



**Biomateriales nanoporosos ordenados y su
funcionalidad como matriz biomimética
administradora de iones terapéuticos para aplicación
en regeneración tisular**

Memoria Presentada por:
Lilian Beatriz Romero Sánchez

Para optar al grado de:
Doctor en Química

Dirigida por:
Dra. María Aránzazu Díaz Cuenca

Tutor:
Dr. Alfonso Caballero Martínez

Departamento de Química Inorgánica
Universidad de Sevilla

Instituto de Ciencia de Materiales
CSIC-US

Sevilla, 2017

AGRADECIMIENTOS

Durante estos 4 años son muchas las personas e instituciones que han participado en este trabajo y a quienes quiero expresar mi gratitud por el apoyo que me han prestado de forma desinteresada.

En primer lugar quiero agradecer a mi Directora de Tesis, la Dra. Aránzazu Díaz Cuenca, por haber confiado en mí, por su enorme contribución a mi crecimiento personal y profesional, por su paciencia ante mis inconsistencias, por su valiosa e indispensable dirección para seguir este arduo camino de la Tesis y llegar a la conclusión del mismo. Tu dedicación, determinación y excelencia profesional han sido fuente inagotable de motivación durante este tiempo.

Debo un reconocimiento especial al Instituto de Ciencia de Materiales de Sevilla por su acogida y el apoyo recibido durante los largos y fructíferos períodos que he desarrollado en ellos mi labor investigadora. Muchas gracias al Profesor Dr. Alfonso Caballero por haber aceptado ser el tutor de esta Tesis Doctoral y por la amabilidad con la que siempre me ha tratado. Extiendo el agradecimiento al Departamento de Química Inorgánica de la Universidad de Sevilla por aceptarme en el Programa de Doctorado de Ciencia y Tecnología de Nuevos Materiales, así como a sus servicios técnicos (CITIUS).

También quiero agradecer el apoyo y medios recibidos durante mi estancia en el Departamento de Biología Celular, Genética y Fisiología y al Departamento de Biología Molecular y Bioquímica de la Universidad de Málaga. Gracias a todo el equipo y especialmente al Dr. Manuel Marí Beffa, por su infinita disposición,

enseñanzas y aportaciones, al Profesor Dr. Miguel Ángel Medina y a la Lic. Paloma Carrillo Fernández por su importante colaboración, que sin duda contribuyeron a la realización de este trabajo de Tesis.

Asimismo, mi más profundo agradecimiento al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la ayuda económica brindada durante todo el proceso de formación doctoral y por hacer posible esta experiencia de vida.

Quiero extender mi agradecimiento a mis compañeras de laboratorio con las cuales he compartido incontables horas de trabajo y buenos ratos, que no tienen precio. Gracias Lourdes y Sara, por sus consejos y disposición a ayudarme en los aspectos intelectuales, por el respaldo y la amistad que siempre he recibido de ustedes. Muchas gracias por las constantes palabras de ánimo e incontables muestras de apoyo. Su entrega y dedicación en el trabajo siempre ha sido una inspiración.

También me complace extender este agradecimiento a Mari Carmen, su persona tiene la capacidad de armonizar las responsabilidades laborales y el buen humor, gracias por aguantarme y escucharme. A José Carlos, por su eficiencia y amabilidad. Gracias por ayudarme a la resolución de problemas informáticos entre otros.

No quiero dejar de agradecer a mis compañeros de la caracola. A Vicky y Nuria, gracias por su ejemplo de continuo esfuerzo y coraje. Y a Mariana, por el buen ánimo que siempre le acompaña y por compartir conmigo alegrías y tristezas. También quiero agradecer a esas amistades que han ido floreciendo con el paso de los días en los pasillos del instituto, aunque no aparecen aquí con nombres y

apellidos, les agradezco a todos que siempre tuvieran una palabra de aliento y una sonrisa para mí.

Muchas gracias a mi queridísima familia, mis hermanos Arturo y Abigail y especialmente a mi madre Ana, que aunque nos separan miles de kilómetros ha sabido hacerse presente en los buenos y en los malos momentos. Mamá, muchas gracias por tu incondicionalidad conmigo, por apoyar cada sueño, cada locura, por animarme a seguir siempre a adelante, por tu comprensión y por la ternura con la que siempre me has cobijado. Te quiero y te agradezco que me hayas enseñado a esforzarme por ser mejor persona, tú eres sin duda la mejor que conozco. A mi padre también quiero agradecer, que aun en su muerte sigue siendo un referente personal. Espero, de igual forma, transmitir tu legado: sencillez, esfuerzo y coherencia. Gracias familia, esto también es vuestro trabajo.

También quiero agradecer a mí otra familia, mis amigos que han sabido disculpar mis ausencias y siempre han tenido una palabra de ánimo. Ruth y Lady, cómplices de otros tiempos, otras curas, otros ritmos y lugares. Gracias Ruth, por tu constante cuidado y por creer en mí. A Lady por su inmensa ilusión en que este trabajo saliese adelante, por todas las aventuras compartidas y por todas las muestras de cariño que has tenido conmigo.

A María, Miguel, Doña Andrea, Youssef, Laura y José Luis, se merecen muchas y buenas palabras, sin excepción. A mis queridísimas amigas Andrea y Miriam, porque han hecho de mi estancia en Sevilla una vivencia inolvidable. Gracias por abrirme las puertas de sus hogares y de su vida, por compartirme a su propia familia y amigos. Con todos ustedes he vivido un encuentro de amistad

permanente, su cercanía, sincera amistad, y los simpáticos e inolvidables momentos que vivimos me hacen sentirme muy afortunada. Gracias por cada cerveza en el Puma después de un día intenso de trabajo, por los apapachos, por las parrandas, por cada viaje, por los consejos y cada una de las carcajadas compartidas. Reconozco públicamente, todas las lecciones que me impartís de forma gratuita y sin condiciones. Os reconozco uno por uno y gracias.

En particular, quiero expresarle mi gratitud a Javi, por hacer que la escritura de esta Tesis haya sido mucho más llevadera en estos últimos meses tan cargadísimos de actividades y compromisos. No alcanzan las palabras para agradecer tu compañía irremplazable, tus palabras de consuelo y por compartir conmigo cada esfuerzo. Admiro tu constancia, tu carácter y la forma en que enfrentas el día a día. Muchas gracias por hacerme sentir querida y por recordarme cada día lo privilegiada que soy. Eres lo más bonito que me ha pasado en la vida.

A todos vosotros, mi mayor reconocimiento y gratitud.

No acaba aquí la historia.

Esto es solo una pequeña pausa para que descansemos...

Entreacto, Ángel González

ÍNDICE

Capítulo 1. Introducción general

1. Antecedentes.....	1
1.1. Evolución histórica de los biomateriales.....	2
1.2. Requerimientos de los biomateriales.....	3
1.3. Clasificación de los biomateriales.....	4
1.3.1. Materiales metálicos.....	5
1.3.2. Materiales poliméricos.....	5
1.3.3. Materiales cerámicos.....	6
1.4. Vidrios bioactivos (BG).....	7
1.5. Concepto de bioactividad.....	10
2. Vidrios bioactivos nanoporosos ordenados (MBG).....	12
2.1. Rango composicional y respuesta bioactiva de material MBG en el sistema $\text{SiO}_2\text{-CaO-P}_2\text{O}_5$	15
3. Motivación, objetivos y estructura del Trabajo de Tesis.....	19
4. Referencias.....	22

Capítulo 2. Estructuras matriz biomiméticas

1. Introducción.....	29
1.1. Tejido óseo.....	30
1.2. Remodelación ósea.....	36
1.3. Mecanismos de regeneración ósea.....	38
1.4. Terapias para la reparación de defectos óseos.....	40
1.5. Ingeniería tisular.....	42

2. Estructuras matriz en terapias de regeneración ósea.....	43
2.1. Requerimientos de las estructuras matriz para terapias de regeneración ósea.....	44
2.2. Biomateriales para el procesado de estructuras matriz.....	45
2.3. Técnicas de para la fabricación de estructuras matriz.....	45
3. Desarrollo de estructuras de macroporo interconectado como matrices biomiméticas.....	49
3.1. Estrategias para la optimización de estructuras macroporosas obtenidas por el método de réplica de una plantilla polimérica.....	53
3.1.1. Incorporación de PVA como agente aglutinante.....	53
3.1.2. Recubrimiento con biopolímero colágeno.....	54
4. Fabricación de matrices biomiméticas híbridas cerámico-biopolímero.....	57
4.1. Procedimiento experimental.....	57
4.1.1. Síntesis del precursor de sílice tipo SBA-15.....	58
4.1.2. Síntesis del sol MBG.....	58
4.1.3. Procesado de las estructuras macroporosas híbridas biopolímero-cerámico.....	59
4.1.4. Caracterización físico-química de las matrices biomiméticas híbridas biopolímero-cerámico.....	60
4.1.5. Ensayos de bioactividad <i>in vitro</i>	62
4.2. Resultados y discusión.....	62
4.2.1. Caracterización físico-química de las estructuras macroporosas híbridas biopolímero-cerámico.....	62
4.2.2. Ensayos de bioactividad <i>in vitro</i> en SBF.....	81
4.3. Conclusiones.....	90
5. Referencias.....	91

Capítulo 3. Materiales MBG con funcionalidad para la administración local de iones terapéuticos

1. Biomateriales como matrices para la administración local de iones terapéuticos.....	107
2. Incorporación de iones terapéuticos en la composición de los MBG.....	108
3. Interés del Cu como ion terapéutico.....	113
4. El proceso de angiogénesis.....	119
4.1. Propiedades angiogénicas del Cu.....	122
4.2. La angiogénesis en terapias de regeneración ósea.....	129
5. Matrices MBG incluyendo Cu en su composición.....	131
5.1. Procedimiento experimental.....	132
5.1.1. Síntesis del material MBG libre de Cu.....	132
5.1.2. Síntesis de materiales MBG incluyendo Cu en una única etapa.....	133
5.1.3. Síntesis de materiales MBG incluyendo Cu utilizando una segunda etapa de impregnación.....	133
5.1.4. Caracterización físico-química de los materiales.....	134
5.1.5. Ensayos de biodegradabilidad y bioactividad.....	136
5.2. Resultados y discusión.....	136
5.2.1. Caracterización físico-química de los materiales.....	136
5.2.2. Ensayos de biodegradabilidad.....	153
5.2.2.1. Protocolo para la determinación de Si por el método UV-Vis.....	154
5.2.2.2. Curva de calibrado para la determinación de Si por el método UV-Vis.....	155
5.2.2.3. Seguimiento de la degradación de MBG en DIH ₂ O utilizando el método UV-Vis.....	158

5.2.2.4. Evolución de la degradación de los MBG en DIH ₂ O con respecto al tiempo utilizando el método UV-Vis.....	163
5.2.2.5. Seguimiento de la degradación de los MBG-5Cu en DIH ₂ O utilizando el método de UV-Vis.....	164
5.2.2.6. Seguimiento de la degradación de los materiales MBG-Cu utilizando en método ICP-MS.....	167
5.3. Conclusiones.....	172
6. Referencias.....	173

Capítulo 4. Evaluación de la funcionalidad angiogénica de biomateriales MBG

1. Introducción.....	197
1.1. Ensayos para evaluar la angiogénesis.....	200
1.1.1 Ensayos <i>in vitro</i>	200
1.1.1.1. Proliferación de células endoteliales.....	201
1.1.1.2. Migración de células endoteliales.....	201
1.1.1.3. Diferenciación de células endoteliales.....	202
1.1.2. Ensayos <i>in vivo</i>	202
1.1.2.1. Ensayos de angiogénesis en la córnea.....	202
1.1.2.2. Ensayo de la membrana corioalantoidea de embrión de pollo (CAM).....	203
1.2. Pez cebra como modelo para evaluar la angiogénesis <i>in vivo</i>	204
2. Procedimiento experimental.....	210
2.1. Ensayos <i>in vitro</i>	211
2.1.1. Viabilidad celular.....	212
2.1.2. Migración celular.....	212

