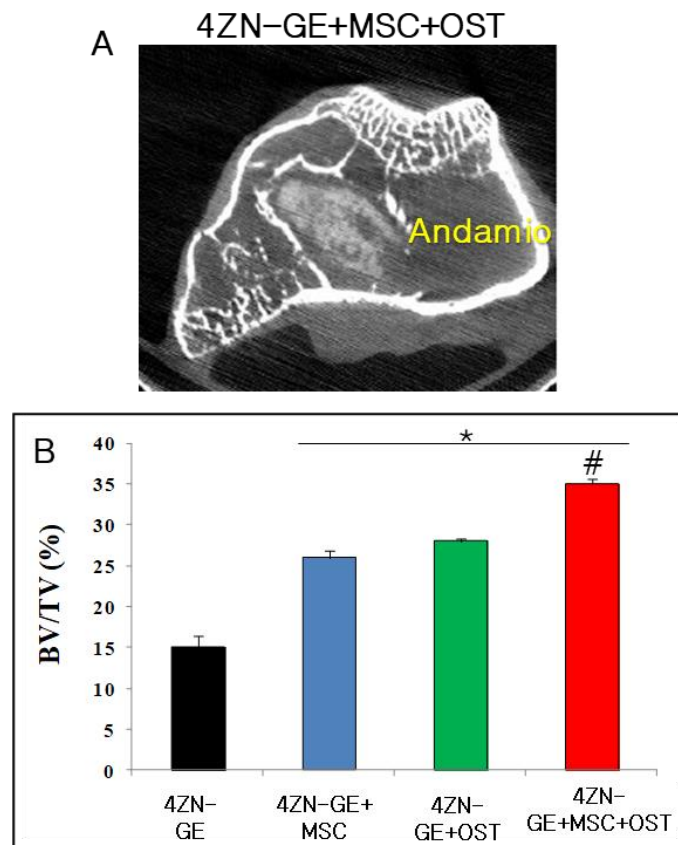


Figura 53. (A) Micrografía de la proyección de μ CT de los alrededores del material 4ZN-GE+MSC+OST, mostrando neoformación después de 3 meses de implantación. (B) Volumen trabecular con respecto al volumen óseo total (BV/TV) medido por μ CT en el área circundante a los distintos implantes. Los resultados se expresan como valores medios $\pm$ SE. * $p < 0.05$ vs. Andamios 4ZN-GE; # $p < 0.05$ vs. Andamios 4ZN-GE+MSC y andamios 4ZN-GE+OST.

Los resultados de necropsia, histología y μ CT muestran que todos los tipos de andamios fomentan el crecimiento óseo tras tres meses de implantación, ya que se observó hueso y tejido fibroso de nueva formación en todos los especímenes analizados. Además, estos resultados muestran la viabilidad del hueso epifisario y metafisario, lo que constituye uno de los tres puntos básicos de la triada de osteoconducción (estabilidad, viabilidad y proximidad) [277] que establece que para que un hueso pueda regenerarse deben cumplirse estos requisitos. Así mismo, no se observaron signos de inflamación, confirmando la citocompatibilidad del sistema *in vivo* [278,279]. Además, se observaron pruebas claras de degradación y absorción de los andamios implantados, cumpliendo las condiciones establecidas para la remodelación ósea a través de un sustituto sintético de injerto óseo [280]. Así mismo, para que un defecto óseo pueda regenerarse debe producirse un proceso de crecimiento y remodelación progresivo del hueso y del tejido fibroso. Este proceso se ha observado *in vivo* [149,150,242,278,279] con este y otros materiales en defectos óseos críticos y no críticos. El mecanismo a través del cual ocurre este hecho podría basarse en un proceso de reclutamiento de células madre mesenquimales de los tejidos circundantes y su posterior transformación en células formadoras de hueso [25,278,279,281].

Estudios previos, incluidos en capítulos anteriores de esta tesis doctoral, demuestran, por primera vez, el efecto sinérgico entre el zinc y la osteostatina en el incremento de la viabilidad y diferenciación de las MSCs *in vitro*. Los resultados de este estudio sugieren que la combinación de los andamios 4ZN-GE con osteostatina [25] y MSCs (4ZN-GE+MSC+OST) mejora significativamente la regeneración del defecto óseo *in vivo* en comparación con los andamios 4ZN-GE originales. Se ha observado un aumento de la neoformación de tejido óseo trabecular, mostrando una mayor degradación de los implantes y aumentando el porcentaje de BV/TV, mientras se ha reducido la cápsula fibrosa. Además, la liberación de los iones de Zn^{2+} de los andamios, podría estimular la actividad de los osteoblastos y reducir la resorción osteoclástica [169,247,282–285]. Estos resultados confirman el efecto sinérgico del zinc y la osteostatina que, junto con la presencia de las MSCs, potencian la regeneración ósea *in vivo*

constituyendo un punto clave cuando, en determinadas situaciones clínicas o experimentales, la reparación natural del hueso no es suficiente [25,144,283,286,287]. Por lo tanto, dada la seguridad, la facilidad de manejo y el bajo coste de este abordaje, el traslado de este sistema a la clínica para cirugía reconstructiva ósea es de gran interés para la comunidad científica [266].

3.4.3. Modelo de defecto en cúbito de conejo

3.4.3.1. Implantación de los andamios en el defecto óseo

Se generó un defecto óseo crítico (7.5 x 15 mm) en el cúbito de una de las patas delanteras de los especímenes empleados para el estudio (figura 54).



Figura 54. Implantación de los andamios de MBG en el cúbito de los conejos de Nueva Zelanda.

3.4.3.2. Análisis macroscópico

Las muestras se analizaron macroscópicamente, observándose un relleno completo del defecto óseo de consistencia densa en la mayoría de los animales correspondientes al grupo de estudio 4ZN-GE+MSC+OST (figura 55). Este proceso de regeneración ósea se aprecia de forma similar en dos de los casos del grupo 4ZN-GE+OST y en dos del grupo 4ZN-GE+MSC. En los otros nueve especímenes restantes, correspondientes a los tres grupos de estudio, se observó un relleno completo del defecto de consistencia fibrosa.



Figura 55. Imagen macroscópica de uno de los huesos extraídos perteneciente al material 4ZN-GE+MSC+OST tras el sacrificio de los animales, donde se puede apreciar la regeneración completa del defecto óseo por hueso de nueva formación.

3.4.3.3. Evaluación histológica

Los resultados obtenidos tras 1.5 meses de seguimiento mostraron que el grupo 4ZN-GE+OST presentaba una respuesta ósea mayor. Se observaron procesos de formación de tejido óseo y conectivo más activos, así como hueso regenerado, lo que podría interpretarse como signo de osificación endocondral (figura 56). El grupo 4ZN-GE+MSC mostró mayor maduración del tejido conectivo generado, observándose más áreas con coloración roja. En cuanto a los restos de material encontrados, la respuesta fue heterogénea. En algunos casos no se produjo reacción celular asociada a los restos por lo que se observan cúmulos de material en la parte central del defecto. En otros casos, si se produjo una reacción tisular fuerte en la que se ven involucrados macrófagos y células multinucleadas. En otros casos se aprecian restos de material muy dispersos que han sufrido un proceso de degradación, desapareciendo casi en su totalidad.

Los resultados obtenidos tras 3 meses de seguimiento mostraron que el grupo 4ZN-GE+OST presentaba procesos de formación ósea más avanzados observándose una respuesta osteogénica homogénea. El grupo 4ZN-GE+MSC+OST mostró una gran formación ósea, aunque con mayores diferencias entre especímenes (figura 56). Los restos de material fueron escasos o inexistentes, mostrando procesos de degradación casi absolutos. Además, se generó tejido de granulación en proceso de fibrosis y colagenización. El tejido conectivo estaba más desarrollado, extendido y en

diferentes estadios de maduración. Este no se encontraba formando tabiques, si no con una disposición más extendida en forma de fibras heterogéneas. Además, se observó un componente celular marcado compuesto por macrófagos, células plasmáticas y células multinucleadas.

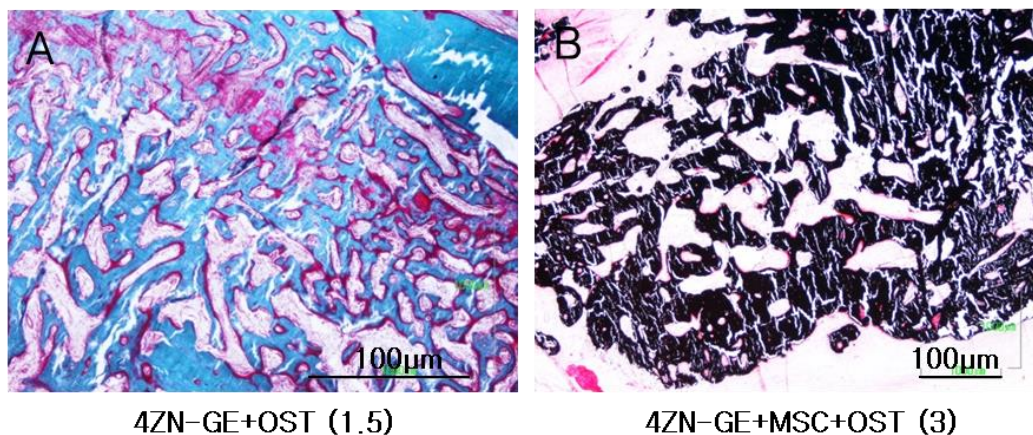


Figura 56. (A) imagen panorámica del hueso trabecular regenerado con numerosas y grandes cavidades vasculares y alta actividad sintética reflejada por los bordes gruesos del osteoide. 4x. (B) vista panorámica de la cavidad del defecto que muestra el hueso regenerado y una disposición irregular de las trabéculas. Tinción Von Kosa. 2x.

3.4.3.4. Evaluación por microtomografía computerizada (μ CT)

A través del estudio de μ CT se analizó la regeneración ósea en la zona de interfase andamio-tejido y en el área perimetral de los implantes (figura 57 y 58). Además, se analizaron matemáticamente los procesos de regeneración ósea comparándose estadísticamente los siguientes valores (tabla 15) mediante el software BoneAnalytics:

Tabla 15. Resumen de los parámetros óseos analizados estadísticamente para determinar el grado de regeneración ósea que se produce en las distintas muestras a estudio.

BT/TV: volumen óseo/volumen de tejido	Mayor será la regeneración/formación ósea cuanto mayor sea este parámetro.
Tb.Th: grosor trabecular	Mayor será la regeneración/formación ósea cuanto mayor sea este parámetro.
Tb.N: número trabecular	Mayor será la regeneración/formación ósea cuanto mayor sea este parámetro.
Tb.Sep: separación trabecular	Mayor será la regeneración/formación ósea cuanto menor sea este parámetro.
Cortical Th: grosor cortical	Mayor será la regeneración/formación ósea cuanto mayor sea este parámetro.

Se observó que a tiempos más largos (3 meses) la inducción de la formación ósea era más avanzada. Ocho de las muestras analizadas mostraron resultados significativos. Seis de ellas pertenecientes al grupo 4ZN-GE+MSC+OST comparado con el grupo 4ZN-GE+MSC. Este fue el grupo de estudio en el que se observó mayor formación y regeneración ósea tras 3 meses de seguimiento. En este tiempo se obtuvieron valores aumentados de BV/TV, Tb.Th, Tb.N y grosor cortical (figura 58). Es importante destacar que este efecto positivo significativo se observó tanto en hueso trabecular como en hueso cortical. Así mismo, es importante señalar que, aunque el grupo 4ZN-GE+OST presentó menor número de resultados significativos, mostró una tendencia positiva clara en cuanto a estos parámetros en comparación con el grupo 4ZN-GE+MSC.

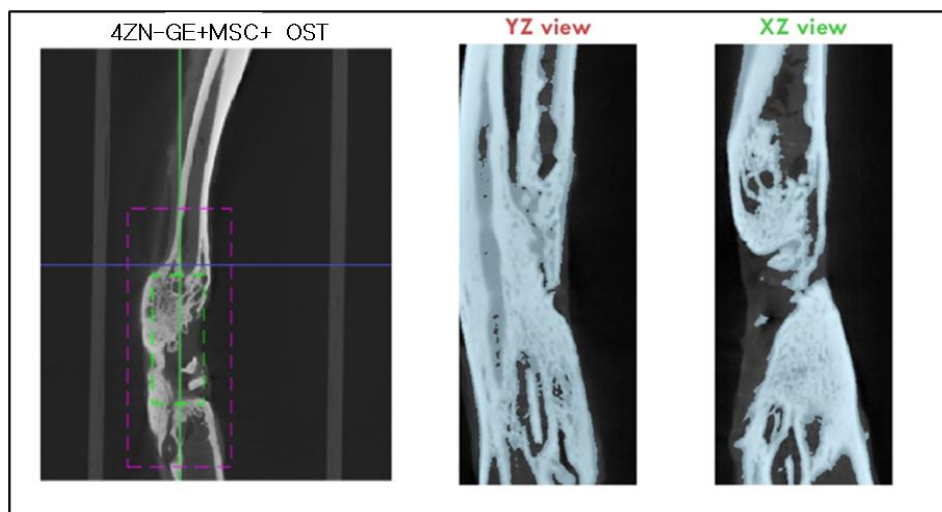


Figura 57. Micrografía correspondiente a uno de los defectos óseos generados tras 3 meses de seguimiento.

El análisis por μ CT mostró un claro aumento del volumen total de hueso en todos los grupos y en ambos tiempos (figura 58 A). Estos valores son superiores tras 3 meses de seguimiento. Así mismo, los grupos con mejores resultados son 4ZN-GE+MSC+OST y 4ZN-GE+MSC, lo que podría guardar relación con la presencia de MSCs como señal osteogeneradora. Además, tanto la presencia como la separación trabecular aumenta en todos los grupos, apreciándose valores más altos tras 1.5 meses (figura 58 B). Esto podría deberse a que a los 1.5 meses se generan trabéculas de nueva

formación que, a medida que avanza el tiempo, van dando lugar a hueso compacto por lo que a los 3 meses el número de trabéculas disminuye. Así mismo, el grosor cortical aumentó en todos los grupos, siendo más elevado en 4ZN-GE+MSC+OST tras 1.5 meses de seguimiento (figura 58 C). Este es el grupo que presenta mayor número de elementos osteoinductores (zinc, osteostatina y MSCs) por lo que el resultado es consistente con el planteamiento previo. El hecho de que los resultados más elevados se obtengan tras 1.5 meses podría deberse a los procesos de consolidación del hueso que tienen lugar a medida que avanza el tiempo.

En base de los resultados obtenidos, se puede afirmar que el sistema estudiado es adecuado para el modelo experimental en cúbito de conejo por su coste, estructura ósea y disponibilidad. El sistema estudiado es biocompatible, reproducible, aplicable y apto para su uso en defectos óseos críticos sin observar procesos adversos que puedan comprometer la formación de hueso. El grupo que ha reportado mejores resultados es el de 4ZN-GE+MSC+OST mostrando, en todas las pruebas, una tendencia clara en cuanto a la regeneración ósea del defecto crítico y obteniéndose, en algunos casos, resultados significativos. En el análisis histológico mostró un aumento de la formación ósea en los grupos 4ZN-GE+OST y 4ZN-GE+MSC+OST, observándose resultados más heterogéneos en este último. El estudio de imagen mostró un claro aumento del volumen total de hueso en todos los grupos. Los valores absolutos de todos los parámetros medidos son mayores en el caso de los 3 meses, obteniéndose valores significativos en el BV/TV en el grupo de 4ZN-GE+MSC+OST, en el Tb.Th en los tres grupos de estudio y en la Tb. Sep en el grupo 4ZN-GE+OST.

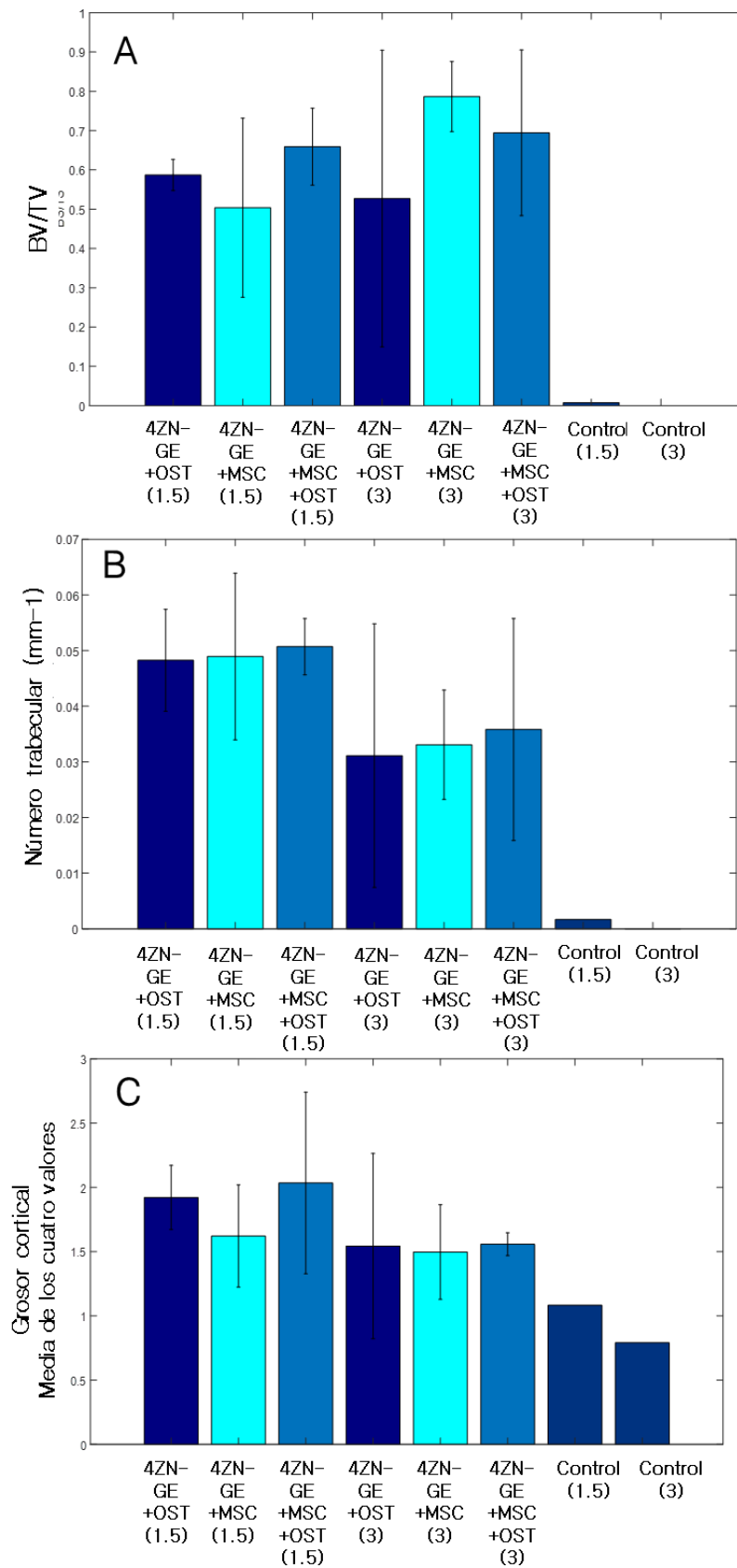


Figura 58. Datos correspondientes al BV/TV (A) al número de trabéculas (B) y al grosor cortical (C) de los distintos grupos analizados tras 1.5 y 3 meses de estudio con respecto a sus controles correspondientes.

4.4.4. Conclusiones: andamios de MBG *in vivo*

Los resultados obtenidos sugieren que los andamios de vidrio mesoporoso bioactivo que combinan zinc, MSCs y osteostatina, muestran una actividad conjunta sinérgica de sus componentes, mejorando significativamente los procesos osteogénicos de reparación *in vivo*. Los resultados muestran inducción de la formación ósea, al mismo tiempo que se produce la degradación de los implantes. En base a los resultados obtenidos, se puede proponer este abordaje como una potente herramienta terapéutica para la cirugía reconstructiva ósea por su efectividad, seguridad, facilidad de manejo y bajo coste [266].

3.5. Nanopartículas de vidrio mesoporoso

Tras llevar a cabo los ensayos explicados anteriormente con los andamios de MBG, se quiso dar un paso más y desarrollar un nuevo biomaterial con capacidades mejoradas para la regeneración ósea. Para ello, se sintetizaron nanopartículas de vidrio mesoporoso (MGNs) con mayor área superficial, capacidad de carga y bioactividad. Estas se doparon con zinc como ion osteogénico y se cargaron con curcumina (cur), componente principal de la cúrcuma, utilizada en la medicina tradicional por sus múltiples propiedades beneficiosas para el organismo, entre las que destaca su capacidad antibacteriana. Se escogió la curcumina con el objetivo de que las MGNs cumplieran ambas funciones, osteogénica y antibacteriana. Este material se caracterizó y estudió *in vitro* en células MC3T3-E1 y MSCs de conejo para analizar su citocompatibilidad y capacidad osteogénica, así como con la cepa bacteriana *S. aureus* en la que se analizaron sus propiedades antibacterianas (figura 59). Las capacidades de las MGNs, que se desarrollan a continuación, provienen del efecto del zinc y la curcumina como sustancias antibacterianas alternativas, dando así un paso más en la lucha contra la infección y los problemas asociado a las resistencias provocadas por los fármacos convencionales.

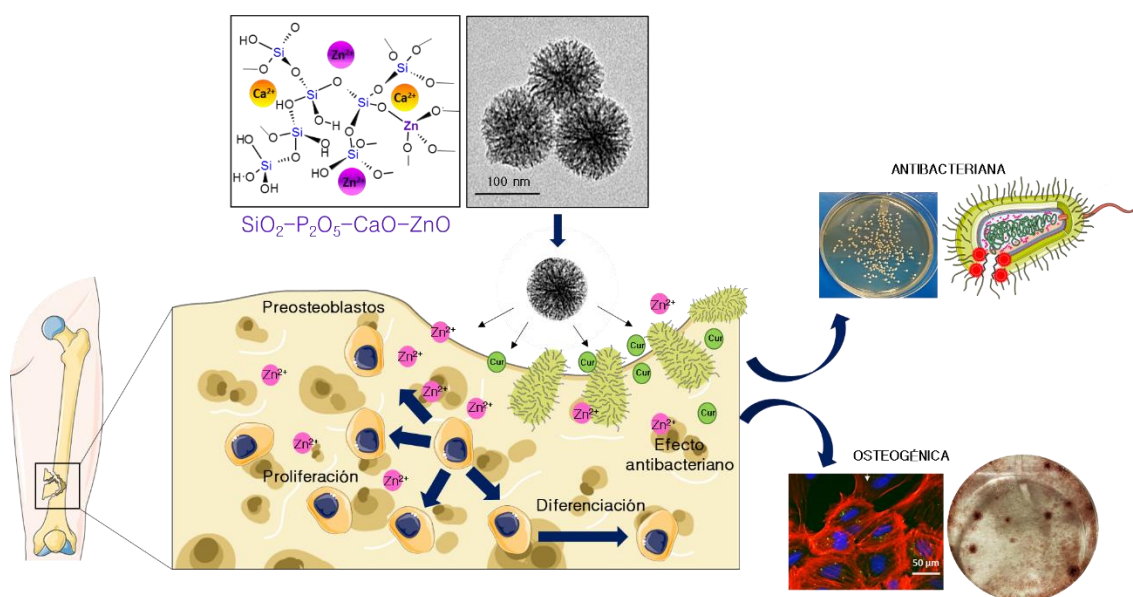


Figura 59. Esquema resumen de las MGNs y su efecto sobre las células y bacterias.

3.5.1. Síntesis y caracterización fisicoquímica de las nanopartículas

Se sintetizaron dos tipos de MGNs de composición ternaria $\text{SiO}_2\text{-P}_2\text{O}_5\text{-CaO}$ que se denominaron MGN_1 y MGN_2 . Estas se doparon con concentraciones de zinc del 2.5% y 4% dando lugar a nanopartículas de composición $\text{SiO}_2\text{-P}_2\text{O}_5\text{-CaO-ZnO}$ que se denominaron $\text{MGN}_{1,2}\text{-2.5ZN}$ y $\text{MGN}_{1,2}\text{-4ZN}$ respectivamente (tabla16).

La figura 60 ilustra el proceso de síntesis de las MGNs, así como los reactivos necesarios para llevar a cabo el proceso.

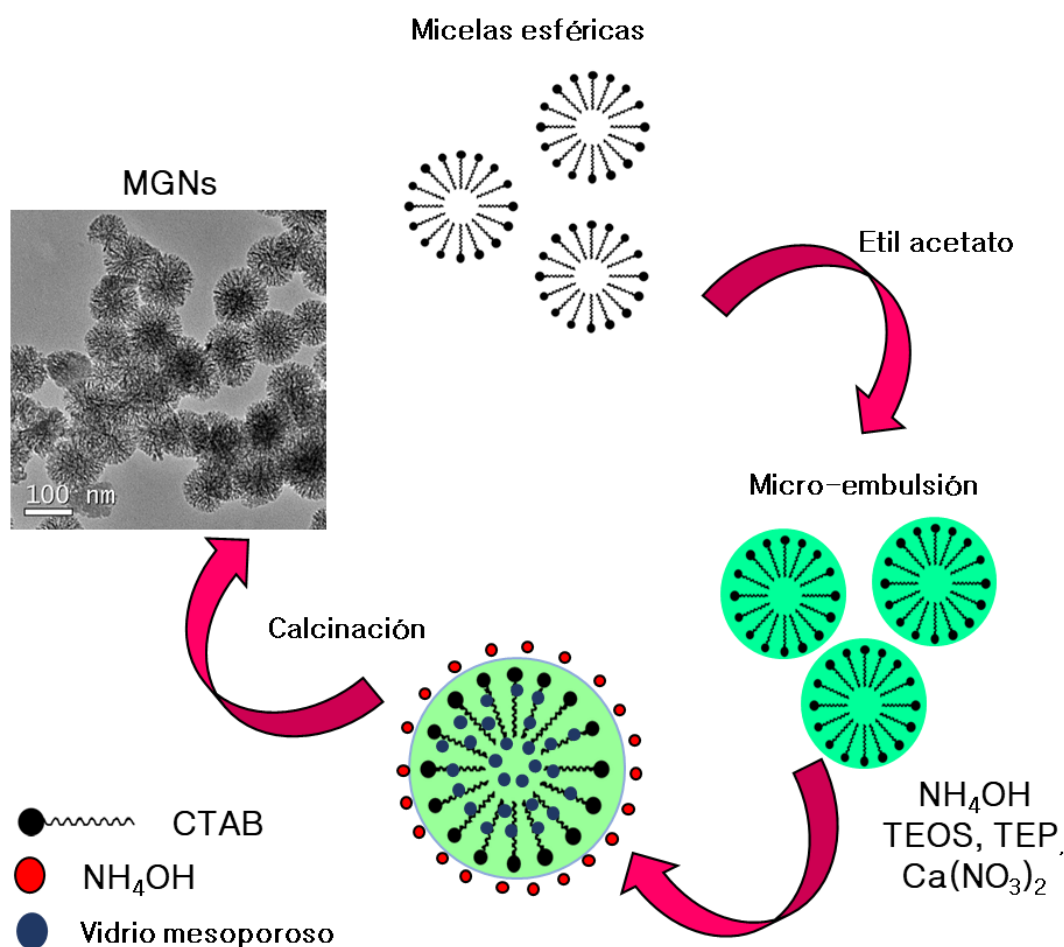


Figura 60. Esquema de los pasos que se llevaron a cabo para sintetizar las MGNs.

Las imágenes de TEM (figura 61) de las distintas MGNs, enriquecidas y no enriquecidas con zinc, muestran la morfología esférica con poros radiales y tamaños homogéneos de $100 \mu\text{m}$ (tabla 16) de dichas MGNs. Así mismo, se muestra el tamaño hidrodinámico de las MGNs medido por DLS, el cual

es ligeramente superior al tamaño obtenido por TEM. Las MGNs sin zinc presentan una morfología radial, aunque los poros de las MGN₁ son ligeramente más pequeños que los de sus homólogas enriquecidas con zinc.

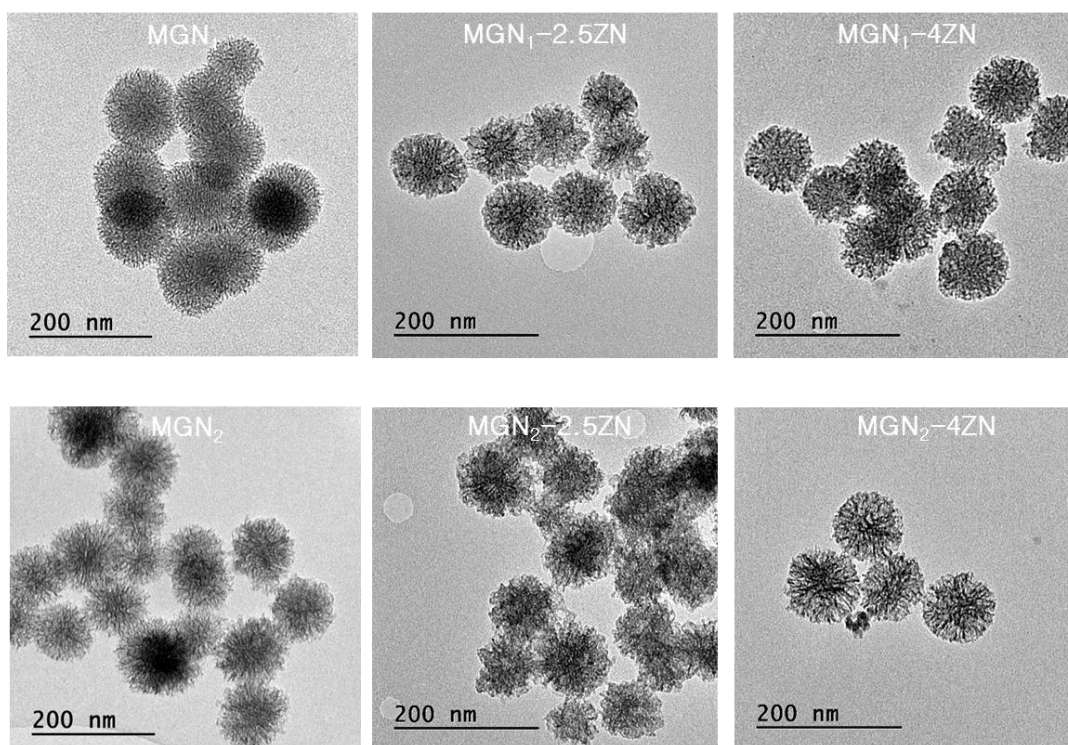


Figura 61. Micrografías de TEM de las MGNs enriquecidas y no enriquecidas con zinc.

Los resultados del análisis de la composición química (EDX), mostrados en la tabla 16, proporcionan el % en peso de cada uno de los elementos que constituyen las MGNs. Como se puede observar, los precursores no se encuentran en las condiciones esperadas teóricamente. La incorporación del silicio (Si) es evidente, siendo el elemento predominante en todas las muestras y con un porcentaje superior al 93% en todos los casos. El fósforo (P) y el calcio (Ca) están presentes en porcentajes inferiores a los valores teóricos, siendo especialmente llamativo el caso del calcio ya que se incorpora en cantidades muy inferiores siendo, como máximo, del 2.3%. El zinc (Zn) está presente en menor porcentaje, aunque sus valores son más próximos a los teóricos. Así mismo, se puede observar que la incorporación del P es mayor en las muestras que contienen Zn, aumentando la cantidad de este cuando las cantidades de Zn aumentan.

Tabla 16. Valores de EDX de las distintas MGNs en % peso. El primer número que se aporta corresponde a los valores experimentales y los valores entre paréntesis corresponden a los nominales teóricos.

	SiO ₂	P ₂ O ₅	CaO	ZnO
MGN₁	97.9 (60)	0.17 (4)	1.9 (36)	0.0 (0)
MGN₁-2.5ZN	95.4 (60)	1.6 (4)	1.8 (33.5)	1.3 (2.5)
MGN₁-4ZN	98.36 (60)	1.1 (4)	0.2 (32)	3.4 (4)
MGN₂	98.1 (79.5)	0.7 (2.5)	1.2 (18)	0.0 (0)
MGN₂-2.5ZN	94.5 (79.5)	1.6 (2.5)	2.3 (15.5)	1.6 (2.5)
MGN₂-4ZN	93.3 (79.5)	2.2 (2.5)	0.6 (14)	3.9 (4)

Las propiedades texturales de las MGNs se estudiaron mediante porosimetría de adsorción de nitrógeno (tabla 17). Los valores de S_{BET} corresponden al área superficial de las MGNs. Los valores D_p corresponden al diámetro de poro y los de V_p al volumen de poro. Es importante señalar que estos parámetros muestran una tendencia positiva a medida que dopaje con zinc aumenta. Se comprobó que las propiedades texturales de las MGNs no disminuyen al incorporar zinc, sino que, por el contrario, mejoran cuando se incorpora el 2.5% de ZnO. En el caso de las MGN₁-4ZN estos valores se mantienen y en las MGN₂-4ZN son ligeramente superiores sin perder, en ningún caso, la morfología radial inicial.

Los valores de ζ -potencial a pH fisiológico son negativos para todas las muestras, mostrando carga negativa en la superficie de las MGNs a causa de los grupos silanol. Las medidas de TGA muestran el porcentaje de curcumina que se carga en las MGNs, confirmándose una carga de entre un 10 y 16% en peso.

Tabla 17. Valores correspondientes al estudio de las MGNs mediante porosimetría de adsorción de nitrógeno, TEM, tamaño hidrodinámico medido por DLS, ζ -potencial y TGA.

	S_{BET} (m^2/g)	V_p (cm^3 /g)	D_p (nm)	Diámetro TEM (nm)	Diámetro hidrodinámico (nm)	ζ - potencial (mV)	Curcumina cargada (% peso)
MGN₁	805	0.94	2.5/6	117.6 $\pm$ 11	164 ($\pm$ 35)	-13.7	16
MGN₁-2.5ZN	830	1.28	2.5/8	104.2 $\pm$ 7	220 ($\pm$ 24)	-18.1	15
MGN₁-4ZN	530	0.95	2.5/6	91.3 $\pm$ 3.7	153 ($\pm$ 22)	-20.8	14
MGN₂	649	0.98	2.5/6	104.76 $\pm$ 9	164 ($\pm$ 17)	-20.5	10
MGN₂-2.5ZN	786	1.39	2.5/8	76.05 $\pm$ 6	255 ($\pm$ 27)	-18.0	13
MGN₂-4ZN	604	0.95	2.5/8	105.3 $\pm$ 5	157 ($\pm$ 11)	-15.4	14

La figura 62 muestra las isothermas de adsorción-desorción y distribuciones de tamaños de poro de las distintas MGNs, dopadas y no dopadas con zinc, obtenidas mediante porosimetría de adsorción de nitrógeno. Las isothermas obtenidas se pueden identificar como de tipo IV, con ciclos de histéresis H3, característicos de los materiales mesoporosos según establece la IUPAC [288]. Se observa una tendencia positiva en el área superficial y el tamaño de poro, los cuales aumentan cuando se añade un 2.5% de ZnO y se mantienen cuando se añade un 4%. La distribución de tamaños de poro muestra un perfil bimodal con un máximo estrecho mesoporoso en 2.5 nm en todas las MGNs y otro máximo mesoporoso ancho entre 6 y 8 nm, más acusado en aquellas MGNs enriquecidas con zinc. Esto podría explicar las ligeras diferencias morfológicas observadas por TEM entre las MGNs enriquecidas con zinc y sin zinc.