2.2. Ensayos <i>in vivo</i>	213
2.2.1. Obtención de embriones.....	213
2.2.2. Ensayo tipo 1: Embriones expuestos a medios conteniendo MBG y SG-MBG-5Cu.....	215
2.2.3. Ensayo tipo 2: Microinyección directa en vitelo de materiales MBG y SG-MBG-5Cu.....	217
2.2.4. Evaluación de angiogénesis: Vasos subintestinales.....	218
2.2.5. Análisis estadístico y multivariante.....	220
2.2.6. Análisis de imagen.....	221
3. Resultados y discusión.....	222
3.1. Resultados de los ensayos <i>in vitro</i>	222
3.1.1. Viabilidad celular.....	222
3.1.2. Migración celular.....	223
3.2. Resultados de los ensayos <i>in vivo</i>	225
3.2.1. Ensayo tipo 1: Embriones expuestos a medios conteniendo MBG y SG-MBG-5Cu.....	225
3.2.2. Ensayo tipo 2: Microinyección directa en vitelo de materiales MBG y SG-MBG-5Cu.....	240
4. Conclusiones.....	246
5. Referencias.....	248
CONCLUSIONES GENERALES	259
Anexo 1. Acrónimos y abreviaturas.....	263
Anexo 2. Métodos y técnicas de caracterización.....	273
Anexo 3. Publicación.....	285

Introducción general

1. Antecedentes

El término biomaterial engloba a compuestos de origen natural o sintético, que puede ser materiales poliméricos, cerámicos y metales o combinaciones de estos, utilizados para aplicaciones médicas. Biomaterial se definió en 1986 por la “Sociedad Europea de Biomateriales” como un “material empleado en un dispositivo médico con el fin de interactuar con sistemas biológicos¹”. Sin embargo, esta definición ha ido reformulándose en el tiempo de acuerdo a nuevos avances y descubrimientos que se han ido produciendo particularmente en aspectos de interacción de la superficie de un material con el medio fisiológico². Una definición más reciente propuesta por William y ampliamente utilizada, es “material diseñado para actuar interfacialmente con sistemas biológicos con el fin de evaluar, tratar, aumentar o reemplazar algún tejido, órgano o función del cuerpo³”. Antes de esta definición, la opinión predominante era que los materiales

adecuados para aplicación médica eran aquellos materiales considerados inertes que cumplieran con unos requisitos mínimos de compatibilidad biológica.

En la actualidad los biomateriales son diseñados, sintetizados y procesados para que tengan una respuesta específica una vez en contacto con un tejido u órgano. Esto implica una intensa colaboración multidisciplinar entre investigadores en Ciencia de Materiales, Bioingeniería, Biotecnología, Medicina Clínica y otras disciplinas de ciencias básicas como la Química, Física y Biología.

1.1. Evolución histórica de los biomateriales

La evolución de los biomateriales durante las últimas décadas se ha descrito en base a tres “generaciones” atendiendo al tipo de propiedades y funcionalidad conseguida.

La primera generación de biomateriales para su implantación en sistemas vivos se refiere a los materiales desarrollados en los años 60 y 70. El objetivo de los primeros biomateriales era “alcanzar una combinación adecuada de propiedades físicas para reemplazar las del tejido sustituido con una respuesta tóxica mínima del receptor”⁴. Para esto se buscaba que los materiales fueran inertes al ser implantados en el cuerpo con el fin de reducir la respuesta inmune y/o reacciones a cuerpo extraño. En este sentido, los biomateriales de primera generación se caracterizaban por ser bioinertes, es decir, que la respuesta del material en contacto con el tejido vivo era casi nula. Como consecuencia de ello, se formaba una capa de tejido fibroso que comprometía la interacción y fijación implante-tejido.

En los años setenta surgieron materiales que interactuaban de manera activa en el entorno biológico favoreciendo la integración del biomaterial y creando una

interfaz continúa implante-tejido, así como la propiedad de experimentar fenómenos de degradación progresiva en presencia de fluidos corporales, mientras el nuevo tejido se regeneraba y cicatrizaba. Estos materiales son considerados bioactivos y bioreabsorbibles⁵.

Para la tercera generación se consideran aquellos materiales que buscan favorecer la regeneración de tejido, mediante estímulos a nivel celular y molecular, y mientras se combinan las propiedades de bioreabsorbabilidad y bioactividad⁴.

1.2. Requerimientos de los biomateriales

Cualquier biomaterial, para poder ser implantado en el cuerpo humano, debe cumplir unos requisitos generales que se engloban en el concepto de biocompatibilidad. En este concepto se aúna la capacidad de un biomaterial para realizar la función deseada con respecto a una terapia médica, sin provocar ningún efecto local o sistémico indeseable en el receptor, al mismo tiempo que se genera una respuesta celular o tisular adecuada que mejore la patología específica⁶. En este sentido, el biomaterial debe cumplir unos requisitos que se pueden resumir en los siguientes puntos:

- 1) Ser biocompatible, aceptado por el organismo receptor, y no provocar que éste desarrolle mecanismos de rechazo ante la presencia del biomaterial.
- 2) No ser tóxico ni cancerígeno.
- 3) Ser químicamente estable o biodegradable en productos no tóxicos.
- 4) Mantener sus propiedades mecánicas y estructura físico-química en el entorno biológico durante el tiempo que deba permanecer íntegro en el organismo.
- 5) Su diseño, tamaño y forma como implante deben ser los adecuados según la terapia a la que se destine su uso.

Sin embargo, los requisitos específicos de los biomateriales dependerán de la función que deba desempeñar, así como de la aplicación terapéutica concreta para el que va a ser introducido en el organismo. Teniendo en cuenta la complejidad de las reacciones tisulares y del entorno fisiológico, la diversidad de biomateriales, y la gran variedad de sus aplicaciones, la biocompatibilidad de los materiales debe evaluarse de forma particular y concreta para la función para la que hayan sido concebidos y diseñados.

1.3. Clasificación de los biomateriales

Los materiales de uso biomédico pueden tener un origen artificial (sintéticos) o natural (biológicos). La Figura 1.1. presenta un esquema con una clasificación de los tipos de materiales para uso biomédico.

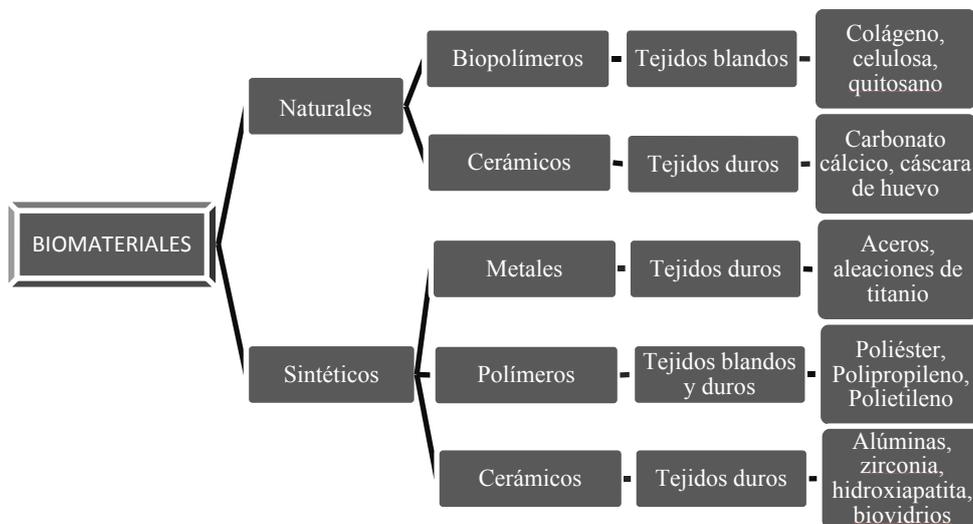


Figura 1.1. Esquema de la clasificación y aplicación de los biomateriales según su origen y naturaleza.

1.3.1. Materiales metálicos

Los metales son sólidos inorgánicos particularmente útiles en aplicaciones estructurales o de carga. Como biomateriales destaca su uso con dos propósitos: fabricación de prótesis para reemplazar una parte del cuerpo (articulaciones, placas craneales, clavos), o implantes utilizados en la estabilización y ayuda al proceso normal de reparación de un tejido (por ejemplo, unión de huesos rotos). Como características generales, presentan buenas conductividades térmicas y eléctricas, alta resistencia mecánica, elevada rigidez, ductilidad y conformabilidad^{5,7}.

Una limitación de estos materiales es su reactividad superficial en medios húmedos con concentración de sales que puedan dar lugar a procesos de corrosión y lixiviación de iones de los metales de su composición, problema general de los metales cuando se encuentra en un ambiente fisiológico. Como consecuencia, el material se deteriora y el implante se debilita. Además, durante la corrosión se liberan productos que pueden producir efectos no deseados o incluso resultar tóxicos para los tejidos circundantes⁸. Se utilizan aceros inoxidable, aleaciones base cobalto-cromo, titanio y otras aleaciones titanio-aluminio-vanadio, tántalo y metales nobles como platino y oro⁵.

1.3.2. Materiales poliméricos

Los polímeros sintéticos son materiales orgánicos, sólidos, no metálicos que se obtienen a partir del petróleo y se caracterizan por su poca resistencia a la temperatura. Las propiedades físicas y estabilidad química de estos materiales dependen de su composición química y de su grado de entrecruzamiento⁹.

Los biomateriales poliméricos son ampliamente utilizados en clínica, por las enormes posibilidades que presentan, tanto en variedad de compuestos como en la posibilidad de fabricarlos y conformarlos fácilmente en fibras, tejidos, películas o

bloques de diferentes tamaños y formas con características bien determinadas (textura, rigidez, densidad, flexibilidad). Además, se encuentran formulaciones bioestables (con carácter permanente y particularmente útiles para sustituir de forma parcial o total tejidos u órganos) o biodegradables (con carácter temporal, con una funcionalidad específica durante un tiempo limitado), lo que amplía su aplicación en biomedicina. También son materiales ideales para el transporte y liberación de fármacos porque son capaces de incorporar grandes cantidades y liberarlos posteriormente¹⁰.

Existe una gran diversidad de polímeros naturales y sintéticos disponibles. Dentro de los sintéticos el ácido poliláctico (PLA, por Polylactic acid) y el ácido poliglicólico (PGA, por Polyglycolic acid) son muy utilizados por poseer buenas propiedades mecánicas. Entre los biopolímeros destacan el colágeno tipo I y ácido hialurónico por ser materiales componentes del organismo humano y por tanto presentar una gran biocompatibilidad y favorecer el reconocimiento celular¹¹.

1.3.3. Materiales cerámicos

Las cerámicas engloban un grupo de compuestos inorgánicos compuestos por elementos metálicos y no metálicos que son estables químicamente frente al oxígeno, los medios ácidos, alcalinos y salinos, y los disolventes orgánicos. Son muy resistentes al desgaste y generalmente se comportan como buenos aislantes térmicos y eléctricos.

Existe una gran variedad de biocerámicas, entre ellas se encuentran cerámicas que son bioinertes (alúmina y el zirconia), reabsorbibles (fosfato tricálcico (TCP, por Tricalcium phosphate)), bioactivas y porosas que favorecen el crecimiento del tejido circundante (hidroxiapatito de calcio (HA, por Hydroxyapatite) y vidrios

bioactivos (BG, por Bioactive glasses)). En general, la mayor desventaja que presentan las cerámicas es su fragilidad y pobres propiedades mecánicas. Sin embargo, las excelentes propiedades para la integración con el tejido vivo han permitido un gran desarrollo de estos materiales para su aplicación en terapias de reparación tisular donde se busca la regeneración del tejido¹².

En este sentido, los materiales cerámicos más estudiados, son el HA sintético y los BG, por su aplicación en regeneración ósea dada su capacidad de unirse al tejido vivo formando lo que se conoce como fijación bioactiva¹³, además de tener una similitud química y estructural con la fase mineral natural del hueso que forma su matriz extracelular (ECM, por Extracellular matrix).

1.4. Vidrios bioactivos (BG)

En los años 60 el Prof L.L. Hench inició una investigación que dio lugar a un vidrio que mostró la capacidad de unirse con el tejido vivo¹³. El vidrio sintetizado por el método de fusión contenía un 45 % de peso de SiO₂ y un 6 % de peso de P₂O₅, en el sistema 45SiO₂-24.5Na₂O-24.5CaO-6P₂O₅, y se patentó en 1969 con el nombre de Bioglass® 45S5. Se observó que este BG formaba en su superficie una capa biológicamente activa de HA carbonatada al entrar en contacto con los fluidos biológicos de cuerpo, a través de la cual se establecía la unión de tejidos^{4,12,14}. Años después, Li y col¹⁵, incorporaron la tecnología sol-gel como un método alternativo para sintetizar BG de elevada pureza y homogeneidad, a temperatura ambiente. Además, este método de síntesis amplió el rango composicional de los vidrios, permitiendo un elevado contenido de Si (hasta un 90%), cuando los vidrios convencionales obtenidos por fusión permiten como máximo un 60 % de sílice. Esto ha permitido la exploración y síntesis de una gran variación en la composición

de los BG con respecto a la propuesta original de Hench en el sistema $\text{SiO}_2\text{-Na}_2\text{O-CaO-P}_2\text{O}_5$.

Una de las principales diferencias entre los vidrios sintetizados por sol-gel y por fusión es el área superficial y la porosidad que tiene una gran influencia en su reactividad. Para los vidrios obtenidos por sol-gel el área superficial puede llegar a $300 \text{ m}^2\cdot\text{g}^{-1}$, mientras que los vidrios creados por fusión presentan un área superficial inferior a $1 \text{ m}^2\cdot\text{g}^{-1}$ para partículas sin tratar y alrededor de $2 \text{ m}^2\cdot\text{g}^{-1}$ para partículas micrométricas¹⁶. Los vidrios obtenidos por fusión que se someten a altas temperaturas ($>1000 \text{ }^\circ\text{C}$), no presentan porosidad y su área superficial depende únicamente del tamaño de partícula disgregado. Sin embargo, las propiedades texturales de los vidrios sol-gel altamente porosos tienen una gran influencia en la cinética de formación de HA en comparación con los BG convencionales¹⁷⁻¹⁹.

En general, el proceso sol-gel involucra la transición de un sistema líquido coloidal llamado sol a un gel. Los precursores más comúnmente utilizados son los alcóxidos que, reaccionan con agua mediante las reacciones de hidrólisis y condensación, que generalmente ocurren simultáneamente²⁰.

La vidrios de sílice se preparan a partir de la policondensación de un alcóxido de Si, comúnmente, el tetraetilortosilicato (TEOS, $\text{C}_8\text{H}_{20}\text{O}_4\text{Si}$). La reacción de hidrólisis ocurre cuando el TEOS y el agua se mezclan en un solvente común, generalmente etanol, en presencia de un catalizador ácido o básico. La reacción de hidrólisis conduce a la formación de grupos silanol ($\equiv\text{Si-OH}$), mientras que la condensación produce enlaces siloxanos ($\equiv\text{Si-O-Si}\equiv$), resultando como productos de la reacción agua y alcohol, como se observa en la Figura 1.2.

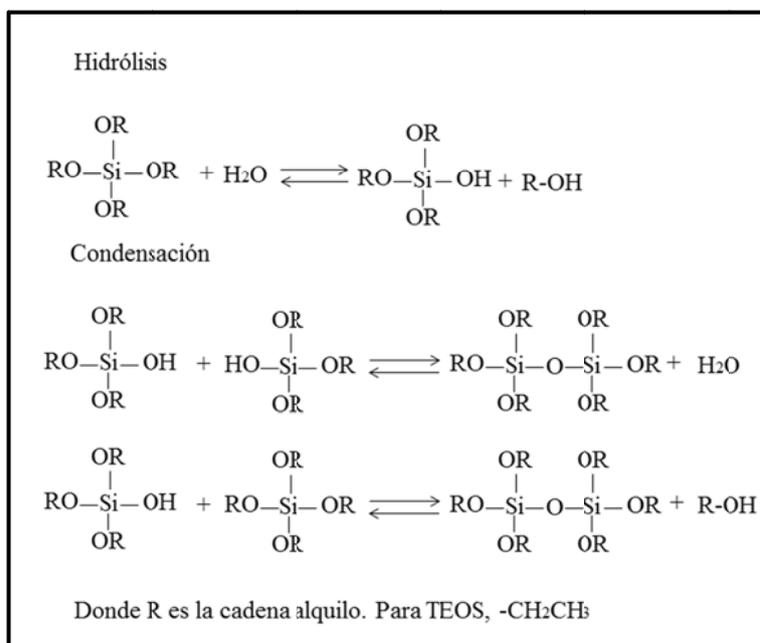


Figura 1.2. Etapas de reacción, hidrólisis y policondensación, del precursor alcóxido TEOS.

Durante el proceso de gelificación las partículas de sílice coloidales se unen entre sí y con los iones presentes, en el caso de sistemas multicomponentes, que da lugar a un incremento en viscosidad y permite la formación de una red tridimensional porosa e interconectada. Para su transformación en vidrio el gel tiene que ser sometido a un tratamiento térmico que va eliminando el agua que contiene el gel en elevada proporción y que produce la progresiva densificación del mismo²¹.

En este sentido, la fabricación de vidrios de sílice usando tecnología sol-gel dio lugar a BG con propiedades interesantes para aplicaciones médicas. Por un lado, las altas áreas superficiales que exhiben estos BG, favorece directamente a la

cinética de reactividad superficial (bioactividad). Por otro lado, el proceso sol-gel proporciona materiales porosos que ofrecen la posibilidad de funcionar como matrices para albergar una variedad de compuestos orgánicos e inorgánicos y moléculas biológicas^{22,23}.

1.5. Concepto de bioactividad

De acuerdo a los descubrimientos del Prof. Hench, la bioactividad de los materiales cerámicos está directamente relacionada con su proceso de biodegradación. Así, la respuesta bioactiva de los materiales comienza con la redisolución de la superficie del material cuando ésta entra en contacto con los fluidos fisiológicos.

Los mecanismos de bioactividad han sido ampliamente estudiados a principios de los años 70²⁴. Los estudios apuntan a que la propiedad de estos materiales cerámicos para formar enlace con el hueso, consecuencia de su reactividad química en contacto con los fluidos corporales, produce la formación de una capa de HA carbonatada sobre la superficie. Debido a que el HA es similar al componente mineral del hueso, se forma una interfaz biomimética con el tejido natural que es reconocida como tal por el entorno biológico y celular.

Se ha establecido que la unión del material Bioglass® 45S5 con el hueso se produce a través de una secuencia de reacciones superficiales que se engloba en el "proceso bioactivo", tal y como se detallan a continuación¹²:

1. Intercambio iónico entre el fluido y la matriz vítrea.
2. Disolución de la red vítrea.
3. Lixiviación de los cationes Na^{+1} y Ca^{+2} a los fluidos circundantes.
4. Formación de silanoles (Si-OH) en la superficie del vidrio.

5. Formación de una capa de gel de sílice que incorpora Ca y P de la solución, formando una capa de fosfato de calcio (CaP) amorfo.

6. Finalmente, la cristalización de la película de CaP amorfa con la incorporación de carbonatos de la disolución, se forma la capa de HA carbonatado cristalino.

Esta serie de eventos fisicoquímicos en la superficie del material se acompaña de la adsorción e incorporación de moléculas biológicas y la adhesión de células en el entorno. La formación inicial de la capa superficial de CaP amorfo facilita la incorporación de estructuras orgánicas y de la adhesión y proliferación celular. En el mecanismo de unión biológica, la interfaz superficie material-tejido vivo se crea por la inserción de fibras de colágeno en el biomaterial²⁵. Tanto la cristalización de CaP en la capa gelatinosa de sílice como la formación de HA como resultado de la actividad celular ocurre simultáneamente dando lugar a un enlace biomaterial-tejido robusto que imita la disposición natural del hueso, en la que nanocristales de HA son embebidos en una matriz de colágeno.

Los estudios comparativos *in vitro* e *in vivo* de materiales BG derivados del proceso sol-gel, muestran mayor velocidad en la formación de HA superficial, de fijación de la unión así como mejores propiedades de degradación y bioresorción, con respecto al material Bioglass® 45S5 obtenido por fusión^{15,26}. Esto se debe, como se mencionó anteriormente, a que los materiales BG sol-gel presentan altas áreas superficiales que favorece el intercambio iónico con fluidos biológicos y, por lo tanto, su cinética de reacción. Además, los estudios *in vivo* indican que la nueva composición BG sol-gel tienen muy alta capacidad para inducir los procesos de adhesión, proliferación y diferenciación celular, sin los inconvenientes del alto

contenido en Na^+ , que presentan los BG derivados de fusión y que puede en mayor medida alterar el microambiente fisiológico^{17,21}.

Actualmente, la respuesta bioactiva de los materiales se ensaya preliminarmente mediante un tratamiento *in vitro*²⁷ y los resultados se admiten como un índice del potencial bioactivo del material²⁸. Para estos ensayos *in vitro* se utilizan soluciones que imitan la composición inorgánica de los fluidos corporales. En 2006, Kokubo y Takadama desarrollaron un fluido corporal acelular simulado (SBF, por Simulated body fluid), con concentraciones iónicas inorgánicas similares a las del plasma, e hicieron ensayos sistemáticos para validar el método. Concluyeron que la formación de una capa de HA carbonatada en la superficie de un material, después de su inmersión en SBF, es extrapolable al comportamiento del mismo material en un organismo vivo. A pesar de ser una aproximación *in vitro* muy simplificada respecto a un sistema vivo real es un ensayo útil y muy utilizado para una primera prueba que proporciona información cualitativa y cuantitativa^{27,29}.

La bioactividad es, por tanto, un fenómeno superficial de los materiales que depende en gran medida de la estructura, carga, topografía y morfología de la superficie. En este sentido, controlar y regular los parámetros texturales y características físicoquímicas de la superficie del biomaterial puede permitir regular y modificar la respuesta bioactiva y por tanto la capacidad los biomateriales para estimular y promover una respuesta del entorno biológico y celular adecuada para la integración y regeneración ósea.

2. Vidrios bioactivos nanoporosos ordenados (MBG)

Un nuevo avance en el desarrollo de los BG se dio cuando el Prof. D.Y. Zhao y col.³⁰ combinaron la química sol-gel de sistemas multicomponente $\text{SiO}_2\text{-CaO-P}_2\text{O}_5$

con las bases de la química supramolecular de surfactantes, obteniendo BG con propiedades texturales propias de los materiales mesoporosos de SiO₂ tipo MCM-41 y SBA-15.

En esta estrategia, la incorporación de agentes directores de estructuras que bajo condiciones de síntesis adecuadas se autorganizan en micelas, aunado con la técnica de autoensamblaje inducido por evaporación (EISA, por Evaporation induced self assembly)³¹, permiten la formación de una mesofase ordenada³². La química del surfactante (iónico, no iónico, polimérico, etc) es uno de los factores más importantes que define la forma y tamaño de los poros del material debido que actúa como una plantilla orgánica que une a los precursores de sílice hidrolizados a través del componente hidrófilo²¹ (Ver Figura 1.3).

Los materiales BG resultantes presentan una estructura nanoporosa altamente ordenada con un diámetro de poro que varía entre 5 y 20 nm y magnitudes de superficie y porosidad hasta cinco veces superiores a las obtenidas por el método sol-gel convencional^{30,33}. Como consecuencia de ello, nos encontramos ante BG que presentan una mayor cinética de bioactividad *in vitro*. En este contexto, dado que la bioactividad es una cascada de eventos de superficie, el control de ésta a escala nanométrica, hace que sea posible imitar el proceso fisiológico de biomineralización y, así, estimular la función de los células para los propósitos de regeneración. Además, la superficie nanoporosa ordenada que presentan los convierte en candidatos excelentes para ser utilizados como matrices liberadoras de fármacos a nivel local. En la bibliografía estos biomateriales son denominados Mesoporous Bioactive Glasses (MBG) y en este trabajo de Tesis se va a adoptar ese nombre y características para hacer referencia a este tipo de vidrios bioactivos con mesoporos, es decir, que presentan una disposición de nanoporos ordenados.