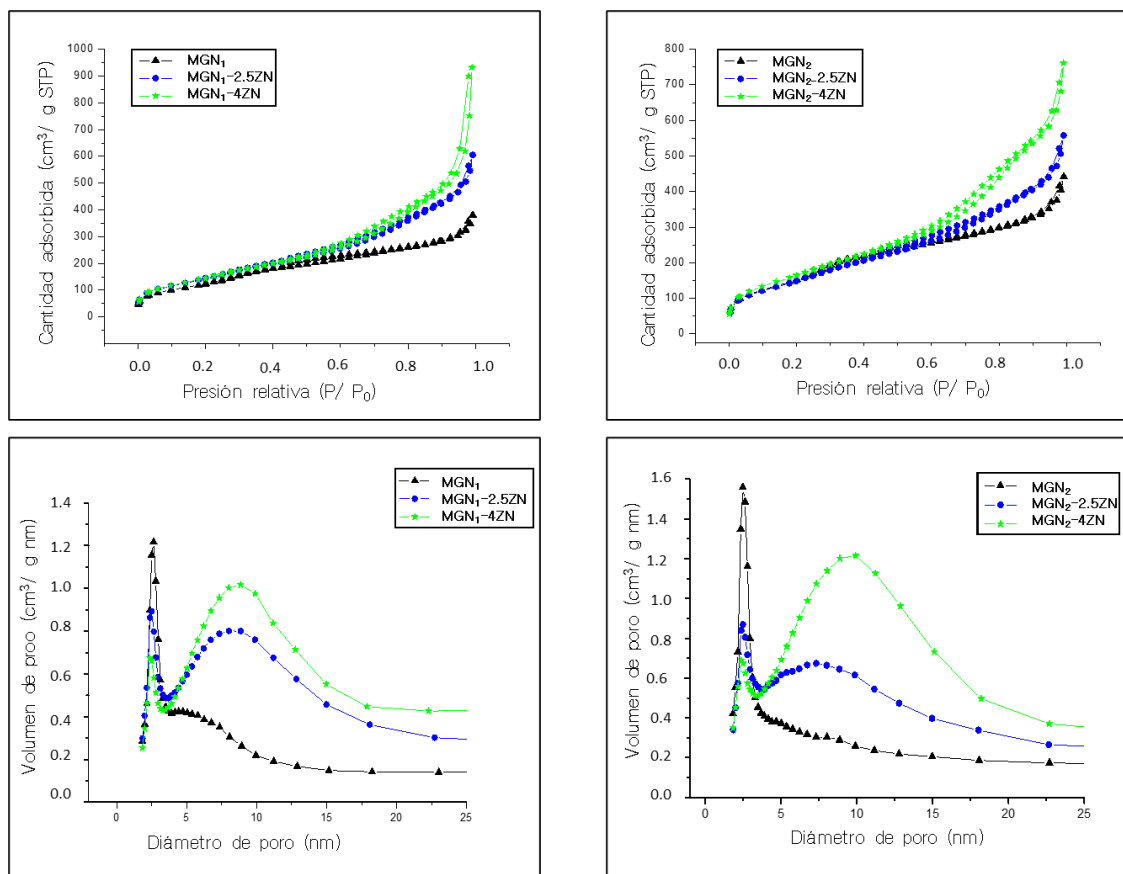


Figura 62. Isothermas de adsorción-desorción de N_2 y distribuciones del tamaño de poro de los distintos tipos de MGNs sintetizadas, dopadas con ZnO al 0% ($MGN_{1,2}$), 2.5% ($MGN_{1,2}-2.5ZN$) o 4% ($MGN_{1,2}-4ZN$).

Los espectros de NMR de los núcleos ^{29}Si (figura 63 A y B) y ^{31}P (figura 63 C), permiten estudiar los elementos que forman la red de las diferentes MGNs a nivel atómico. En los espectros de NMR del ^{29}Si (figura 63 A) aparecen Q^2 , Q^3 y Q^4 que representan los átomos de silicio (Si^*) en $(ONE)_2Si^*-(OSi)_2$, $(ONE)Si^*-(OSi)_3$, y $Si^*(OSi)_4$ (ONE = oxígeno no enlazante) respectivamente, mientras que Q_n es el parámetro de conectividad de la red. La tabla 18 muestra los desplazamientos químicos y la figura 63 A las áreas relativas obtenidas por deconvolución. Las señales de las regiones -110 ppm, -102 ppm y -96 ppm corresponden a Q^4 , Q^3 y Q^2 respectivamente. Por otro lado, Q_n mide el grado de polimerización. Se puede observar que cuando se incorpora un 2.5% de Zn^{2+} en las MGN_1 la conectividad de la red se mantiene y disminuye cuando el zinc está presente al 4%. Para las MGN_2 , la conectividad de la red disminuye gradualmente con la cantidad de zinc. El Zn^{2+} puede actuar como formador o como modificador de red [289]. En

las $\text{MGN}_1\text{-2.5/4ZN}$, el Zn^{2+} se comporta mayoritariamente como formador de red, por lo que Q_n a penas cambia, mientras que en el caso de las $\text{MGN}_2\text{-2.5/4ZN}$, el Zn^{2+} actúa mayoritariamente como modificador de red, lo que hace que Q_n disminuya (tabla 18).

Tabla 18. Desplazamientos químicos, áreas y conectividad de red (Q_n) obtenidas por NMR- ^{29}Si . Estas áreas se calcularon mediante deconvolución gaussiana y su población relativa se expresa como porcentaje (%).

^{29}Si	Q^4		Q^3		Q^2		$^a\langle Q^n \rangle$
	CS ppm	Area (%)	CS ppm	Area (%)	CS ppm	Area (%)	
MGN_1	-110	87.3	-102	7.6	-97	5.1	3.82
$\text{MGN}_1\text{-2.5ZN}$	-110	87.8	-102	6.5	-96	5.7	3.82
$\text{MGN}_1\text{-4ZN}$	-111	74.0	-102	15.0	-95	10.9	3.63
MGN_2	-110	68.5	-102	26.1	-95	5.3	3.68
$\text{MGN}_2\text{-2.5ZN}$	-110	66.3	-102	22.1	-95	11.5	3.54
$\text{MGN}_2\text{-4ZN}$	-111	59.4	-102	34.8	-95	5.7	3.53

En los espectros de NMR del ^{31}P (figura 63 B) aparece Q^0 que representa a los átomos de fósforo (denominados P^*) en el PO_4^{3-} (NBO) $3\text{P}^*-(\text{OP})$. Q^0 se asigna al grupo fosfato que se observa a 2.4 ppm en las MGNs, típico del ortofosfato amorfo [247]. Los espectros de polarización cruzada de NMR del ^{31}P muestran que, a pesar de que la cantidad de fósforo que se incorpora en las MGNs es pequeña, ésta es visiblemente mayor cuando el Zn^{2+} está presente. Si no hay Zn^{2+} el fósforo no se aprecia, tal y como se observa en los espectros de EDX. Por ello, se puede hipotetizar que el Zn^{2+} ayuda a la incorporación de P mayoritariamente como clústeres de ortofosfato amorfo embebidos en la red de vidrio.

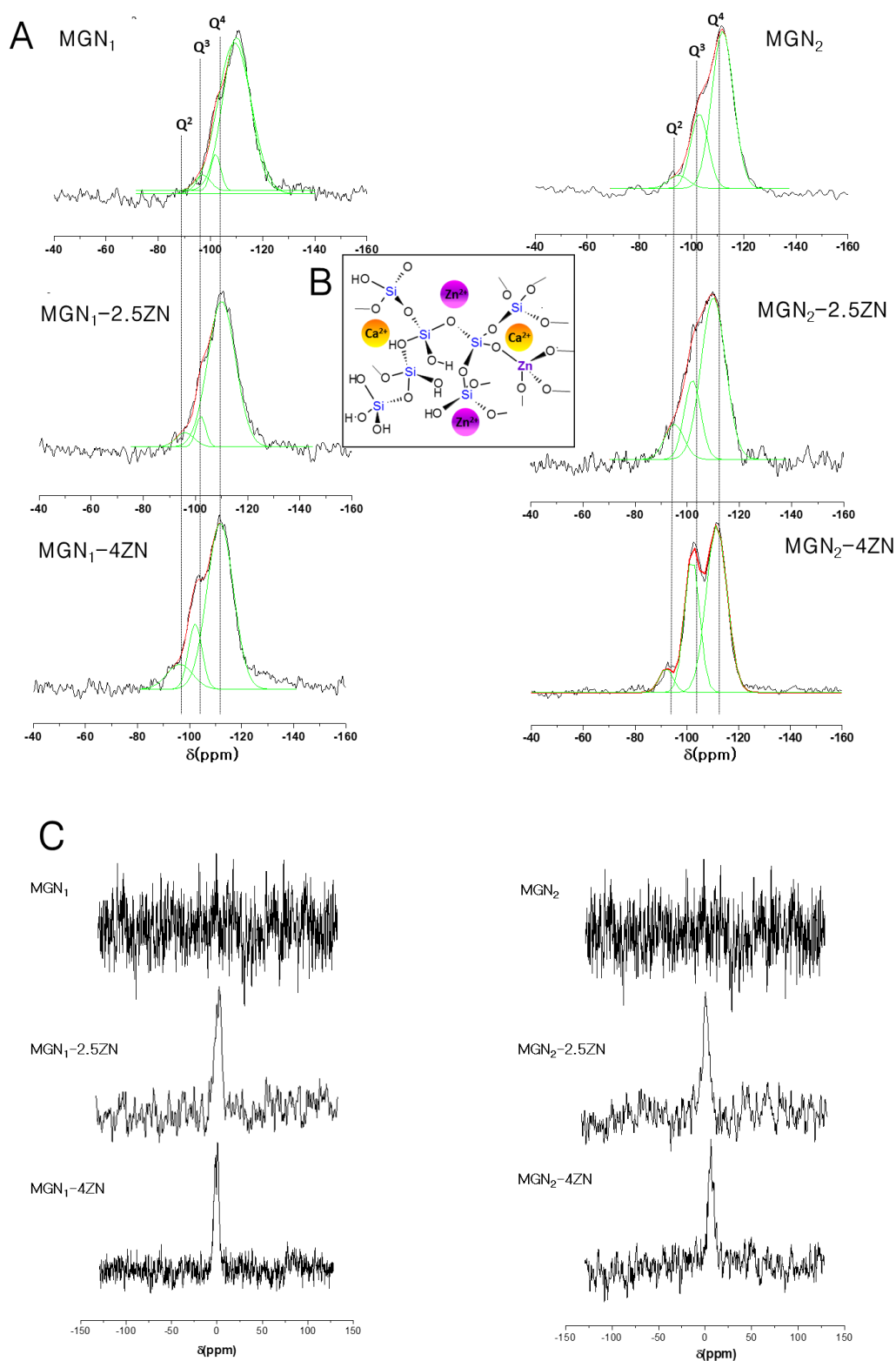


Figura 63. (A) Espectro MAS-NMR- ^{29}Si de pulso simple. Las áreas de unidades Q_n se calcularon mediante deconvolución gaussiana y se muestran en verde. (B) Representación gráfica de la estructura de las MGNs enriquecidas con zinc. Representación gráfica de la estructura de la sílice (C) Espectros de NMR- ^{31}P de polarización cruzada de estado sólido de las series MGN_1 y MGN_2 .

3.5.2. Carga y liberación de la curcumina

Las características texturales de las nanopartículas (gran superficie específica, tamaño y volumen de poro, su carga superficial y estructura) constituyen los factores más importantes para la carga y liberación selectiva de antibióticos. La curcumina es una base fuerte de Lewis que reacciona fuertemente con ácidos fuertes de Lewis, como por ejemplo los iones cerio o galio [290]. Por ello, el dopaje con estos iones facilita la carga de curcumina, aunque complica la liberación. Por su parte, el zinc forma un óxido anfotérico ZnO [290] con capacidad de reaccionar tanto con ácidos como bases. De esta forma, existirá cierta atracción entre el zinc y la curcumina, obteniéndose una carga más efectiva de esta en las nanopartículas enriquecidas con zinc. Sin embargo, esta interacción dificulta su liberación, como se observa en los perfiles de liberación (figura 64), llegando a un máximo de entorno del 90% de la carga. Esta podría ser la razón por la que la liberación de la curcumina de las MGN₁ y MGN₂ es un 25% y un 5% más rápida que la de sus homologas dopadas con zinc, respectivamente. En todos los tipos de MGNs se alcanza una liberación de, al menos, el 90% de la curcumina cargada tras 28 h de liberación. Además, la morfología diferente de los canales de las MGNs₁ influye en su perfil de liberación.

Asumiendo que la liberación se produce a través de los canales mesoporosos, se puede describir como una desviación del comportamiento teórico de las ecuaciones Noyes–Whitney:

$$W_t/W_0 = A (1 - \exp -k_1 t)^\delta,$$

donde W_t es la masa liberada en el tiempo t , W_0 representa la masa total inicial cargada, A es la cantidad máxima de curcumina liberada y K_1 es la constante de liberación. El valor δ proporciona una aproximación del grado de fidelidad de esta ecuación y tiene un valor entre 0 y 1 (tabla 19).

Tabla 19. Parámetros cinéticos de la liberación de curcumina de las MBGs. W_0 : masa inicial cargada (mg Cur/mg MBG); $(w_t/w_0)_{\max}$: cantidad máxima del relativo lanzamiento de Cur; k_1 : velocidad de liberación constante; δ : factor cinético de no idealidad; R: bondad de ajuste.

Muestra	W_0 (mg/mg)	A (%)	k_1 (10^3) (h^{-1})	δ	R
MGN ₁	0.16	99 ±2.8	0.08±0.04	0.12±0.02	0.95
MGN ₁ -2.5ZN	0.15	94±3.6	0.05±0.04	0.10±0.02	0.95
MGN ₁ -4ZN	0.14	87±1.6	0.12±0.03	0.11±0.02	0.93
MGN ₂	0.10	95±1.3	0.04±0.01	0.09±0.01	0.95
MGN ₂ -2.5ZN	0.13	93±1.9	0.10±0.02	0.13±0.02	0.95
MGN ₂ -4ZN	0.14	89±1.3	0.11±0.01	0.13±0.02	0.94

El modelo de liberación descrito a través de la ecuación de Noyes–Whitney muestra que la liberación de la curcumina es más rápida en las primeras 6 h, alcanzando una fase estable a las 28 h. Esta desviación podría deberse a varios factores como la distorsión de los canales mesoporos y/o la liberación de moléculas adsorbidas en la superficie externa de la red. En todas las MGNs, el valor de δ es bajo y similar, lo que indica que un porcentaje relativamente grande de curcumina se libera de la superficie externa.

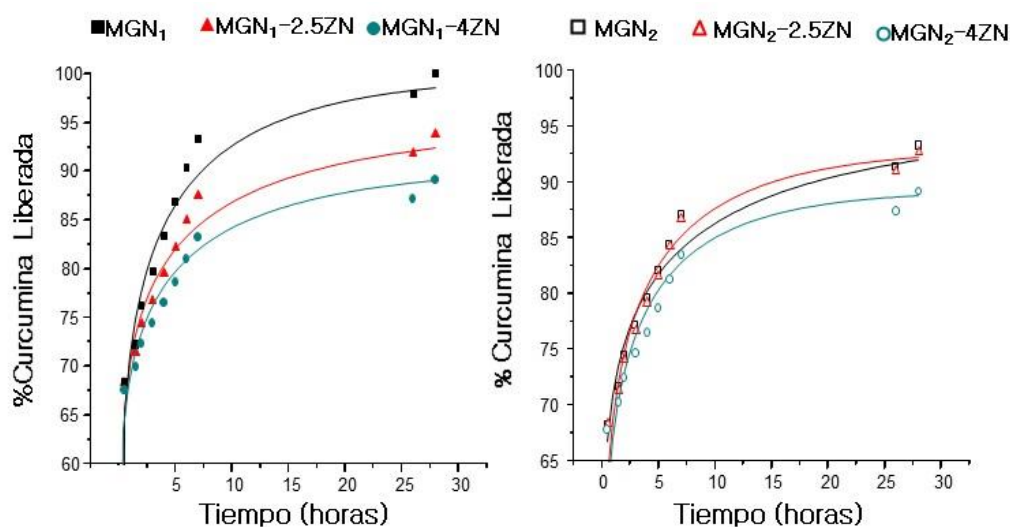


Figura 64. Liberación de curcumina de las MGNs entre 0,5 h y 30h en PBS a pH 7.4. Los puntos que trazan las curvas son las medias de tres mediciones independientes por período de tiempo. Los valores SEM (que representan un coeficiente de variación <5% para cada punto) se omiten para simplificar.

3.5.3. Ensayos *in vitro*

3.5.3.1. Citocompatibilidad

3.5.3.1.1. Células preosteoblásticas MC3T3–E1

– Viabilidad

Con el objetivo de averiguar la concentración óptima de MGNs para las células MC3T3–E1, se realizó un estudio previo en el que las células se pusieron en contacto con las MGNs a concentraciones de entre 100 y 200 $\mu\text{g/mL}$. Los resultados mostraron que las MGNs comenzaban a ser citotóxicas a 200 $\mu\text{g/mL}$, por lo que se realizaron nuevos ensayos con concentraciones inferiores para averiguar cuál era más adecuada.

Con este fin, los distintos tipos de MGNs se pusieron en contacto con las células MC3T3–E1 a tres concentraciones diferentes 125, 150 y 175 $\mu\text{g/mL}$. Las MGNs se mantuvieron en contacto con el cultivo durante 2 h. Después, los pocillos se lavaron con PBS para eliminar todas aquellas MGNs que no se hubieran internalizado, se añadió medio nuevo y se continuó con el cultivo. Se realizaron pruebas de viabilidad celular tras 24, 48 y 72 h (figura 64) para observar el comportamiento de las células tras entrar en contacto con las MGNs. La figura 65 muestra la viabilidad de las células MC3T3–E1 en contacto con las MGNs con respecto al control sin MGNs. En casi todos los grupos la viabilidad celular se mantiene constante con respecto al control, con ligeras variaciones. En la mayoría de los casos en los que se observa disminución de la viabilidad con respecto al control, los valores se mantienen por encima del 70%. Sin embargo, ciertos grupos provocaron una disminución de la viabilidad celular por debajo del 70%: MGN₁–2.5ZN y MGN₁–4ZN a 175 $\mu\text{g/mL}$ a partir de 48h y a 150 $\mu\text{g/mL}$ a partir de 72 h.

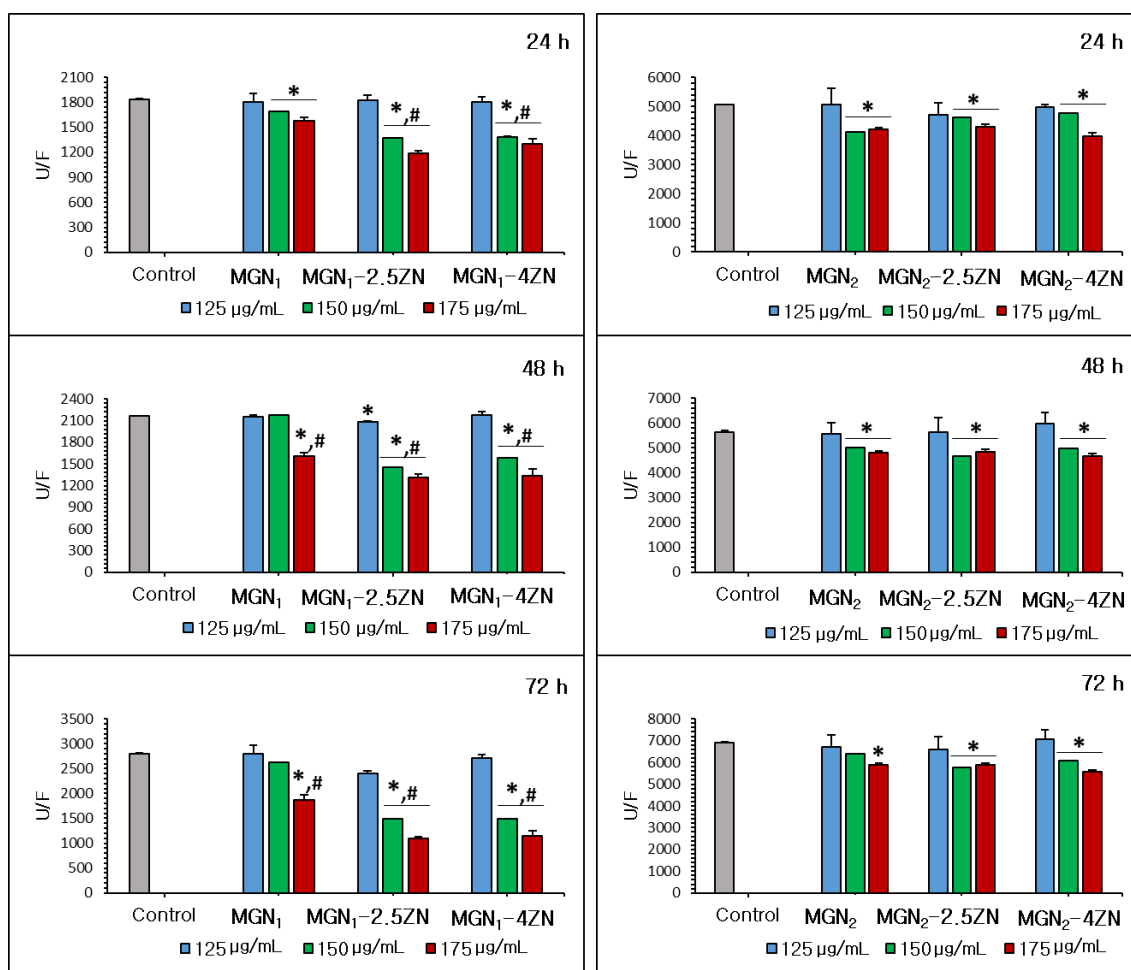


Figura 65. Viabilidad celular expresada en unidades de fluorescencia (U/F) correspondientes a las células preosteoblásticas de ratón MC3T3-E1 tras permanecer en contacto durante 2 h con las MGN₁ y MGN₂ y evolución tras 24, 48 y 72 h de cultivo. *p < 0.05 vs control. # p < 0.05 vs 125 µg/mL.

Por ello, se escogió la concentración de MGNs de 125 µg/mL para llevar a cabo el resto de los ensayos celulares ya que se determinó como la óptima para estas células y condiciones. Estudios anteriores establecieron 100 µg/mL como la concentración óptima para las MGNs con células MC3T3-E1 [291,292], por lo que la concentración escogida para continuar con los estudios se aproxima bastante a la establecida previamente. Posteriormente, las MGNs cargadas con curcumina (MGN_{cur}) se pusieron en contacto con las células MC3T3-E1, siguiendo el mismo protocolo descrito anteriormente y a una concentración de 125 µg/mL. En este ensayo (figura 66) la viabilidad celular no disminuyó en ninguno de los casos, comparada con un control celular en el que no se añadieron MGNs. Los resultados obtenidos muestran que las MGNs, tanto enriquecidas con zinc como sin

zinc, a una concentración de 125 $\mu\text{g/mL}$ no disminuyen la viabilidad del cultivo, incluso tras su carga con curcumina.

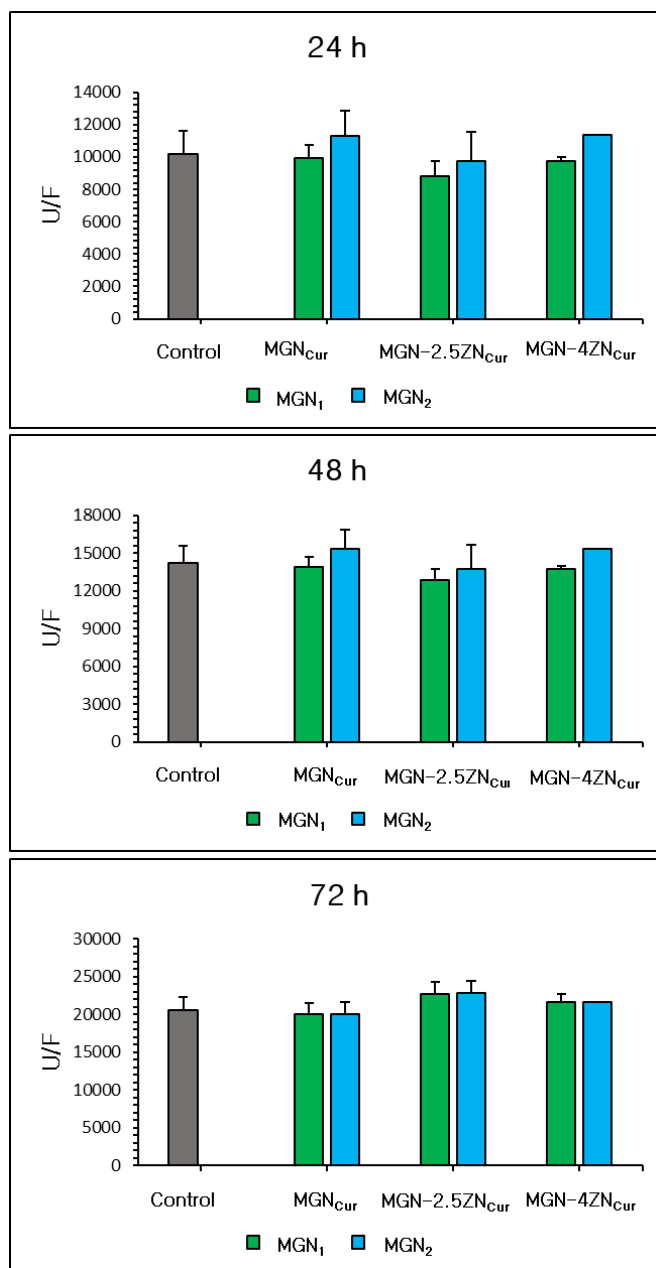


Figura 66. Resultados viabilidad expresados en unidades de fluorescencia (U/F) correspondientes a las células MC3T3-E1 tras permanecer en contacto durante 2 h con las MGN₁ y MGN₂ cargadas con curcumina (Cur) a una concentración de 125 $\mu\text{g/mL}$ y evolución tras 24, 48 y 72 h de cultivo. * $p < 0.05$ vs control.

– Internalización

La internalización de las MGNs a una concentración de 125 $\mu\text{g/mL}$ en las células MC3T3-E1 se estudió mediante citometría de flujo. La figura 67 muestra el porcentaje de internalización de las MGNs, apreciándose un

aumento significativo tanto en la intensidad de fluorescencia como en la internalización en comparación con el control de MC3T3-E1. Además, es necesario destacar el aumento de ambos parámetros a medida que aumenta el porcentaje de zinc. Se observaron diferencias significativas entre grupos, obteniéndose una internalización significativamente mayor en todas las MGN₁ y MGN₂ enriquecidas con zinc que fue del doble en las nanopartículas MGN₁-4ZN y MGN₂-4ZN. En cuanto a la intensidad de la fluorescencia, se observaron diferencias significativas en las nanopartículas MGN₁-4ZN y MGN₂-4ZN. Por otro lado, no hubo diferencias significativas entre las MGN₁ y MGN₂ en cuanto a ninguno de los dos parámetros.

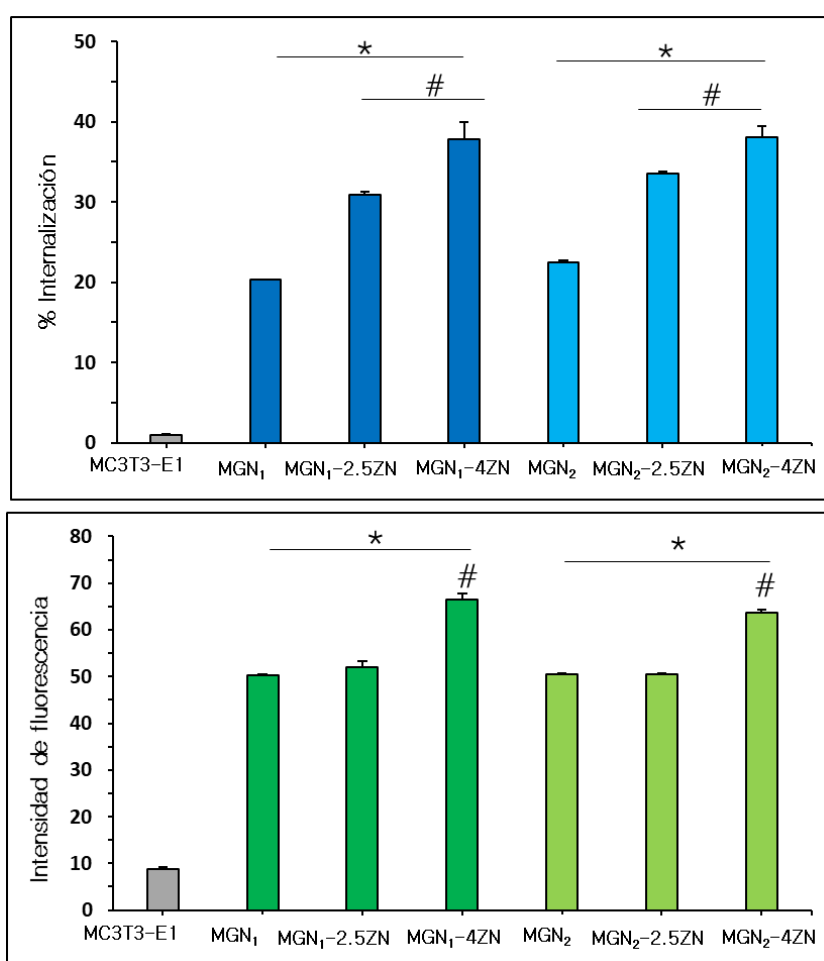


Figura 67. Internalización de las distintas MGNs en las células MC3T3-E1 a una concentración de 125 µg/mL tras 2 h en contacto con el cultivo celular. * $p < 0.05$ vs MC3T3-E1 # $P < 0.05$ VS MGN_{1,2}.

– Mineralización

Las células MC3T3–E1 se sembraron en placas de 6 pocillos en contacto con 125 µg/mL de las distintas MGNs. Después de 2 h, el cultivo se lavó con PBS, se añadió medio nuevo y se mantuvo durante 7 días. Los resultados de mineralización (figura 68) por tinción de rojo de alizarina muestran que las células que estuvieron en contacto con las MGN₂ dopadas con zinc (MGN₂–2.5/4ZN), presentaron tasas de mineralización significativamente más elevadas en comparación con el control celular y su propio control MGN₂.

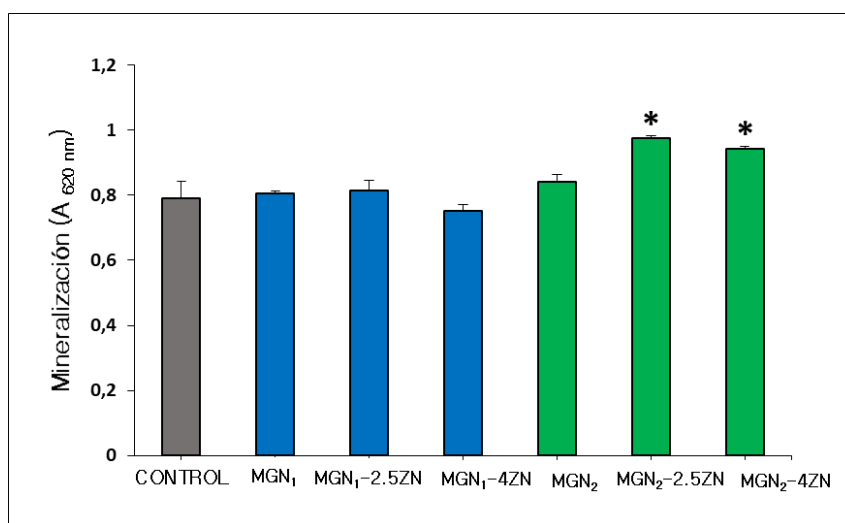


Figura 68. Mineralización de las células MC3T3–E1 tras estar en contacto con los distintos tipos de MGNs a una concentración de 125 µg/mL durante 2 h y después de 7 días de cultivo celular. *p < 0.05 vs control.

– Diferenciación

Las células MC3T3–E1 se cultivaron en contacto con los distintos tipos de MGNs a una concentración de 125 µg/mL durante 2 h. Tras este tiempo, los cultivos se lavaron con PBS, se añadió medio nuevo y se mantuvo el cultivo durante 5 días más. Tras 5 días, se analizaron los genes de diferenciación osteoblástica Runx2 y ALP por PCR a tiempo real. Tal y como se puede observar en la figura 69, existe un aumento de la diferenciación de las células MC3T3–E1 al entrar en contacto con las MGNs que, a su vez, aumenta cuando el zinc está presente en cantidades crecientes. Se obtuvieron resultados significativos con ambos tipos de MGNs, tanto para las nanopartículas MGN₁–4ZN y MGN₂–4ZN en Runx2 como para las

nanopartículas MGN_2 -2.5ZN y MGN_2 -4ZN en valores de expresión génica de ALP.

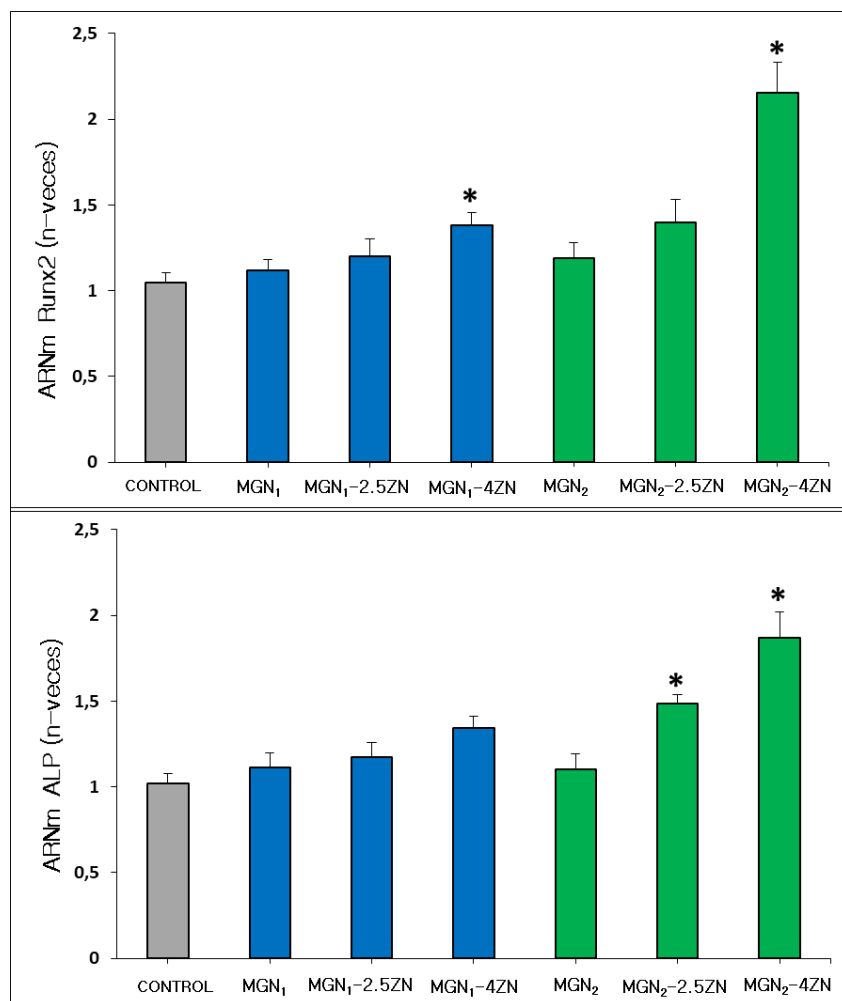


Figura 69. Expresión génica de marcadores de diferenciación en las células MC3T3-E1, analizada por PCR a tiempo real, tras entrar en contacto durante 2 h con $\text{MGNs}_{1/2}$ a concentración de 125 $\mu\text{g/mL}$ y tras 5 días de cultivo. * $p < 0.05$ vs control.

3.5.3.1.2. Células madre mesenquimales

– Extracción y purificación de MSCs de médula ósea de conejo

Para llevar a cabo este procedimiento, se emplearon conejos de la raza “New Zealand” a los que se sacrificó como parte de otros ensayos *in vivo*. Se utilizaron algunos de sus huesos largos, como el fémur, para realizar la extracción de la médula ósea. Una vez se obtuvieron dichos huesos, se limpiaron y esterilizaron con etanol. Se introdujeron en una campana de flujo laminar donde, con una jeringuilla, se introdujo PBS a presión por el canal

medular. Una vez se extrajo la médula ósea, esta se disgregó mecánicamente utilizando la misma jeringuilla y se cultivó con medio de cultivo específico para MSCs. Las MSCs tienen capacidad de adherencia al plástico y esta fue la característica que permitió diferenciarlas frente al resto de tipos celulares presentes en la médula ósea. Una vez se estableció el cultivo, se fue cambiando el medio por medio fresco cada dos días con el objetivo de eliminar otro tipo de células y obtener, finalmente, un monocultivo de MSCs. Tras llevar a cabo su purificación, las MSCs se expandieron para llevar a cabo los ensayos de citocompatibilidad, internalización, mineralización y diferenciación correspondientes.

– Viabilidad

Los distintos tipos de MGNs se pusieron en contacto con las MSCs de conejo a tres concentraciones diferentes 125, 150 y 175 $\mu\text{g/mL}$. Las MGNs se mantuvieron en contacto con el cultivo durante 2 h. Después, los pocillos se lavaron con PBS con el objetivo de eliminar todas aquellas MGNs que no se hubieran internalizado, se añadió medio nuevo y se continuó con el cultivo. Se realizaron pruebas de viabilidad tras 24, 48 y 72 h (figura 70) para observar el comportamiento de las células tras entrar en contacto con las MGNs. Los resultados de viabilidad celular muestran ausencia de citotoxicidad en ambos tipos de MGNs para todas las concentraciones estudiadas. Sin embargo, se aprecia una ligera disminución de la viabilidad de las células tras permanecer en contacto con las MGNs a 150 y 175 $\mu\text{g/mL}$. En ningún caso este descenso de la viabilidad llega a provocar citotoxicidad siendo, en todas ellas, igual o superior al 70% con respecto al control. Los casos en los que la viabilidad disminuyó de forma más acusada corresponden a las $\text{MGN}_1\text{-4ZN}$ (30%) y $\text{MGN}_2\text{-4ZN}$ (19%) a una concentración de 175 $\mu\text{g/mL}$ tras 72h. Además, es importante resaltar que en el caso de las $\text{MGN}_1\text{-2.5ZN}$ y $\text{MGN}_1\text{-4ZN}$ a una concentración de 125 $\mu\text{g/mL}$ y tras 48 h, la viabilidad celular aumentó por encima del control de forma significativa.

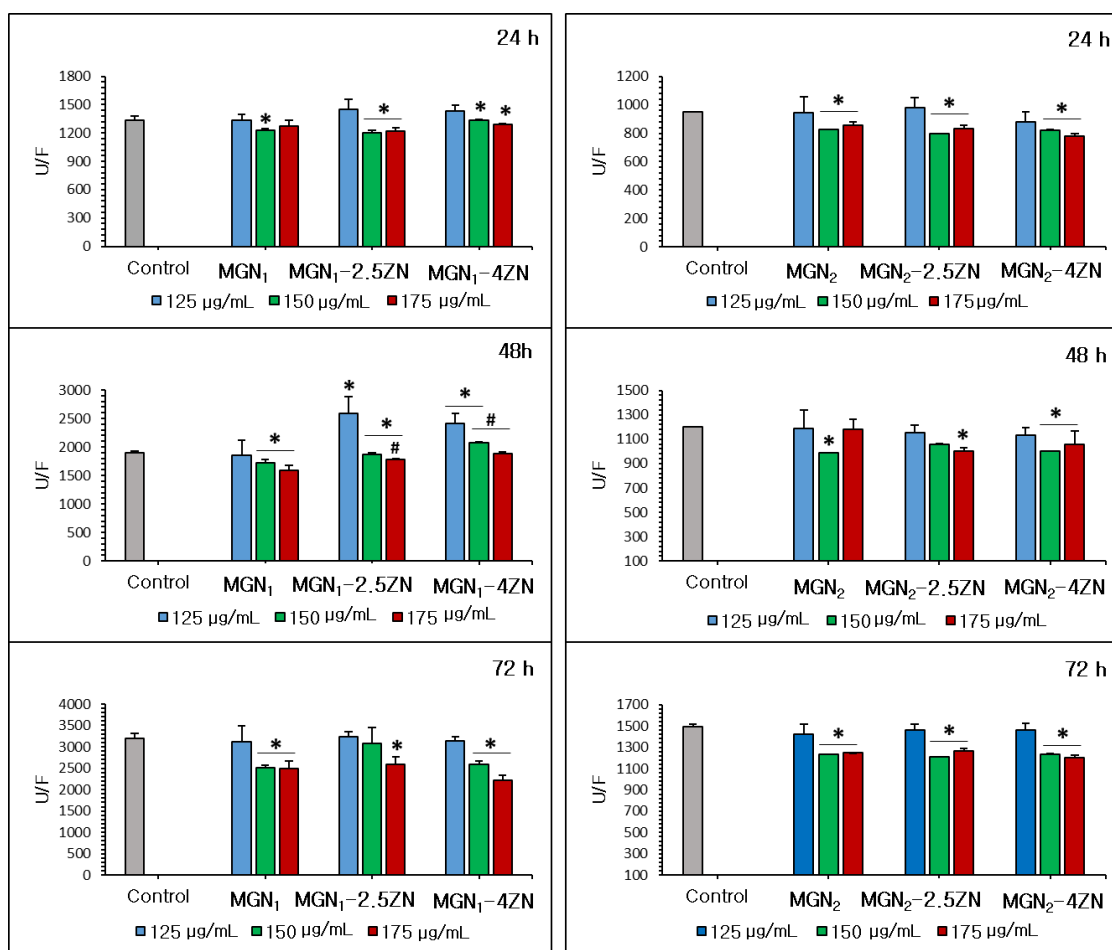


Figura 70. Viabilidad celular expresada en unidades de fluorescencia (U/F) correspondientes a las MSCs de conejo, tras permanecer en contacto durante 2 h con las MGNs₁ y MGN₂ y desarrollo tras 24, 48 y 72 h de cultivo. *p< 0.05 vs control. # p< 0.05 vs 125 µg/mL.

Debido a lo anterior, se eligió la concentración de 125 µg/mL como la concentración óptima y fue la que se utilizó en el resto de los ensayos celulares. Trabajos previos realizados con MSCs emplean MGNs a concentraciones de entre 100 y 200 µg/mL [293–295], por lo que los resultados aquí expuestos concuerdan con el rango establecido anteriormente. Posteriormente, las MGNs cargadas con curcumina (MGN_{cur}) se pusieron en contacto con las MSCs de conejo, siguiendo el mismo protocolo descrito anteriormente y a una concentración de 125 µg/mL. En este caso la viabilidad celular no disminuyó en ninguno de los casos (figura 71), comparada con un control celular en el que no se añadieron MGNs. Los resultados obtenidos muestran que las MGNs a una concentración de 125 µg/mL no disminuyen en ningún caso la viabilidad del cultivo, incluso tras su carga con curcumina.

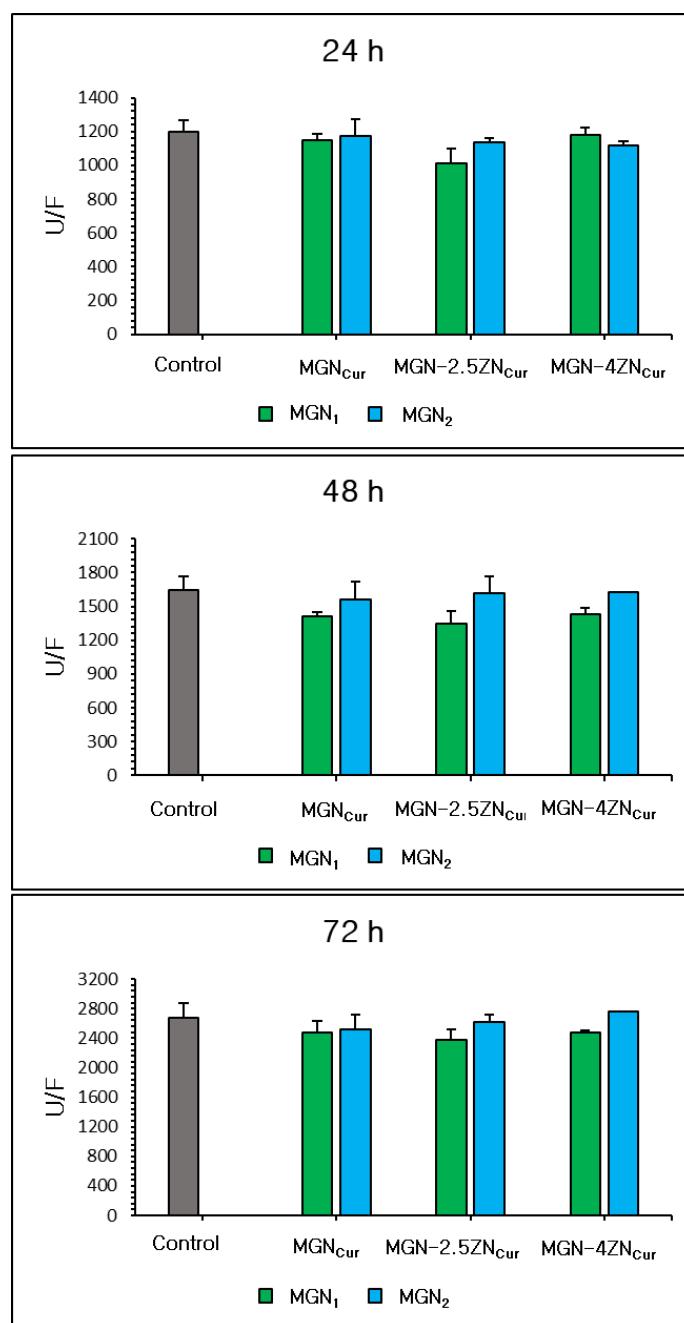


Figura 71. Viabilidad expresada en unidades de fluorescencia (U/F) correspondientes a las células MSCs de conejo tras permanecer en contacto durante 2 h con las MGNs₁ y MGN₂ cargadas con curcumina a una concentración de 125 µg/mL tras 24, 48 y 72 h de cultivo. *p< 0.05 vs control.

– Internalización

Se estudió la internalización de las MGNs (125 µg/mL) en las MSCs de conejo mediante la citometría de flujo. La figura 72 muestra el porcentaje de internalización y la intensidad de fluorescencia de las MGNs marcadas con fluoresceína en las MSCs de conejo. Se observó un incremento en ambos

parámetros al añadirse las MGNs en comparación con el control, así como resultados significativos en el porcentaje de internalización de las MGNs dopadas con zinc ($MGN_{1,2}-2.5/4ZN$). Este fue de hasta el doble, con respecto a las que no contenían zinc ($MGN_{1,2}$). También se apreció un incremento en cuanto a la intensidad de fluorescencia que aumenta a medida que lo hace el contenido en zinc, obteniéndose resultados significativos en el caso de las MGN_1 y en los tres tipos de MGN_2 .

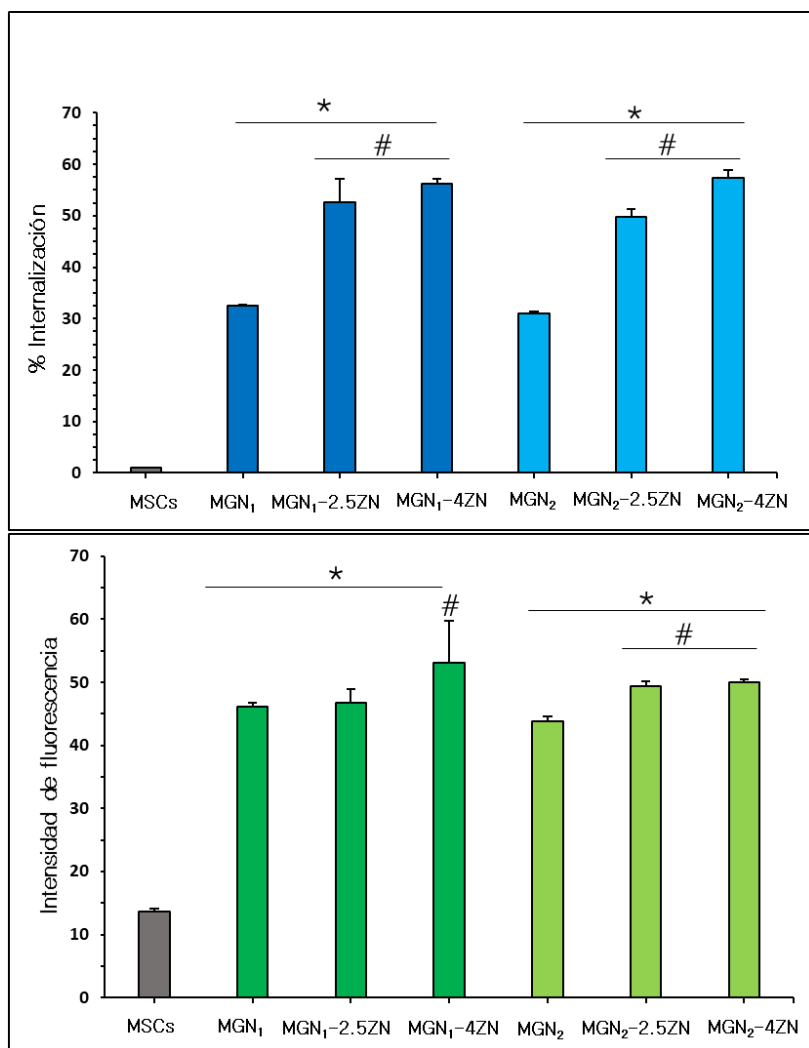
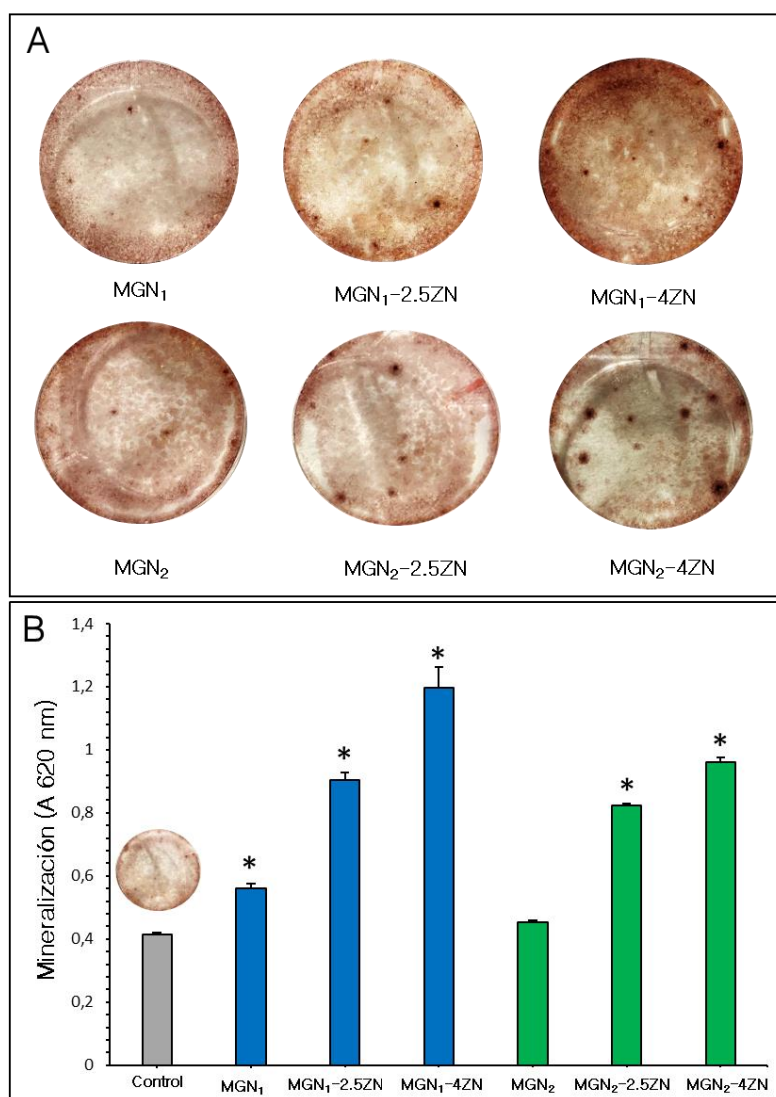


Figura 72. Internalización de las distintas MGNs en las MSCs de conejo a una concentración de 125 $\mu\text{g/mL}$ tras 2 h en contacto con el cultivo celular. * $p < 0.05$ vs MSCs # $P < 0.05$ vs $MGN_{1,2}$.

– Mineralización

Las MSCs de conejo se sembraron en placas de 6 pocillos en contacto con 125 $\mu\text{g/mL}$ de las distintas MGNs. Después de 2 h, el cultivo se lavó con

PBS, se añadió medio nuevo y se mantuvo durante 7 días. Los resultados (figura 73) muestran un aumento de la mineralización de las MSCs al añadir las MGNs al cultivo. Este aumento es del doble en el caso de las $MGN_1-2.5ZN$ y el triple en las MGN_1-4ZN con respecto al control celular sin MGNs. En el caso de las MGN_2 se observó un aumento de 2 y de 2.5 veces en las $MGN_2-2.5ZN$ y MGN_2-4ZN , respectivamente, respecto al control celular sin MGNs. Estos resultados muestran, no solo como la mineralización aumenta cuando las MGNs entran en contacto con las células, si no como la presencia del zinc supone un incremento significativo.



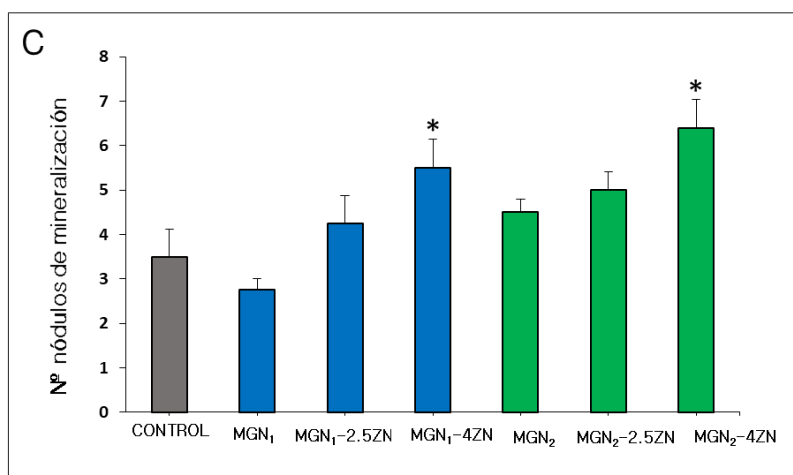


Figura 73. (A) Micrografías correspondientes a los pocillos con las MSCs tras permanecer en contacto con las MGNs teñidas con Rojo de Alizarina donde se pueden apreciar los nódulos de mineralización. (B) Mineralización y (C) nódulos de mineralización generados en las MSCs tras estar en contacto con los distintos tipos de MGNs a una concentración de 125 µg/mL durante 2 h y después de 7 días de cultivo celular. *p < 0.05 vs control.

– Diferenciación

Las MSCs de conejo se cultivaron en contacto con los distintos tipos de MGNs a una concentración de 125 µg/mL durante 2 h. Tras este tiempo, se lavaron los cultivos con PBS, se añadió medio nuevo y se mantuvo el cultivo durante 5 días más. Tras 5 días, se llevó a cabo un análisis de expresión génica por PCR a tiempo real de los marcadores de diferenciación osteoblástica Runx2 y ALP. Tal y como se puede observar en la figura 74, existe un aumento en la diferenciación de las MSCs al entrar en contacto con las MGNs que, a su vez, fue más elevada cuando las MGNs contenían cantidades crecientes de zinc. Se obtuvieron resultados significativos con las MGN₁-4ZN y con los tres tipos de MGN₂ para Runx2. Así mismo, para ALP se obtuvieron resultados significativos con las MGN₂ dopadas con 2.5% y 4% de zinc (MGN₂-2.5/4ZN).

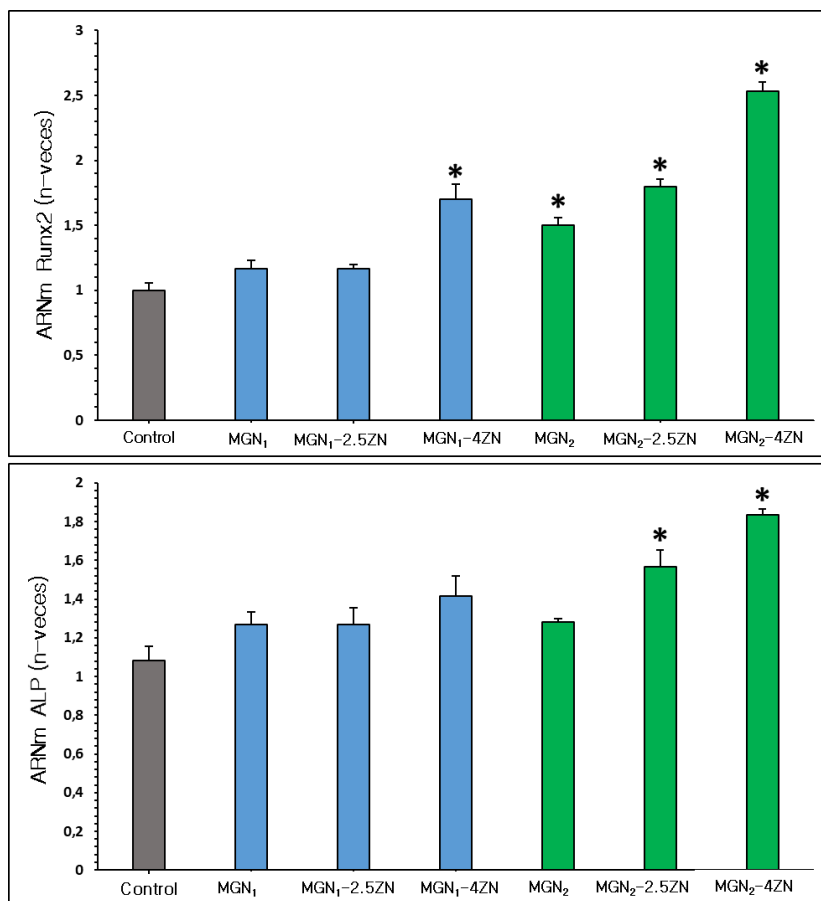


Figura 74. Expresión génica de marcadores de diferenciación en las células MSCs de conejo, analizada por PCR a tiempo real, tras entrar en contacto con 125 µg/mL de ambos tipos de MGNs (MGN₁ y MGN₂) durante 2 h y tras 5 días de cultivo. * p< 0.05 vs control.

3.5.3.2. Cultivos bacterianos con *S. aureus*

– Ensayos en crecimiento planctónico con *S. aureus*

Cómo ya se ha comentado anteriormente, las bacterias tienden a generar resistencia a los antibióticos que se las administra, lo que supone un gran problema sanitario a nivel mundial. Por ello, es necesario desarrollar nuevas estrategias que solventen este problema. En publicaciones previas donde se estudia el efecto antibacteriano de la curcumina, se ha observado que su valor de MIC es de 187.5–500 µg/mL para *S. aureus*. H. Gunes et al. obtuvieron resultados congruentes con estos datos al detectar valores de MIC similares para *S. aureus* sensible a la meticilina (MSSA) y *S. aureus* resistentes a la meticilina (MRSA), siendo estos de 219 µg/ml de 217 µg/ml respectivamente [296,297].

En este capítulo se han sintetizado MGNs dopadas con zinc a distintas concentraciones que se han cargado con curcumina (MGN_{Cur}), y se han mantenido en contacto con cultivos planctónicos de *S. aureus* a concentraciones de 125, 150 y 175 $\mu\text{g/mL}$ durante 24 h a 37°C, condiciones de agitación y pH 7.4. Tras 24 h, se extrajeron alícuotas del cultivo bacteriano que se diluyeron de forma seriada y se sembraron en placas de agar (10 μL). Después de 24 h de incubación a 37°C y condiciones estáticas, se contaron las CFUs resultantes. Las MGNs enriquecidas con zinc han mostrado ser efectivas para *S. aureus* a una concentración de 125 $\mu\text{g/mL}$ para ambas series $\text{MGN}_{1,2}$. Teniendo en cuenta que la curcumina cargada en las MGNs fue de entre un 10–16 % en peso, se propone que la concentración de curcumina mínima necesaria para matar a *S. aureus* es de 20 $\mu\text{g Cur/mL}$ para las MGNs sin zinc y de 15,8 $\mu\text{g Cur/mL}$ para las series $\text{MGN}_1\text{--}4\text{ZN}_{\text{Cur}}$ y $\text{MGN}_2\text{--}4\text{ZN}_{\text{Cur}}$, siendo estas últimas las de menor crecimiento bacteriano.

Por otro lado, se define como concentración bactericida mínima (MBC) la concentración más baja de agente antibacteriano que consigue matar $\geq 99\%$ del inóculo bacteriano original [298]. En el presente estudio las MGNs que alcanzaron este valor fueron todas las series de $\text{MGN}_{2\text{Cur}}$ y $\text{MGN}_1\text{--}4\text{ZN}_{\text{Cur}}$ a una concentración de 175 $\mu\text{g/mL}$, siendo necesaria una liberación de curcumina de 24 $\mu\text{g/mL}$. Así mismo, es importante resaltar que se pudo apreciar de forma más clara el efecto antibacteriano sinérgico entre el zinc y la curcumina con *S. aureus*, cuando la concentración de MGNs era inferior. En estos casos se observó una disminución del crecimiento bacteriano de hasta un 36% en la serie $\text{MGN}_1\text{--}4\text{ZN}_{\text{Cur}}$ y de hasta de un 70% en la serie $\text{MGN}_2\text{--}4\text{ZN}_{\text{Cur}}$, respecto de sus controles $\text{MGN}_{1,2}$ sin zinc. Estos resultados manifiestan la mejora de la capacidad antibacteriana del sistema (MGNs + zinc + curcumina), mostrando una disminución significativa del crecimiento de las bacterias a concentraciones de 125 y 150 $\mu\text{g/mL}$. A concentraciones de 175 $\mu\text{g/mL}$ se puede hipotetizar que la cantidad de Cur liberada enmascara el efecto antibacteriano del zinc. Este abordaje muestra la posibilidad de tratar las infecciones bacterianas con enfoques alternativos evitando la problemática de las resistencias bacterianas, de gran importancia en la actualidad.

Se cree que el mecanismo de acción de la curcumina podría estar basado en su unión a proteínas FtsZ [299]. Estudios previos [185] han demostrado que la curcumina es capaz de interactuar con las proteínas FtsZ (homólogas procariotas de la proteína citoesquelética eucariótica tubulina) *in vitro* [300,301]. Se plantea que la curcumina interactúa con ellas impidiendo que se produzca el ensamblaje de los protofilamentos, por lo que suprime la formación del anillo Z, lo que conduce a la inhibición de la citocinesis y, por lo tanto, imposibilita la proliferación bacteriana[302].

Así mismo, se propone su unión a peptidoglicanos como otro posible mecanismo de acción. Se ha demostrado que la curcumina es capaz de unirse al peptidoglicano (PNG) de la pared celular bacteriana[181]. La unión entre la curcumina y el peptidoglicano podría desencadenar daños en la pared celular y en la membrana, lo que llevaría a la lisis de la bacteria [182]. Por otra parte, este estudio [181] demuestra que concentraciones crecientes de PGN bloquean la actividad antibacteriana de la curcumina.

Además, la curcumina podría funcionar a través de la Inhibición del gen *mecA*, lo que se traduce en una disminución de la expresión de las proteínas PBP2 α . Estas proteínas son responsables de aportar resistencia a los antibióticos β -lactámicos. Si su expresión disminuye, la bacteria se sensibilizaría a la acción de los antibióticos β -lactámicos, como la penicilina y la meticiclina, cuyo objetivo es la pared celular bacteriana [186].

Al mismo tiempo, se ha demostrado que la acción antibacteriana de la curcumina contra las MSSA y las MRSA se potencia notablemente cuando se utiliza en combinación de inhibidores de ATPasa y detergentes suaves que inhabilitan a los transportadores cassette dependientes de ATP (transportadores ABC del inglés ATP-binding cassette) y que afectan a la integridad de la membrana citoplasmática, respectivamente. Así mismo, se ha demostrado que la integridad de la membrana bacteriana se ve comprometida en presencia de curcumina-1.

Aunque las pruebas existentes sugieren que la curcumina inhibe a *S. aureus* principalmente dañando su membrana bacteriana, es necesario seguir investigando en este contexto, con el fin de identificar proteínas bacterianas diana que interactúen con la curcumina en el desarrollo de su potencial

antibacteriano, además de las ya comentadas previamente. Esto es importante no sólo para mejorar la comprensión de la interacción de la curcumina con sus proteínas diana, sino también para mejorar la actividad de la curcumina contra *S. aureus*, en particular las cepas MRSA.

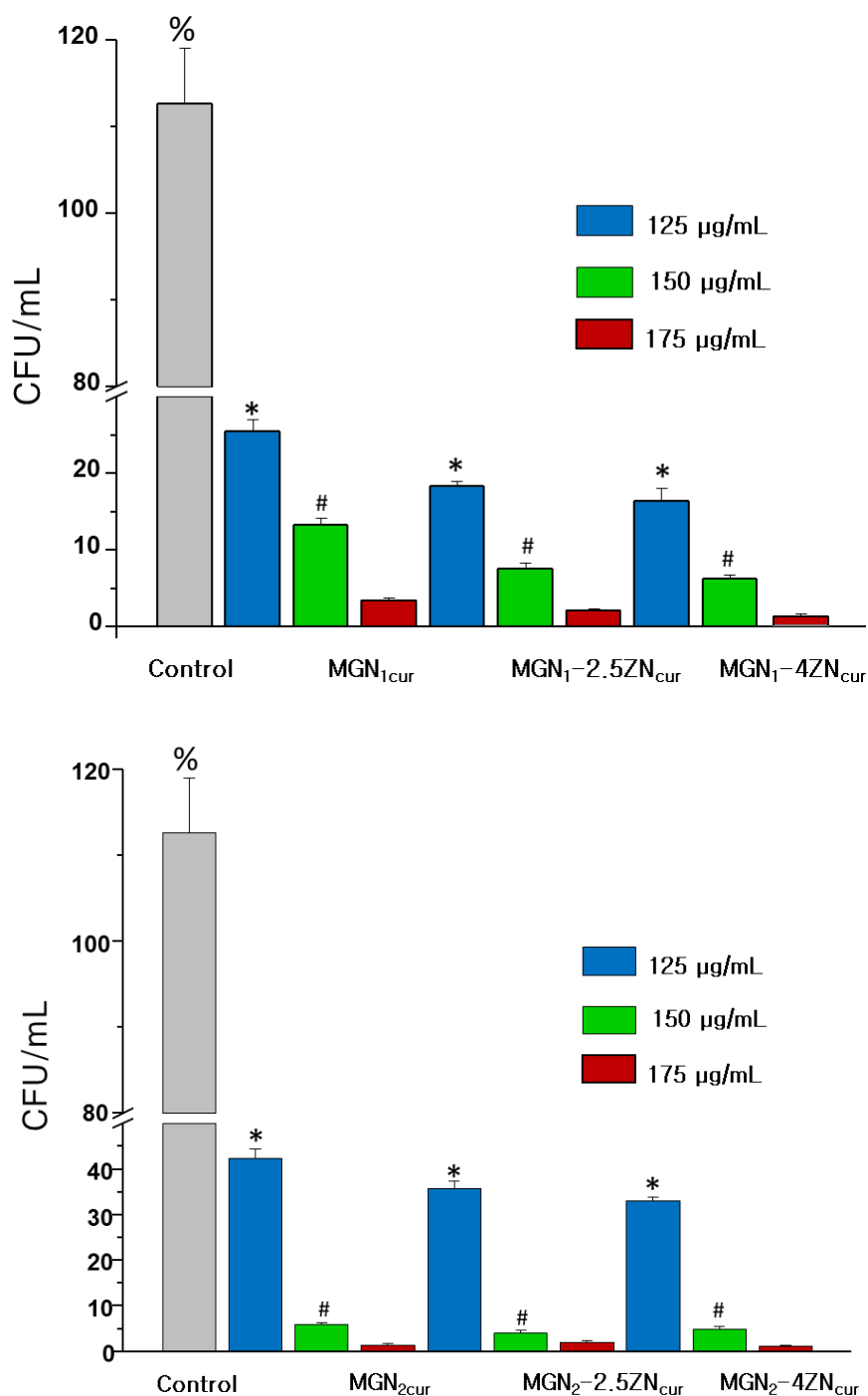


Figura 75. Contaje de CFUs de *S. aureus* que crecieron a pH 7.4 tras 24 h en contacto con los distintos tipos de MGNs a las concentraciones indicadas. % control vs todas las MGNs* MGN_{1,2} vs MGN_{1,2}-2.5ZN_{Cur} y MGN_{1,2}-4ZN_{Cur}.

3.5.4. Conclusiones: nanopartículas de vidrio mesoporoso

En resumen, las MGNs han emergido como una nueva herramienta terapéutica capaz de fomentar la regeneración ósea a la vez que previenen y/o tratan procesos de infección. Se sintetizaron dos tipos distintos de MGN: MGN₁ y MGN₂, dopadas con ZnO a distintas concentraciones: 0% (MGN_{1/2}), 2.5% (MGN_{1/2}-2.5ZN) y 4% (MGN_{1/2}-4ZN). Estas MGNs mostraron un tamaño de aproximadamente 100 nm con poros radiales y diámetros de entre 4.2–7.2 nm, volúmenes de poro de entre 0.5–0.95 cm³/g y áreas superficiales totales de entre 450–600 m²/g. Estas MGNs se cargaron con curcumina en porcentajes de entre 10–16 % en peso consiguiéndose una liberación paulatina de la misma durante, al menos, 28 h y alcanzándose una liberación del 90% de la curcumina cargada.