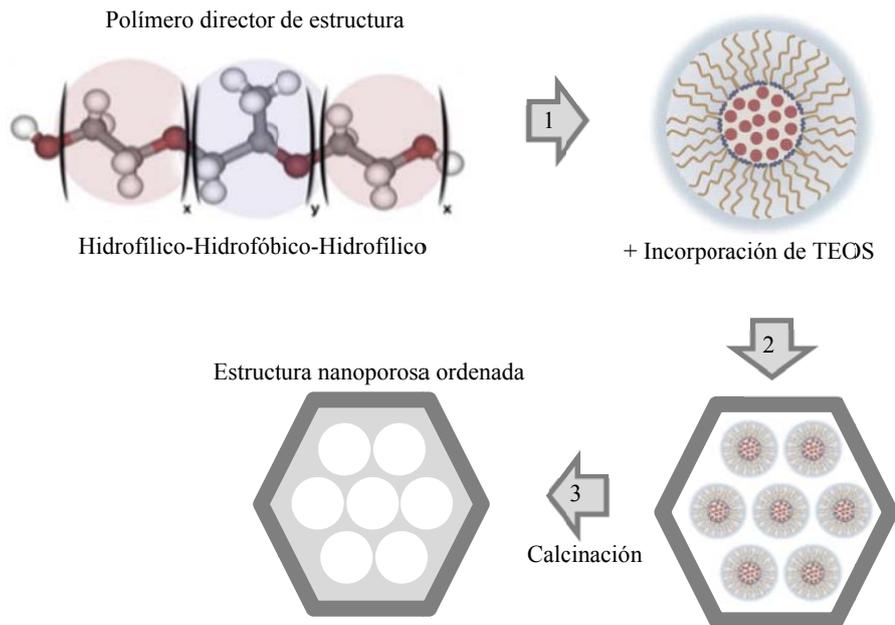


Figura 1.3. Esquema del mecanismo de autoensamblaje de las micelas de un surfactante copolímero de tres bloques. (1) Formación de micelas, (2) organización hexagonal de micelas y formación de la capa de sílice y (3) eliminación del surfactante.

2.1. Rango composicional y respuesta bioactiva de material MBG en el sistema SiO₂-CaO-P₂O₅

Como se ha venido indicando, los parámetros texturales influyen directamente en la bioactividad del material, ya que este proceso es esencialmente una reacción superficial. Sin embargo, la bioactividad también está influenciada en gran medida por la composición y la estructura del biomaterial. En este sentido, los MBG con altos contenidos de SiO₂ tiene una estructura nanoporosa más ordenada, con un área de superficie específica y un volumen de poros mayor que los MBG con bajo contenido de SiO₂. Sin embargo, los materiales de SiO₂ como único componente carecen de una respuesta bioactiva adecuada, que mejora con la incorporación iones como el Ca y P.

En la Figura 1.4 se representan mediante un diagrama ternario las composiciones MBG publicadas en la bibliografía que tienen una respuesta bioactiva de clase A. Esta clase de bioactividad hace referencia a materiales cuyas reacciones superficiales implican su redisolución en iones Si, Ca, P y que dan lugar tanto a respuestas intracelulares como extracelulares en la interfase del vidrio y el entorno fisiológico. En la Tabla 1.1 se muestran las propiedades texturales de las mismas. Como se puede observar, las superficies específicas varían entre 200 y 550 m²·g⁻¹ y valores de volumen y diámetro de poro en el rango 0.4-0.8 cm³·g⁻¹ y 4-7 nm, respectivamente.

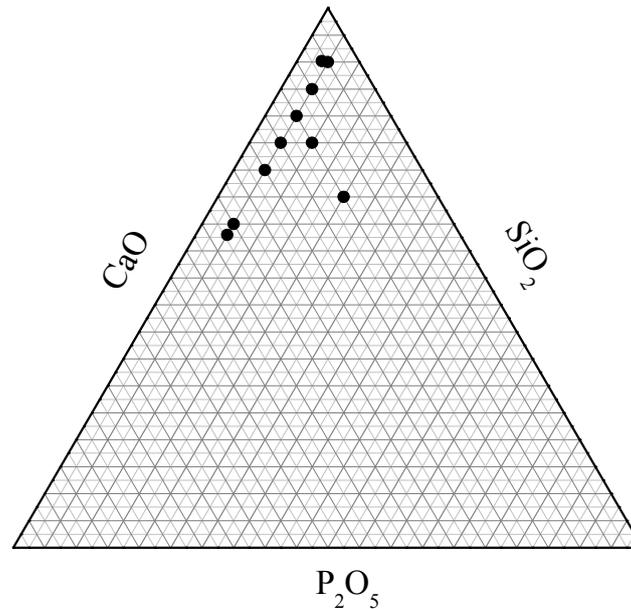


Figura 1.4. Diagrama ternario que indica el rango composicional de vidrios bioactivos con nanoporos ordenados.

Para entender el comportamiento bioactivo se debe considerar la estructura-composición del biomaterial. Los MBG son compuestos estructuralmente amorfos constituidos por una red covalentemente unida de SiO_2 , que es el formador de red principal, junto con el P_2O_5 . Ambos componentes forman unidades tetraédricas SiO_4 y PO_4 unidas covalentemente a través de los átomos de oxígeno en el vértice.

Tabla 1.1. Propiedades texturales y respuesta bioactiva de los MBG con diferentes composiciones en el sistema SiO₂-CaO-P₂O₅.

Composición en el sistema SiO ₂ :CaO:P ₂ O ₅	Área superficial (m ² ·g ⁻¹)	Volumen de poro (cm ³ ·g ⁻¹)	Diámetro de poro (nm)	Bioactividad <i>in vitro</i> (h)	Referencias
58:37:5	195	0.46	9.4	24	³⁴
65:15:20	430	0.51	4.2	72	³⁵
60:35:5	310	0.43	4.3	8	³⁰
70:25:5	556**	1.53	3.8/15.1*	24	³⁶
	319	0.49	4.6	8	³⁰
75:20:5	393	0.59	6.0	8	³⁴
75:15:10	376	0.46	4.2	72	³⁵
80:15:5	554**	0.79	3.9/5.4	24	³⁶
	351	0.49	4.6	8	³⁰
85:10:5	427	0.61	5.7	4	^{34,37}
	499-	0.70	6.1	12	³⁸
90:5:5	497**	0.69	3.9/4.8*	24	³⁶
92:6:4	376	0.66	5.7	48	³⁹

*Distribuciones de diámetro de poro bimodal

**MBG en forma de microesferas

-Incorporación de ácido acético en la síntesis

Por su lado, el CaO se comporta como un modificador de red, cuyos cationes interrumpen la red covalente, estableciendo interacciones iónicas con los átomos de oxígeno, que se convierten en átomos de oxígeno no enlazados (NBO, por Non-bridging oxygen). Algunos autores sugieren que existe una relación directa entre el número de NBO y la velocidad de reactividad. En este sentido, el modelo de Stevel propone el parámetro Y , análogo al grado de conectividad de red, como un valor con el que se puede predecir la reactividad de los vidrios. Este parámetro se calcula a partir de la composición molar del vidrio,

$$Y = 2Z - 2R$$

donde Z es el número promedio de coordinación de los cationes formadores de red, y R es la relación entre el número total de oxígenos y el número total de cationes formadores de vidrio⁴⁰.

Los vidrios que contienen únicamente SiO_2 , con todos los átomos de oxígeno enlazados, tienen valores Y iguales a 4. Por el contrario, los estudios en BG de diferentes composiciones indican que aquellos vidrios cuyo $Y < 2.3$ exhiben bioactividad *in vitro*⁴¹. En consecuencia, los modificadores de red al producir más NBO aumentan la reactividad del vidrio y, por tanto, favorecen la respuesta bioactiva⁴².

Además, el Ca es fundamental para desencadenar el proceso bioactivo, ya que durante las primeras etapas, el vidrio administra concentraciones de cationes Ca^{+2} al fluido circundante que, aparte de aumentar el pH, induce la nucleación y cristalización de apatita en la superficie del vidrio⁴³. Sin embargo, un exceso de CaO en la composición del MBG puede causar toxicidad durante la biodegradación del biomaterial⁴⁴.

Por otro lado, la incorporación de pequeñas concentraciones de P_2O_5 , al igual que el CaO es determinante en el compartimiento bioactivo y en la estructura mesoporosa del vidrio⁴⁴. Esto se debe a que el P_2O_5 , en presencia de CaO, conduce la formación de agregados de fosfato de calcio amorfo en la superficie. Este fenómeno químico se ha demostrado mediante microscopía electrónica de alta resolución (HRTEM, por High-resolution transmission electron microscopy) y por espectroscopía de resonancia magnética nuclear (RMN, por Nuclear magnetic resonance spectroscopy) y se ha correlacionado con dos aspectos muy importantes. Por un lado, durante la formación de CaP amorfo se consume iones Ca^{+2} , que en consecuencia ayuda a conservar la estabilidad de la red vítrea al disminuir la disponibilidad de cationes modificadores de red. Por otro lado, la presencia de núcleos nanocristalinos de ortofosfatos promueve una microestructura con regiones donde la conexión química de la estructura de vidrio es más débil. Estos defectos,

influyen en la biodegradabilidad del vidrio y actúan como sitios preferenciales para la deposición de HA^{35,45}. No obstante, se debe considerar que altas concentraciones (mayores a 10 % mol) de P₂O₅ en la composición del MBG conlleva una mayor segregación superficial de agregados de CaP. En consecuencia, estos agregados no solubles inhibirían el crecimiento de HA cristalina, debido a que impiden el intercambio iónico que desencadena el proceso bioactivo³⁵.

En general, la bibliografía sugiere que el material MBG en el sistema 80SiO₂-CaO-P₂O₅ con 80-85 % de Si, con Ca y P en su composición, son los que presentan una mayor bioactividad en términos de cinética y de la cantidad de HA que crece en su superficie. Para estas composiciones, ≈ 4 h son suficiente, para la nucleación de la HA, en condiciones *in vitro*. Esto se puede atribuir principalmente a su composición, ya que como se observa en la Tabla 1.1, no hay cambios drásticos en sus propiedades texturales. En este sentido, estos materiales exhiben una bioactividad excelente debido a la cantidad y la accesibilidad de los cationes Ca⁺² al fluido circundante, la presencia de agregados de fosfato de calcio y las propiedades texturales inherentes a su estructura nanoporosa ordenada.

3. Motivación, objetivos y estructura del presente trabajo de Tesis

Los MBG presentados constituyen unos materiales muy prometedores para su aplicación en el campo de la ingeniería tisular de hueso. Por un lado pueden sintetizarse con una composición en el rango en que se han demostrado bioactivos. Por otro lado, sus propiedades texturales les confieren unas características notables que promueven esta bioactividad además de aportar otras ventajas adicionales como las de ser materiales con capacidad para adsorber biomoléculas o agentes terapéuticos.

Sin embargo, la síntesis sol-gel da lugar a la obtención de biomateriales en forma de micropartículas lo que dificulta su utilización como implantes o soportes celulares para ingeniería tisular. Por ello, un reto importante para su implementación en estas aplicaciones es el de procesarlos o conformarlos en estructuras estables que puedan ser manipuladas como implantes o como matrices soporte para ingeniería tisular.

En este sentido, el primer objetivo en este trabajo de Tesis ha sido el desarrollo de estructuras macroporosas con unas propiedades mecánicas mejoradas mientras se preservaran las características texturales de los materiales MBG.

Otro aspecto muy interesante en el estudio de los materiales MBG es su potencialidad como matrices administradoras de los iones que lo componen como productos de su biodegradación. Los estudios, tanto *in vitro* como *in vivo*, sobre las propiedades biológicas de los productos de la disolución iónica de los materiales MBG se han centrado en los iones de su composición base, Si, Ca y P, y señalan que estos iones pueden modificar la expresión génica en células del tipo osteoblasto, así como inferir en otros aspectos relacionados con los procesos de regeneración tisular, como la angiogénesis, la respuesta inflamatoria y la actividad bactericida⁴³. En este sentido, los MBG son sistemas versátiles que pueden incorporar otros elementos químicos con funcionalidad terapéutica.

El estudio de la aplicación de los MBG como materiales administradores de iones con capacidad terapéutica es el segundo objetivo de esta Tesis.

Por tanto, el objetivo general este trabajo de Tesis Doctoral es el estudio de materiales MBG para su aplicación en ingeniería de tejidos como matriz biomimética administradora de iones terapéuticos. Para alcanzar este objetivo general, esta Tesis Doctoral se ha estructurado en varios capítulos con los sub-objetivos específicos, que se indican a continuación.

Capítulo 2.

Considerando que para terapias de regeneración ósea se precisan de estructuras que mimeticen la ECM, el objetivo específico de este capítulo es el desarrollo de matrices biomiméticas de materiales MBG con estructuras macroporosas que permitan la migración celular y vascularización mientras se preservan las características de nanoporosidad ordenada del material MBG precursor. Para ello, primero se desarrollaran nuevas estructuras tridimensionales basadas en biocerámicas que, posteriormente, se optimizaron con el revestimiento de un biopolímero. En este capítulo se estudia la influencia de las distintas variables del procesado sobre las propiedades fisico-químicas, mecánicas y bioactividad de las estructuras finales.

Capítulo 3.