Todas las MGNs fueron capaces de internalizarse en las células preosteoblásticas de ratón MC3T3-E1 y en las MSCs de conejo tras 2 h en contacto con los cultivos. Ninguna de las MGNs presentó problemas de citotoxicidad, siendo 125 µg/mL la concentración de MGNs óptima tanto para los preosteoblastos MC3T3-E1 como para células madre mesenquimales de conejo. Además, ambos tipos de MGNs dopadas con zinc, presentaron mejor viabilidad, proliferación, mineralización y diferenciación en comparación sus homólogas sin zinc.

La actividad osteogénica observada fue mayor en las MGNs dopadas con zinc, y la carga de curcumina en las MGNs enriquecidas con zinc potenció el efecto antibacteriano del sistema contra *S. aureus*. Teniendo en cuenta estos resultados, el sistema MGN + zinc + curcumina podría ser un buen candidato para terapias relacionadas con la regeneración e infección ósea.

CONCLUSIONES

4. CONCLUSIONES

1. Se han sintetizado tres vidrios mesoporosos bioactivos (MBGs) uno de composición $85\text{SiO}_2\text{--}15\text{CaO--}5\text{P}_2\text{O}_5$ (%-mol) (BL, de blanco) y los otros dos con un 4% (4ZN) y con un 5% de ZnO (5ZN).
2. Los iones Zn^{2+} se incorporan en los MBG afectando muy poco a la superficie específica y al volumen de poro que pasan de $372\text{ m}^2/\text{g}$ y $0.47\text{ cm}^3/\text{g}$, en BL, a 352 y $340\text{ m}^2/\text{g}$ y 0.38 y $0.39\text{ cm}^3/\text{g}$, en 4ZN y 5ZN. Por otra parte, TEM y DRX muestran un alto orden de mesoporos para BL, que va disminuyendo al aumentar el contenido en ZnO. Este orden se aprecia en 4ZN y desaparece en 5ZN que presenta una estructura parcialmente ordenada denominada tipo “canales de gusano”.
3. La compactación de polvos de BL, 4ZN y 5ZN para obtener discos utilizados en los primeros estudios *in vitro* no afecta al orden de poros, pero disminuye la superficie específica y el volumen de poro hasta 287 , 280 y $285\text{ m}^2/\text{g}$ y 0.38 , 0.30 y $0.22\text{ cm}^3/\text{g}$.
4. Los NMR del ^{29}Si de los discos de MBG muestran valores de conectividad de red (Q_n) que no varían sustancialmente en 4ZN (3.55) y 5ZN (3.67) con respecto a BL (3.57). Además, para NMR de ^{31}P se observa un desplazamiento químico en Q^1 tanto en 4ZN como en 5ZN, sugiriendo una conversión parcial de las unidades de P–O–Si en unidades P–O–Zn. Por lo que el zinc actúa fundamentalmente como formador de red con coordinación tetraédrica $[\text{ZnO}_4]^{2-}$.
5. Los discos de BL, 4ZN y 5ZN se cargan con 0.8 , 0.9 y $0.95\text{ }\mu\text{g/g}$ de osteostatina (OST). La liberación de OST a las 24 h fue un 95% para BL y 90% para 4ZN y 5ZN.
6. Los ensayos de los discos en SBF muestran la formación de una capa de hidroxycarbonatoapatita (HCA) en BL tras 1 d, lo que confirma su alta bioactividad. Sin embargo, los iones Zn^{2+} liberados desde 4ZN y 5ZN impiden la formación de HCA en estos materiales incluso a los 21 d. Asimismo, no se encuentran diferencias de comportamiento antes y después de cargar los discos con OST.

Conclusiones

7. Los ensayos de citocompatibilidad de los discos con preosteoblastos MC3T3-E1 demostraron por primera vez, que la OST mejora la capacidad osteogénica *in vitro* de los materiales enriquecidos con Zn^{2+} , lo que sugiere el potencial de este material.
8. Se han fabricado soportes cilíndricos 3D meso-macroporosos (7x5 mm) de BL, 4ZN y 5ZN mediante prototipado rápido que presentan alta superficie específica, 343, 238 y 188 m^2/g y volumen de poro, 0.40, 0.40 y 0.14 m^3/g , respectivamente.
9. Los soportes muestran una porosidad jerarquizada óptima para utilizar como implantes óseos ya que contienen canales (400 y 700–1500 μm) necesarios para el crecimiento interno de células y vasos sanguíneos, macroporos (1–10 μm) que favorecen la adhesión y proliferación celular y los mesoporos propios de los MBGs (~ 5 nm) necesarios para cargar y liberar biomoléculas.
10. Los andamios de MBG muestran valores de Q_n de 3.60 para BL, y ligeramente superiores para 4ZN (3.63) y 5ZN (3.62). Presentan mayor porcentaje de especies Q^3 y menor de Q^2 en comparación con los discos por su doble calcinación, por lo que el zinc actúa fundamentalmente como formador de red. Además, el NMR de ^{31}P revela que el fósforo actúa mayoritariamente como componente de los clusters de ortofosfato y en menor medida como formador de red en el entorno P–O–Si.
11. El recubrimiento de los soportes con gelatina (GE) mejora sus propiedades mecánicas y facilita su manipulación. Asimismo, el recubrimiento provoca el hinchamiento de los soportes (absorbiendo $\sim 30\%$ de agua) que facilita el intercambio de iones y OST con el medio.
12. Los estudios *in vitro* muestran que 4ZN-GE y 5ZN-GE liberan al medio cantidades significativas de iones Zn^{2+} (8 mg/mL a los 10 d). Asimismo, la carga con OST disminuye la superficie específica a 164, 113 y 101 m^2/g y el volumen de poro a 0.17, 0.10 y 0.10 cm^3/g siendo su liberación muy rápida las primeras 2 h (70%) y luego sostenida hasta las 96 h ($\sim 100\%$).

13. Los ensayos *in vitro* de citocompatibilidad con células madre mesenquimales (MSCs) humanas muestran que la composición y la arquitectura 3D de los andamios 4ZN-GE con poros jerárquicos recubiertos con gelatina reticulada con glutaraldehído (GA) facilita la liberación controlada tanto del zinc como de la osteostatina que afecta positivamente en el desarrollo y diferenciación osteogénica de las MSCs en un medio sin los inductores de diferenciación clásicos.
14. Dadas sus excelentes propiedades y citocompatibilidad, los andamios 4ZN-GE se evaluaron *in vivo* en un modelo animal de conejos de Nueva Zelanda en fémur y en cúbito en estudios realizados fuera del ámbito de esta tesis. En este caso se fabricaron y caracterizaron andamios con las dimensiones de cada defecto óseo, 7 mm de diámetro y 10 o 15 mm de longitud. Los andamios se cargaron con OST, se sembraron con MSCs y se trasladaron a los hospitales Miguel Servet de Zaragoza y 12 de Octubre de Madrid en condiciones de ser implantados.
15. Tras 3 meses de implantación, las muestras se analizaron a través varias técnicas. Considerando BV/TV (% de volumen de hueso formado por volumen total) como una medida representativa de la formación ósea, 4ZN-GE+OST+MSC, en el modelo de fémur, y 4ZN-GE+MSC en el modelo de cúbito, mostraron alta capacidad osteogénica y su utilidad para regenerar fracturas óseas.
16. Se ha evaluado la capacidad bactericida de BL-GE y 4ZN-GE antes y después de cargarse con levofloxacino (L), vancomicina (V), rifampicina (R) o gentamicina (G) frente a *E. coli* y *S. aureus* en cultivo planctónico, halo de inhibición y destrucción de biofilm. Todos los antibióticos se liberan del andamio en su concentración mínima inhibitoria (MIC) a las 24 h.
17. Los ensayos de halo de inhibición muestran que la muestra 4ZN-GE cargada con antibiótico (L, V, R o G) inhibe el crecimiento bacteriano, alcanzando los 18 d en el caso de 4ZN-GE-L. El crecimiento bacteriano planctónico se inhibe mediante la acción combinada de los iones Zn^{2+} y la MIC de todos los antibióticos (L, V, G y R) para *S. aureus* y de G y L para *E. coli*. Se logra una destrucción parcial del biofilm de *S. aureus* con BL-GE, 4ZN-GE, 4ZN-GE-G y una destrucción total con 4ZN-GE-R/V/L. Para *E. coli*

Conclusiones

se logra una destrucción parcial con BL-GE, 4ZN-GE, 4ZN-GE-R y una destrucción total con 4ZN-GE-G/V/L.

18. Se han sintetizado nanopartículas mesoporosas de $\text{SiO}_2\text{-CaO-P}_2\text{O}_5$ (MGNs), con 2.5% (MGNs-2.5ZN) o 4% (MGNs-4ZN) de ZnO. Su caracterización muestra que los iones Zn^{2+} se introducen en la estructura del vidrio y revela partículas con morfología esférica, tamaño homogéneo (~ 100 nm), áreas superficiales de entre 604 y 805 m^2/g y volúmenes de poro de entre 0.94 y 1.39 cm^3/g .
19. Las MGNs_{1,2} enriquecidas o no enriquecidas con zinc muestran valores de Q_n de entre 3.53 y 3.82. En la serie MGN₁ la Q_n tiende a decrecer ligeramente por lo que el zinc actúa como formador de red. En las MGN₂ la Q_n disminuye gradualmente y más sustancialmente con la cantidad de zinc por lo que este actúa como modificador de red. Además, en NMR de ^{31}P se observa que el fósforo únicamente aparece en las MGNs enriquecidas con zinc, por lo que se propone que el zinc ayuda a la incorporación de fósforo mayoritariamente como clústeres de ortofosfato amorfo embebidos en la red de vidrio.
20. Los ensayos *in vitro* con células MC3T3-E1 y MSCs de conejo, obtenidas en esta tesis a partir de aspirado de médula ósea, revelan un desarrollo celular óptimo a una concentración de MGNs de 125 $\mu\text{g}/\text{mL}$. A esta concentración se observa un aumento significativo en la internalización, diferenciación y mineralización de ambos tipos celulares en las MGNs con zinc.
21. Los ensayos antibacterianos con *S. aureus* se realizan después de cargar las MGNs con curcumina como antibacteriano natural alternativo. Se observa inhibición del crecimiento planctónico y muerte bacteriana al aumentar la concentración de MGNs y con la combinación del zinc y la curcumina.

En resumen, se puede concluir que se han conseguido diseñar, sintetizar, caracterizar y evaluar *in vitro* y/o *in vivo* distintos biomateriales con base de vidrio mesoporoso, dopados con zinc y cargados con distintas biomoléculas (osteostatina y curcumina) y fármacos (levofloxacino, vancomicina, rifampicina y gentamicina). Estos materiales muestran biocompatibilidad y capacidades osteogénicas y antibacterianas, por lo que constituyen herramientas terapéuticas prometedoras para la ingeniería de tejidos, la infección y la regeneración ósea.

ANEXO I: MATERIAL Y MÉTODOS

5. ANEXO I: Materiales y métodos

5.1. Biomateriales estudiados

5.1.1. Vidrios mesoporosos bioactivos

5.1.1.1. Síntesis de los vidrios mesoporosos bioactivos

Los vidrios mesoporosos bioactivos, se sintetizaron a través del método EISA (Evaporation Induced Self Assembly), empleando 4.5 g de Pluronic F123 como surfactante, 85 mL (99,98%) de etanol como disolvente y 1.2 mL de HNO_3 0.5 N como agente catalizador (figura 76). La reacción se mantuvo durante 1 h en condiciones de agitación a 250 rpm, cubriendo el vaso de precipitados con Parafilm® para evitar la evaporación del disolvente. Posteriormente, las cantidades correspondientes de TEOS, $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, TEP y $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ se añadieron como fuentes de SiO_2 , CaO, P_2O_5 y ZnO respectivamente (todos los reactivos se adquirieron de Sigma–Aldrich, St. Louis, MO, USA). Así, 8.9 mL de TEOS se añadieron y se dejaron reaccionar durante 3 h, seguidos de la adición de 0.71 mL de TEP que se dejaron reaccionar durante otras 3 h. Después se añadieron, 1.10 g de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ y las distintas cantidades de $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ dependiendo de la cantidad de zinc requerida (0 g para los andamios sin dopar con zinc denominados como BL, 0.60 g para los materiales dopados con un 4% de zinc y nombrados como 4ZN o 0.75 g para los materiales dopados con un 5% de zinc y nombrados como 5ZN). La solución se agitó vigorosamente a 250 rpm durante todo el proceso. Una vez se añadieron todos los reactivos, se mantuvo en condiciones de agitación a temperatura ambiente durante toda la noche (14 h). Posteriormente, la disolución se distribuyó en placas petri (30 mL/placa) que se mantuvieron a 30 °C durante 7 días para que el etanol se vaporara (figura 76). Las membranas transparentes resultantes se calcinaron durante 6 h a 700 °C con una rampa de subida de 1°C/min. Finalmente, el material se trituyó en un mortero de vidrio y se tamizó en un tamiz con poros de 40 µm obteniéndose el polvo de MBG (figura 76).

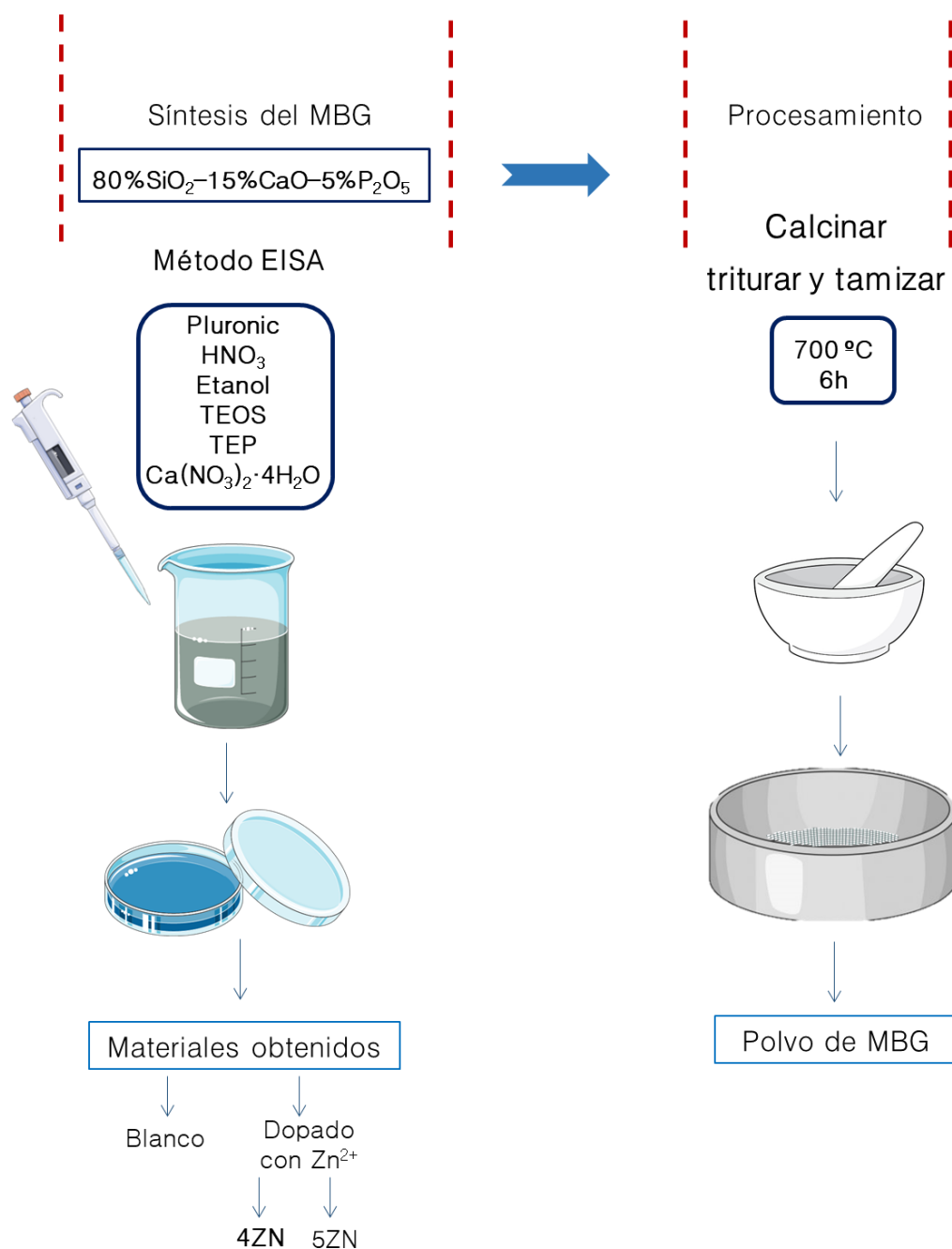


Figura 76. Esquema del proceso de síntesis y procesamiento de los MBGs.

5.1.1.1.1. Fabricación de los discos de MBG

Se emplearon 70 mg del polvo de vidrio mesoporoso bioactivo para compactar discos de 6 mm de diámetro y 2 mm de altura mediante presión uniaxial de 5 MPa.

5.1.1.1.2. Fabricación de los andamios de MBG

Para fabricar los andamios tridimensionales de vidrio mesoporoso bioactivo, se emplearon 4.5 g de polvo que se mezclaron con 37 mL de diclorometano (DCM) a temperatura ambiente y condiciones de agitación a 250 rpm. De igual forma y en paralelo, se disolvieron 2.5 g de ϵ -policaprolactona (PCL) ($M_w = 58,000$ Da) (Sigma-Aldrich) en 25 mL de DCM. Una vez se disolvieron ambos compuestos, se mezclaron ambas soluciones, manteniéndose la reacción en marcha hasta que el DCM se evaporó. Cuando se consiguió que la pasta presentara la consistencia adecuada para poder utilizarse en la maquinaria de impresión 3D de prototipado rápido equipment 3D BioplotterTM (EnvisionTEC, Gladbeck, Alemania), se cargó en el cartucho de polietileno correspondiente, utilizándose una punta de 0.55 mm de diámetro con ajuste de separación de barra de 1.5 mm. Cada una de las capas dispensadas se generaba con un ángulo de 45 grados con respecto a la anterior, dibujándose dos tipos de canales romboidales. La velocidad de la punta se ajustó a 50 mm/min en el plano horizontal o vertical, respectivamente. Como resultado, se obtuvieron cilindros de 7 mm de diámetro y 5 mm de altura. Los restos de diclorometano se eliminaron secando los andamios a 37 °C durante 24 h. Posteriormente, estos se calcinaron a 700 °C durante 6 h para eliminar la PCL. Las piezas resultantes se recubrieron con glutaraldehído entrecruzado con gelatina al 2.4 wt% con el objetivo de mejorar las propiedades mecánicas del material. Una vez se obtuvieron los andamios recubiertos con gelatina, pasaron a denominarse BL-GE, 4ZN-GE y 5ZN-GE (figura 77).

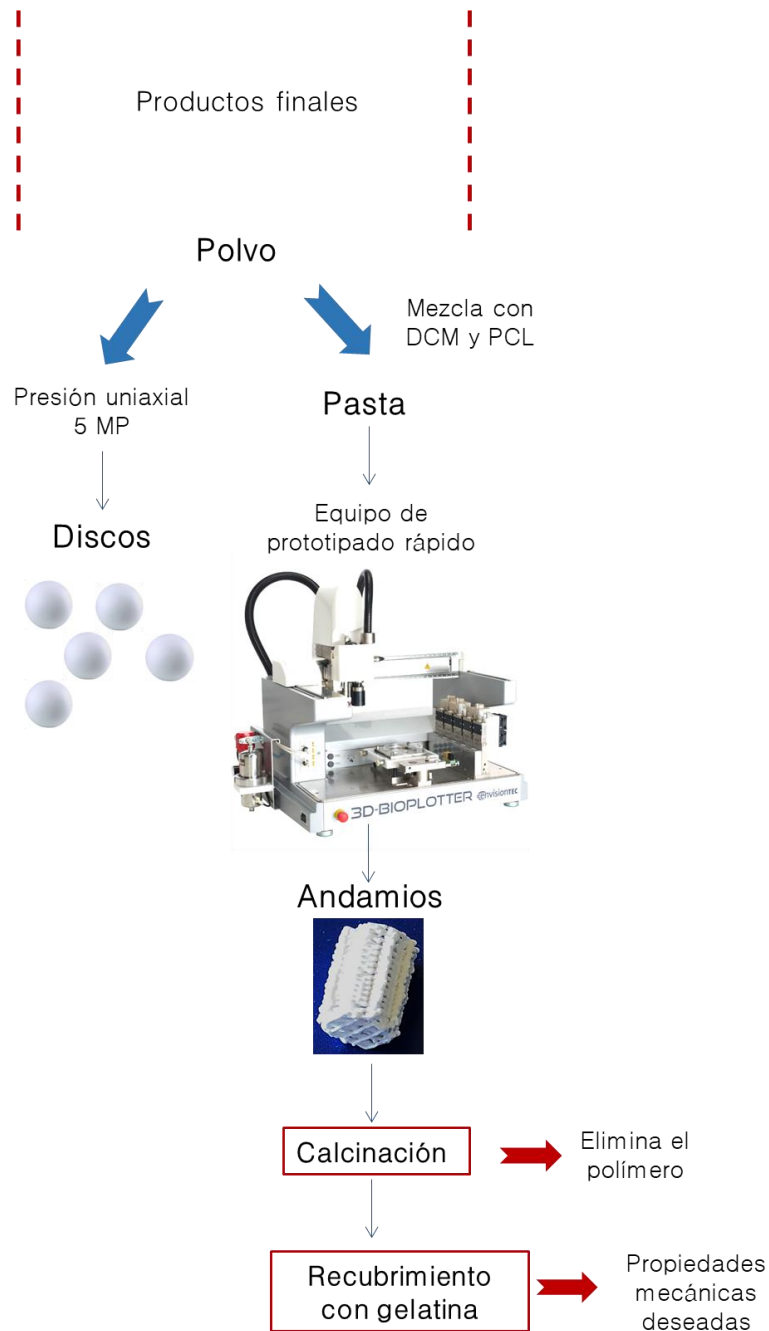


Figura 77. Materiales obtenidos tras el proceso de síntesis y fabricación.

5.1.1.2. Caracterización fisicoquímica de los materiales

Con el objetivo de estudiar el área superficial y el volumen y tamaño de poro, se llevaron a cabo medidas de porosimetría de adsorción de nitrógeno en los discos de MBG, los andamios de MBG calcinados y los andamios de MBG recubiertos con gelatina. Los análisis se llevaron a cabo a $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ empleando un equipo Micromeritics ASAP 2020 (Micromeritics, Norcross,

USA). Para empezar, las muestras (entre 100 y 150 mg del material) se desgasificaron a 200 °C durante 24 h y bajo una presión de vacío de <0.3 kPa. El área superficial (S_{BET}) se determinó mediante el método Brunauer–Emmett–Teller (BET) [303]. El volumen total de poro (V_{T}) se calculó a través del volumen total de N_2 adsorbido a una presión relativa de 0.97. La posible existencia de microporos (< 2 nm) se analizó a través del método t-plot. El tamaño medio de diámetro de los mesoporos se determinó mediante la rama de adsorción de la isoterma empleando el método Barrett–Joyner–Halenda (BJH) [304]. La presencia de posible orden en los mesoporos se investigó mediante difracción de rayos X de bajo ángulo (SA–XRD) en un difractómetro Philips X’Pert (Eindhoven, Alemania) equipado con una fuente de radiación Cu Ka (longitud de onda 1.5418 Å). Los patrones de SA–XRD se registraron durante 2 h en el rango entre 0.6° y 0.8°, en un intervalo de 0.02° y un periodo de tiempo de 0.5 s entre medidas. El orden de los mesoporos también se evaluó mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM) en un microscopio JEOL2100 operando a 200 kV (Tokio, Japón). Además, los andamios 3D de MBG se estudiaron mediante porosimetría de adsorción de mercurio para analizar la macroporosidad de las muestras en un equipo Micromeritics Autopore IV 9500 device (Norcross, GA, USA). Para analizar la composición de las distintas muestras, se empleó espectroscopia infrarroja transformada de Fourier (FITR). Las medidas se realizaron en un equipo Thermo Scientific Nicolet iS10 apparatus (Waltham, MA, USA) equipado con una SMART Golden Gate° attenuated total reflection ATR, un accesorio de reflectancia difusa. Para estudiar la interconexión de los macroporos y su composición química se llevó a cabo microscopía electrónica de barrido (SEM) en un equipo JEOL JSM–6400 (Tokio, Japón) operando a 20 kV y equipado con un espectrofotómetro de dispersión de rayos X (EDX) Oxford Instruments INCA. Se realizaron micrografías de SEM de los distintos materiales con el objetivo de describir la morfología de su superficie y su interior. La materia orgánica presente en los materiales se estudió mediante termogravimetría (TGA). Se realizaron también estudios de Resonancia Magnética Nuclear (NMR) para estudiar el entorno atómico de los átomos de fósforo y silicio empleando un espectrómetro Bruker Avance AW–400WB (Karl–sruhe, Alemania). Las muestras se trataron a 10 and 6

kHz para el ^{29}Si y el ^{31}P , ajustando las frecuencias del espectrofotómetro a 79.5 y 162.0 MHz, respectivamente. Los valores de variación química se referenciaron con respecto al tetrametilsilano (TMS) y el H_3PO_4 para ^{29}Si and ^{31}P , respectivamente.

Pruebas específicas en andamios de MBG

– Ensayo de liberación de iones

Para medir el grado de solubilidad de los materiales, los andamios tridimensionales se colocaron en una placa transwell de 12 pocillos en contacto con 2 mL del medio de cultivo Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM), suplementado con un 10% de suero fetal bovino, 2 mM de glutamina y un 1% de penicilina–estreptomicina, en condiciones de agitación durante 10 días. El medio de cultivo se fue extrayendo cada día para medir los iones que se habían liberado, añadiéndose medio nuevo en cada tiempo para continuar con la liberación. Se realizó un seguimiento de la concentración de los iones de Ca, P y Zn que se midieron mediante ICP/OES utilizando un equipo OPTIMA 3300 DV Perkin Elmer device (Waltham, MA, USA). La concentración de cada ion se determinó midiéndolo en dos muestras diferentes, realizando cada medida por triplicado.

– Ensayo de rehidratación

Con el objetivo de estudiar el comportamiento que presentaban los andamios tridimensionales en un medio acuoso, los distintos tipos de andamios dopados (4ZN, 5ZN) y no dopados (BL) con zinc y recubiertos con gelatina (4ZN–GE, 5ZN–GE y BL–GE), se introdujeron en agua destilada a 37 °C. El porcentaje de hidratación de los materiales se determinó mediante la siguiente ecuación (1):

$$\%W_{\text{REHIDRATACION}} = 100 \times (W_t - W_d/W_d) \quad (1)$$

Donde W_t es el peso de los andamios a tiempo t , y W_d es el peso de la muestra seca. Los valores de W_t se determinaron a diferentes tiempos,

hasta que los andamios alcanzaron un punto de equilibrio en el que no absorbían más agua.

5.1.2. Nanopartículas de vidrio mesoporoso

5.1.2.1. Síntesis de las MGNs

Los distintos tipos de MGNs se sintetizaron de acuerdo con el método descrito por Q. Liang et al. [220] a través del método sol-gel mejorado, utilizando microembulsiones de agua, etil acetato y bromuro de hexadecil trimetilamonio (CTAB) como estructura orgánica. Se sintetizaron dos tipos de MGNs distintas: MGN₁ (60-SiO₂-4-P₂O₅-(36-X)-CaO) y MGNs₂ (79.5 SiO₂-2.5-P₂O₅-(18-X)-CaO) en %mol. Ambas composiciones se doparon con zinc (X = 0, 2.5 y 4 %mol) obteniéndose como resultado seis tipos diferentes de MGNs denominadas MGN_{1/2} para las MGNs sin zinc MGN_{1/2}-2.5ZN para las MGNs dopadas con un 2.5% de zinc y MGN_{1/2}-4ZN para las MGNs dopadas con un 4% de zinc.

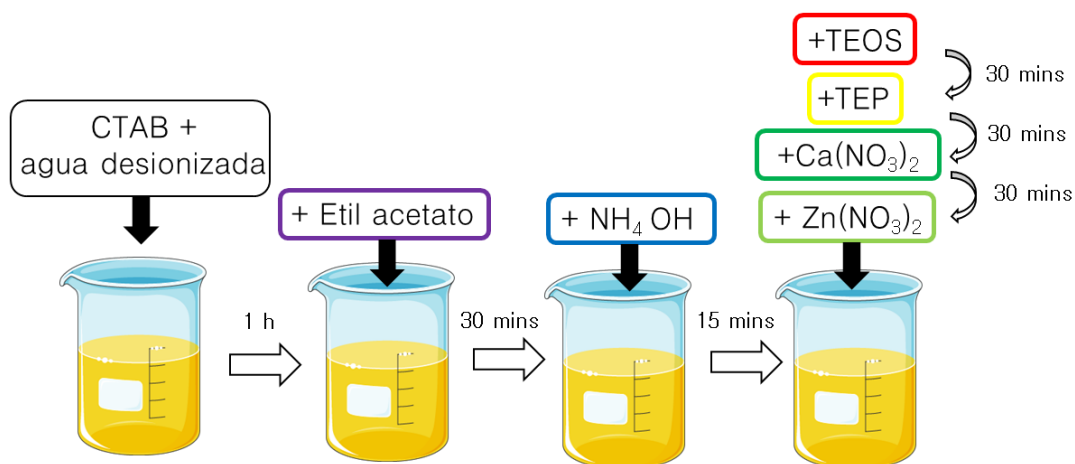


Figura 78. Esquema del proceso de síntesis de las MGNs.

La síntesis comienza con la disolución de 0.35 g de CTAB en 16.5 mL de agua miliQ durante 1 h a 30 °C (figura 78). Después, se añaden 5 mL de acetato de etilo y se dejan reaccionar durante 30 min, 3.5 mL de amonio (NH₄ 1M) que reaccionan durante 15 min y posteriormente se van añadiendo las cantidades TEOS, TEP, nitrato de calcio tetrahidratado (CaNO₃·4H₂O) y

nitrate de zinc hidratado ($\text{ZnNO}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$) indicadas en la tabla 20 en intervalos de 30 min, dejándose reaccionar finalmente durante 4 h. La solución final se centrifuga a 11 000 rpm y 4 °C, se lava 3 veces con etanol absoluto y una última vez con agua antes de dejarse secar a 60 °C durante 24 h. Finalmente se calcina a 650 °C durante 4 h.

Tabla 20. Reactivos y cantidades empleadas para la síntesis de los distintos tipos de MGNs.

Nomenclatura	Composición	TEOS (mL)	TEP (mL)	$\text{CaNO}_3 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (g)	$\text{ZnNO}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (g)
MGN₁	60-SiO ₂ - 4P ₂ O ₅ - 36CaO	1.80	0.18	1.14	-
MGN₁-2.5ZN	60-SiO ₂ - 4P ₂ O ₅ - 33.3CaO- 2.5ZnO	1.80	0.18	1.06	0.07
MGN₁-4ZN	60-SiO ₂ - 4P ₂ O ₅ - 32CaO- 4ZnO	1.80	0.18	1	0.14
MGN₂	79.5-SiO ₂ - 2.5P ₂ O ₅ - 18CaO	2.36	0.11	0.56	-
MGN₂-2.5ZN	79.5-SiO ₂ - 2.5P ₂ O ₅ - 15. CaO- 2.5ZnO	2.36	0.11	0.49	0.07
MGN₂-4ZN	79.5-SiO ₂ - 2.5P ₂ O ₅ - 14CaO- 4ZnO	2.36	0.11	0.42	0.14

Síntesis de las MGNs marcadas con fluoresceína

Para llevar a cabo los estudios de internalización, las MGNs se marcaron con fluoresceína, molécula fluorescente que permite observar las MGNs en el cultivo celular cuando se las excita con la longitud de onda indicada. Para ello, se mezcló 1 mg de fluoresceína con 2.2 µL de 3-aminopropiltietoxisilano (APTS) y 100 µL de etanol absoluto. La solución se dejó reaccionando durante 2 h en condiciones de agitación y temperatura ambiente. Posteriormente, se extrajeron 2 µL de esta solución por cada mL de TEOS a añadir en la reacción y se mezclaron ambos compuestos. En el momento en el que se ha de añadir el TEOS a la reacción, se añade la mezcla explicada anteriormente y se continúa con el proceso de síntesis en condiciones de oscuridad para que la fluoresceína no se degrade con la luz. Las MGNs marcadas con fluoresceína no se pueden calcinar, por lo que se sustituye por un proceso de extracción. Para realizarlo, se preparó una disolución extractora mezclando 20 g de NH_4NO_3 en 1L de etanol absoluto. Posteriormente se extrajeron 60 mL de esta disolución, se mezclaron con 60

mL de etanol absoluto y 250 mg de MGNs. La mezcla se mantuvo en una columna de reflujo durante 2 h a 70 °C y condiciones de agitación. Después, las MGNs se centrifugaron a 11 000 rpm y 4 °C durante 10 min y, posteriormente, se realizaron tres lavados con etanol y uno con agua en las mismas condiciones de centrifugación. Al acabar las MGNs se secaron en una estufa a 60 °C durante la noche.

5.1.2.2. Caracterización de las MGNs

Se llevaron a cabo distintas técnicas para caracterizar fisicoquímicamente las distintas MGNs. Se realizaron estudios de potencial Z y DLS (Dynamic Light Scattering) para analizar el tamaño y la carga de las MGNs a pH 7.4 en un equipo Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments Ltd) equipado con un láser de 633 nm. Con el objetivo de analizar el área superficial, tamaño y volumen de poro de las MGNs, se llevaron a cabo estudios de porosimetría de adsorción de nitrógeno a -196 °C en un equipo Micromeritics ASAP2020 (Micromeritics, Norcross, USA). El primer paso consistió en la degasificación de las muestras a 200 °C durante 24 h bajo una presión de vacío de <0.3 KPa. El área superficial (S_{BET}) se determinó mediante el método Brunauer-Emmett-Teller (BET). El volumen total de poro (V_{T}) se calculó a través del volumen total de N_2 adsorbido a una presión relativa de 0.97. La posible existencia de microporos (< 2 nm) se analizó a través del método t-plot. El tamaño medio de diámetro de los mesoporos se determinó mediante la rama de adsorción de la isoterma, empleando el método Barrett-Joyner-Halenda (BJH). La presencia de posible orden en los mesoporos se investigó mediante difracción de rayos X de bajo ángulo (SA-XRD) en un difractómetro Philips X'Pert (Eindhoven, Países Bajos) equipado con una fuente de radiación Cu Ka (longitud de onda 1.5418 Å). Los patrones de SA-XRD se registraron durante 2 h en el rango entre 0.6° y 0.8°, en un intervalo de 0.02° y un periodo de tiempo de 0.5 s entre medidas.

El orden de los mesoporos también se evaluó mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM) en un microscopio JEOL2100 operando a 200 kV (Tokio, Japón). Se llevaron a cabo análisis EDX en un equipo Oxford Instruments INCA, para cuantificar la composición iónica de las MGNs. Para analizar la composición de las distintas muestras, se empleó espectroscopia

infrarroja transformada de Fourier (FTR). Las medidas se realizaron en un equipo Thermo Scientific Nicolet iS10 apparatus (Waltham, MA, USA) equipado con una SMART Golden Gate® attenuated total reflection ATR, un accesorio de reflectancia difusa. La materia orgánica presente en los distintos tipos de MGNs se estudió mediante termogravimetría (TGA). Se realizaron también estudios de Resonancia Magnética Nuclear (NMR) para analizar el entorno atómico de los átomos de fósforo y silicio empleando un espectrofotómetro Bruker Avance AW-400WB (Karl-sruhe, Alemania). Las muestras se trataron a 10 and 6 kHz para el ^{29}Si y el ^{31}P , ajustando las frecuencias del espectrofotómetro a 79.5 y 162.0 MHz, respectivamente. Los valores de variación química se referenciaron con respecto al tetrametilsilano (TMS) y el H_3PO_4 para ^{29}Si and ^{31}P , respectivamente.

5.2. Estudios *in vitro*

Los discos de MBG se testaron con la línea celular MC3T3-E1 (subclone 4, CRL-2593; ATCC, Mannassas, VI) [142,149], línea celular establecida de células preosteoblásticas de ratón. Los andamios tridimensionales de MBG se testaron con células madre mesenquimales humanas (MSCs) de médula ósea (Lonza, Walkersville, MD, USA). Las MGNs mesoporosas de sílice se testaron con MC3T3-E1 y con MSCs de conejo extraídas manualmente de la médula ósea de huesos largos de conejos de la raza “New Zealand”. Todos los materiales se esterilizaron previamente con radiación ultravioleta (30 min/cara) en una cabina de flujo laminar.

5.2.1. Discos de MBG

Ensayos de bioactividad en fluido biológico simulado (SBF)

La actividad *in vitro* del material base (discos de MBG), se evaluó mediante un ensayo en SBF. El SBF se pasó previamente por un filtro de 0.22 μm de diámetro para prevenir infecciones bacterianas. Los discos se colocaron en frascos de polietileno que contenían 13 mL de SBF de acuerdo con la ecuación $V_s = S_a/10$ (siendo V_s el volumen de SBF en mL y S_a el área superficial externa de los discos en mm^2). Dentro del SBF, los discos se

colocaron de forma vertical gracias a una “cesta” fabricada con hilos de platino. Se mantuvieron inmersas durante 6 h, 24 h, 3 días, 7 días, 14 días y 21 días a pH 7.4 y 37 °C [305], realizándose dos réplicas de cada material y tiempo además de controles en los que solo había SBF. Antes y después de los ensayos, los discos fueron caracterizados mediante difracción de rayos X (XRD, 2θ desde 10–70) en un equipo X’Pert-MPD (Philips), espectroscopia infrarroja transformada de Fourier (FTIR) en un equipo Thermo Scientific Nicolet iS10 (KBr pellet method), y microscopía electrónica de barrido (SEM) en un equipo JSM-6400 (JEOL) (Tokio, Japón) equipado con un sistema de espectroscopia EDX (Oxford Instruments, Abingdom, UK). Además, los cambios en la concentración de iones Ca^{2+} y los cambios de pH del medio se analizaron con un sistema sensitivo de electrodos ILyte® (Diamond Diagnostics, Holliston, MA, USA). Mediante este ensayo se valoró la bioactividad que presentaría el material *in vivo*, en contacto con los fluidos biológicos, determinada mediante el análisis de la formación de una capa de ACP en la superficie del material que, posteriormente, cristaliza convirtiéndose en una capa de nanocristales de HCA análogos a los que existen en el hueso [306].

Carga y liberación de osteostatina

Para la carga de osteostatina, los distintos tipos de discos de MBG se colocaron en placas de 24 pocillos en las que se introdujo 1 mL de PBS (phosphate-buffered saline) a pH 7.4 y una concentración de osteostatina de 100 nM (figura 79). Las muestras se mantuvieron en condiciones de agitación (400 rpm) a 4 °C durante 24 h. La adsorción de la osteostatina se analizó comparando la cantidad osteostatina que había en el medio al empezar el proceso de carga y 24 h después. Las medidas se llevaron a cabo mediante espectroscopía UV a 280 nm utilizando un equipo NanoDrop ND-2000 (NanoDrop Technologies, Thermo Fisher Scientific, Wilmington, DE, USA). La liberación de osteostatina se analizó introduciendo cada uno de los materiales cargados en PBS, a 37 °C y condiciones de agitación, midiendo la cantidad de osteostatina liberada después de 1, 2, 24, 48, 72

y 96 h mediante espectroscopía UV a 280 nm utilizando el mismo equipo que en la carga.

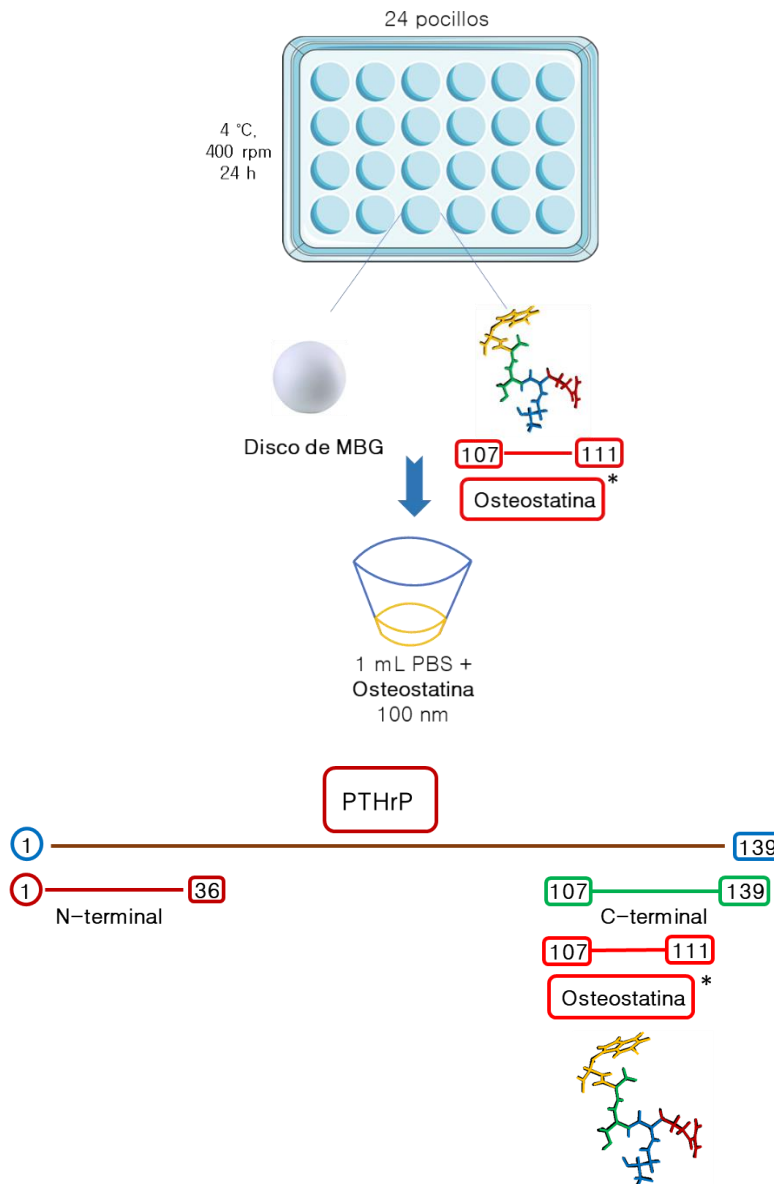


Figura 79. Proceso de carga de la osteostatina en los discos de MBG y estructura de la molécula.

Ensayos de citocompatibilidad con células MC3T3-E1

Los distintos tipos de discos (BL, 4ZN y 5ZN) se colocaron en placas de 6 y 24 pocillos. Posteriormente, se sembraron 20.000 células/cm² en 2 mL de medio α -MEM (Gibco Minimum Essential Media, ThermoFisher Scientific), suplementado con 10% de FBS, 2 mM de glutamina y 1% de penicilina-estreptomicina, a 37 °C en una atmósfera húmeda con un 5% de CO₂. Las

células de incubaron durante distintos tiempos de entre 1 y 13 días, cambiándose el medio cada dos días. Como control se emplearon pocillos con células, pero sin material.

– Viabilidad

El número de células vivas, en cada uno de los tiempos seleccionados, se determinó mediante ensayo de MTS (3-(4,5-dimetilpolisol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolio), método colorimétrico que determina la población de células vivas en cultivo, empleando el equipo CellTiter 96® AQueous Assay (Promega, Madison, WI, USA). La viabilidad celular se midió a las 10 h de cultivo en la superficie de la pastilla. Entre los días 2 y 5, la viabilidad se midió tanto en la superficie del material, como en la superficie del pocillo. Para llevar a cabo este método, se extrajo el medio de cultivo, se lavaron los pocillos con PBS y se añadieron 40 µL del reactivo CellTiter 96® AQueous One [3-(4,5-dimetilpolisol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolio, sal (MTS)] y el reactivo de acoplamiento de electrones (etosulfato de fenazina), que permite la formación de una solución estable, en cada pocillo, obteniéndose un volumen total de 200 µL que se mantuvieron en contacto con las células durante 4 h. Posteriormente, se evaluó la cantidad de formazán que se había producido en este periodo de tiempo, midiendo la absorbancia a 490 nm en un equipo de espectrofotometría Unicam UV-500. La cantidad de formazán es directamente proporcional a la cantidad de células vivas presentes en el cultivo.

– Morfología

Se analizó la morfología de las células MC3T3-E1, sembradas en los distintos discos de MBG, mediante un microscopio óptico invertido Eclipse TS100 (Nikon) (Amsterdam, Países Bajos) después de 24 h de cultivo. También se llevaron a cabo ensayos de microscopía de fluorescencia para observar las células que se habían adherido al material. Para ellos, las células se fijaron, permeabilizaron e incubaron con faloidina, Atto 565–

conjugated (disolución 1:40, Molecular Probes, Sigma–Aldrich, St. Louis, MO, USA) que tiñe los filamentos de actina del citoesqueleto de las células. Después, los pocillos se lavaron con PBS y se tiñeron los núcleos celulares con Dihidrocloreto de 2–(4–amidino–fenil)–6–indolecarbamidina (DAPI) (Molecular Probes). El marcaje celular se analizó en un microscopio óptico EVOS FL Cell Imaging System (Waltham, MA, USA) equipado con tres tipos distintos de luces led (kEX (nm); kEM (nm): DAPI (357/44; 447/60), RFP (531/40; 593/40) de AMG (Advance Microscopy Group, Bothell, WA, USA).

– Actividad enzimática

La actividad de la fosfatasa alcalina (ALP) se midió después de 5 días de cultivo en extractos celulares de MC3T3–31 obtenidos añadiendo 0.1% de Tritón X–100 y empleando nitrofenilfosfato como sustrato [307]. La actividad de la ALP se normalizó con la cantidad de proteína total, determinada mediante el método Bradford, utilizando albúmina de suero bovino como referencia.

– Mineralización

La mineralización celular se midió después de 12 días de cultivo en la población celular de MC3T3–E1, utilizando para ello tinción de rojo de alizarina [242]. Se extrajo el medio de cultivo, se lavaron las células con PBS y se fijaron con etanol al 75% durante 1 h a temperatura ambiente. Posteriormente, las células se tiñeron con 40 mM de rojo de alizarina (pH 4.2) durante 10–30 min a temperatura ambiente. Después, las células se lavaron con agua destilada y el marcaje se disolvió con 10% de cloruro de cetilpiridinio en 10 mM en PBS. Para finalizar, se midió la absorbancia a 620 nm en un espectrofotómetro Unicam UV–500 (ThermoSpectronic, Cambridge, UK).

– PCR a tiempo real

El RNA total presente en las células MC3T3–E1, se aisló siguiendo el procedimiento estándar (Trizol, Invitrogen, Groningen, Países Bajos).

Posteriormente, se analizó la expresión génica de Runx2, utilizando un sistema de PCR a tiempo real Quant Studio 5 (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, DE, USA). La PCR a tiempo real, se llevó a cabo utilizando cebadores y sondas TaqMan MGB específicos para Runx2, que es el gen que es el que se quiere analizar (Assay-by-Design SM, Applied Biosystems, CA, USA). Las copias de RNAm se calcularon para cada muestra utilizando el valor umbral (Ct). El gen de la enzima glutaraldehído fosfato deshidrogenada (GAPDH) se utilizó como gen control y se amplificó en paralelo a Runx2. La expresión génica relativa se representa mediante la siguiente ecuación $2^{-\Delta\Delta Ct}$, donde $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{\text{gen diana}} - \Delta Ct_{\text{GAPDH}}$. El aumento o disminución en la expresión del gen analizado, se definió como la expresión relativa de dicho gen comparado con el control y se calculó como $2^{-\Delta\Delta Ct}$, donde $\Delta\Delta Ct = \Delta C_{\text{tratamiento}} - \Delta C_{\text{control}}$ [146]. Runx2 (Mm00501578_m1; NM_001146038.2). GAPDH (Mm99999915_g1; NM_001289726.1).

5.2.2. Andamios de MBG

Carga y liberación de osteostatina

Los andamios se cargaron con osteostatina mediante la inmersión de las piezas en un volumen de 2.5 mL de PBS y concentración de osteostatina de 100 nM durante 24 h en condiciones de agitación (100 rpm) y a 4 °C (figura 80). La cantidad de péptido absorbido se calculó midiendo la absorbancia (280 nm) del medio, antes y después de llevarse a cabo el proceso de carga. La liberación de osteostatina por parte de los andamios se llevó a cabo introduciendo los andamios en PBS a 37 °C y condiciones de agitación, y midiendo la absorbancia del medio a 280 nm durante los diferentes tiempos de liberación. Ambas medidas se realizaron en un sistema NanoDrop ND-2000 (NanoDrop Technologies, Thermo Fisher Scientific, Wilmington, DE, USA).

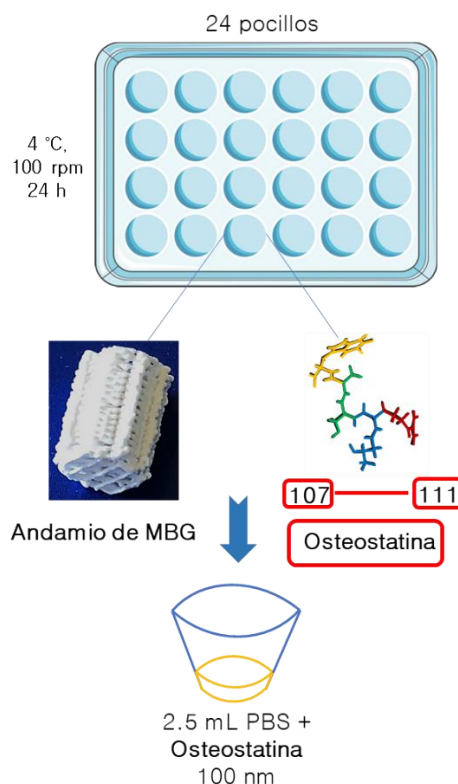


Figura 80. Esquema del proceso de carga de la osteostatina en los andamios de MBG.

Ensayos de citocompatibilidad con MSCs

Las células madre mesenquimales humanas (MSCs) se cultivaron en medio MSCBM o Mesenchymal Stem Cell Basal Medium (MSCBM; Lonza, Walkersville, MD, USA). Una vez alcanzada la confluencia, el cultivo de MSCs se lavó con PBS a pH 7.4 y se tripsinizó utilizando 5 mL de tripsina/0.25% EDTA (Lonza) que se dejó actuar 5 min a 37 °C. Posteriormente, las células se centrifugaron a 1200 g durante 7 min y el pellet resultante se resuspendió en 100 mL de medio de cultivo. El volumen total se añadió, gota a gota, a los andamios tridimensionales de MBG (15×10^4 células/andamio), colocados en placas de 24 pocillos. Posteriormente, se añadieron 1.2 mL de medio de cultivo MSCBM por pocillo y se mantuvo el cultivo a 37 °C en una atmósfera húmeda y con CO₂ al 5% durante diferentes periodos de tiempo.

– Viabilidad

La población de células madre mesenquimales humanas (MSCs) en cultivo, se determinó el día 5 y 7 de cultivo mediante el método Alamar Blue (AbD Serotec, Oxford, UK), siguiendo las instrucciones del fabricante. Se analizó el crecimiento celular en los andamios cargados (BL-GE + OST, 4ZN-GE + OST, 5ZN-GE + OST) y sin cargar con osteostatina (BL-GE, 4ZN-GE, 5ZN-GE) añadiendo un 10% de solución Alamar Blue y dejándola reaccionar con el cultivo durante 4 h. Después, la intensidad de fluorescencia se midió mediante espectrofotometría a longitudes de onda de excitación y de emisión de 560 y 590 nm, respectivamente, mediante un espectrofotómetro BioTek Synergy 4 (Winooski, VT, USA).

– Morfología

La adhesión de las células madre mesenquimales, a los distintos andamios 3D, se analizó mediante microscopía de fluorescencia. Para ello, se extrajo el medio de cultivo de los pocillos y se lavó cada andamio con PBS dos veces seguidas. Después, se fijaron las células con 4% de paraformaldehído en PBS a 37 °C, durante 20 minutos. Los andamios se lavaron nuevamente con PBS y las células se permeabilizaron con 5% de tritón X-100 durante 5 minutos, a 4 °C. Posteriormente, se bloquearon las uniones no-específicas con 1% de albúmina de suero bovino (BSA) en PBS durante 20 min a 37 °C. Entonces, las muestras se incubaron a 37 °C durante 20 min con faloidina Atto 565-conjugated (a dilución 1:40; Molecular Probes, Thermo Fisher, Waltham, MA, USA). Después de lavar los andamios con PBS de nuevo, se tiñó el núcleo celular con DAPI en PBS. La microscopía de fluorescencia se analizó mediante un microscopio confocal laser OLYMPUS FV1200 (OLYMPUS, Tokyo, Japan), utilizando lentes de inmersión en agua 60X FLUOR (NA = 1.0). Las micrografías se obtuvieron mediante el software 3D Imaris que se utilizó para convertir cada una de las imágenes en 2D en micrografías en 3D, utilizando para ello, las secciones Z y un algoritmo que muestra el valor máximo de píxel de cada corte Z de 1 mm.

– Citotoxicidad

La medida de la actividad de la enzima lactato deshidrogenasa (LDH), liberada por parte de las células, cultivadas en contacto con los andamios 3D, se utilizó como referencia de citotoxicidad del cultivo celular. Este procedimiento se basa en la reacción de reducción de la nicotinamida adenina dinucleótida (NAD) por la enzima LDH [229]. El compuesto coloreado resultante se mide mediante espectrofotometría a 340 nm cada 60 s durante 4 min. Este ensayo se llevó a cabo después de 10 días de cultivo utilizando el kit comercial (Spinreact, La Vall D'en Bas, Spain).

– PCR a tiempo real

El RNA total de las MSCs sembradas en los andamios 3D se extrajo después de 7 días de cultivo (Trizol, Invitrogen, Groningen, Países Bajos). Se analizó la expresión génica de los marcadores de diferenciación osteoblástica, ALP y Runx2 mediante PCR a tiempo real, utilizando un equipo QuantStudio5 y el protocolo ya descrito en el apartado 5.2.1 [247].

Estudios bacterianos con *S. aureus* y *E. coli*

La capacidad antibacteriana de los andamios tridimensionales de MBG, dopados con zinc y cargados con distintos fármacos (Levofloxacin, Vancomicina, Gentamicina y Rifampicina), se testó en las cepas modelo *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) y *Escherichia coli* (*E. coli*).

– Carga de los fármacos

Los andamios tridimensionales se esterilizaron con radiación ultravioleta (30 min/cara) y se cargaron, por separado y de forma individual, con cada uno de los fármacos antibacterianos mediante inmersión. Los andamios se colocaron en placas de 12 pocillos y se les añadió la concentración específica de cada antibiótico, disuelta en 3 mL del disolvente correspondiente para cada uno de ellos (figura 81). Dependiendo del experimento, esto se realizó a una concentración saturada de cada uno de los fármacos o a la Concentración Mínima Inhibitoria (MIC=50%) de cada

uno de ellos para cada cepa en concreto. Los andamios se mantuvieron inmersos durante 24 h en condiciones de agitación (100 rpm) y temperatura ambiente. Posteriormente, se lavaron vigorosamente y se secaron en una estufa a 37 °C durante 48 h. Es importante tener en cuenta que LEVO y RIFAM son sensibles a la luz, por lo que todo el proceso se llevó a cabo en condiciones de oscuridad para evitar la degradación de los fármacos. Una vez secos, los andamios se introdujeron en PBS con un pH de 7.4, que corresponde a las condiciones fisiológicas, y a 6.5, que corresponde con el pH que se genera en una infección. Las piezas se mantuvieron a 37 °C y condiciones de agitación (100 rpm) hasta 18 días. Durante este tiempo, se fueron extrayendo alícuotas (500 µL) de PBS de forma periódica para medir, mediante espectrofotometría, la liberación de los antibióticos al medio. No se observaron diferencias significativas de liberación a distinto pH. Por ello, únicamente se muestran los datos de la liberación de los fármacos a pH fisiológico.

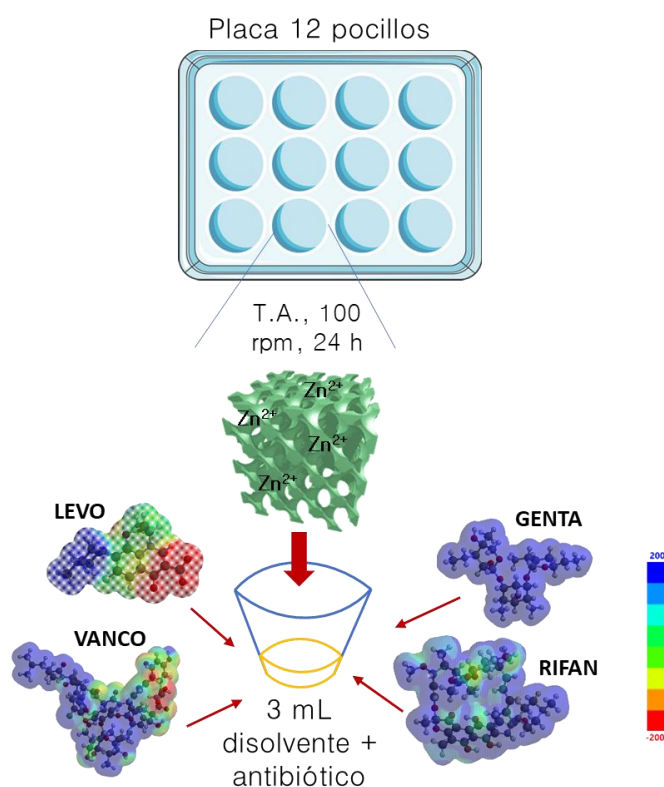


Figura 81. Proceso de carga de cada uno de los antibióticos en los andamios de MBG.

– Modelado molecular

Se llevó a cabo un modelo molecular basado en MCM-41 de base silicio dopado con zinc, ya que presenta una estructura muy similar a la del modelo mesoporoso $\text{SiO}_2\text{-CaO-P}_2\text{O}_5\text{-ZnO}$. Este modelo se realizó utilizando el software Spartan'14 (Wavefunction Inc). La unidad de construcción fue la molécula de Si_6O_{12} , la cual consiste en hexágonos formados a base de unidades de Si-O-Si hasta alcanzar un modelo de 2 nm de altura y 4 nm de diámetro. La estructura final se refinó mediante optimización geométrica usando el campo de fuerza MM+. Los cálculos de las uniones entre átomos se realizaron tomando como referencia la superficie del modelo MCM-41 mediante el software Hex Cuda 8.0 con un modelo cúbico de 10 nm y una dimensión de cuadrícula de 0.6 nm. La correlación se realizó únicamente en cuanto a forma. Para el mapa de potencial electrostático, se tuvieron en cuenta moléculas de gentamicina 5+, rifampicina zwitterionica, levofloxacinó zwitterionico y vancomicina 1+, los cuales se obtuvieron de PubChem (U.S. National Library of Medicine) y se trataron a través de las dinámicas moleculares del Spartan'14 (Wavefunction, Inc).

– Ensayos de halo de inhibición

Los andamios dopados con zinc al 4% (4ZN-GE) y sin dopar con zinc (BL-GE) se cargaron con los distintos antibióticos en condiciones de saturación, se introdujeron en PBS con pH ajustado a 6.5 y 7.4, 37 °C y condiciones de agitación (100 rpm). Se fueron extrayendo alícuotas (20 µL), a distintos tiempos, con las que se cargaron esponjas en forma de disco que se colocaron en placas de agar pre sembradas con las cepas bacterianas *S. aureus* y *E. coli*. Estas pacas se incubaron durante 24 h, 37 °C y de forma estática. Posteriormente, se analizó mediante la siguiente fórmula (2), la inhibición del crecimiento bacteriano que se había conseguido al poner en contacto las sustancias liberadas por el andamio con las bacterias en cultivo. Cada uno de los análisis se realizó por triplicado.

Diámetro del halo de inhibición generado-diámetro del disco/2 (2)

– Ensayos de inhibición del crecimiento planctónico

Los andamios, dopados (4ZN-GE) y no dopados (BL-GE) con zinc, cargados en condiciones de saturación o con la concentración mínima inhibitoria (CMI = 50%) de cada uno de los fármacos para las bacterias a estudio (*S. aureus* y *E. coli*), se colocaron en placas transwell de 12 pocillos. Después, se añadieron 3 mL una disolución de 2×10^8 bacterias/mL, para poner en contacto las bacterias en cultivo con el sistema andamio-antibiótico. Las bacterias se mantuvieron en cultivo a 37 °C y condiciones de agitación, mientras que se fueron extrayendo alícuotas a distintos tiempos (2, 6, 24 y 48 h en los ensayos realizados a concentración saturada de fármaco y 24 h en los ensayos de CMI). Estas alícuotas se diluyeron de forma seriada, y se sembraron en placas de agar que se mantuvieron en cultivo durante 24 h a 37 °C y en condiciones estáticas. Una vez transcurridas las 24 h, se contabilizó el número de CFUs que habían crecido en cada placa de agar. Estos números se compararon entre materiales y fármacos para determinar qué combinación era más efectiva para cada cepa bacteriana.

Para los ensayos a concentración saturada de fármaco, se llevaron a cabo controles de bacterias sin material y bacterias en contacto con el material sin cargar con los fármacos.

Para los ensayos de CMI, se llevaron a cabo controles en los que crecía la población bacteriana en contacto con la CMI del fármaco, pero sin material.

– Ensayos de degradación de biofilm

Se sembró 1 mL de cada una de las cepas bacterianas (*S. aureus* y *E. coli*), a una concentración bacteriana de 2×10^8 bacteria/mL, en un portaobjetos de vidrio y se mantuvo en condiciones de cultivo (37 °C y 100 rpm). Durante las primeras 24 h, el medio de cultivo bacteriano (THB) estuvo dopado con sucrosa al 4%. Después este se reemplazó por THB normal y se mantuvo 24 h más para conseguir la formación del biofilm (figura 82). Los biofilms preformados se colocaron en placas transwell de 12 pocillos donde también se colocaron los distintos andamios dopados (4ZN-GE) o no (BL-GE) con

zinc y cargados o no con los distintos fármacos antibacterianos. Después de 24 h de cultivo celular a 37 °C y 100 rpm, se extrajo el biofilm y se tiñó con un kit de viabilidad celular llamado live and dead BacLigth bacteria viability kit (Thermo Fisher Scientific, Invitrogen™). Se comprobó el efecto del zinc cargado en los andamios, así como el efecto de la combinación de este con los distintos fármacos, observándose la población de bacterias vivas o muertas presentes en el biofilm. Las bacterias vivas se observaban en verde (SYTO 9), las bacterias muertas se veían en rojo (yoduro de propidio) y la matriz extracelular en azul (calcofluor).

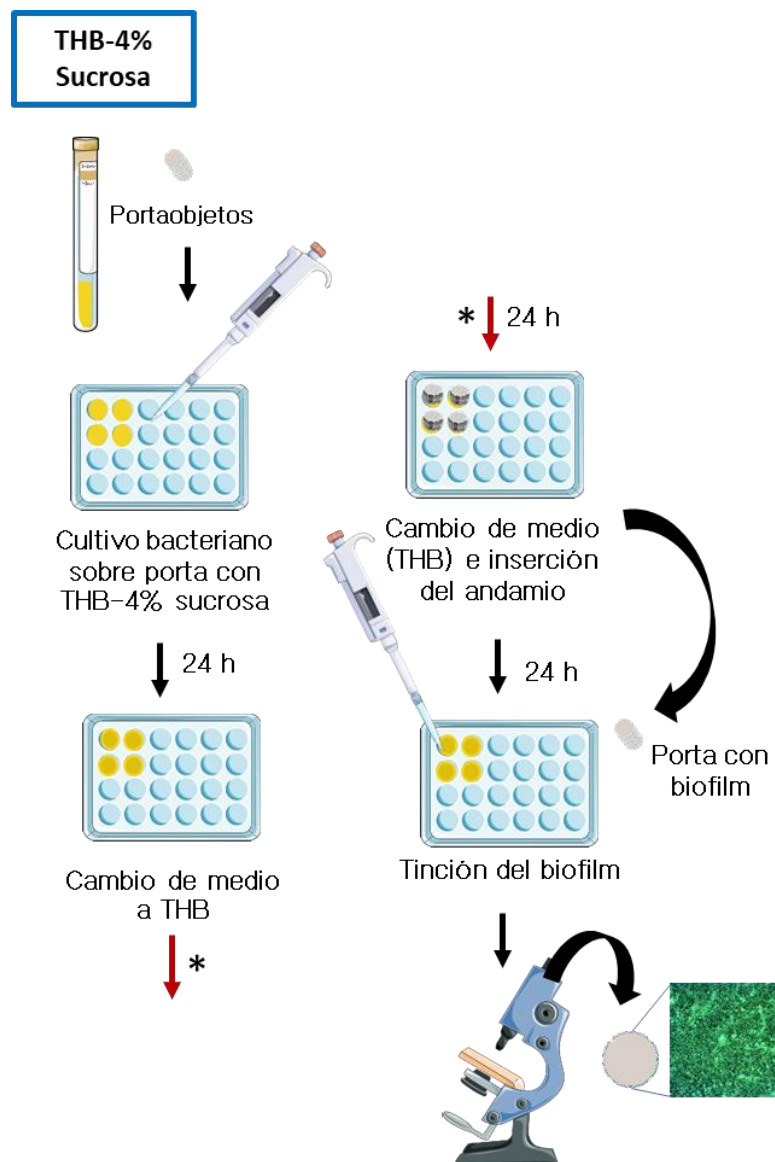


Figura 82. Esquema de la formación del biofilm, la puesta en contacto con los distintos andamios de MBG y visualización de la viabilidad bacteriana a través de su tinción.

5.2.3. Nanopartículas de vidrio mesoporoso

Carga y liberación de curcumina

Para cargar las MGNs con una concentración saturada de curcumina, se dispersaron 100 mg de cada tipo de MGNs en 25 mL de una disolución de curcumina (4 mg de curcumina por mL de etanol) tal y como muestra la figura 83. Las MGNs se mantuvieron en esta disolución durante 48 h a temperatura ambiente y condiciones de agitación (100 rpm). La cantidad de curcumina que se cargó se determinó mediante termogravimetría (TGA) en una atmósfera dinámica de aire entre los 30 °C y 100 °C (10 mL/min flux, 10°C/min) en un quipo Perkin–Elmer Diamond. Para analizar la liberación de la curcumina, se extrajeron 0.5 mL de MGNs cargadas, dispersadas en PBS (4 µg de MGNs por mL de PBS) que se colocaron en el transwell de una placa de 12 pocillos. Se añadieron 1.5 mL de PBS en cada pocillo y la placa se mantuvo a 37 °C en agitación. Se extrajo el volumen completo de cada pocillo a cada uno de los tiempos y se midió mediante espectrofotometría a $\lambda = 420$ nm por triplicado (Biotek Synergy). Se añadió PBS fresco en cada pocillo a cada tiempo de medida para continuar con la liberación de la curcumina.

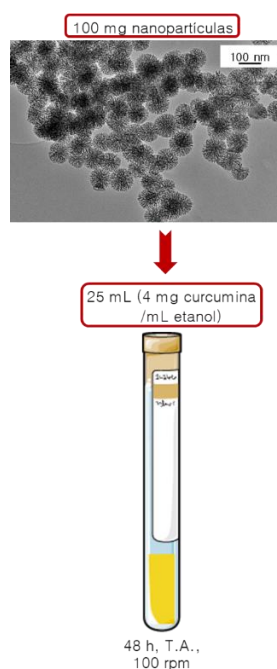


Figura 83. Proceso de carga de las MGNs con curcumina.

Ensayos de citocompatibilidad

a) Con células MC3T3–E1

La línea celular establecida de células preosteoblásticas de ratón MC3T3–E1 (subclon 4, CRL–2593; ETCC, Mannassas, VA.) se empleó para testar el comportamiento de las MGNs de MBG en cultivo celular. Estas células se sembraron en placas de 24 pocillos a una concentración de 5×10^4 células/mL utilizando α –MEM (Gibco, BRL) suplementado con 10% de FBS (FBS, Invitrogen, California, EE. UU.), 1% de L–glutamina (Gibco, BRL) y 1% de penicilina (Invitrogen, California, EE. UU.) como medio de cultivo. Las células se cultivaron en una estufa a 37 °C en atmósfera húmeda y 5% de CO₂.

b) Con MSCs de conejo

Las MSCs de conejo, se extrajeron, purificaron y expandieron partiendo de la médula ósea de conejos de la raza “New Zealand”. Los huesos empleados para este procedimiento han de ser huesos largos como tibia o fémur. Tras sacrificar los conejos, como parte de otros ensayos, estos huesos se extrajeron, limpiaron y esterilizaron. Posteriormente se generó una incisión en la epífisis empleando agujas de insulina. Una vez se generó el orificio, esta misma aguja se cargó con medio de cultivo específico para MSCs (MSCBM o Mesenchymal Stem Cell Basal Medium (MSCBM; Lonza, Walkersville, MD, USA) que se hizo pasar a presión a través de la diáfisis ósea, obteniendo la médula ósea por el otro extremo del hueso sobre una placa Petri estéril. Este proceso se repitió de 2 a 3 veces con el objetivo de extraer la médula ósea al completo. Posteriormente, la médula ósea obtenida se disgregó mecánicamente haciéndola pasar varias veces por la misma aguja de insulina. Las células en suspensión se pasaron a una placa Petri nueva donde se resuspendieron en medio de cultivo fresco. Posteriormente se sembraron en flasks de 75 cm² y se mantuvieron en una estufa a 37 °C en atmósfera húmeda y 5% de CO₂. El medio se fue renovando el 50% del medio de cultivo cada 2 o 3 días con el objetivo de

eliminar otros tipos celulares presentes en la médula y aislar las MSCs gracias a su capacidad de adherencia al plástico.

Tras llevar a cabo su purificación, las MSCs se expandieron para realizar posteriormente los ensayos de citocompatibilidad, internalización, mineralización y diferenciación correspondientes.