Este capítulo se desarrolló con el objetivo de evaluar la funcionalidad del MBG como matriz administradora de iones terapéuticos. La primera tarea fue ensayar nuevas síntesis químicas para obtener MBG en sistema $\text{SiO}_2\text{-CaO-P}_2\text{O}_5$ con incorporación de Cu en su composición así como de su posterior caracterización fisico-química. Se ensayaron dos rutas de síntesis y diferentes composiciones para evaluar la influencia de estos parámetros sobre sus propiedades texturales y su mecanismo de biodegradación. Este capítulo también incluye diferentes estudios de

degradación *in vitro* de los biomateriales obtenidos para la evaluación de su capacidad como matriz administradora de los iones constituyentes.

Capítulo 4.

En este capítulo se evalúa la funcionalidad angiogénica de los biomateriales MBG y MBG con Cu y el efecto de cada uno de los iones administrados durante su degradación. Para ello, se llevaron a cabo ensayos *in vitro* de viabilidad y migración celular, así como ensayos *in vivo* en el modelo pez cebra.

4. Referencias

- (1) Williams, D. F. *Definition in Biomaterials*; 1987.
- (2) Williams, D. F. The Biomaterials Conundrum in Tissue Engineering. *Tissue Eng. Part A* **2014**, *20* (7-8), 1129–1131.
- (3) Williams, D. F. *The William Dictionary of Biomaterials*; 1999.
- (4) Hench, L. L.; Polak, J. M. Third-Generation Biomedical Materials. *Science* (80-.). **2002**, *295* (5557), 1014–1017.
- (5) Navarro, M.; Michiardi, A.; Castaño, O.; Planell, J. A. Biomaterials in Orthopaedics. *J R Soc Interface* **2008**, *5*, 1137–1158.
- (6) Williams, D. F. On the Mechanisms of Biocompatibility. *Biomaterials* **2008**, *29* (20), 2941–2953.
- (7) Kokubo, T.; Kim, H. M.; Kawashita, M.; Nakamura, T. Bioactive Metals: Preparation and Properties. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **2004**, *15* (2), 99–107.
- (8) Singh, R.; Dahotre, N. B. Corrosion Degradation and Prevention by Surface Modification of Biometallic Materials. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **2007**, *18* (5), 725–751.

- (9) Kolybaba, M.; Tabil, L. G.; Panigrahi, S.; Crerar, W. J.; Powell, T.; Wang, B. Biodegradable Polymers : Past, Present, and Future. *Soc. Eng. Agric. food, Biol. Syst.* **2003**, *03* (0007), 1–15.
- (10) Heras Alarcón, C.; Pennadam, S.; Alexander, C. Stimuli Responsive Polymers for Biomedical Applications. *Chem. Soc. Rev.* **2005**, *34* (3), 276–285.
- (11) Rojas Cortés, M. G.; Valleho Díaz, B. M.; Perilla, J. E. Los Biopolímeros Como Materiales Para El Desarrollo En Aplicaciones Farmaceuticas Y de Uso Biomédico. *Rev. Ing. e Investig.* **2008**, *28* (1), 57–71.
- (12) Hench, L. L. Bioceramics – from Concept to Clinic. *J. Am. Ceram. Soc.* **1991**, *74* (7), 1487–1510.
- (13) Hench, L. L.; Splinter, R. J.; Allen, W. C.; Greenlee, T. K. Bonding Mechanisms at the Interface of Ceramic Prosthetic Materials. *J. Biomed. Mater. Res. Symp.* **1971**, *5* (6), 117–141.
- (14) Suvorova, E. I.; Christensson, F.; Lundager Madsen, H. E.; Chernov, A. A. Terrestrial and Space-Grown HAP and OCP Crystals: Effect of Growth Conditions on Perfection and Morphology. *J. Cryst. Growth* **1998**, *186* (1-2), 262–274.
- (15) Li, R.; Clark, A. E.; Hench, L. L. An Investigation of Bioactive Glass Powders by Sol-Gel Processing. *J. Appl. Biomater.* **1991**, *2* (4), 231–239.
- (16) Sepulveda, P.; Jones, J. R.; Hench, L. L. Characterization of Melt-Derived 45S5 and Sol-Gel-Derived 58S Bioactive Glasses. *J. Biomed. Mater. Res.* **2001**, *58*, 734–740.
- (17) Hamadouche, M.; Meunier, A.; Greenspan, D. C.; Blanchat, C.; Zhong, J. P.; La Torre, G. P.; Sedel, L. Long-Term in Vivo Bioactivity and Degradability of Bulk Sol-Gel Bioactive Glasses. *J. Biomed. Mater. Res.* **2001**, *54* (4), 560–566.
- (18) Hench, L. L.; Xynos, I. D.; Polak, J. M. Bioactive Glasses for in Situ Tissue Regeneration. *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* **2004**, *15* (4), 543–562.

- (19) Kaur, G.; Pandey, O. P.; Singh, K.; Homa, D.; Scott, B.; Pickrell, G. A Review of Bioactive Glasses: Their Structure, Properties, Fabrication and Apatite Formation. *J. Biomed. Mater. Res. - Part A* **2014**, *102* (1), 254–274.
- (20) Owens, G. J.; Singh, R. K.; Foroutan, F.; Alqaysi, M.; Han, C.; Mahapatra, C.; Kim, H.; Knowles, J. C. Sol-Gel Based Materials for Biomedical Applications. *Prog. Mater. Sci.* **2016**, *77*, 1–79.
- (21) Arcos, D.; Vallet-Regí, M. Sol-Gel Silica-Based Biomaterials and Bone Tissue Regeneration. *Acta Biomater.* **2010**, *6* (8), 2874–2888.
- (22) Gupta, R.; Kumar, A. Bioactive Materials for Biomedical Applications Using Sol-Gel Technology. *Biomed. Mater.* **2008**, *3* (3), 34005–34020.
- (23) Ciriminna, R.; Fidalgo, A.; Pandarus, V.; Béland, F.; Ilharco, L. M.; Pagliaro, M. The Sol-Gel Route to Advanced Silica-Based Materials and Recent Applications. *Chem. Rev.* **2013**, *113* (8), 6592–6620.
- (24) Hench, L. L. Bioceramics. *J. Am. Ceram. Soc.* **1998**, *81* (7), 1705–1728.
- (25) Hench, L. L. Some Comments on Bioglass: Four Eras of Discovery and Development. *Biomed. Glas.* **2015**, *1*, 1–11.
- (26) Pereira, M. M.; Clark, A. E.; Hench, L. L. Effect of Texture on the Rate of Hydroxyapatite Formation on Gel-Silica Surface. *J Am. Ceram. Soc.* **1995**, *78* (9), 2463–2468.
- (27) Kokubo, T.; Takadama, H. How Useful Is SBF in Predicting in Vivo Bone Bioactivity? *Biomaterials* **2006**, *27* (15), 2907–2915.
- (28) Ducheyne, P.; Qiu, Q. Bioactive Ceramics: The Effect of Surface Reactivity on Bone Formation and Bone Cell Function. *Biomaterials* **1999**, *20* (23-24), 2287–2303.
- (29) Kokubo, T.; Kushitani, H.; Sakka, S.; Kitsugi, T.; Yamamum, T. Solution Able to Reproduce in Vivo Surface-Structure Changes in Bioactive Glass-Ceramic A-W3. *J. Biomed. Mater. Res.* **1990**, *24*, 721–734.

- (30) Yan, X.; Yu, C.; Zhou, X.; Tang, J.; Zhao, D. Highly Ordered Mesoporous Bioactive Glasses with Superior In Vitro Bone-Forming Bioactivities. *Angew Chem Int Ed* **2004**, *43*, 5980–5984.
- (31) Brinker, B. C. J.; Lu, Y.; Sellinger, A.; Fan, H. Evaporation-Induced Self-Assembly : Nanostructures Made Easy. *Adv. Mater.* **1999**, *11* (7), 579–585.
- (32) Yan, X.; Deng, H. X.; Huang, X. H.; Lu, G. Q.; Qiao, S. Z.; Zhao, D. Y.; Yu, C. Z. Mesoporous Bioactive Glasses . I . Synthesis and Structural Characterization. *J. Non. Cryst. Solids* **2005**, *351*, 3209–3217.
- (33) Vallet-Regí, M.; Arcos, D.; Pérez-Periente, J. Evolution of Porosity during in Vitro Hydroxycarbonate Apatite Growth in Sol-Gel Glasses. *J Biomed Mater Res* **2000**, *51* (1), 23–28.
- (34) Izquierdo-barba, I.; Vallet-regí, M. Fascinating Properties of Bioactive Templated Glasses : A New Generation of Nanostructured Bioceramics. *Solid State Sci.* **2011**, *13* (4), 773–783.
- (35) Zhao, S.; Li, Y.; Li, D. Synthesis of CaO–SiO₂–P₂O₅ Mesoporous Bioactive Glasses with High P₂O₅ Content by Evaporation Induced Self Assembly Process. *J Mater Sci Mater Med* **2011**, *22*, 201–208.
- (36) Zhu, M.; Shi, J.; He, Q.; Zhang, L.; Chen, F.; Chen, Y. An Emulsification – Solvent Evaporation Route to Mesoporous Bioactive Glass Microspheres for Bisphosphonate Drug Delivery. *J Mater Sci* **2012**, *47*, 2256–2263.
- (37) García, A.; Cicuéndez, M.; Izquierdo-Barba, I.; Arcos, D.; Vallet-Regí, M. Essential Role of Calcium Phosphate Heterogeneities in 2D-Hexagonal and 3D-Cubic SiO₂–CaO–P₂O₅ Mesoporous Bioactive Glasses. *Chem. Mater.* **2009**, *21* (22), 5474–5484.
- (38) Yan, P.; Wang, J.; Liu, S.; Ou, J.; Lei, Z.; Yang, S. “ Green ” Synthesis of Highly Ordered Mesoporous Bioactive Glass Using Acetic Anhydride as the Catalyst. *J. Non. Cryst. Solids* **2010**, *356*, 1514–1518.
- (39) Letaïef, N.; Lucas-girot, A.; Oudadesse, H.; Dorbez-sridi, R.; Boullay, P. Microporous and Mesoporous Materials Investigation of the Surfactant Type Effect on Characteristics and Bioactivity of New Mesoporous Bioactive Glass in the Ternary System SiO₂–CaO–P₂O₅ : Structural ,

- Textural and Reactivity Studies. *Microporous Mesoporous Mater.* **2014**, *195*, 102–111.
- (40) Strnad, Z. Role of the Glass Phase in Bioactive Glass-Ceramics. *Biomaterials* **1992**, *13* (5), 317–321.
- (41) Hill, R. An Alternative View of the Degradation of Bioglass. *J. Mater. Sci. Lett.* **1996**, *15* (13), 1122–1125.
- (42) Arcos, D.; Greenspan, D. C.; Vallet-Regí, M. A New Quantitative Method to Evaluate the in Vitro Bioactivity of Melt and Sol-Gel-Derived Silicate Glasses. *J. Biomed. Mater. Res. A* **2003**, *65* (3), 344–351.
- (43) Vallet-Regí, M.; Ragel, C. V.; Salinas, A. J. Glasses with Medical Applications. *Eur. J. Inorg. Chem.* **2003**, *2003*, 1029–1042.
- (44) Hoppe, A.; Güldal, N. S.; Boccaccini, A. R. A Review of the Biological Response to Ionic Dissolution Products from Bioactive Glasses and Glass-Ceramics. *Biomaterials* **2011**, *32* (11), 2757–2774.

Estructuras matriz biomiméticas

1. Introducción

Los tejidos del organismo humano se encuentran constantemente sometidos a tensiones y estímulos que pueden causar el daño y/o desgaste de los mismos. Para contrarrestar esto el organismo dispone de mecanismos de autoreparación del tejido lesionado. Sin embargo, la capacidad de regeneración de los tejidos es limitada. Cada tejido tiene una capacidad regenerativa intrínseca y está estrechamente relacionada con el grado de complejidad y diferenciación que presente¹.

La degradación de las propiedades de los tejidos asociadas a traumas y patologías, hace necesario el uso de materiales biomédicos para reparar o reemplazar dichos tejidos. En el caso del tejido óseo, por ejemplo, la pérdida de masa ósea es una degeneración que se presenta a partir de los 40 años de edad, y que compromete su integridad biomecánica². Actualmente, la disminución de la densidad del hueso es

una de las principales causas de riesgo de fractura entre los adultos mayores, por lo que constituye un grave problema sanitario y social, además, su impacto tiende a crecer en los próximos años debido al incremento de la esperanza de vida.