– Viabilidad

El crecimiento y proliferación celular se estudió mediante un microscopio óptico invertido EVOS FL Cell Imaging System (Thermo Fisher Scientific). Las células MC3T3–E1, se cultivaron en condiciones normales de cultivo hasta alcanzar la confluencia, entonces se añadieron al cultivo distintas concentraciones (125, 150 Y 175 $\mu\text{g/mL}$) de los distintos tipos de MGNs y se mantuvieron durante 2 h en contacto con las células. Posteriormente el cultivo se lavó con PBS, se añadió medio de cultivo nuevo y se continuó con el ensayo durante 3 días más. Se analizó la viabilidad celular de las MC3T3–E1 a las 24, 48 y 72 h de haber estado en contacto con las MGNs mediante Alamar Blue. A cada uno de estos tiempos, se retiró el medio de cultivo, se lavaron los pocillos con PBS y se añadió 1 mL de la disolución de Alamar Blue, en medio de cultivo incoloro (100 $\mu\text{g/mL}$), por pocillo y se mantuvo en contacto con las células durante 4 h a 37 °C. Posteriormente, se extrajeron 200 μL de cada pocillo que se cargaron por duplicado en una placa de 96 pocillos donde se midió la absorbancia a 560, 590 nm mediante un espectrofotómetro (BiotekSynergy). Se extrajeron los restos de Alamar Blue de los pocillos, se lavaron con PBS y se añadió medio de cultivo nuevo para continuar con el ensayo hasta la siguiente medida.

En el caso de los ensayos con MSCs de conejo, los ensayos se realizaron de la misma forma, añadiendo las MGNs de MBG, a una concentración de 125 $\mu\text{g/mL}$, al cultivo confluyente de MSCs. Las MGNs, se mantuvieron en contacto con las células durante 2 h, se lavó el cultivo con PBS y se añadió medio de cultivo nuevo para seguir con el cultivo celular durante 3 días más. De igual manera, se realizó la prueba de Alamar Blue como se ha detallado anteriormente, empleando mismas condiciones y tiempos de medida.

– Internalización

Ambos tipos celulares se cultivaron en placas de 6 pocillos con su medio de cultivo correspondiente hasta alcanzar la confluencia. Posteriormente, se añadieron los distintos tipos de MGNs marcadas con fluoresceína a una concentración de 125 µg/mL. Las MGNs se mantuvieron en contacto con el cultivo durante 2 h, se lavaron los pocillos con PBS y se incubaron las células con tripsina (Sigma–Aldrich) a 37 °C durante 5 min para levantar las células de la placa. Posteriormente, se añadió el mismo volumen de medio de cultivo que de tripsina para detener la reacción y se centrifugó la suspensión a 11.000 rpm durante 10 min. Se resuspendió el pellet de células en medio de cultivo fresco y se fijó la fluorescencia con azul de tripán (0.4%) para confirmar la presencia de las MGNs en el interior celular. La internalización de las MGNs se analizó mediante citometría de flujo. Para ello, se llevaron a cabo medidas con una longitud de onda de excitación de 480 nm y una longitud de onda de emisión (en verde) de 580 nm (FL1). Las condiciones de adquisición de datos se determinaron estableciendo controles positivos y negativos, que se mantuvieron durante todos los experimentos, con el programa Cell Quest de Becton–Dickinson. Cada una de las medidas se llevó a cabo por triplicado, mostrándose únicamente experimentos representativos. Con el objetivo de tener resultados significativos, se analizaron como mínimo 10.000 células por muestra en un equipo FACS can machine (Becton, Dickinson and Company, USA) utilizándose la medida de fluorescencia emitida individualmente por las células.

– Microscopía de fluorescencia

Ambos tipos celulares se cultivaron con su medio de cultivo correspondiente hasta alcanzar la confluencia. Se añadieron los distintos tipos de MGNs de MBG a una concentración de (125 µg/mL) y se mantuvieron en contacto con el cultivo durante 2 h. Los pocillos se lavaron posteriormente con PBS para eliminar todas las MGNs que no se hubieran internalizado en las células. Las células se fijaron añadiendo etanol al 75% al cultivo y se mantuvieron a –20 °C durante 10 min. Se extrajo el etanol de los pocillos y se volvieron a lavar

con PBS. Se añadió la solución de faloidina (Alexa Fluor[®]555) (10 μ L/mL BSA) y se mantuvo en contacto con las células a 37 °C durante 20 min y condiciones de agitación (100 rpm). El cultivo se lavó con PBS y se añadió la solución de DAPI (1 μ L/mL PBS) que se mantuvo en contacto con las células durante 5 min. Se lavó el cultivo con PBS y se visualizó en un microscopio óptico invertido Evos FL Cell Imaging System (Thermo Fisher Scientific) equipado con tres cubetas de luces led (kex (nm); kem (nm)): DAPI (357/44; 447/60), GFP (470/22; 525/50), RFP (531/40;593/40) de AMG (Advance Microscopy Group). El canal rojo se utilizó para visualizar el citoplasma (filamentos de actina teñidos con faloidina), el azul para el núcleo celular (teñido con DAPI) y el verde para las MGNs (teñidas con fluoresceína).

– Mineralización

Los distintos tipos de MGNs se añadieron al cultivo celular confluyente a una concentración de 125 μ g/mL y se mantuvieron en contacto durante 2 h. Posteriormente se lavaron los pocillos con PBS, se añadió medio de cultivo nuevo y se continuó con el cultivo durante 20 días más, cambiando el medio cada dos días. Una vez transcurridos los 20 días, se estudió la mineralización celular tiñendo las células con rojo de alizarina 40 mM a pH 4.2 durante 10 min. El diámetro y área de las colonias positivas para ALP y nódulos de mineralización se cuantificó mediante Photoshop cs 8.0.1. (Adobe Systems Inc., San Jose, CA, USA)

– PCR a tiempo real

Se cultivaron ambos tipos celulares con sus medios de cultivo correspondientes hasta alcanzar la confluencia. Se añadieron 125 μ g/mL de las distintas MGNs que se mantuvieron en contacto con el cultivo durante 2 h. Se lavó el cultivo con PBS, se añadió medio de cultivo nuevo y se continuó con el cultivo durante 5 días más. Después, se llevó a cabo la lisis celular y se extrajo el RNA empleando Trizol (Trizol, Invitrogen, Groningen, Países Bajos). El RNA purificado se convirtió a DNA complementario (cDNA) y se

estudió la expresión de dos genes de diferenciación osteoblástica (ALP y Runx2) mediante PCR a tiempo real utilizando un equipo Quant Studio 5 y el protocolo ya descrito en el apartado 5.2.1 [247].

Ensayos bacterianos

Para estudiar la posible actividad antibacteriana de los distintos tipos de MGNs, dopadas con zinc y cargadas con curcumina, se llevaron a cabo distintas pruebas con la cepa modelo *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) (ATCC 29213). Para ello se extrajo una CFU de un cultivo de *S. aureus* y se introdujo en 20 mL de medio de cultivo bacteriano *Todd Hewitt Broth* (THB) a 37°C y condiciones de agitación (100 rpm) durante toda la noche. Posteriormente se extrajeron 1.6 mL del cultivo que se añadieron a 10 mL de THB fresco que se mantuvieron a 37 °C y condiciones de agitación hasta que el cultivo alcanzó una turbidez de 0.4 medido a 600 nm. Una vez alcanzadas estas condiciones, se pasó a la realización de los ensayos.

– Crecimiento planctónico

Los distintos tipos de MGNs, dopadas y no dopadas con zinc, y cargadas con curcumina en condiciones de saturación, se dispersaron en THB (125, 150 y 175 µg/mL). Posteriormente se realizó una dilución del cultivo bacteriano de *S. aureus* con una OD de 0.4 con el objetivo de obtener una concentración de 1.5×10^7 CFUs/mL. Se extrajeron 5 µL de este cultivo bacteriano y se pusieron en contacto con 100 µL de cada uno de los tipos de MGNs a las distintas diluciones establecidas en una placa de 96 pocillos junto con los controles correspondientes. Tras 24 h de cultivo a 37°C y condiciones de agitación, se extrajeron alícuotas de cada uno de los pocillos que se diluyeron de forma seriada (10^{-8}), se sembraron en placas de agar (10 µL) y se cultivaron 24 h más a 37°C y, en este caso, condiciones estáticas. Posteriormente se pasó a contar las CFUs de *S. aureus* que habían crecido en las pacas de agar tras estar en contacto con los distintos tipos de MGNs a las distintas concentraciones con el objetivo de comparar

la capacidad antibacteriana de los distintos grupos y concentraciones en comparación con un control.

5.3. Ensayos *in vivo*

Los vidrios mesoporoso bioactivos se sintetizaron mediante el método EISA, tal y como se ha descrito previamente [266]. Algunos de los materiales se doparon con zinc al 4% (4ZN) y otros se mantuvieron libres de zinc para utilizarlos como control (BL). Posteriormente se construyeron los andamios tridimensionales mediante maquinaria de prototipado rápido tal y como se ha detallado anteriormente. Los andamios se calcinaron y se recubrieron con gelatina entrecruzada con glutaraldehído, en las mismas condiciones que se han descrito previamente, con el objetivo de mejorar las propiedades mecánicas del material y que se pudiera manejar más fácilmente durante la intervención quirúrgica (4ZN-GE y BL-GE). Los andamios se cargaron con osteostatina por inmersión tal y como se ha explicado previamente (4ZN-GE+OST y BL-GE+OST) y/o se sembraron con células madre mesenquimales humanas (MSCs) a una concentración de 4×10^5 por pieza (4ZN-GE+MSC y BL-GE+MSC), generándose los grupos a estudio mostrados en la figura 84.

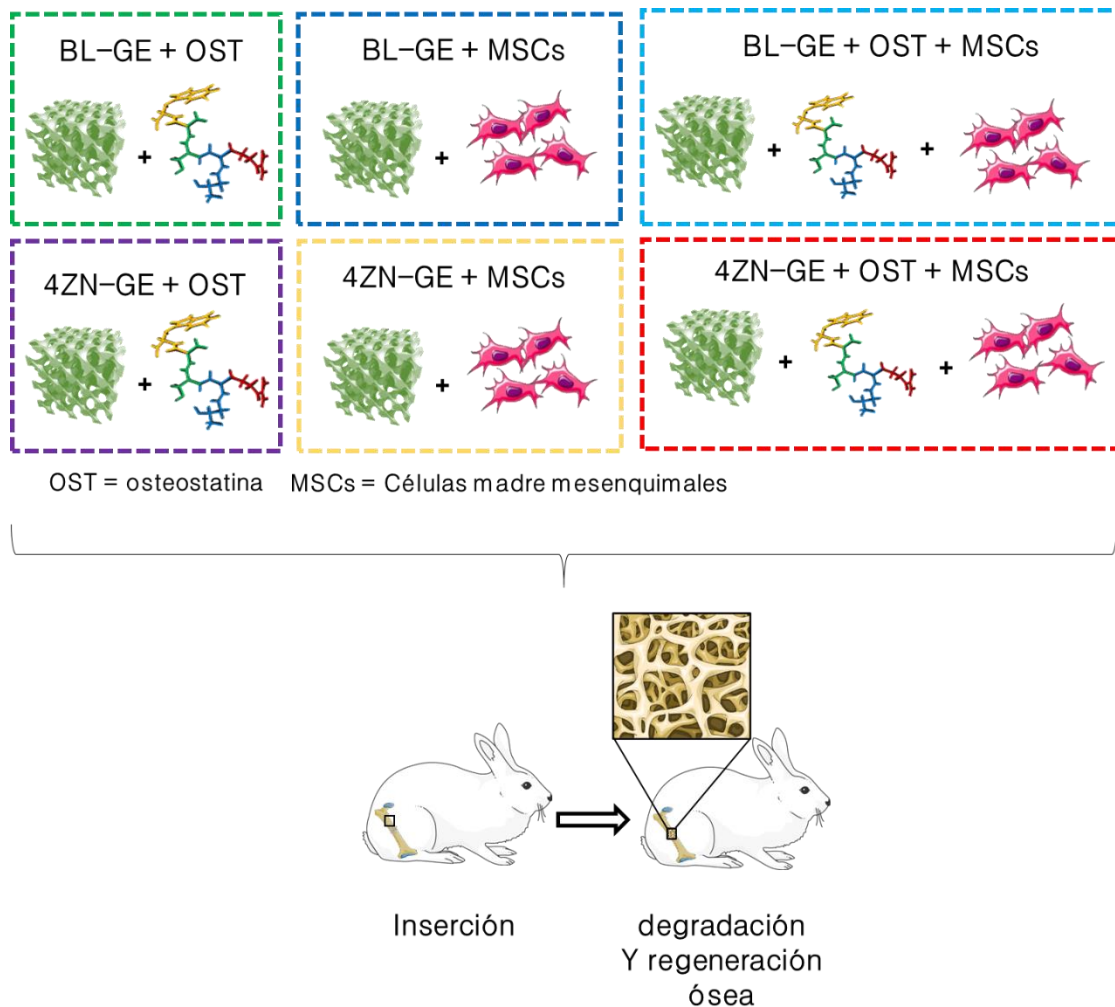


Figura 84. Esquema de los distintos tipos de materiales y su implantación en los animales.

5.3.1. Modelo de defecto en fémur

– Procedimiento quirúrgico

Para realizar el ensayo, se contó con 12 hembras de conejo de Nueva Zelanda con 6 meses de vida y peso medio de 3.9 ± 0.3 Kg. Los defectos se tallaron en el lateral de ambas epífisis femorales distales de todos los conejos mediante un taladro motorizado (7.5 mm de diámetro y 12 mm de profundidad) con irrigación salina fisiológica continua para prevenir la necrosis del hueso. Una vez se realizaron los defectos, se fueron rellenando con los distintos tipos de piezas de forma aleatoria. Los animales continuaron el proceso postoperatorio en jaulas individuales bajo condiciones estándar (temperatura de 20 ± 0.5 °C, humedad relativa de 55

± 5% y fotoperiodos de luz y oscuridad de 12 h / 12 h). Se alimentaron con forraje completo especial para conejo (Nantas[®]), administrado sin límite y sin restricciones de movimiento. La cirugía se llevó a cabo en condiciones de esterilidad y con anestesia general inducida por una inyección subcutánea de ketamina (25 mg/kg), medetomidina (0.5 mg/kg), y anestesia intraespinal. La anestesia y los analgésicos intraoperatorios se mantuvieron mediante la administración de fentanilo y lidocaína en suero salino hasta alcanzar el volumen de 1 mL en el canal espinal. La solución intravenosa de Ringer-Lactato, se administró a una velocidad de 8 mL / Kg / h durante la cirugía.

Los analgésicos postoperatorios, se mantuvieron durante 5 días mediante inyecciones subcutáneas de meloxicam 0.2 mg/Kg por día. La profilaxis de los antibióticos se llevó a cabo mediante dos inyecciones de cefazolina (50 mg/Kg). La eutanasia se realizó después de 3 meses de seguimiento mediante la administración de 0.5 g de tiopental de sodio intravenoso.

Los defectos óseos que se generaron cumplían las características un defecto óseo crítico según los requerimientos establecidos [308–312]. Debido a los datos que se han adquirido en experimentos en modelos críticos previos [278,279], y las recomendaciones de nuestra Comisión Ética de Experimentación Animal, no se realizaron defectos óseos control con el objetivo de reducir el número de animales empleados. Todos los procedimientos se llevaron a cabo bajo la licencia del proyecto PI33/14, aprobada por el Comité Interno de Ética de la Universidad de Zaragoza (España). El cuidado y tratamiento de los animales se llevó a cabo de acuerdo con la ley española (RD 53/2013) y los estándares internacionales de bienestar animal definidos por la directiva europea(2010/63/EU).

– Evaluación radiológica e histológica

Después de la cirugía, se llevó a cabo una rutina de evaluación radiológica de la parte lateral de los fémures operados para evaluar el estado de los implantes. Después de sacrificar a los animales, se les extrajo el tercio distal de hueso para su estudio histológico. Las muestras de hueso se fijaron en formaldehído, introduciéndolas en cubetas de alcohol con porcentaje

creciente de pureza, desde el 50% al 100% y, posteriormente, se embebieron en metacrilato (Merck Schuchardt OHG, Alemania). Se realizaron secciones sagitales mediante un sistema de molienda de corte (EXAKT Apparatebau GMBH, Norderstedt, Alemania), que se tiñeron con Hematoxilina Eosina (H&E) y tricromo de Masson–Goldner para su evaluación histológica. Las secciones histológicas se examinaron mediante un microscopio Zeiss AxiokoP 40 (Oberkochen, Alemania) y las microtomografías se obtuvieron mediante una cámara Zeiss AxioCam MRc5.

– Microtomografías de Rayos-X

Se realizaron cortes del fémur de cada uno de los conejos con discos de diamante que, posteriormente, se escanearon mediante microtomografía de Rayos X de alta resolución (μ CT) empleando un equipo Bio Scan nano SPECT–CT (Dallas, TX, USA). La Fuente de Rayos X estaba compuesta por un tubo de rayos X en miniatura con microenfoque de funcionamiento continuo y únicamente filtración de aire. El detector estaba constituido por un dispositivo de imagen de radiación de alta resolución con una matriz de fotodiodos de 1024 por 2048 píxeles con una separación de píxeles de 48 μ m. La pantalla del centellador estaba formada por Gd₂OI₂S. El estudio se realizó a 65 kV de voltaje de tubo, tiempo de exposición de 1300 ms: 1300 ms, proyecciones de 360 y 0.5 pitch. Las imágenes se trataron posteriormente con el software de imagen Vivoquant 2.0® (Invicro). Finalmente se calculó el % de volumen óseo por volumen total (BV / TV) generado alrededor de cada andamio.

5.3.2. Modelo de defecto en cúbito

– Procedimiento quirúrgico

Para llevar a cabo este ensayo, se emplearon 32 conejos adultos de Nueva Zelanda de entre 4 y 5.5 Kg de peso. Fueron intervenidos quirúrgicamente con el propósito de causarles un defecto óseo crítico mediante osteotomía. Para ello se les sustrajeron 15 mm de la tercera mitad del cúbito diafisario

de una pierna delantera [313]. Posteriormente se establecieron tres grupos de estudio según el material que se les fuera a implantar: andamio con células (4ZN-GE+MSC = 9 ejemplares), andamio con osteostatina (4ZN-GE+OST = 8 ejemplares) y andamio con células y osteostatina (4ZN-GE+MSC+OST = 8 ejemplares). Se realizó un seguimiento de los animales durante periodos de tiempo de 6 y 12 semanas, estableciéndose dos controles en los que solo se implantó el andamio en el defecto óseo por cada tiempo de estudio. Para llevar a cabo la cirugía, se empleó sedación preanestésica con dosis intramusculares de xylazina (25 mg/kg), ketamina (4 mg/kg) y atropina (1 mg/kg). En el inicio de la cirugía, se mantuvo la ketamina con dosis de 1–1.5 mg, añadiendo halotano al 3–4% de mantenimiento con mascarilla. Las intervenciones se llevaron a cabo bajo profilaxis antibiótica mediante cefazolina a una dosis de 50 mg/kg en dos dosis. La primera dosis se administró tras la inducción anestésica y la segunda transcurridas 12 horas. Para el tratamiento del dolor se empleó meloxicam 5 mg/ml y para el sacrificio se empleó el método de sobredosis anestésica con equipromacina y tiopental.

– Análisis macroscópico

Se registraron datos quirúrgicos y aspecto macroscópico del defecto tras la implantación del material.

– Análisis de imagen

Las muestras se analizaron mediante radiografía y micro-TC de animal pequeño SuperArgus (SEDECAL) a través de las cuales se examinaron las características del hueso neoformado empleando las siguientes variables:

- Volumen de hueso en el área a estudio: BV/TV
- Parámetros trabeculares: grosor trabecular (Tb.Th); número trabecular (Tb.N); separación trabecular (Tb.Sp)
- Parámetros corticales en los bordes del defecto: Ct.Ar (área de hueso cortical/volumen cortical, mm²); Ct.Ar/Tt.Ar (fracción cortical, %); Ct.Th (media de grosor cortical, mm)

Estas variables se integraron en una interfaz, BoneAnalytics, desarrollada en MATLAB mediante un enfoque modular y basada en la programación orientada a objetos.

– Evaluación histológica

Una vez sacrificados los especímenes, se extrajeron las muestras y se llevó a cabo el estudio histológico[314]. Para ello, se incluyeron en etanol de 96° para su fijación y conservación. Como las muestras no estaban descalcificadas, se lavaron con agua y se serraron con el objetivo de delimitar macroscópicamente la zona de la lesión. Posteriormente, se deshidrató cada una de las muestras mediante inmersión en soluciones de etanol de gradación creciente (70 °, 80 °, 90 ° y 95 °). Las muestras se incluyeron durante 15 días en metacrilato de metilo líquido a 4 °C y condiciones de agitación. Se llevaron a cabo los protocolos de tinción de Tricrómico de Goldner y Von Kossa, los cuales permiten la distinción del osteoide en el hueso calcificado, así como la morfología y distribución de las células en el tejido. Las imágenes microscópicas de las muestras histológicas se obtuvieron mediante un equipo Nikon digital Sight DS-smc acoplada a un microscopio óptico Nikon eclipse 90i y fueron digitalizadas directamente mediante el programa MetaMorph Meta Imaging Series 6.1 image capture.

– Análisis estadístico

Los resultados se expresan como media $\pm$ error estándar de la media (EEM). La comparación no paramétrica entre dos muestras se realizó por la prueba de Mann Whitney, utilizando el programa SPSS en su versión 15.0. Se utilizó ANOVA no paramétrica para comparar varias muestras (Kruskal-Wallis), seguido de una prueba post-hoc (Dunn). Todos los valores con $p < 0,05$ fueron considerados significativos.

ANEXO II: RESULTADO DERIBADOS DE LA TESIS

6. ANEXO II: Resultados derivados de la tesis

Publicaciones

- R. Pérez, S. Sánchez–Salcedo, D. Lozano, **C. Heras**, P. Esbrit, M. Vallet–Regí, A. J. Salinas, Osteogenic Effect of ZnO–Mesoporous Glasses Loaded with Osteostatin, **Nanomaterials**, 2018, 8, 592. Impact factor 4.324.
- S. Sánchez–Salcedo, **C. Heras**, J. Jiménez–Holguín, M. Vallet–Regí, A. Salinas, Antibacterial capability of 3D meso–macroporous scaffolds enriched with zinc and osteostatin, **The International Journal of Artificial Organs**, 2018, 41, 559–560. Impact factor 1.337.
- **C. Heras**, S. Sánchez–Salcedo, D. Lozano, J. Peña, P. Esbrit, M. Vallet–Regí, A. J. Salinas, Osteostatin potentiates the bioactivity of mesoporous glass scaffolds containing Zn 2+ ions in human mesenchymal stem cells, **Acta Biomaterialia**, 2019, 89, 359–371. Impact factor 7.502.
- **C. Heras**, J. Jimenez–Holguín, A. L. Doadrio, M. Vallet–Regí, S. Sánchez–Salcedo, A. J. Salinas. Multifunctional antibiotic and zinc containing mesoporous bioactive glass scaffolds to fight against bone infection, **Acta Biomaterialia**, 2020, 114, 395–406. Impact factor 7.502.
- D. Lozano, J. Gil–Albaroba* , **C. Heras**, S. Sánchez–Salcedo, V. E. Gómez–Palacio, A. Gómez–Blasco, J. C. Doadrio, M. Vallet–Regí, A. J. Salinas* , ZnO– mesoporous glass scaffolds loaded with osteostatin and mesenchymal cells improve bone healing in a rabbit bone defect, **J. Mater. Sci: Mater. Med**, 2020, 31, 100. Impact factor 2.832.
- **C. Heras**, D. Lozano, C. Beltrán, M. Vallet–Regí, S. Sánchez–Salcedo, A. J. Salinas. Mesoporous Glass Nanoparticles for bacterial infection and bone regeneration– **En preparación**.

Comunicaciones en congresos nacionales e internacionales

- S. Sánchez–Salcedo, **C. Heras**, J. Jiménez, A.J. Salinas, M. Vallet–Regí. Antibacterial capability of 3d meso–macroporous scaffolds enriched with zinc and osteostatin. **XLV ESAO 2018 Congress, Madrid, (España)**.

- **C. Heras**, J. Jiménez–Holguín, S. Sánchez–Salcedo, M. Vallet–Regí, A. J. Salinas. Porous scaffolds based on ZnO–mesoporous glasses loaded with antibiotics as antibacterial and bone regenerative materials. **EUROMAT Congress 2019, Estocolmo** (Sweden).
- **C. Heras**, S. Sánchez–Salcedo, D. Lozano, M. Vallet–Regí, A. J. Salinas. Mesoporous Bioactive Glass Scaffolds for bone regeneration. **II Jornadas de PhDay**, Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense, **Madrid** (España).
- B. Bravo–Giménez, **C. Heras**, L. Benito–Garzon, D. Lozano, G. Luengo–Alonso Lozano, S. Sanchez–Salcedo, A. J. Salinas, M. Vallet–Regí. Bone regeneration capacity of bioactive glasses containing zinc, osteostatin and mesenchymal cells for the treatment of critical defects in rabbit ulna. **ESB Congress 2019, Dresden** (Alemania).
- **C. Heras**, J. Jimenez–Holguín, S. Sánchez–Salcedo, A. L. Doadrio, M, Vallet–Regí, A. J. Salinas. Antibacterial 3D meso–macroporous scaffolds doped with zinc and loaded with antibiotics. **III Jornadas de PhDay**, Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense, **Madrid** (España).

Perspectivas futuras

Tras finalizar los ensayos descritos en la tesis, nuestro grupo se plantea realizar una serie de trabajos con el objetivo de completar los descritos anteriormente.

- Realizar co–cultivos de células madre mesenquimales (MSCs) de conejo y la cepa bacteriana *S. aureus* en los que se aplican las nanopartículas de vidrio mesoporoso (MGNs) dopadas con zinc y cargadas con curcumina con el objetivo de comprobar si la concentración de nanopartículas escogida (125 µg/mL) fomenta la proliferación y diferenciación de las MSCs mientras elimina o disminuye la población bacteriana.
- Llevar a cabo ensayos con bacterias en los que se teste la capacidad antibacteriana de las MGNs en contacto con biofilms de *S. aureus*.
- Cargar las MGNs con osteostatina con el objetivo de analizar su funcionamiento como transportadores y el efecto de esta en la proliferación y diferenciación de las MSCs.

BIBLIOGRAFÍA

7. BIBLIOGRAFÍA

- [1] J. Pødenphant, U. Engel, Regional variations in histomorphometric bone dynamics from the skeleton of an osteoporotic woman, *Calcif. Tissue Int.* 40 (1987) 184–188.
- [2] M. Manzano, M. Vallet–Regí, Revisiting bioceramics: Bone regenerative and local drug delivery systems, *Prog. Solid State Chem.* 40 (2012) 17–30.
- [3] J. Gonzalez Macías, L. Olmos Martinez, Introducción: Fisiopatología del remodelado óseo, *Formadores de Hueso*, X. Nogués, Editor. Scientific communication management: Barcelona. (2005) 13–25.
- [4] S. Weiner, W. Traub, H.D. Wagner, Lamellar Bone: Structure–Function Relations, *J. Struct. Biol.* 126 (1999) 241–255.
- [5] L. Arboleya, S. Castañeda, Osteoclastos: mucho más que células remodeladoras del hueso, *Rev. Osteoporos. y Metab. Miner.* 6 (2014) 109–121.
- [6] G. Chen, C. Deng, Y.–P. Li, TGF– β and BMP Signaling in Osteoblast Differentiation and Bone Formation, *Int. J. Biol. Sci.* 8 (2012) 272–288.
- [7] D.G. Winkler, Osteocyte control of bone formation via sclerostin, a novel BMP antagonist, *EMBO J.* 22 (2003) 6267–6276.
- [8] H. Gerber, Angiogenesis and Bone Growth, *Trends Cardiovasc. Med.* 10 (2000) 223–228.
- [9] E.A. Streeten, M.L. Brandi, Biology of bone endothelial cells, *Bone Miner.* 10 (1990) 85–94.
- [10] A. Rivard, J.E. Fabre, M. Silver, D. Chen, T. Murohara, M. Kearney, M. Magner, T. Asahara, J.M. Isner, Age–Dependent Impairment of Angiogenesis, *Circulation.* 99 (1999) 111–120.
- [11] L. G. Raisz, Physiology and Pathophysiology of Bone Remodeling, *Clin. Chem.* 45 (1999) 1353–1358.
- [12] D. J. Hadjidakis, I. I. Androulakis, Bone remodeling, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1092 (2006) 385–396.
- [13] T.A. Franz–Odendaal, B.K. Hall, P.E. Witten, Buried alive: How osteoblasts become osteocytes, *Dev. Dyn.* 235 (2006) 176–190.
- [14] K. Henriksen, A. V. Neutzsky–Wulff, L.F. Bonewald, M.A. Karsdal, Local communication on and within bone controls bone remodeling, *Bone.* 44 (2009) 1026–1033.
- [15] S. Khosla, Minireview: The OPG/RANKL/RANK System, *Endocrinology.* 142 (2001) 5050–5055.

- [16] C.A. O'Brien, L.I. Plotkin, C. Galli, J.J. Goellner, A.R. Gortazar, M.R. Allen, A.G. Robling, M. Bouxsein, E. Schipani, C.H. Turner, R.L. Jilka, R.S. Weinstein, S.C. Manolagas, T. Bellido, Control of Bone Mass and Remodeling by PTH Receptor Signaling in Osteocytes, *PLoS One*. 3 (2008) e2942.
- [17] T. Bellido, A.A. Ali, I. Gubrij, L.I. Plotkin, Q. Fu, C.A. O'Brien, S.C. Manolagas, R.L. Jilka, Chronic Elevation of Parathyroid Hormone in Mice Reduces Expression of Sclerostin by Osteocytes: A Novel Mechanism for Hormonal Control of Osteoblastogenesis, *Endocrinology*. 146 (2005) 4577–4583.
- [18] Organización Mundial de la Salud, Informe Mundial sobre el envejecimiento y la salud (2015) 32. WHO/FWC/ALC/15.01
- [19] A. Klibanski, L. Adams–Campbell, T. Bassford, S. N. Blair, S. D. Boden, K. Dickersin, D. R. Gifford, L. Glasse, S. R. Goldring, K. Hruska, S. R. Johnson, L. K. McCauley, W. E. Russell, Osteoporosis prevention, diagnosis, and therapy, *J. Am. Med. Assoc.* 285 (2001) 785–795.
- [20] J.Y. Reginster, N. Burlet, Osteoporosis: A still increasing prevalence, *Bone*. 38 (2006) 4–9.
- [21] E.M. Curtis, R.J. Moon, N.C. Harvey, C. Cooper, Reprint of: The impact of fragility fracture and approaches to osteoporosis risk assessment worldwide, *Int. J. Orthop. Trauma Nurs.* 26 (2017) 7–17.
- [22] W.S. Group, Assessment of fracture risk and its application to screening for postmenopausal osteoporosis. Report of a WHO Study Group, *World Heal. Organ. Tech. Rep. Ser.* 843 (1994) 1–129.
- [23] M. F. Luz, F. D. Elena, Osteoporosis: una patología con afectación personal, familiar, laboral y social, *Med. Secur. Trab.* 53 (2007) 43–47.
- [24] E. Canalis, MANAGEMENT OF ENDOCRINE DISEASE: Novel anabolic treatments for osteoporosis, *Eur. J. Endocrinol.* 178 (2018) R33–R44.
- [25] A.J. Salinas, P. Esbrit, M. Vallet–Regí, A tissue engineering approach based on the use of bioceramics for bone repair, *Biomater. Sci.* 1 (2013) 40–51.
- [26] P. V. Giannoudis, H. Dinopoulos, E. Tsiridis, Bone substitutes: An update, *Injury*. 36 (2005) S20–S27.
- [27] J.M. Armentano, I. Dottori, M., Fortunati, E., Mattioli, S., & Kenny, Biodegradable polymer matrix nanocomposites for tissue engineering: A review, *Polym. Degrad. Stab.* 95 (2010) 2126–2146.
- [28] M. Vallet–Regí, Evolution of bioceramics within the field of biomaterials, *Comptes Rendus Chim.* 13 (2010) 174–185.
- [29] B.D. Katthagen, Bone Regeneration with Bone Substitutes: an animal study, Springer, Berlin, 2012,1987.
- [30] D.F. Williams, On the nature of biomaterials, *Biomaterials*. 30 (2009) 5897–5909.

- [31] M. Vallet–Regí, A. J. Salinas, 6–Ceramics as bone repair materials; Bone Repair Biomaterials (Second Edition), Regeneration and Clinical Applications, Woodhead Publishing Series in Biomaterials, (2019), 141–178.
- [32] S. Samavedi, A.R. Whittington, A. S. Goldstein, Calcium phosphate ceramics in bone tissue engineering: A review of properties and their influence on cell behavior, *Acta Biomater.* 9 (2013) 8037–8045.
- [33] A.R. Amini, C.T. Laurencin, S. P. Nukavarapu, Bone tissue engineering: recent advances and challenges, *Crit. Rev. Biomed. Eng.* 40 (2012) 363–408.
- [34] J.R. Jones, Reprint of: Review of bioactive glass: From Hench to hybrids, *Acta Biomater.* 23 (2015) S53–S82.
- [35] D.W. Hutmacher, T. Schantz, I. Zein, K.W. Ng, S.H. Teoh, K. C. Tan, Mechanical properties and cell cultural response of polycaprolactone scaffolds designed and fabricated via fused deposition modeling, *J. Biomed. Mater. Res.* 55 (2001) 203–216.
- [36] L. Diaz–Gomez, A. Concheiro, C. Alvarez–Lorenzo, C. A. García–González, Growth factors delivery from hybrid PCL–starch scaffolds processed using supercritical fluid technology, *Carbohydr. Polym.* 142 (2016) 282–292.
- [37] L.A. A. Gloria, F. Causa, T. Russo, E. Battista, R. Della Moglie, S. Zeppetelli, R. De Santis, P.A. Netti, Three–Dimensional Poly(ϵ -caprolactone) Bioactive Scaffolds with Controlled Structural and Surface Properties, *Biomacromolecules.* 13 (2012) 3510–3521.
- [38] Y. Zhu, C. Wu, Y. Ramaswamy, E. Kockrick, P. Simon, S. Kaskel, H. Zreiqat, Preparation, characterization and in vitro bioactivity of mesoporous bioactive glasses (MBGs) scaffolds for bone tissue engineering, *Microporous Mesoporous Mater.* 112 (2008) 494–503.
- [39] A. García, I. Izquierdo–Barba, M. Colilla, C.L. de Laorden, M. Vallet–Regí, Preparation of 3–D scaffolds in the SiO₂–P₂O₅ system with tailored hierarchical meso–macroporosity, *Acta Biomater.* 7 (2011) 1265–1273.
- [40] H. Yun, S. Kim, Y. Hyeon, Design and preparation of bioactive glasses with hierarchical pore networks, *Chem. Commun.* (2007) 2139–2141.
- [41] D. Arcos, M. Vila, A. López–Noriega, F. Rossignol, E. Champion, F.J. Oliveira, M. Vallet–Regí, Mesoporous bioactive glasses: Mechanical reinforcement by means of a biomimetic process, *Acta Biomater.* 7 (2011) 2952–2959.
- [42] S. Utech, A.R. Boccaccini, A review of hydrogel–based composites for biomedical applications: enhancement of hydrogel properties by addition of rigid inorganic fillers, *J. Mater. Sci.* 51 (2016) 271–310.
- [43] D. Arcos, I. Izquierdo–Barba, M. Vallet–Regí, Promising trends of bioceramics in the biomaterials field, *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 20 (2009) 447–455.