Como se mencionó antes, los materiales empleados para el remplazo parcial o total de tejidos se denominan biomateriales y, además de ser biocompatibles, deben cumplir requerimientos que están determinados por la naturaleza del tejido que se quiere reemplazar y su entorno funcional.

En el caso particular de biomateriales de sustitución para el tejido óseo, se debe tener en cuenta que el material a reemplazar es un tejido denominado duro, por presentar una rigidez en el rango de 0.05 a 20 GPa y una resistencia a la tracción en el rango de 10 a 200 MPa³. Para el desarrollo de biomateriales para terapias de defectos óseos, es necesario considerar las características morfológicas del tejido óseo y los mecanismos involucrados en el proceso de regeneración ósea.

1.1. Tejido óseo

El hueso, junto con el cartílago, forma el sistema esquelético, que desempeña un doble papel en el organismo. Por un lado, proporciona apoyo estructural para la locomoción y para la protección de los órganos vitales y, por otro lado, la fase mineral del hueso actúa como reservorio de minerales esenciales, especialmente fosfato y calcio, para el mantenimiento de la homeostasis⁴.

El hueso se compone por minerales, proteínas, agua, diversas células y otras macromoléculas. Aunque la proporción de los componentes del hueso varían en relación a su localización anatómica y al sexo, edad y variabilidad genética del

individuo. El tejido óseo está formado por células y componentes extracelulares calcificados, que forman la EMC ósea.

En promedio, dos tercios de los componentes de la matriz ósea corresponden a la fase mineral y el resto a la fase orgánica. La fase mineral o inorgánica está compuesta principalmente por HA ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) con una relación Ca/P de 1.67. Esta apatita ósea está en forma de nanocristales, producidos por las células osteoblastos, de dimensiones aproximadas a 4x50x50 nm, que conforman una red cristalina con imperfecciones y que es la responsable de proporcionarle dureza y rigidez al hueso. Además, la fase mineral contiene otros elementos, que regulan funciones metabólicas, entre los que están los carbonatos, citratos, sodio, magnesio, fluoruros, cloruros y potasio^{5,6}.

Por su parte, la fase orgánica contiene un 90 % de colágeno tipo I en su composición y sirve de sustrato de la fase mineral equilibrando su baja elasticidad y flexibilidad. El colágeno tiene una estructura fibrilar característica, cuyo diámetro varía entre 100 y 200 nm y ofrece motivos característicos que promueven la nucleación y el crecimiento de los cristales de HA que se forman generando una estructura híbrida biopolímero-cerámico. En la fase orgánica, también se encuentran proteínas no colagénicas que representan entre un 3 y 8 % en la composición de la fase orgánica del tejido óseo y que, además, contribuyen a la estructura, intervienen o median fundamentalmente en la fisiología dinámica del hueso⁷.

La fase viva del hueso la representan varios tipos de células (osteoblastos, osteoclastos y osteocitos) que constituyen únicamente el 3 % del volumen óseo. Los osteoblastos son las células responsables de la formación de tejido óseo.

Proceden de células progenitoras mesenquimales del tejido contiguo, los proteoblastos, que bajo la influencia de factores de crecimiento se diferencian en osteoblastos. Estas células se caracterizan por ser células polarizadas, es decir, su núcleo se encuentra en el extremo de la célula, y tienen un tamaño de 25 μm de diámetro y una forma poliédrica. Los osteoblastos generan un tejido denominado osteoide, que tras un período de maduración se mineraliza, constituyendo la plantilla sobre la que se organiza la estructura ósea. Además, secretan una gran variedad de macromoléculas como son el colágeno, la fosfatasa alcalina, la osteonectina, la fibronectina, la vitronectina, la osteopontina y la sialoproteína de hueso. Su alta actividad sintética se observa por la presencia de un retículo endoplasmático extenso y un aparato de Golgi bien desarrollado. Cada osteoblasto al completar un ciclo de síntesis de la matriz se convierte en un osteocito, o permanecen asociados a la superficie ósea como células de revestimiento en forma de osteoblasto inactivo^{8,9}

Como se mencionó antes, los osteocitos son osteoblastos que han madurado al quedar atrapados en lagunas dentro de la matriz ósea. Estas son las células más abundantes del tejido óseo, representando un 90 %, cuya función es mantener al hueso como un tejido vivo. Morfológicamente estas células son más alargadas que los osteoblastos, con un núcleo más grande y con el retículo endoplasmático menos desarrollado. Además, destaca su capacidad para establecer redes que permiten la comunicación entre los canaliculos óseos y las células superficiales del hueso¹⁰.

Los osteoclastos por su parte monitorizan la carga mecánica y el daño tisular en los huesos, y son los responsables de mantener constante el equilibrio entre la fracción mineral y la orgánica⁶. Los osteoclastos son las células que controlan y direccionan el proceso de resorción ósea (destrucción del tejido óseo), que se encuentran en

regiones llamadas lagunas de Howship. Se caracterizan por ser células voluminosas (20-100 μm de diámetro) y ser multinucleadas (3 a 20 núcleos), además, también contiene numerosas mitocondrias y lisosomas y están altamente polarizadas. Estas células se unen a la superficie del hueso mediante proteínas encargadas de la unión celular llamadas integrinas. Aíslan una zona del hueso a la cual se han unido y bajan el pH localmente mediante la secreción de hidrogeniones. Esto conduce a la solubilidad del HA, y una vez que el mineral ha sido eliminado, los componentes orgánicos de la matriz son hidrolizados^{11,12}.

Existen dos tipos principales de hueso: cortical o compacto y trabecular o esponjoso. Si bien, ambos tipos de huesos tienen los mismos componentes, presentan diferencias estructurales y funcionales. Por un lado, el hueso cortical tiene el 80-90 % de su volumen calcificado y una porosidad del 5 %. Mientras que el hueso trabecular solo está calcificado el 15-25 % de su volumen, el resto está ocupado por médula ósea, vasos sanguíneos y tejido conjuntivo, y además es altamente poroso (50-90 %). Tanto el grado de biomineralización como la porosidad son factores determinantes en las capacidades mecánicas, por lo que, desde un punto de vista biomecánico, el hueso cortical y trabecular poseen propiedades mecánicas diferentes, que se presentan en la Tabla 2.1.

El tejido óseo compacto es duro, denso y frágil, su unidad funcional es la osteona o sistema de Havers. La matriz ósea del hueso compacto se organiza formando lamelas o laminillas óseas concéntricas (de 4 a 20 lamelas), en torno a un conducto central o de Havers, que contiene en su interior capilares sanguíneos, vasos linfáticos, fibras nerviosas y tejido conectivo, como se observa en la Figura 2.1. Los osteocitos, que como se mencionó antes son las células del hueso maduro,

ocupan unos espacios denominados lagunas, dispuestos, al igual que las laminillas, de manera concéntrica.

Tabla 2.1. Propiedades mecánicas del hueso (tomada de Bernabéu Martínez 2006¹³).

Propiedades	Medidas	
	Hueso cortical	Hueso trabecular
Módulo de Young (GPa)	14-20	0.05-0.5
Límite de tracción (MPa)	50-150	10-20
Límite de compresión (MPa)	170-193	7-10
Resistencia a la fractura (MPa m ^{1/2})	2-12	0.1
Rotura a tracción	1-3	5-7
Densidad (g·cm ³)	18-22	0.1-1
Densidad aparente (g·cm ³)	1.8-2	0.1-1
Volumen superficie/hueso (mm ² ·mm ³)	2.5	20
Volumen total del hueso (mm ³)	1.4-106	0.35-106
Superficie interna total	3.5-106	7-106

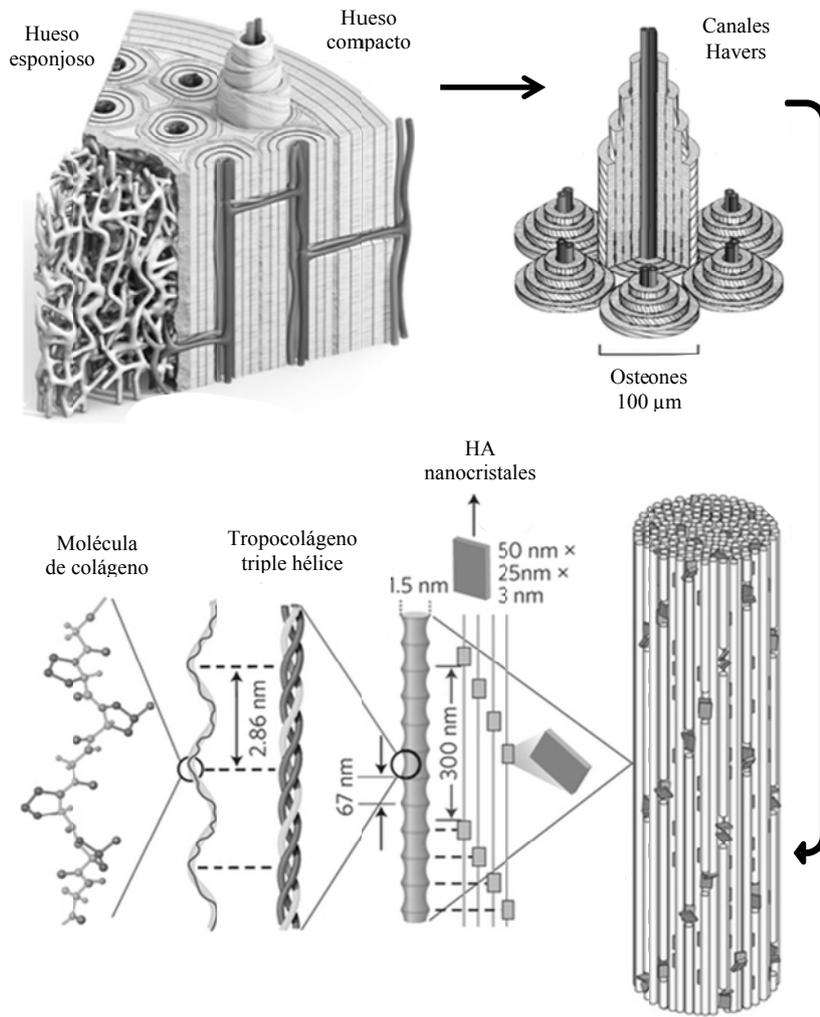


Figura 2.1. Esquema de la estructura del hueso (Figura modificada de West y col. 2014¹⁴)

En el caso del tejido óseo esponjoso tiene una superficie mayor, pero es menos denso y menos resistente mecánicamente. Por lo general se produce en los extremos de los huesos largos, en las proximidades de las articulaciones y en el interior de las vértebras. Está formado por laminillas óseas que forman una red tridimensional, permitiendo el paso de las fibras de colágeno de una laminilla a otra. Los huecos que quedan entre las laminillas están ocupados por la médula ósea.

Como se puede observar en la Figura 2.1, el hueso tiene una arquitectura compleja, presenta varios niveles de unidades estructurales jerárquicas, diseñadas elegantemente en varias escalas, de macro a nano, para cumplir múltiples funciones. Esta estructura altamente compleja del hueso es la responsable de su comportamiento mecánico particular: anisótropo, heterogéneo, no-lineal, viscoelástico.

1.2. Remodelación ósea

El hueso es un tejido dinámico y metabólicamente activo que sufre un continuo proceso de remodelado, lo que confiere al esqueleto su capacidad regenerativa y de adaptación funcional. La formación y resorción ósea son procesos paralelos que están activados a lo largo de toda la vida, remodelando continuamente el esqueleto a fin de mantener su integridad y la homeostasis mineral.

El proceso de remodelación ocurre secuencialmente, es decir, de manera cíclica (Ver Figura 2.2). Las principales fases son activación, reabsorción y formación.

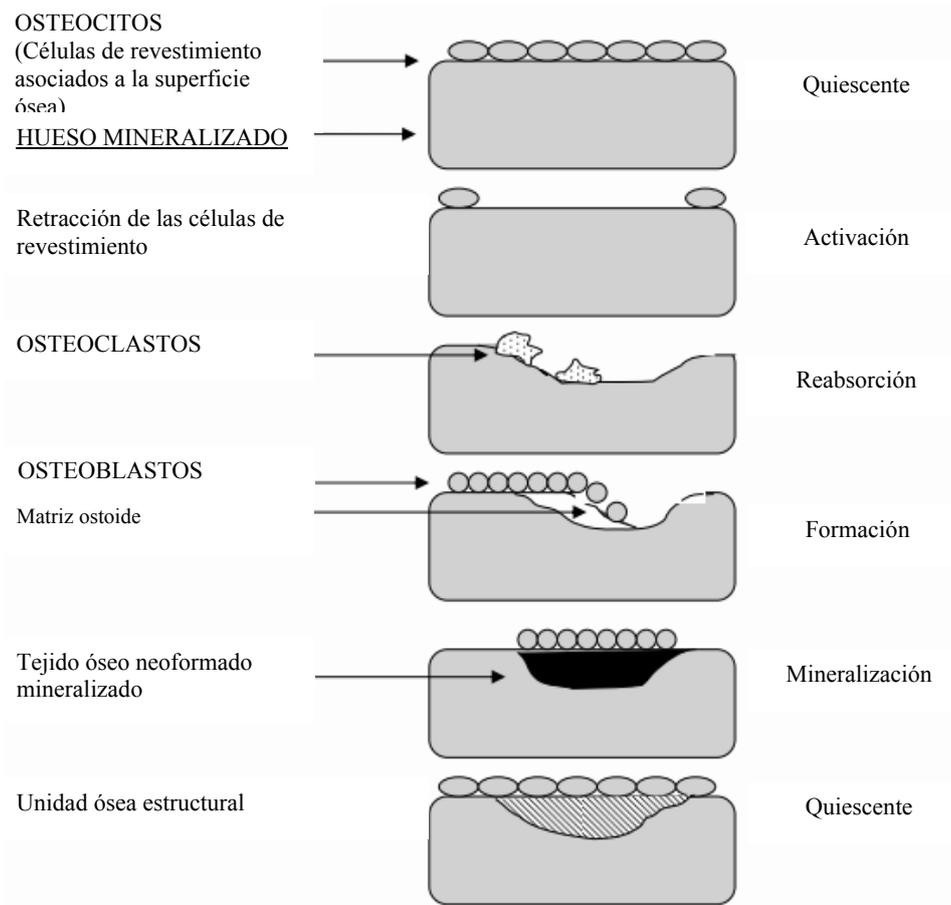


Figura 2.2. Esquema de las diferentes fases del remodelado óseo (Figura modificada de Fernandez y col. 2006¹⁵).

La resorción comienza cuando los osteocitos que se encuentran revistiendo la superficie mineralizada en estado quiescente migran, dejando la superficie de hueso libre para que los osteoclastos reabsorban pequeñas porciones óseas. Este proceso es una respuesta de los osteocitos a un estímulo mecánico (microfracturas o falta de carga mecánica) o a señales endocrinas que actuarían directa o indirectamente sobre los mismos. La terminación de la resorción osteoclástica, da lugar a la fase de formación, donde los osteoblastos sintetizan y depositan la matriz osteoide que posteriormente se mineralizará. El proceso de remodelación ósea dura entre 2-3 meses en humanos, y al final de este proceso, el balance del remodelado (la diferencia entre el hueso formado y eliminado) es neutro⁶.

1.3. Mecanismos de regeneración ósea

La eficacia de la selección de los biomateriales para su utilización en terapias de regeneración ósea debe fundamentarse, tanto en el conocimiento de los principios histológicos y fisiológicos del hueso, como en los mecanismos biológicos básicos de neoformación del hueso, que se describen brevemente a continuación^{16,17}:

Osteogénesis: Proceso de formación y desarrollo de hueso por crecimiento o por reparación debido a la actividad de los osteoblastos. Un biomaterial con propiedades osteogénicas contiene células viables con la capacidad de formar hueso (células osteoprogenitoras) o el potencial para diferenciarse en células formadoras de hueso (células inductibles precursoras osteogénicas).

Osteoinducción: Un biomaterial osteoinductivo contribuye a la formación ósea durante el proceso de remodelación. Esta propiedad hace referencia a la capacidad de los biomateriales para inducir la diferenciación de células

mesenquimatosas en células óseas maduras. Este proceso está típicamente relacionado con la presencia de moléculas reguladoras del metabolismo óseo.

Osteoconducción: Proceso mediante el cual se dirige el hueso para conformarse en la superficie de un material. Se trata de la propiedad física del biomaterial de servir como soporte para el crecimiento de hueso en su superficie. Además, permite el desarrollo de una neovascularización así como la infiltración de células osteogénicas.

Osteointegración: Este término hace referencia a la conexión firme, estable y duradera entre un implante y el hueso que lo rodea, sin la formación de tejido fibroso entre hueso-implante y sin la presencia de síntomas severos de inflamación. El éxito de la conexión interfase hueso-implante está sujeta a diversos factores como la respuesta inmune del paciente, el procedimiento de implantación quirúrgica, las características fisiológicas del hueso receptor, los factores mecánicos del implante y su superficie y la acción de cargas mecánicas sobre el hueso y el implante.

La osteointegración no es un fenómeno aislado, sino que es el resultado de la osteoinducción previa y de la osteoconducción¹⁶. En este sentido, los diferentes biomateriales utilizados para terapias de regeneración ósea pueden actuar por al menos uno de los tres mecanismos que se han descrito anteriormente y que esquematizan en la Figura 2.3.

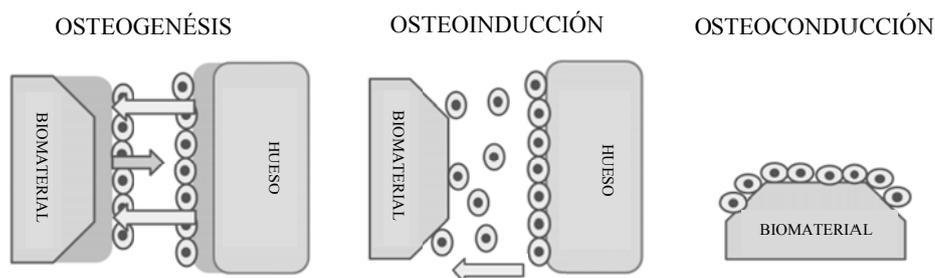


Figura 2.3. Esquema de los mecanismos de regeneración ósea que tienen lugar cuando se implanta un biomaterial en el cuerpo (Figura modificada de Moraleda 2013¹⁸).

1.4. Terapias para la reparación de defectos óseos

Los huesos son susceptibles a sufrir daños importantes causados por traumas o patologías óseas. Si bien es cierto que los huesos humanos tienen ciertas propiedades auto-regenerativas, el proceso es lento. Además, existen condiciones en las cuales estas propiedades no son suficientes para lograr la restauración del tejido dañado, como la ocurrencia de fracturas de gran tamaño, en donde el cuerpo no tiene la capacidad de seguir los procesos de reparación normales.

Actualmente, las técnicas utilizadas para terapias de regeneración ósea abarcan tanto la utilización de injerto como la de sustitutos sintéticos para promover la reparación ósea. Los metales y aleaciones fueron los primeros biomateriales empleados para la reparación de defectos óseos en la implantación de prótesis que fuesen capaces de restablecer el funcionamiento mecánico de los huesos. Básicamente se siguen empleando como materiales estructurales en dispositivos

para la fijación de fracturas y en sustitución total o parcial de articulaciones, por sus propiedades mecánicas y su resistencia a la corrosión en el organismo humano. Sin embargo, los implantes metálicos no son enteramente satisfactorios, ya que con el tiempo, estos biomateriales presentan fallos en su aplicación como desgaste, fractura, liberación de especies químicas al organismo, pérdida de la unión con los tejidos circundante y daños a los tejidos óseos próximos al implante por las fuerzas de roce presentes durante el movimiento del paciente^{19,20}.

En la búsqueda de terapias alternativas, que solventen las limitaciones asociadas al uso de prótesis metálicas, surgió el uso de injertos para el tratamiento de defectos óseos. Evidentemente, el mejor sustituto óseo es el propio hueso, ya sea proveniente del propio paciente (autoinjerto), o de un donante de la misma especie (aloinjerto) o de diferente especie (xenoinjerto). El hueso autólogo es el mejor candidato por presentar propiedades osteoinductoras, osteoconductoras y osteogénicas óptimas, por no generar respuestas inmunes y por su integración con el tejido circundante, favoreciendo la regeneración del mismo. Sin embargo, presenta serias limitaciones, especialmente la poca disponibilidad para cubrir defectos de gran tamaño, así como la alta morbilidad a la que se expone la región donadora. Todas las otras formas de injerto óseo tienen desventajas en comparación con el autoinjerto y, como tal, su uso es sub-óptimo²¹.

Las limitaciones que presentan los procedimientos antes señalados, han llevado al desarrollo de tecnologías alternativas que permitan la síntesis de biomateriales sustitutos de injertos óseos que permitan recuperar la funcionalidad del área afectada mediante la inducción y conducción de la regeneración del hueso²².

1.5. Ingeniería tisular

En este contexto, la ingeniería tisular nace como respuesta a los problemas que presentan las terapias de reparación y/o regeneración de tejidos óseos que se utilizan actualmente. La ingeniería de tejidos es un área científica multidisciplinar cuyo fundamento es el uso de células vivas y moléculas bioactivas, así como la creación de sustitutos biológicos para su posterior implantación en el cuerpo²³.

El objetivo de esta disciplina es la reparación de tejidos, reproduciendo los mecanismos de regeneración ósea (osteogénesis, osteoinducción y osteoconducción). Como las células son los componentes fundamentales del tejido y las encargadas de modular dichos mecanismos, es importante considerar el proceso natural de formación de tejido. Las células se agrupan y forman sus propias estructuras de soporte, llamada ECM. Esta matriz, aparte de dar soporte a las células, actúa como una estación repetidora para varias moléculas de señalización que determinarán la proliferación y diferenciación celular. Finalmente, esto da lugar a la constitución de un tejido biológico con una función fisiológica específica^{24,25}. Desde un punto de vista teórico, podemos considerar que cualquier tejido biológico tiene las siguientes componentes:

- a) Células que pueden poseer cualquier grado de diferenciación.
- b) Una matriz que de soporte a las células.
- c) Biomoléculas señalizadoras que actúan como receptores intercelulares, para mediar las respuestas celulares.

En este sentido, la ingeniería tisular parte del principio de que la regeneración de nuevo tejido puede ser guiada a través de la combinación de uno, dos o tres de los componentes mencionados previamente. La Figura 2.4 representa mediante un gráfico estos fundamentos denominado la tríada de la ingeniería de tejidos²⁶.

Específicamente, en terapias de regeneración ósea, el principal objetivo de la ingeniería de tejidos es el desarrollo de un constructo artificial, capaz de inducir la formación de tejido. En la bibliografía a la matriz soporte para las células se les denomina estructuras andamios o soporte, equivalente al inglés “scaffolds”, sin embargo, en este trabajo se ha elegido el término estructuras matriz biomimética para indicar la necesidad de su aproximación a la funcionalidad de la ECM.

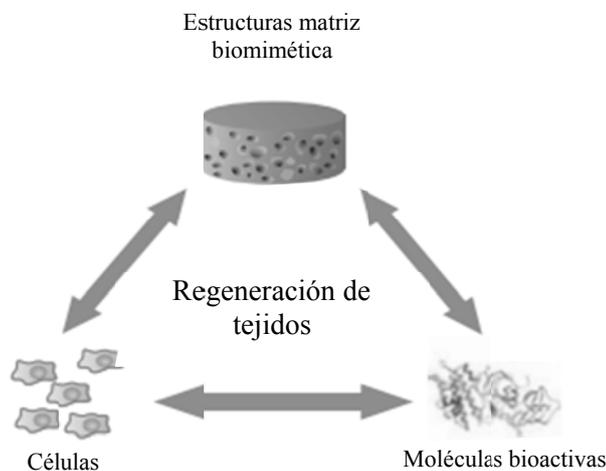


Figura 2.4. Tríada de la ingeniería de tisular. Una estructura matriz, células y un componente molecular son necesarios para la creación de constructos para terapia de regeneración de tejidos (Figura modificada de Barreto 2009²²).

2. Estructuras matriz en terapias de regeneración ósea

Para las terapias de regeneración ósea, la ingeniería de tejidos puede hacer uso de biomateriales para reproducir una estructura capaz de mimetizar la ECM, generando es esta forma un entorno fisicoquímico, esencial para la reparación y regeneración del hueso.