- [44] M.Vallet-Regí, Nanostructured mesoporous silica matrices in nanomedicine, *J. Intern. Med.* 267 (2010) 22–43.
- [45] C. J. Brinker, Y. Lu A. Sellinger, Evaporation-Induced Self-Assembly: Nanostructures Made Easy, *Advanced Materials*. 11 (1999) 579–585.
- [46] J.M. Lehn, Toward complex matter: Supramolecular chemistry and self-organization, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 99 (2002) 4763–4768.
- [47] F. Vögtle, *Dendrimers II: Architecture, Nanostructure and Supramolecular Chemistry*, Springer. 210 (2003).
- [48] Y. Liu, J. Lim, S.H. Teoh, Review: Development of clinically relevant scaffolds for vascularised bone tissue engineering, *Biotechnol. Adv.* 31 (2013) 688–705.
- [49] Z. Min, Z. Shichang, X. Chen, Z. Yufang, Z. Changqing, 3D-printed dimethyloxallyl glycine delivery scaffolds to improve angiogenesis and osteogenesis, *Biomater. Sci.* 3 (2015) 1236–1244.
- [50] C. Wu, Y. Zhou, M. Xu, P. Han, L. Chen, J. Chang, Y. Xiao, Copper-containing mesoporous bioactive glass scaffolds with multifunctional properties of angiogenesis capacity, osteostimulation and antibacterial activity, *Biomaterials*. 34 (2013) 422–433.
- [51] V. Karageorgiou, D. Kaplan, Porosity of 3D biomaterial scaffolds and osteogenesis, *Biomaterials*. 26 (2005) 5474–5491.
- [52] G. Turnbull, J. Clarke, F. Picard, P. Riches, L. Jia, F. Han, B. Li, W. Shu, 3D bioactive composite scaffolds for bone tissue engineering, *Bioact. Mater.* 3 (2018) 278–314.
- [53] S. Viguet-Carrin, P. Garnero, P.D. Delmas, The role of collagen in bone strength, *Osteoporos. Int.* 17 (2006) 319–336.
- [54] T. Lu, Y. Li, T. Chen, Techniques for fabrication and construction of three-dimensional scaffolds for tissue engineering, *Int. J. Nanomedicine*. 8 (2013) 337–350.
- [55] S.M. Giannitelli, D. Accoto, M. Trombetta, A. Rainer, Current trends in the design of scaffolds for computer-aided tissue engineering, *Acta Biomater.* 10 (2014) 580–594.
- [56] S.M. Peltola, F.P.W. Melchels, D.W. Grijpma, M. Kellomäki, A review of rapid prototyping techniques for tissue engineering purposes, *Ann. Med.* 40 (2008) 268–280.
- [57] F. Baino, S. Fiorilli, C. Vitale-Brovarone, Bioactive glass-based materials with hierarchical porosity for medical applications: Review of recent advances, *Acta Biomater.* 42 (2016) 18–32.
- [58] J.A. Inzana, D. Olvera, S.M. Fuller, J.P. Kelly, O.A. Graeve, E.M. Schwarz, S.L. Kates, H.A. Awad, 3D printing of composite calcium phosphate and collagen scaffolds for bone regeneration, *Biomaterials*. 35 (2014) 4026–4034.

- [59] A.D. Bagde, A.M. Kuthe, S. Quazi, V. Gupta, S. Jaiswal, S. Jyothilal, N. Lande, S. Nagdeve, State of the Art Technology for Bone Tissue Engineering and Drug Delivery, *IRBM*. 40 (2019) 133–144.
- [60] V. Mouriño, A.R. Boccaccini, Bone tissue engineering therapeutics: controlled drug delivery in three-dimensional scaffolds, *J. R. Soc. Interface*. 7 (2010) 209–227.
- [61] J.D. Kretlow, L. Klouda, A.G. Mikos, Injectable matrices and scaffolds for drug delivery in tissue engineering, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 59 (2007) 263–273.
- [62] R. Dorati, A. DeTrizio, T. Modena, B. Conti, F. Benazzo, G. Gastaldi, I. Genta, Biodegradable Scaffolds for Bone Regeneration Combined with Drug-Delivery Systems in Osteomyelitis Therapy, *Pharmaceuticals*. 10 (2017) 96.
- [63] J.L. Paris, J. Román, M. Manzano, M.V. Cabañas, M. Vallet-Regí, Tuning dual-drug release from composite scaffolds for bone regeneration, *Int. J. Pharm.* 486 (2015) 30–37.
- [64] M. Cicuéndez, J.C. Doadrio, A. Hernández, M.T. Portolés, I. Izquierdo-Barba, M. Vallet-Regí, Multifunctional pH sensitive 3D scaffolds for treatment and prevention of bone infection, *Acta Biomater.* 65 (2018) 450–461.
- [65] N. Mas, D. Arcos, L. Polo, E. Aznar, S. Sánchez-Salcedo, F. Sancenón, A. García, M.D. Marcos, A. Baeza, M. Vallet-Regí, R. Martínez-Máñez, Towards the Development of Smart 3D “Gated Scaffolds” for On-Command Delivery, *Small*. 10 (2014) 4859–4864.
- [66] C. Faucheux, E. Verron, A. Soueidan, S. Josse, M.D. Arshad, P. Janvier, P. Pilet, J.M. Bouler, B. Bujoli, J. Guicheux, Controlled release of bisphosphonate from a calcium phosphate biomaterial inhibits osteoclastic resorption in vitro, *J. Biomed. Mater. Res. Part A*. 89A (2009) 46–56.
- [67] C. Wu, Y. Zhou, W. Fan, P. Han, J. Chang, J. Yuen, M. Zhang, Y. Xiao, Hypoxia-mimicking mesoporous bioactive glass scaffolds with controllable cobalt ion release for bone tissue engineering, *Biomaterials*. 33 (2012) 2076–2085.
- [68] F. Jakob, R. Ebert, A. Ignatius, T. Matsushita, Y. Watanabe, J. Groll, H. Walles, Bone tissue engineering in osteoporosis, *Maturitas*. 75 (2013) 118–124.
- [69] M. Vallet-Regí, E. Ruiz-Hernández, Bioceramics: From Bone Regeneration to Cancer Nanomedicine, *Adv. Mater.* 23 (2011) 5177–5218.
- [70] Y. Su, Q. Su, W. Liu, M. Lim, J.R. Venugopal, X. Mo, S. Ramakrishna, S.S. Al-Deyab, M. El-Newehy, Controlled release of bone morphogenetic protein 2 and dexamethasone loaded in core-shell PLLACL-collagen fibers for use in bone tissue engineering, *Acta Biomater.* 8 (2012) 763–771.
- [71] M. Zhu, K. Li, Y. Zhu, J. Zhang, X. Ye, 3D-printed hierarchical scaffold for localized isoniazid/rifampin drug delivery and osteoarticular tuberculosis therapy, *Acta Biomater.* 16 (2015) 145–155.

- [72] W. Tang, D. Lin, Y. Yu, H. Niu, H. Guo, Y. Yuan, C. Liu, Bioinspired trimodal macro/micro/nano-porous scaffolds loading rhBMP-2 for complete regeneration of critical size bone defect, *Acta Biomater.* 32 (2016) 309–323.
- [73] M. Manzano, D. Lozano, D. Arcos, S. Portal-Núñez, C.L. 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.
- [74] S. Bose, S. Tarafder, A. Bandyopadhyay, Effect of Chemistry on Osteogenesis and Angiogenesis Towards Bone Tissue Engineering Using 3D Printed Scaffolds, *Ann. Biomed. Eng.* 45 (2017) 261–272.
- [75] M. Ozaki, K. Narita, M. Kurita, Y. Iwashina, A. Takushima, K. Harii, Implantation of Thickened Artificial Bone for Reduction of Dead Space and Prevention of Infection Between Implant and Dura in Secondary Reconstruction of the Skull, *J. Craniofac. Surg.* 28 (2017) 888–891.
- [76] S. Masuda, S. Fujibayashi, B. Otsuki, H. Kimura, S. Matsuda, Efficacy of Target Drug Delivery and Dead Space Reduction Using Antibiotic-loaded Bone Cement for the Treatment of Complex Spinal Infection, *Clin. Spine Surg.* 30 (2017) E1246–E1250.
- [77] S. Sánchez-Salcedo, M. Colilla, I. Izquierdo-Barba, M. Vallet-Regí, Preventing bacterial adhesion on scaffolds for bone tissue engineering, *Int. J. Bioprinting.* 2 (2016) 20–34.
- [78] M. Tesmer, S. Wallet, T. Koutouzis, T. Lundgren, Bacterial Colonization of the Dental Implant Fixture-Abutment Interface: An In Vitro Study, *J. Periodontol.* 80 (2009) 1991–1997.
- [79] P.P. Chakraborty, A. Roy, R. Bhattacharjee, S. Mukhopadhyay, S. Chowdhury, Reversible Secondary Osteolysis in Diabetic Foot Infection, *J. Am. Podiatr. Med. Assoc.* 107 (2017) 538–540.
- [80] H.W. Zhang, L. Peng, W.B. Li, K.G. Song, The Role of RANKL/RANK/OPG System in the Canine Model of Hip Periprosthetic Infection Osteolysis, *Int. J. Artif. Organs.* 39 (2016) 619–624.
- [81] S. Kargozar, M. Montazerian, S. Hamzehlou, H.W. Kim, F. Baino, Mesoporous bioactive glasses: Promising platforms for antibacterial strategies, *Acta Biomater.* 81 (2018) 1–19.
- [82] R. P. Murray, K.S. Rosenthal, M. A. Pfaller, *Microbiología Médica*. Sexta Edición. 21 (2009) 209–224.
- [83] A. Tekin, T. Dal, Ö. Deveci, R. Tekin, N. Özcan, S. Atmaca, S. Dayan, In vitro susceptibility to methicillin, vancomycin and linezolid of staphylococci isolated from bloodstream infections in eastern Turkey, *Brazilian J. Microbiol.* 45 (2014) 829–833.
- [84] G. F. Brooks, K. C. Carroll, J. S. Butel, S. A. Morse, *Med. Microbiol.* 13 (2011) 185–194.

- [85] F.D. Lowy, *Staphylococcus aureus* Infections, *N. Engl. J. Med.* 339 (1998) 520–532.
- [86] M. Hurtado, M. De la Parte, A. Brito, *Staphylococcus aureus*: Revision of the mechanisms of pathogenicity and physiopathology of staphylococcal infections, *Rev. Soc. Ven. Microbiol.* 22 (2002) 112–118.
- [87] A.L. Cheung, K.J. Eberhardt, E. Chung, M.R. Yeaman, P.M. Sullam, M. Ramos, A.S. Bayer, Diminished virulence of a *sar*–/*agr*– mutant of *Staphylococcus aureus* in the rabbit model of endocarditis., *J. Clin. Invest.* 94 (1994) 1815–1822.
- [88] M.A. Croxen, R.J. Law, R. Scholz, K.M. Keeney, M. Wlodarska, B.B. Finlay, Recent Advances in Understanding Enteric Pathogenic *Escherichia coli*, *Clin. Microbiol. Rev.* 26 (2013) 822–880.
- [89] P.B. Crichton, D.C. Old, Biotyping of *Escherichia coli*, *J. Med. Microbiol.* 12 (1979) 473–486.
- [90] N. Allocati, M. Masulli, M. Alexeyev, C. Di Ilio, *Escherichia coli* in Europe: An Overview, *Int. J. Environ. Res. Public Health.* 10 (2013) 6235–6254.
- [91] J.B. Kaper, J.P. Nataro, H.L.T. Mobley, Pathogenic *Escherichia coli*, *Nat. Rev. Microbiol.* 2 (2004) 123–140.
- [92] O. Clermont, S. Bonacorsi, E. Bingen, Rapid and Simple Determination of the *Escherichia coli* Phylogenetic Group, *Appl. Environ. Microbiol.* 66 (2000) 4555–4558.
- [93] G. O'Toole, H.B. Kaplan, R. Kolter, Biofilm Formation as Microbial Development, *Annu. Rev. Microbiol.* 54 (2000) 49–79.
- [94] C. Cucarella, C. Solano, J. Valle, B. Amorena, I. Lasa, J.R. Penadés, Bap, a *Staphylococcus aureus* Surface Protein Involved in Biofilm Formation, *J. Bacteriol.* 183 (2001) 2888–2896.
- [95] A. Toledo-Arana, J. Valle, C. Solano, M.J. Arrizubieta, C. Cucarella, M. Lamata, B. Amorena, J. Leiva, J.R. Penadés, I. Lasa, The Enterococcal Surface Protein, Esp, Is Involved in *Enterococcus faecalis* Biofilm Formation, *Appl. Environ. Microbiol.* 67 (2001) 4538–4545.
- [96] W. A. McGuinness, N. Malachowa, F. R. DeLeo, Vancomycin Resistance in *Staphylococcus aureus*, *Yale J. Biol. Med.* 90 (2017) 269–281.
- [97] K. Hiramatsu, Y. Katayama, M. Matsuo, T. Sasaki, Y. Morimoto, A. Sekiguchi, T. Baba, Multi-drug-resistant *Staphylococcus aureus* and future chemotherapy, *J. Infect. Chemother.* 20 (2014) 593–601.
- [98] R. Gao, Q. Wang, P. Li, Z. Li, Y. Feng, Genome sequence and characteristics of plasmid pWH12, a variant of the *mcr*–1 –harbouring plasmid pHNSHP45, from the multi-drug resistant *E. coli*, *Virulence.* 7 (2016) 732–735.
- [99] L.W. Riley, Pandemic lineages of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*, *Clin. Microbiol. Infect.* 20 (2014) 380–390.

- [100] G. Sharma, S. Sharma, P. Sharma, D. Chandola, S. Dang, S. Gupta, R. Gabrani, *Escherichia coli* biofilm: development and therapeutic strategies, *J. Appl. Microbiol.* 121 (2016) 309–319.
- [101] S. K. Shukla, T. S. Rao, *Staphylococcus aureus* biofilm removal by targeting biofilm-associated extracellular proteins, *Indian J. Med. Res.* 146 (2017) S1–S8.
- [102] I. Lasa, J. L. del Pozo, J. R. Penadés, J. Leiva, *Bacterial biofilms and infection*, *An. Sis San Navarra.* 28 (2005) 163–175.
- [103] A. Bari, N. Bloise, S. Fiorilli, G. Novajra, M. Vallet–Regí, G. Bruni, A. Torres–Pardo, J.M. González–Calbet, L. Visai, C. Vitale–Brovarone, Copper-containing mesoporous bioactive glass nanoparticles as multifunctional agent for bone regeneration, *Acta Biomater.* 55 (2017) 493–504.
- [104] X. Yan, C. Yu, X. Zhou, J. Tang, D. Zhao, Highly Ordered Mesoporous Bioactive Glasses with Superior In Vitro Bone–Forming Bioactivities, *Angew. Chemie Int. Ed.* 43 (2004) 5980–5984.
- [105] G. Jin, H. Cao, Y. Qiao, F. Meng, H. Zhu, X. Liu, Osteogenic activity and antibacterial effect of zinc ion implanted titanium, *Colloids Surfaces B Biointerfaces.* 117 (2014) 158–165.
- [106] G. Applerot, A. Lipovsky, R. Dror, N. Perkas, Y. Nitzan, R. Lubart, A. Gedanken, Enhanced Antibacterial Activity of Nanocrystalline ZnO Due to Increased ROS–Mediated Cell Injury, *Adv. Funct. Mater.* 19 (2009) 842–852.
- [107] Y. Xie, Y. He, P.L. Irwin, T. Jin, X. Shi, Antibacterial Activity and Mechanism of Action of Zinc Oxide Nanoparticles against *Campylobacter jejuni*, *Appl. Environ. Microbiol.* 77 (2011) 2325–2331.
- [108] T. Wang, J.C. Zhang, Y. Chen, P.G. Xiao, M.S. Yang, Effect of zinc ion on the osteogenic and adipogenic differentiation of mouse primary bone marrow stromal cells and the adipocytic trans-differentiation of mouse primary osteoblasts, *J. Trace Elem. Med. Biol.* 21 (2007) 84–91.
- [109] J. Pasquet, Y. Chevalier, J. Pelletier, E. Couval, D. Bouvier, M.–A. Bolzinger, The contribution of zinc ions to the antimicrobial activity of zinc oxide, *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.* 457 (2014) 263–274.
- [110] T.J. Brunner, P. Wick, P. Manser, P. Spohn, R.N. Grass, L.K. Limbach, A. Bruinink, W.J. Stark, In Vitro Cytotoxicity of Oxide Nanoparticles: Comparison to Asbestos, Silica, and the Effect of Particle Solubility †, *Environ. Sci. Technol.* 40 (2006) 4374–4381.
- [111] Y.H. Leung, C.M.N. Chan, A.M.C. Ng, H.T. Chan, M.W.L. Chiang, A.B. Djurišić, Y.H. Ng, W.Y. Jim, M.Y. Guo, F.C.C. Leung, W.K. Chan, D.T.W. Au, Antibacterial activity of ZnO nanoparticles with a modified surface under ambient illumination, *Nanotechnology.* 23 (2012) 475703.
- [112] S.C. Cunnane, *Fatty acids, and lipids and membranes.* "Zinc: Clinical and Biochemical Significance, CRC Press. Boca Raton, FL USA. (1988) 99–113.

- [113] B.L. Vallee, K.H. Falchuk, The biochemical basis of zinc physiology, *Physiol. Rev.* 73 (1993) 79–118.
- [114] R.D. Palmiter, S.D. Findley, Cloning and functional characterization of a mammalian zinc transporter that confers resistance to zinc, *EMBO J.* 14 (1995) 639–649.
- [115] D. Eide, Molecular biology of iron and zinc uptake in eukaryotes, *Curr. Opin. Cell Biol.* 9 (1997) 573–577.
- [116] A. Lipovsky, Y. Nitzan, A. Gedanken, R. Lubart, Antifungal activity of ZnO nanoparticles—the role of ROS mediated cell injury, *Nanotechnology.* 22 (2011) 105101.
- [117] B. Sugarman, Zinc and Infection, *Clin. Infect. Dis.* 5 (1983) 137–147.
- [118] J. Borovanský, P.A. Riley, Cytotoxicity of zinc in vitro, *Chem. Biol. Interact.* 69 (1989) 279–291.
- [119] S. Atmaca, K. Gül, R. Çiçek, The effect of zinc on microbial growth, *Turkish J. Med. Sci.* 28 (1998) 595–598.
- [120] L.P. Miller, S.E.A. McCallan, Fungicides, Toxic Action of Metal Ions to Fungus Spores, *J. Agric. Food Chem.* 5 (1957) 116–122.
- [121] K.M. Reddy, K. Feris, J. Bell, D.G. Wingett, C. Hanley, A. Punnoose, Selective toxicity of zinc oxide nanoparticles to prokaryotic and eukaryotic systems, *Appl. Phys. Lett.* 90 (2007) 213902.
- [122] T. Xia, M. Kovoichich, M. Liong, L. Mädler, B. Gilbert, H. Shi, J.I. Yeh, J.I. Zink, A.E. Nel, Comparison of the Mechanism of Toxicity of Zinc Oxide and Cerium Oxide Nanoparticles Based on Dissolution and Oxidative Stress Properties, *ACS Nano.* 2 (2008) 2121–2134.
- [123] N. Padmavathy, R. Vijayaraghavan, Enhanced bioactivity of ZnO nanoparticles—an antimicrobial study, *Sci. Technol. Adv. Mater.* 9 (2008) 035004.
- [124] L. Zhang, Y. Jiang, Y. Ding, N. Daskalakis, L. Jeuken, M. Povey, A.J. O'Neill, D.W. York, Mechanistic investigation into antibacterial behaviour of suspensions of ZnO nanoparticles against *E. coli*, *J. Nanoparticle Res.* 12 (2010) 1625–1636.
- [125] S. Yang, S. Guo, S. Tong, X. Sun, Promoting Osteogenic Differentiation of Human Adipose-Derived Stem Cells by Altering the Expression of Exosomal miRNA, *Stem Cells Int.* 2019 (2019) 1–15.
- [126] W.M. Philbrick, J.J. Wysolmerski, S. Galbraith, E. Holt, J.J. Orloff, K.H. Yang, R.C. Vasavada, E.C. Weir, A.E. Broadus, A.F. Stewart, Defining the roles of parathyroid hormone-related protein in normal physiology, *Physiol. Rev.* 76 (1996) 127–173.
- [127] T. J. Martin, J. M. Moseley, E. D. Williams, Parathyroid hormone-related protein: hormone and cytokine, *J. Endocrinol.* 154 (1997) S23–S37.

- [128] V. Kartsogiannis, J. Moseley, B. McKelvie, S.T. Chou, D.K. Hards, K.W. Ng, T.J. Martin, H. Zhou, Temporal expression of PTHrP during endochondral bone formation in mouse and intramembranous bone formation in an in vivo rabbit model, *Bone*. 21 (1997) 385–392.
- [129] J.J. Orloff, D. Reddy, A.E. de Papp, K.H. Yang, N.E. Soifer, A.F. Stewart, Parathyroid Hormone–Related Protein as a Prohormone: Posttranslational Processing and Receptor Interactions, *Endocr. Rev.* 15 (1994) 40–60.
- [130] M. Iwamura, P.A. di Sant’agnese, G. Wu, A.T.K. Cockett, P.–A. Abrahamsson, L.J. Deftos, Parathyroid hormone–related protein is expressed by prostatic neuroendocrine cells, *Urology*. 43 (1994) 667–674.
- [131] A.J. Fenton, B.E. Kemp, R.G. Hammonds, K. Mitchelhill, J.M. Moseley, T.J. Martin, G.C. Nicholson, A potent inhibitor of osteoclastic bone resorption within a highly conserved pentapeptide region of parathyroid hormone–related protein; PTHrP[107–III], *Endocrinology*. 129 (1991) 3424–3426.
- [132] J.J. Orloff, M.B. Ganz, M.H. Nathanson, M.S. Moyer, Y. Kats, M. Mitnick, A. Behal, J. Gasalla–Herraiz, C.M. Isales, A midregion parathyroid hormone–related peptide mobilizes cytosolic calcium and stimulates formation of inositol trisphosphate in a squamous carcinoma cell line., *Endocrinology*. 137 (1996) 5376–5385.
- [133] A. Valín, C. Guillén, P. Esbrit, C–Terminal Parathyroid Hormone–Related Protein (PTHrP) (107–139) Stimulates Intracellular Ca²⁺ through a Receptor Different from the Type 1 PTH/PTHrP Receptor in Osteoblastic Osteosarcoma UMR 106 Cells, *Endocrinology*. 142 (2001) 2752–2759.
- [134] T. Dean, J.P. Vilardaga, J.T. Potts, T.J. Gardella, Altered Selectivity of Parathyroid Hormone (PTH) and PTH–Related Protein (PTHrP) for Distinct Conformations of the PTH/PTHrP Receptor, *Mol. Endocrinol.* 22 (2008) 156–166.
- [135] M.J. Horwitz, M.B. Tedesco, C. Gundberg, A. Garcia–Ocana, A.F. Stewart, Short–Term, High–Dose Parathyroid Hormone–Related Protein as a Skeletal Anabolic Agent for the Treatment of Postmenopausal Osteoporosis, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 88 (2003) 569–575.
- [136] A.F. Stewart, PTHrP(1–36) as a skeletal anabolic agent for the treatment of osteoporosis, *Bone*. 19 (1996) 303–306.
- [137] G. Boileau, H.S. Tenenhouse, L. DesGroseillers, P. Crine, Characterization of PHEX endopeptidase catalytic activity: identification of parathyroid–hormone–related peptide107–139 as a substrate and osteocalcin, PPI and phosphate as inhibitors, *Biochem. J.* 355 (2001) 707–713.
- [138] A.J. Fenton, T.J. Martin, G.C. Nicholson, Long–term culture of disaggregated rat osteoclasts: Inhibition of bone resorption and reduction of osteoclast–like cell number by calcitonin and PTHrP[107–139], *J. Cell. Physiol.* 155 (1993) 1–7.
- [139] A.J. Fenton, T.J. Martin, G.C. Nicholson, Carboxyl–terminal parathyroid

- hormone-related protein inhibits bone resorption by isolated chicken osteoclasts, *J. Bone Miner. Res.* 9 (2009) 515–519.
- [140] J. Cornish, K.E. Callon, G.C. Nicholson, I.R. Reid, Parathyroid Hormone-Related Protein-(107–139) Inhibits Bone Resorption in Vivo, *Endocrinology*. 138 (1997) 1299–1304.
- [141] V. Alonso, A.R. de Gortázar, J.A. Ardura, I. Andrade-Zapata, M.V. Alvarez-Arroyo, P. Esbrit, Parathyroid hormone-related protein (107–139) increases human osteoblastic cell survival by activation of vascular endothelial growth factor receptor-2, *J. Cell. Physiol.* 217 (2008) 717–727.
- [142] A.R. de Gortázar, V. Alonso, M. V. Alvarez-Arroyo, P. Esbrit, Transient Exposure to PTHrP (107–139) Exerts Anabolic Effects through Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 2 in Human Osteoblastic Cells In Vitro, *Calcif. Tissue Int.* 79 (2006) 360–369.
- [143] D. Lozano, M. Manzano, J.C. Doadrio, A.J. Salinas, M. Vallet-Regí, E. Gómez-Barrena, P. Esbrit, Osteostatin-loaded bioceramics stimulate osteoblastic growth and differentiation, *Acta Biomater.* 6 (2010) 797–803.
- [144] P. Esbrit, M.J. Alcaraz, Current perspectives on parathyroid hormone (PTH) and PTH-related protein (PTHrP) as bone anabolic therapies, *Biochem. Pharmacol.* 85 (2013) 1417–1423.
- [145] N.S. Datta, A.B. Abou-Samra, PTH and PTHrP signaling in osteoblasts, *Cell. Signal.* 21 (2009) 1245–1254.
- [146] D. Lozano, L.F. de Castro, S. Dapía, I. Andrade-Zapata, F. Manzarbeitia, M.V. Alvarez-Arroyo, E. Gómez-Barrena, P. Esbrit, Role of Parathyroid Hormone-Related Protein in the Decreased Osteoblast Function in Diabetes-Related Osteopenia, *Endocrinology*. 150 (2009) 2027–2035.
- [147] D. Lozano, L. Fernández-de-Castro, S. Portal-Núñez, A. López-Herradón, S. Dapía, E. Gómez-Barrena, P. Esbrit, The C-terminal fragment of parathyroid hormone-related peptide promotes bone formation in diabetic mice with low-turnover osteopaenia, *Br. J. Pharmacol.* 162 (2011) 1424–1438.
- [148] A.J. Fenton, B.E. Kemp, G.N. Kent, J.M. Moseley, M.H. Zheng, D.J. Rowe, J.M. Britto, T.J. Martin, G.C. Nicholson, A Carboxyl-Terminal Peptide from the Parathyroid Hormone-Related Protein Inhibits Bone Resorption by Osteoclasts, *Endocrinology*. 129 (1991) 1762–1768.
- [149] C.G. Trejo, D. Lozano, M. Manzano, J.C. Doadrio, A.J. Salinas, S. Dapía, E. Gómez-Barrena, M. Vallet-Regí, N. García-Honduvilla, J. Buján, The osteoinductive properties of mesoporous silicate coated with osteostatin in a rabbit femur cavity defect model, *Biomaterials*. 31 (2010) 8564–8573.
- [150] D. Lozano, S. Sánchez-Salcedo, S. Portal-Núñez, M. Vila, A. López-Herradón, J.A. Ardura, F. Mulero, E. Gómez-Barrena, M. Vallet-Regí, P. Esbrit, Parathyroid hormone-related protein (107–111) improves the bone regeneration potential of gelatin-glutaraldehyde biopolymer-coated

- hydroxyapatite, *Acta Biomater.* 10 (2014) 3307–3316.
- [151] J.A. Ardura, S. Portal-Núñez, D. Lozano, I. Gutiérrez-Rojas, S. Sánchez-Salcedo, A. López-Herradón, F. Mulero, M.L. Villanueva-Peñacarrillo, M. Vallet-Regí, P. Esbrit, Local delivery of parathyroid hormone-related protein-derived peptides coated onto a hydroxyapatite-based implant enhances bone regeneration in old and diabetic rats, *J. Biomed. Mater. Res. Part A.* 104 (2016) 2060–2070.
- [152] P. Mora-Raimundo, D. Lozano, M. Manzano, M. Vallet-Regí, Nanoparticles to Knockdown Osteoporosis-Related Gene and Promote Osteogenic Marker Expression for Osteoporosis Treatment, *ACS Nano.* 13 (2019) 5451–5464.
- [153] X. Wei, X. Yang, Z. Han, F. Qu, L. Shao, Y. Shi, Mesenchymal stem cells: a new trend for cell therapy, *Acta Pharmacol. Sin.* 34 (2013) 747–754.
- [154] M. J. Evans, M. H. Kaufman, Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos, *Nature.* 292 (1981) 154–156.
- [155] K. Takahashi, S. Yamanaka, Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors, *Cell.* 126 (2006) 663–676.
- [156] A.J. Friedenstein, J.F. Gorskaja, N.N. Kulagina, Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs, *Exp. Hematol.* 4 (1976) 267–74.
- [157] E.M. Horwitz, K. Le Blanc, M. Dominici, I. Mueller, I. Slaper-Cortenbach, F.C. Marini, R.J. Deans, D.S. Krause, A. Keating, Clarification of the nomenclature for MSC: The International Society for Cellular Therapy position statement, *Cytotherapy.* 7 (2005) 393–395.
- [158] M. F. Pittenger, A. M. Mackay, S. C. Beck, R. K. Jaiswal, R. Douglas, J. D. Mosca, M. A. Moorman, D. W. Simonetti, S. Craig, D.R. Marshak, Multilineage Potential of Adult Human Mesenchymal Stem Cells, *Science.* 284 (1999) 143–147.
- [159] M. Crisan, S. Yap, L. Casteilla, C.W. Chen, M. Corselli, T.S. Park, G. Andriolo, B. Sun, B. Zheng, L. Zhang, C. Norotte, P.N. Teng, J. Traas, R. Schugar, B.M. Deasy, S. Badylak, H.-J. Bühring, J.P. Giacobino, L. Lazzari, J. Huard, B. Péault, A Perivascular Origin for Mesenchymal Stem Cells in Multiple Human Organs, *Cell Stem Cell.* 3 (2008) 301–313.
- [160] M. Dominici, K. Le Blanc, I. Mueller, I. Slaper-Cortenbach, F. C. Marini, D. S. Krause, R. J. Deans, A. Keating, D. J. Prockop, E. M. Horwitz, Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement, *Cytotherapy.* 8 (2006) 315–317.
- [161] D.K. Garzón-Perdomo, L.M. De los Reyes, L.F. Turner, Metodologías utilizadas en la diferenciación de células madre mesenquimales a linaje neuronal, *Acta Neurológica Colomb.* 33 (2017) 299–306.
- [162] A. Neve, A. Corrado, F.P. Cantatore, Osteoblast physiology in normal and

- pathological conditions, *Cell Tissue Res.* 343 (2011) 289–302.
- [163] I. Ullah, R.B. Subbarao, G.J. Rho, Human mesenchymal stem cells – current trends and future prospective, *Biosci. Rep.* 35 (2015) e00191.
- [164] P. Semedo, C.G. Palasio, C.D. Oliveira, C.Q. Feitoza, G.M. Gonçalves, M.A. Cenedeze, P.M.H. Wang, V.P.A. Teixeira, M.A. Reis, A. Pacheco-Silva, N.O.S. Câmara, Early modulation of inflammation by mesenchymal stem cell after acute kidney injury, *Int. Immunopharmacol.* 9 (2009) 677–682.
- [165] L.T. Galindo, T.R.M. Filippo, P. Semedo, C.B. Ariza, C.M. Moreira, N.O.S. Camara, M.A. Porcionatto, Mesenchymal Stem Cell Therapy Modulates the Inflammatory Response in Experimental Traumatic Brain Injury, *Neurol. Res. Int.* 2011 (2011) 1–9.
- [166] E. Gerdoni, B. Gallo, S. Casazza, S. Musio, I. Bonanni, E. Pedemonte, R. Mantegazza, F. Frassoni, G. Mancardi, R. Pedotti, A. Uccelli, Mesenchymal stem cells effectively modulate pathogenic immune response in experimental autoimmune encephalomyelitis, *Ann. Neurol.* 61 (2007) 219–227.
- [167] F.E. Figueroa, F. Carrión, S. Villanueva, M. Khoury, Mesenchymal Stem Cell treatment for autoimmune diseases: a critical review, *Biol. Res.* 45 (2012) 269–277.
- [168] V.D. Roobrouck, F. Ulloa-Montoya, C.M. Verfaillie, Self-renewal and differentiation capacity of young and aged stem cells, *Exp. Cell Res.* 314 (2008) 1937–1944.
- [169] E. Xie, Y. Hu, X. Chen, X. Bai, D. Li, L. Ren, Z. Zhang, In vivo bone regeneration using a novel porous bioactive composite, *Appl. Surf. Sci.* 255 (2008) 545–547.
- [170] C.H. Ryu, S.A. Park, S.M. Kim, J.Y. Lim, C.H. Jeong, J.A. Jun, J.H. Oh, S.H. Park, W. Oh, S.-S. Jeun, Migration of human umbilical cord blood mesenchymal stem cells mediated by stromal cell-derived factor-1/CXCR4 axis via Akt, ERK, and p38 signal transduction pathways, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 398 (2010) 105–110.
- [171] Y. Zhou, C. Wu, J. Chang, Bioceramics to regulate stem cells and their microenvironment for tissue regeneration, *Mater. Today.* 24 (2019) 41–56.
- [172] R.T.C. Red de Terapia Celular, Libro Blanco de la Terapia Celular en España, (2019).
- [173] R. Davis, H.M. Bryson, Levofloxacin, *Drugs.* 47 (1994) 677–700.
- [174] S. Elyasi, H. Khalili, S. Dashti-Khavidaki, A. Mohammadpour, Vancomycin-induced nephrotoxicity: mechanism, incidence, risk factors and special populations. A literature review, *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 68 (2012) 1243–1255.
- [175] F. Baquero, A.P. Tedim, T.M. Coque, Antibiotic resistance shaping multi-level population biology of bacteria, *Front. Microbiol.* 4 (2013) 15.
- [176] M.L.A.D. Lestari, G. Indrayanto, Curcumin, Profiles of Drug Substances,

- Excipients and Related Methodology. 39, (2014) 113–204.
- [177] A. Goel, A.B. Kunnumakkara, B.B. Aggarwal, Curcumin as “Curecumin”: From kitchen to clinic, *Biochem. Pharmacol.* 75 (2008) 787–809.
- [178] S. Zorofchian Moghadamtousi, H. Abdul Kadir, P. Hassandarvish, H. Tajik, S. Abubakar, K. Zandi, A Review on Antibacterial, Antiviral, and Antifungal Activity of Curcumin, *Biomed Res. Int.* 2014 (2014) 1–12.
- [179] D. Ghosh, D. Bagchi, T. Konishi, eds., *Clinical Aspects of Functional Foods and Nutraceuticals*, CRC Press. (2014).
- [180] E. Schraufstatter, H. Bernt, Antibacterial Action of Curcumin and Related Compounds, *Nature*. 164 (1949) 456–457.
- [181] P. Tyagi, M. Singh, H. Kumari, A. Kumari, K. Mukhopadhyay, Bactericidal Activity of Curcumin Is Associated with Damaging of Bacterial Membrane, *PLoS One*. 10 (2015) e0121313.
- [182] S.Y. Teow, K. Liew, S.A. Ali, A.S.B. Khoo, S.C. Peh, Antibacterial Action of Curcumin against *Staphylococcus aureus* : A Brief Review, *J. Trop. Med.* 2016 (2016) 1–10.
- [183] A. Shahverdi, K. Moghaddam, M. Iranshahi, M. Yazdi, The combination effect of curcumin with different antibiotics against *Staphylococcus aureus*, *Int. J. Green Pharm.* 3 (2009) 141.
- [184] S. Han, Y. Yang, Antimicrobial activity of wool fabric treated with curcumin, *Dyes and Pigments*. 64 (2005) 157–161.
- [185] D. Rai, J. K. Singh, N. Roy, and D. Panda, Curcumin inhibits FtsZ assembly: an attractive mechanism for its antibacterial activity, *Biochem. J.* 410 (2008) 147–155.
- [186] R.K. et al. S.H. Mun, S.–B. Kim, Curcumin reverse methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*, *Molecules*. 19 (2014) 18283–18295.
- [187] A. Baeza, M. Colilla, M. Vallet–Regí, Advances in mesoporous silica nanoparticles for targeted stimuli–responsive drug delivery, *Expert Opin. Drug Deliv.* 12 (2015) 319–337.
- [188] I. Slowing, J. Viveroescoto, C. Wu, V. Lin, Mesoporous silica nanoparticles as controlled release drug delivery and gene transfection carriers☆, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 60 (2008) 1278–1288.
- [189] M. Vallet–Regí, F. Balas, D. Arcos, Mesoporous Materials for Drug Delivery, *Angew. Chemie Int. Ed.* 46 (2007) 7548–7558.
- [190] M. Vallet–Regí, A. Rámila, R.P. del Real, J. Pérez–Pariente, A New Property of MCM–41: Drug Delivery System, *Chem. Mater.* 13 (2001) 308–311.
- [191] M. Vallet–Regí, M. Colilla, I. Izquierdo–Barba, M. Manzano, Mesoporous Silica Nanoparticles for Drug Delivery: Current Insights, *Molecules*. 23 (2017) 47.

- [192] J.G. Croissant, Y. Fatieiev, N.M. Khashab, Functional Nanoparticles: Degradability and Clearance of Silicon, Organosilica, Silsesquioxane, Silica Mixed Oxide, and Mesoporous Silica Nanoparticles, *Adv. Mater.* 29 (2017) 1604634.
- [193] J.L. Paris, M. Colilla, I. Izquierdo-Barba, M. Manzano, M. Vallet-Regí, Tuning mesoporous silica dissolution in physiological environments: a review, *J. Mater. Sci.* 52 (2017) 8761–8771.
- [194] J. Lu, M. Liong, Z. Li, J.I. Zink, F. Tamanoi, Biocompatibility, Biodistribution, and Drug-Delivery Efficiency of Mesoporous Silica Nanoparticles for Cancer Therapy in Animals, *Small.* 6 (2010) 1794–1805.
- [195] M. Lindén, Biodistribution and Excretion of Intravenously Injected Mesoporous Silica Nanoparticles: Implications for Drug Delivery Efficiency and Safety, in: 2018: pp. 155–180.
- [196] R.R. Castillo, M. Vallet-Regí, Functional Mesoporous Silica Nanocomposites: Biomedical applications and Biosafety, *Int. J. Mol. Sci.* 20 (2019) 929.
- [197] E.M. Vega-López, U. Morales-Muñoz, El Proceso Stöber: Principios y Actualidad 1ª Parte, *Rev Nat y Tecnol.* 9 (2016) 19–30.
- [198] A.A.R. de Oliveira, D.A. de Souza, L.L.S. Dias, S.M. de Carvalho, H.S. Mansur, M. de Magalhães Pereira, Synthesis, characterization and cytocompatibility of spherical bioactive glass nanoparticles for potential hard tissue engineering applications, *Biomed. Mater.* 8 (2013) 025011.
- [199] S. Labbaf, O. Tsigkou, K.H. Müller, M.M. Stevens, A.E. Porter, J.R. Jones, Spherical bioactive glass particles and their interaction with human mesenchymal stem cells in vitro, *Biomaterials.* 32 (2011) 1010–1018.
- [200] C. Wu, W. Fan, J. Chang, Functional mesoporous bioactive glass nanospheres: synthesis, high loading efficiency, controllable delivery of doxorubicin and inhibitory effect on bone cancer cells, *J. Mater. Chem. B.* 1 (2013) 2710–2718.
- [201] C. Vichery, J.M. Nedelec, Bioactive Glass Nanoparticles: From Synthesis to Materials Design for Biomedical Applications, *Materials (Basel).* 9 (2016) 288.
- [202] K. Zheng, X. Dai, M. Lu, N. Hüser, N. Taccardi, A.R. Boccaccini, Synthesis of copper-containing bioactive glass nanoparticles using a modified Stöber method for biomedical applications, *Colloids Surfaces B Biointerfaces.* 150 (2017) 159–167.
- [203] H. Yun, S. Kim, S. Lee, I. Song, Synthesis of high surface area mesoporous bioactive glass nanospheres, *Mater. Lett.* 64 (2010) 1850–1853.
- [204] Y. Li, X. Chen, C. Ning, B. Yuan, Q. Hu, Facile synthesis of mesoporous bioactive glasses with controlled shapes, *Mater. Lett.* 161 (2015) 605–608.
- [205] Q. Hu, Y. Li, N. Zhao, C. Ning, X. Chen, Facile synthesis of hollow mesoporous bioactive glass sub-micron spheres with a tunable cavity size, *Mater. Lett.* 134 (2014) 130–133.

- [206] Y. Wang, H. Pan, X. Chen, The Preparation of Hollow Mesoporous Bioglass Nanoparticles With Excellent Drug Delivery Capacity for Bone Tissue Regeneration, *Front. Chem.* 7 (2019) 283.
- [207] J.J. Labbaf S, Tsigkou O, Müller KH, Stevens MM, Porter AE, Spherical bioactive glass particles and their interaction with human mesenchymal stem cells in vitro, *Biomaterials.* 32 (2011) 1010–1018.
- [208] A. Rahikkala, S.A.P. Pereira, P. Figueiredo, M.L.C. Passos, A.R.T.S. Araújo, M.L.M.F.S. Saraiva, H.A. Santos, Mesoporous Silica Nanoparticles for Targeted and Stimuli-Responsive Delivery of Chemotherapeutics: A Review, *Adv. Biosyst.* 2 (2018) 1800020.
- [209] X. Du, S.Z. Qiao, Dendritic Silica Particles with Center-Radial Pore Channels: Promising Platforms for Catalysis and Biomedical Applications, *Small.* 11 (2015) 392–413.
- [210] M. Erol-Taygun, K. Zheng, A.R. Boccaccini, Nanoscale Bioactive Glasses in Medical Applications, *Int. J. Appl. Glas. Sci.* 4 (2013) 136–148.
- [211] D.S. Brauer, Bioactive Glasses-Structure and Properties, *Angew. Chemie Int. Ed.* 54 (2015) 4160–4181.
- [212] C. Wang, Y. Xie, A. Li, H. Shen, D. Wu, D. Qiu, Bioactive Nanoparticle through Postmodification of Colloidal Silica, *ACS Appl. Mater. Interfaces.* 6 (2014) 4935–4939.
- [213] S.L. Greasley, S.J. Page, S. Sirovica, S. Chen, R.A. Martin, A. Riveiro, J. V. Hanna, A.E. Porter, J.R. Jones, Controlling particle size in the Stöber process and incorporation of calcium, *J. Colloid Interface Sci.* 469 (2016) 213–223.
- [214] O. Tsigkou, S. Labbaf, M.M. Stevens, A.E. Porter, J.R. Jones, Monodispersed Bioactive Glass Submicron Particles and Their Effect on Bone Marrow and Adipose Tissue-Derived Stem Cells, *Adv. Healthc. Mater.* 3 (2014) 115–125.
- [215] K. Zheng, N. Taccardi, A.M. Beltrán, B. Sui, T. Zhou, V.R.R. Marthala, M. Hartmann, A.R. Boccaccini, Timing of calcium nitrate addition affects morphology, dispersity and composition of bioactive glass nanoparticles, *RSC Adv.* 6 (2016) 95101–95111.
- [216] Z. Min, W. Huixue, Z. Yujie, J. Lixin, H. Hai, Z. Yufang, Synthesis of monodispersed mesoporous bioactive glass nanospheres for bone repair, *Mater. Lett.* 171 (2016) 259–262.
- [217] Y. Geng, P. Dalhaimer, S. Cai, R. Tsai, M. Tewari, T. Minko, D.E. Discher, Shape effects of filaments versus spherical particles in flow and drug delivery, *Nat. Nanotechnol.* 2 (2007) 249–255.
- [218] M. Vallet-Regí, I. Izquierdo-Barba, M. Colilla, Structure and functionalization of mesoporous bioceramics for bone tissue regeneration and local drug delivery, *Philos. Trans. R. Soc. A Math. Phys. Eng. Sci.* 370 (2012) 1400–1421.

- [219] L.W. Wang X, Biodegradable mesoporous bioactive glass nanospheres for drug delivery and bone tissue regeneration, *Nanotechnology*. 27 (2016) 1–8.
- [220] Q. Liang, Q. Hu, G. Miao, B. Yuan, X. Chen, A facile synthesis of novel mesoporous bioactive glass nanoparticles with various morphologies and tunable mesostructure by sacrificial liquid template method, *Mater. Lett.* 148 (2015) 45–49.
- [221] A. Hoppe, N.S. Gldal, A.R. Boccaccini, A review of the biological response to ionic dissolution products from bioactive glasses and glass–ceramics, *Biomaterials*. 32 (2011) 2757–2774.
- [222] K. Zheng, A.R. Boccaccini, Sol–gel processing of bioactive glass nanoparticles: A review, *Adv. Colloid Interface Sci.* 249 (2017) 363–373.
- [223] P. Mora–Raimundo, M. Manzano, M. Vallet–Reg, Nanoparticles for the treatment of osteoporosis, *AIMS Bioeng.* 4 (2017) 259–274.
- [224] R.R. Castillo, D. Lozano, B. González, M. Manzano, I. Izquierdo–Barba, M. Vallet–Reg, Advances in mesoporous silica nanoparticles for targeted stimuli–responsive drug delivery: an update, *Expert Opin. Drug Deliv.* 16 (2019) 415–439.
- [225] M. Gisbert–Garzarn, M. Manzano, M. Vallet–Reg, Mesoporous Silica Nanoparticles for the Treatment of Complex Bone Diseases: Bone Cancer, Bone Infection and Osteoporosis, *Pharmaceutics*. 12 (2020) 83.
- [226] A.J. Salinas, S. Shruti, G. Malavasi, L. Menabue, M. Vallet–Reg, Substitutions of cerium, gallium and zinc in ordered mesoporous bioactive glasses, *Acta Biomater.* 7 (2011) 3452–3458.
- [227] S. Shruti, A.J. Salinas, G. Malavasi, G. Lusvardi, L. Menabue, C. Ferrara, P. Mustarelli, M. Vallet–Reg, Structural and in vitro study of cerium, gallium and zinc containing sol–gel bioactive glasses, *J. Mater. Chem.* 22 (2012) 13698–13706.
- [228] J. Serra, P. Gonzalez, S. Liste, S. Chiussi, B. León, M. Pérez–Amor, H. O. Ylnen, M. Hupa, Influence of the non–bridging oxygen groups on the bioactivity of silicate glasses, *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 13 (2002) 1221–1225.
- [229] S. Sánchez–Salcedo, S. Shruti, A.J. Salinas, G. Malavasi, L. Menabue, M. Vallet–Reg, In vitro antibacterial capacity and cytocompatibility of SiO₂ – CaO–P₂O₅ meso–macroporous glass scaffolds enriched with ZnO, *J. Mater. Chem. B*. 2 (2014) 4836–4847.
- [230] C. Turdean–Ionescu, B. Svensson, I. Izquierdo–Barba, A. García, D. Arcos, M. Vallet–Reg, M. Edén, Surface Reactions of Mesoporous Bioactive Glasses Monitored by Solid–State NMR: Concentration Effects in Simulated Body Fluid, *J. Phys. Chem. C*. 120 (2016) 4961–4974.
- [231] T.W.T. Tsai, J.C.C. Chan, Recent Progress in the Solid–State NMR Studies of Biomineralization, *Annual Reports on NMR Spectroscopy*. 73 (2011) 1–61.

- [232] E. Leonova, I. Izquierdo-Barba, D. Arcos, A. López-Noriega, N. Hedin, M. Vallet-Regí, M. Edén, Multinuclear Solid-State NMR Studies of Ordered Mesoporous Bioactive Glasses, *J. Phys. Chem. C*. 112 (2008) 5552–5562.
- [233] A. García, M. Cicuéndez, I. Izquierdo-Barba, D. Arcos, M. Vallet-Regí, Essential Role of Calcium Phosphate Heterogeneities in 2D-Hexagonal and 3D-Cubic $\text{SiO}_2\text{-CaO-P}_2\text{O}_5$ Mesoporous Bioactive Glasses, *Chem. Mater.* 21 (2009) 5474–5484.
- [234] L. Linati, G. Lusvardi, G. Malavasi, L. Menabue, M.C. Menziani, P. Mustarelli, U. Segre, Qualitative and Quantitative Structure–Property Relationships Analysis of Multicomponent Potential Bioglasses, *J. Phys. Chem. B*. 109 (2005) 4989–4998.
- [235] I. Izquierdo-Barba, A.J. Salinas, M. Vallet-Regí, Bioactive Glasses: From Macro to Nano, *Int. J. Appl. Glas. Sci.* 4 (2013) 149–161.
- [236] S.H. Yang, C.K. Hsu, K.C. Wang, S.M. Hou, F.H. Lin, Tricalcium phosphate and glutaraldehyde crosslinked gelatin incorporating bone morphogenetic protein—A viable scaffold for bone tissue engineering, *J. Biomed. Mater. Res. Part B Appl. Biomater.* 74B (2005) 468–475.
- [237] P. Verma, V. Verma, P. Ray, A.R. Ray, Agar–gelatin hybrid sponge–induced three–dimensional in vitro ‘liver–like’ HepG2 spheroids for the evaluation of drug cytotoxicity, *J. Tissue Eng. Regen. Med.* 3 (2009) 368–376.
- [238] O. Mahony, O. Tsigkou, C. Ionescu, C. Minelli, L. Ling, R. Hanly, M.E. Smith, M.M. Stevens, J.R. Jones, Silica–Gelatin Hybrids with Tailorable Degradation and Mechanical Properties for Tissue Regeneration, *Adv. Funct. Mater.* 20 (2010) 3835–3845.
- [239] F. Perut, E.B. Montufar, G. Ciapetti, M. Santin, J. Salvage, T. Traykova, J.A. Planell, M.P. Ginebra, N. Baldini, Novel soybean/gelatine–based bioactive and injectable hydroxyapatite foam: Material properties and cell response, *Acta Biomater.* 7 (2011) 1780–1787.
- [240] J. Heino, The collagen family members as cell adhesion proteins, *BioEssays*. 29 (2007) 1001–1010.
- [241] A. López-Noriega, D. Arcos, I. Izquierdo-Barba, Y. Sakamoto, O. Terasaki, M. Vallet-Regí, Ordered Mesoporous Bioactive Glasses for Bone Tissue Regeneration, *Chem. Mater.* 18 (2006) 3137–3144.
- [242] D. Lozano, C.G. Trejo, E. Gómez-Barrena, M. Manzano, J.C. Doadrio, A.J. Salinas, M. Vallet-Regí, N. García-Honduvilla, P. Esbrit, J. Buján, Osteostatin–loaded onto mesoporous ceramics improves the early phase of bone regeneration in a rabbit osteopenia model, *Acta Biomater.* 8 (2012) 2317–2323.
- [243] C.J. Brinker, G. W. Scherer, *Sol–Gel Science: The Physics and Chemistry of Sol–Gel Processing*, Academic Press. (2013).
- [244] R. Shi, H. Geng, M. Gong, J. Ye, C. Wu, X. Hu, L. Zhang, Long–acting and broad–spectrum antimicrobial electrospun poly (ϵ -caprolactone)/gelatin

- micro/nanofibers for wound dressing, *J. Colloid Interface Sci.* 509 (2018) 275–284.
- [245] M. Xu, L. Wei, Y. Xiao, H. Bi, H. Yang, Y. Du, Physicochemical and functional properties of gelatin extracted from Yak skin, *Int. J. Biol. Macromol.* 95 (2017) 1246–1253.
- [246] S. Shruti, A.J. Salinas, G. Lusvardi, G. Malavasi, L. Menabue, M. Vallet–Regí, Mesoporous bioactive scaffolds prepared with cerium–, gallium– and zinc–containing glasses, *Acta Biomater.* 9 (2013) 4836–4844.
- [247] R. Pérez, S. Sanchez–Salcedo, D. Lozano, C. Heras, P. Esbrit, M. Vallet–Regí, A. Salinas, Osteogenic Effect of ZnO–Mesoporous Glasses Loaded with Osteostatin, *Nanomaterials.* 8 (2018) 592.
- [248] B. Bageshlooyafshar, S. Vakilian, M. Kehtari, T. Eslami–Arshaghi, F. Rafeie, R. Ramezanifard, R. Rahchamani, A. Mohammadi–Sangcheshmeh, Y. Mostafaloo, E. Seyedjafari, Zinc silicate mineral–coated scaffold improved in vitro osteogenic differentiation of equine adipose–derived mesenchymal stem cells, *Res. Vet. Sci.* 124 (2019) 444–451.
- [249] F. Schüth, K. S. W. Sing, J. Weitkamp, Handbook of Porous Solids, in: *Handb. Porous Solids*, *Handb. Porous Solids*, 3 (2002) 1543–1591.
- [250] D. Lozano, M.J. Feito, S. Portal–Núñez, R.M. Lozano, M.C. Matesanz, M.C. Serrano, M. Vallet–Regí, M.T. Portolés, P. Esbrit, Osteostatin improves the osteogenic activity of fibroblast growth factor–2 immobilized in Si–doped hydroxyapatite in osteoblastic cells, *Acta Biomater.* 8 (2012) 2770–2777.
- [251] F. Balas, M. Manzano, P. Horcajada, M. Vallet–Regí, Confinement and Controlled Release of Bisphosphonates on Ordered Mesoporous Silica–Based Materials, *J. Am. Chem. Soc.* 128 (2006) 8116–8117.
- [252] G. Barton, The Mathematics of Diffusion 2nd edn, *Phys. Bull.* 26 (1975) 500–501.
- [253] M. Manzano, V. Aina, C.O. Areán, F. Balas, V. Cauda, M. Colilla, M.R. Delgado, M. Vallet–Regí, Studies on MCM–41 mesoporous silica for drug delivery: Effect of particle morphology and amine functionalization, *Chem. Eng. J.* 137 (2008) 30–37.
- [254] C.W. Levenson, D. Morris, Zinc and Neurogenesis: Making New Neurons from Development to Adulthood, *Adv. Nutr.* 2 (2011) 96–100.
- [255] S.A. Oh, S.H. Kim, J.E. Won, J.J. Kim, U.S. Shin, H.W. Kim, Effects on Growth and Osteogenic Differentiation of Mesenchymal Stem Cells by the Zinc–Added Sol–Gel Bioactive Glass Granules, *J. Tissue Eng.* 1 (2010) 475260.
- [256] Y. Liu, F. Yan, W.L. Yang, X.F. Lu, W.–B. Wang, Effects of Zinc Transporter on Differentiation of Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells to Osteoblasts, *Biol. Trace Elem. Res.* 154 (2013) 234–243.
- [257] J. Cornish, K.E. Callon, C. Lin, C. Xiao, J.M. Moseley, I.R. Reid, Stimulation

- of Osteoblast Proliferation by C-Terminal Fragments of Parathyroid Hormone-Related Protein, *J. Bone Miner. Res.* 14 (1999) 915–922.
- [258] C. Granéli, A. Thorfve, U. Ruetschi, H. Brisby, P. Thomsen, A. Lindahl, C. Karlsson, Novel markers of osteogenic and adipogenic differentiation of human bone marrow stromal cells identified using a quantitative proteomics approach, *Stem Cell Res.* 12 (2014) 153–165.
- [259] D.E. Ingber, The riddle of morphogenesis: a question of solution chemistry or molecular cell engineering?, *Cell.* 75 (1993) 1249–1252.
- [260] S. Haimi, G. Gorianc, L. Moimas, B. Lindroos, H. Huhtala, S. Rätty, H. Kuokkanen, G.K. Sándor, C. Schmid, S. Miettinen, Characterization of zinc-releasing three-dimensional bioactive glass scaffolds and their effect on human adipose stem cell proliferation and osteogenic differentiation, *Acta Biomater.* 5 (2009) 3122–3131.
- [261] V. Salih, A. Patel, J.C. Knowles, Zinc-containing phosphate-based glasses for tissue engineering, *Biomed. Mater.* 2 (2007) 11–20.
- [262] V. Aina, G. Malavasi, A. Fiorio Pla, L. Munaron, C. Morterra, Zinc-containing bioactive glasses: Surface reactivity and behaviour towards endothelial cells, *Acta Biomater.* 5 (2009) 1211–1222.
- [263] H. Drissi, Q. Luc, R. Shakoory, S. Chuva De Sousa Lopes, J.-Y. Choi, A. Terry, M. Hu, S. Jones, J.C. Neil, J.B. Lian, J.L. Stein, A.J. Van Wijnen, G.S. Stein, Transcriptional autoregulation of the bone related CBFA1/RUNX2 gene, *J. Cell. Physiol.* 184 (2000) 341–350.
- [264] J.E. Coleman, Structure and mechanism of alkaline phosphatase., *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 21 (1992) 441–483.
- [265] G. Lusvardi, G. Malavasi, L. Menabue, M.C. Menziani, A. Pedone, U. Segre, V. Aina, A. Perardi, C. Morterra, F. Boccafroschi, S. Gatti, M. Bosetti, M. Cannas, Properties of Zinc Releasing Surfaces for Clinical Applications, *J. Biomater. Appl.* 22 (2008) 505–526.
- [266] C. Heras, S. Sanchez-Salcedo, D. Lozano, J. Peña, P. Esbrit, M. Vallet-Regí, A.J. Salinas, Osteostatin potentiates the bioactivity of mesoporous glass scaffolds containing Zn²⁺ ions in human mesenchymal stem cells, *Acta Biomater.* 89 (2019) 359–371.
- [267] W. FAN, D. WU, T. MA, B. FAN, Ag-loaded mesoporous bioactive glasses against *Enterococcus faecalis* biofilm in root canal of human teeth, *Dent. Mater. J.* 34 (2015) 54–60.
- [268] W. Xia, J. Chang, Well-ordered mesoporous bioactive glasses (MBG): A promising bioactive drug delivery system, *J. Control. Release.* 110 (2006) 522–530.
- [269] A. Nieto, F. Balas, M. Colilla, M. Manzano, M. Vallet-Regí, Functionalization degree of SBA-15 as key factor to modulate sodium alendronate dosage, *Microporous Mesoporous Mater.* 116 (2008) 4–13.

- [270] W. Zimmerli, P. Sendi, Orthopaedic biofilm infections, *APMIS*. 125 (2017) 353–364.
- [271] C. Loc-Carrillo, C. Wang, A. Canden, M. Burr, J. Agarwal, Local Intramedullary Delivery of Vancomycin Can Prevent the Development of Long Bone Staphylococcus aureus Infection, *PLoS One*. 11 (2016) e0160187.
- [272] S.W.N. Ueng, S.S. Lin, I.C. Wang, C.Y. Yang, R.C. Cheng, S.J. Liu, E.C. Chan, C.F. Lai, L.J. Yuan, S.C. Chan, Efficacy of vancomycin-releasing biodegradable poly(lactide-co-glycolide) antibiotics beads for treatment of experimental bone infection due to Staphylococcus aureus, *J. Orthop. Surg. Res.* 11 (2016) 52.
- [273] M. Cicuéndez, I. Izquierdo-Barba, M.T. Portolés, M. Vallet-Regí, Biocompatibility and levofloxacin delivery of mesoporous materials, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 84 (2013) 115–124.
- [274] C.C. Llanos-Paez, S. Hennig, C.E. Staatz, Population pharmacokinetic modelling, Monte Carlo simulation and semi-mechanistic pharmacodynamic modelling as tools to personalize gentamicin therapy, *J. Antimicrob. Chemother.* 72 (2017) 639–667.
- [275] L. Angiolini, M. Agnes, B. Cohen, K. Yannakopoulou, A. Douhal, Formation, characterization and pH dependence of rifampicin: heptakis(2,6-di- O -methyl)- β -cyclodextrin complexes, *Int. J. Pharm.* 531 (2017) 668–675.
- [276] J.M. Andrews, Determination of minimum inhibitory concentrations, *J. Antimicrob. Chemother.* 48 (2001) 5–16.
- [277] E.C. Shors, Coralline bone graft substitutes, *Orthop. Clin. North Am.* 30 (1999) 599–613.
- [278] J. Gil-Albarova, R. Garrido-Lahiguera, A.J. Salinas, J. Román, A.L. Bueno-Lozano, R. Gil-Albarova, M. Vallet-Regí, The in vivo performance of a sol-gel glass and a glass-ceramic in the treatment of limited bone defects, *Biomaterials*. 25 (2004) 4639–4645.
- [279] J. Gil-Albarova, M. Vila, J. Badiola-Vargas, S. Sánchez-Salcedo, A. Herrera, M. Vallet-Regí, In vivo osteointegration of three-dimensional crosslinked gelatin-coated hydroxyapatite foams, *Acta Biomater.* 8 (2012) 3777–3783.
- [280] T.W. Bauer, G.F. Muschler, Bone Graft Materials, *Clin. Orthop. Relat. Res.* 371 (2000) 10–27.
- [281] M. Vallet-Regí, A.J. Salinas, D. Arcos, Tailoring the Structure of Bioactive Glasses: From the Nanoscale to Macroporous Scaffolds, *Int. J. Appl. Glas. Sci.* 7 (2016) 195–205.
- [282] D. Liu, W. Nie, D. Li, W. Wang, L. Zheng, J. Zhang, J. Zhang, C. Peng, X. Mo, C. He, 3D printed PCL/SrHA scaffold for enhanced bone regeneration, *Chem. Eng. J.* 362 (2019) 269–279.
- [283] D.G. Barceloux, D. Barceloux, Copper, *J. Toxicol. Clin. Toxicol.* 37 (1999) 217–230.

- [284] K.B. Hadley, S.M. Newman, J.R. Hunt, Dietary zinc reduces osteoclast resorption activities and increases markers of osteoblast differentiation, matrix maturation, and mineralization in the long bones of growing rats, *J. Nutr. Biochem.* 21 (2010) 297–303.
- [285] M. Yamaguchi, M.N. Weitzmann, Zinc stimulates osteoblastogenesis and suppresses osteoclastogenesis by antagonizing NF- κ B activation, *Mol. Cell. Biochem.* 355 (2011) 179–186.
- [286] H. Begam, S.K. Nandi, A. Chanda, B. Kundu, Effect of bone morphogenetic protein on Zn-HAp and Zn-HAp/collagen composite: A systematic in vivo study, *Res. Vet. Sci.* 115 (2017) 1–9.
- [287] M.R. Dias, J.M. Guedes, C.L. Flanagan, S.J. Hollister, P.R. Fernandes, Optimization of scaffold design for bone tissue engineering: A computational and experimental study, *Med. Eng. Phys.* 36 (2014) 448–457.
- [288] N.J. Coleman, L.L. Hench, A gel-derived mesoporous silica reference material for surface analysis by gas sorption 1. Textural features, *Ceram. Int.* 26 (2000) 171–178.
- [289] S.M. Rabiee, N. Nazparvar, M. Azizian, D. Vashaei, L. Tayebi, Effect of ion substitution on properties of bioactive glasses: A review, *Ceram. Int.* 41 (2015) 7241–7251.
- [290] S. Shruti, A.J. Salinas, E. Ferrari, G. Malavasi, G. Lusvardi, A.L. Doadrio, L. Menabue, M. Vallet-Regí, Curcumin release from cerium, gallium and zinc containing mesoporous bioactive glasses, *Microporous Mesoporous Mater.* 180 (2013) 92–101.
- [291] T. Sun, Y. Sun, H. Zhang, Phospholipid-Coated Mesoporous Silica Nanoparticles Acting as Lubricating Drug Nanocarriers, *Polymers (Basel)*. 10 (2018) 513.
- [292] M. Martínez-Carmona, D. Lozano, M. Colilla, M. Vallet-Regí, Lectin-conjugated pH-responsive mesoporous silica nanoparticles for targeted bone cancer treatment, *Acta Biomater.* 65 (2018) 393–404.
- [293] X. Huang, F. Zhang, H. Wang, G. Niu, K.Y. Choi, M. Swierczewska, G. Zhang, H. Gao, Z. Wang, L. Zhu, H.S. Choi, S. Lee, X. Chen, Mesenchymal stem cell-based cell engineering with multifunctional mesoporous silica nanoparticles for tumor delivery, *Biomaterials*. 34 (2013) 1772–1780.
- [294] T.H. Chung, S.H. Wu, M. Yao, C.W. Lu, Y.S. Lin, Y. Hung, C.Y. Mou, Y.C. Chen, D.M. Huang, The effect of surface charge on the uptake and biological function of mesoporous silica nanoparticles in 3T3-L1 cells and human mesenchymal stem cells, *Biomaterials*. 28 (2007) 2959–2966.
- [295] J.L. Paris, P. de la Torre, M. Manzano, M.V. Cabañas, A.I. Flores, M. Vallet-Regí, Decidua-derived mesenchymal stem cells as carriers of mesoporous silica nanoparticles. In vitro and in vivo evaluation on mammary tumors, *Acta Biomater.* 33 (2016) 275–282.
- [296] Y. Sivasothy, S.F. Sulaiman, K.L. Ooi, H. Ibrahim, K. Awang, Antioxidant and

- antibacterial activities of flavonoids and curcuminoids from *Zingiber spectabile* Griff., *Food Control*. 30 (2013) 714–720.
- [297] G. Tajbakhsh, S. Mohammadi, K. Deilami, I. Zandi, K. Fouladvand, M. Ramedani, E. Asayesh, Antibacterial activity of indium curcumin and indium diacetylcurcumin, *African J. Biotechnol.* 7 (2008) 3832–3835.
- [298] S. Burt, Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review, *Int. J. Food Microbiol.* 94 (2004) 223–253.
- [299] D. Rai, J.K. Singh, N. Roy, D. Panda, Curcumin inhibits FtsZ assembly: an attractive mechanism for its antibacterial activity, *Biochem. J.* 410 (2008) 147–155.
- [300] T. Matsui, J. Yamane, N. Mogi, H. Yamaguchi, H. Takemoto, M. Yao, I. Tanaka, Structural reorganization of the bacterial cell-division protein FtsZ from *Staphylococcus aureus*, *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* 68 (2012) 1175–1188.
- [301] P. Singh, D. Panda, FtsZ inhibition: A promising approach for antistaphylococcal therapy, *Drug News Perspect.* 23 (2010) 295–304.
- [302] S.H. Mun, S.B. Kim, R. Kong, J.G. Choi, Y.C. Kim, D.W. Shin, O.H. Kang, D.Y. Kwon, Curcumin Reverse Methicillin Resistance in *Staphylococcus aureus*, *Molecules*. 19 (2014) 18283–18295.
- [303] S. Brunauer, P.H. Emmett, E. Teller, Adsorption of Gases in Multimolecular Layers, *J. Am. Chem. Soc.* 60 (1938) 309–319.
- [304] E.P. Barrett, L.G. Joyner, P.P. Halenda, The Determination of Pore Volume and Area Distributions in Porous Substances. I. Computations from Nitrogen Isotherms, *J. Am. Chem. Soc.* 73 (1951) 373–380.
- [305] A.L.B. Maçon, T.B. Kim, E.M. Valliant, K. Goetschius, R.K. Brow, D.E. Day, A. Hoppe, A.R. Boccaccini, I.Y. Kim, C. Ohtsuki, T. Kokubo, A. Osaka, M. Vallet–Regí, D. Arcos, L. Fraile, A.J. Salinas, A. V. Teixeira, Y. Vueva, R.M. Almeida, M. Miola, C. Vitale–Brovarone, E. Verné, W. Höland, J.R. Jones, A unified in vitro evaluation for apatite-forming ability of bioactive glasses and their variants, *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 26 (2015) 115–125.
- [306] A.J. Salinas, M. Vallet–Regí, Glasses in bone regeneration: A multiscale issue, *J. Non. Cryst. Solids*. 432 (2016) 9–14.
- [307] A.H. Reddi, C.B. Huggins, Citrate and Alkaline Phosphatase During Transformation of Fibroblasts by the Matrix and Minerals of Bone, *Exp. Biol. Med.* 140 (1972) 807–810.
- [308] N.G. Lasanianos, N.K. Kanakaris, P. V. Giannoudis, Current management of long bone large segmental defects, *Orthop. Trauma*. 24 (2010) 149–163.
- [309] N. Miño–Fariña, F. Muñoz–Guzón, M. López–Peña, M.–P. Ginebra, S. del Valle–Fresno, D. Ayala, A. González–Cantalapiedra, Quantitative analysis of the resorption and osteoconduction of a macroporous calcium phosphate bone cement for the repair of a critical size defect in the femoral condyle,

Vet. J. 179 (2009) 264–272.

- [310] J.C. Reichert, S. Saifzadeh, M.E. Wullschleger, D.R. Epari, M.A. Schütz, G.N. Duda, H. Schell, M. van Griensven, H. Redl, D.W. Hutmacher, The challenge of establishing preclinical models for segmental bone defect research, *Biomaterials*. 30 (2009) 2149–2163.
- [311] G.C. Cacchioli A, Spaggiari B, Ravanetti F, Martini FM, Borghetti P, The critical sized bone defect: morphological study of bone healing, *Ann. Fac. Medic. Vet. Parma*. 26 (2006) 97–100.
- [312] Z. Gugala, S. Gogolewski, Regeneration of Segmental Diaphyseal Defects in Sheep Tibiae Using Resorbable Polymeric Membranes: A Preliminary Study, *J. Orthop. Trauma*. 13 (1999) 187–195.
- [313] L.A. Mills, A.H.R.W. Simpson, In vivo models of bone repair, *J. Bone Joint Surg. Br.* 94–B (2012) 865–874.
- [314] B. Rai, A. Chatterjea, Z.X.H. Lim, T.C. Tan, A.A. Sawyer, Y.Z. Hosaka, S. Murali, J.J.L. Lee, S.A. Fenwick, J.H. Hui, V. Nurcombe, S.M. Cool, Repair of segmental ulna defects using a β -TCP implant in combination with a heparan sulfate glycosaminoglycan variant, *Acta Biomater.* 28 (2015) 193–204.