2.1. Requerimientos de las estructuras matriz para terapias de regeneración ósea

Estas estructuras matriz deben actuar como soporte temporal y transportador de células y/o biomoléculas señalizadoras, favoreciendo así, el proceso osteogénico. Los avances actuales en este campo indican que las estructuras matriz diseñadas para terapias de regeneración ósea deben cumplir con los requerimientos, que se enuncian a continuación^{27,28}:

- a) La superficie de la matriz debe permitir la adhesión celular, así como promover la proliferación y diferenciación de las mismas.
- b) La matriz y los subproductos de su degradación deben ser biocompatibles, o sea, que no provoquen una reacción inflamatoria significativa o toxicidad *in vivo*.
- c) Debe ser biodegradable para permitir que las propias células del cuerpo sinteticen su propia ECM y reemplacen a la estructura implantada.
- d) La estructura debe ser altamente porosa, de poros abiertos y completamente interconectados, de forma que permita la vascularización y la distribución uniforme de células en todo la estructura para facilitar la formación de tejido homogéneo. Para el caso de la microporosidad, se requieren poros menores a 10 μm para el crecimiento capilar y las interacciones célula-matriz. Mientras que en términos de macroporosidad se precisa de poros con tamaños en el rango de 150-900 μm para el suministro de nutrientes y la eliminación de residuos celulares.

- e) Debe cumplir con los requerimientos biomecánicos mínimos para el tipo de aplicación y sitio de implante, además de soportar el manejo quirúrgico propio de la cirugía.
- f) Desde el punto de vista de su potencial comercialización y aplicación clínica deben ser biomateriales que se puedan obtener de formar reproducible y rentable.

2.2. Biomateriales para el procesamiento de estructuras matriz

Con base a los puntos que se han expuesto en el apartado anterior a la selección de materiales que se consideran más adecuados son las biocerámicas y los polímeros biodegradables²⁹.

Entre las biocerámicas más utilizadas para este propósito se encuentra el HA, TCP y BG^{30,31}. De los polímeros biodegradables se pueden mencionar los de origen natural, como el colágeno, ácido hialurónico y quitosano, o sintéticos como los policarbonatos, los polímeros de PLA y PGA, policaprolactona y polianhídridos, entre otros^{32,33}. También se pueden fabricar estructuras matriz híbridas, donde se combinan materiales orgánico e inorgánicos, como el BG-colágeno-fosfatidilserina³⁴ y BG-gelatina³⁵.

2.3. Técnicas de procesamiento para la fabricación de estructuras matriz

En la bibliografía se puede encontrar una gran variedad de técnicas para la fabricación de estructuras tridimensionales macroporosas. A continuación se describen brevemente algunas técnicas de procesamiento estudiadas^{29,33,36}:

- a) Conformado por fusión (Melt molding): En esta metodología permite obtener estructuras basadas en polímero, donde este se mezcla con un agente

formador de poro y se introduce en un molde de teflón. Este molde se calienta por encima de la temperatura de transición vítrea del polímero y después el compuesto resultante se sumerge en un disolvente para la disolución selectiva del porógeno. Con este método se puede variar fácilmente la forma, porosidad y tamaño de poro de la estructura. Oh y col.³⁷ obtuvieron estructuras mediante esta técnica que presentaban propiedades mecánicas, como el módulo de compresión, similares al hueso trabecular y significativamente más altas en comparación con los estructuras procesadas por otras metodologías. Además, se ha demostrado que las estructuras fabricadas mediante esta técnica son capaces de sostener el crecimiento celular de los osteoblastos, sin embargo, es difícil controlar la distribución de poro (Ver Figura 2.5).

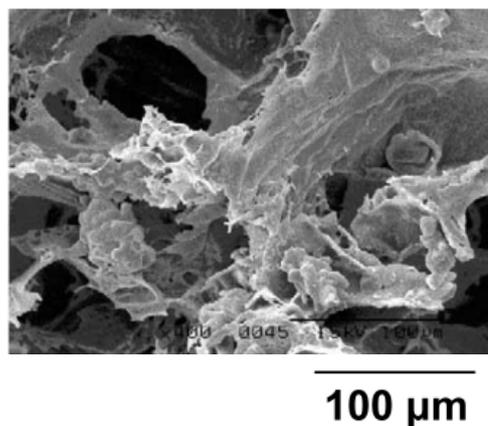


Figura 2.5. Micrografía SEM de una sección de una estructura de PLA procesada por el método moldeo por fusión³⁷.

b) Liofilización (Freeze drying): Con este método se pueden obtener sistemas compuestos de matriz polimérica con una distribución homogénea de partículas de cerámica así como reproducir la macroporosidad con una direccionalidad tubular. Para el procesado inicialmente se realiza una emulsión con

el disolvente utilizado y el polímero, para posteriormente liofilizarla y separar el disolvente del polímero por sublimación. Entre las limitaciones de la técnica encontramos baja estabilidad mecánica(Ver Figura 2.6).

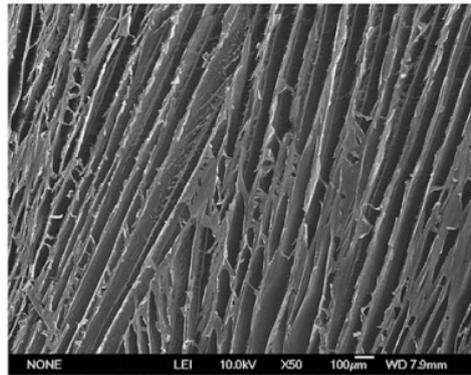


Figura 2.6. Micrografía SEM de un corte longitudinal de una estructura de gelatina fabricada por el método de liofilización³⁸.

c) Impresión 3D (3D printing): Es una técnica de inyección que se emplea para depositar capa por capa una mezcla en formato de pasta de materiales cerámicos o mezcla de cerámico y polímero (Ver Figura 2.7). Todo el proceso se realiza a temperatura ambiente, lo que permite la incorporación eventual de biomoléculas orgánicas. Esta técnica permite procesar estructuras matriz con morfologías complejas cuyos macroporos están bien interconectados. Sin embargo, debido a que la estructura final es una combinación de varias capas apiladas, las propiedades mecánicas se ven comprometidas. Esta técnica es versátil para la obtención de distintas geometrías de poro aunque va a depender de las limitaciones técnicas de los equipos disponibles. Además, la obtención de la mezcla de inyección con características adecuadas puede requerir la utilización de solventes orgánicos u otros agentes químicos que presentan toxicidad.

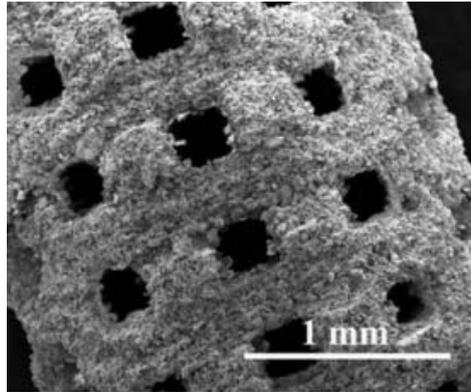


Figura 2.7. Micrografía SEM de una estructura de TCP, fabricada por impresión 3D, mostrando la morfología superficial y la distribución de poros diseñada³⁹.

d) Técnica de conformado por réplica de una plantilla polimérica (Foam replica technique): Con este método se obtienen estructuras macroporosas altamente interconectadas a través de la impregnación de una plantilla polimérica con una suspensión cerámica de viscosidad adecuada. La etapa de impregnación y la eliminación de la suspensión en exceso deben controlarse cuidadosamente para realizar un revestimiento homogéneo, tanto en la superficie de la plantilla como en su interior (Ver Figura 2.8). Ya que las estructuras matriz que se obtienen mediante este método presentan propiedades mecánicas pobres, se deben optimizar diferentes parámetros tales como carga sólida de la suspensión cerámica, tipo y cantidad de aglutinante, con el fin de maximizar la resistencia mecánica.

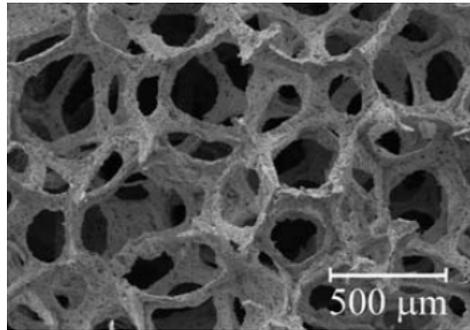


Figura 2.8. Micrografía SEM de la red macroporosa de una estructura de sílice/MBG fabricada por la técnica de réplica de una plantilla polimérica⁴⁰.

Desde el punto de vista de fabricación de estructuras matriz cada técnica influye en las características morfológicas de porosidad. Actualmente existe una intensa investigación en técnicas y metodologías para procesar estructuras más avanzadas que cumplan con los requerimientos necesarios para los tratamientos de reparación y regeneración de hueso.

3. Desarrollo de estructuras de macroporo interconectado como matrices biomiméticas

Para la concepción de estructuras matriz biomiméticas para tratamientos de defectos óseos se deben considerar diversos requerimientos biológicos y estructurales. En primer lugar, la estructura debe tener una porosidad suficiente para permitir la proliferación y diferenciación celular. La macoporosidad debe estar bien interconectada y tener una buena distribución para la difusión de los nutrientes y para la vascularización. Además, la estructura procesada debe tener una estabilidad mecánica adecuada para favorecer la formación de nuevo tejido. Por

último, la estructura debe ser biodegradable y tener una superficie químicamente adecuada para el reconocimiento celular.

En este sentido, se ha demostrado que las estructuras macroporosas interconectadas basadas en BG procesados por la técnica de réplica presentan buenas propiedades para su aplicación en tratamientos de defectos óseos^{41,42}.

El BG Bioglass® 45S5 ha sido particularmente investigado para la fabricación de estructuras matriz para tejido óseo, especialmente el Bioglass® 45S5. Como se ha mencionado antes, la característica principal de estos biomateriales es su reactividad superficial, ya que al entrar en contacto con los fluidos biológicos forma en su superficie una fase tipo sílice hidratada donde se depositan iones Ca y P. La posterior cristalización de esta capa conlleva a la formación de HA en la superficie del material, la cual promueve la formación de una fijación bioactiva entre la superficie del material y del tejido circundante⁴³.

Además, los productos de su redisolución, especialmente concentraciones críticas de iones solubles de Si y Ca, y de otros iones metálicos incorporados, pueden regular funciones celulares. Ensayos *in vitro* e *in vivo*^{44,45} indican que estos iones favorecen la expresión de genes que controlan la osteogénesis, ya que están involucrados en los mecanismos de proliferación, diferenciación y la expresión génica de osteoblastos⁴⁶.

Como se ha introducido en el Capítulo 1, la incorporación del método sol-gel y el uso de surfactantes en la síntesis de BG dieron lugar a una generación de vidrios que exhiben mejores propiedades para su utilización en ingeniería tisular y que se denominan MBG. La combinación del proceso sol-gel y surfactantes da lugar a una

estructura nanoporosa ordenada e interconectada a través del vidrio, que proporciona mayores valores de superficie específica⁴⁷. Por lo tanto, los MBG sol-gel tienen una mejor capacidad de reabsorción, bioactividad y uniones óseas *in vivo*⁴⁸. Además, investigaciones recientes sugieren que la nanoporosidad ordenada es esencial para la adhesión, proliferación y migración celular, especialmente de los osteoblastos. En ensayos de regeneración ósea se ha encontrado que el proceso de vascularización se ve afectado por la presencia de estos nanoporos influyendo de manera constatable en la progresión de la osteogénesis⁴⁹.

Otra ventaja importante del proceso sol-gel es que se puede combinar con las etapas de procesado de una estructura matriz, mediante la técnica de réplica, que permite obtener estructuras matriz con una porosidad dual. Así, se genera una red macroporosa interconectada proveniente de la réplica de una plantilla a la vez que un material nanoestructurado (nanoporoso) en las paredes de estos macroporos. Estos nanoporos aportan a la estructura muy alta superficie que va aumentar la reactividad superficial⁵⁰. El método consiste en impregnar una espuma generalmente de poliuretano, en una suspensión sol precursora del material biocerámico, con o sin aglutinante. Posteriormente se remueve el exceso de suspensión de la espuma y se secan a temperatura ambiente. Una vez la estructura esta homogéneamente recubierta y seca se procede a la eliminación de los precursores orgánicos, mediante un tratamiento térmico. La eliminación de los compuestos orgánicos debe realizarse muy lentamente, para evitar la formación de grietas y fracturas debido a la eliminación de gases por la combustión de los agentes orgánicos⁴⁰.

Sin embargo, las estructuras obtenidas mediante esta técnica presentan baja resistencia mecánica para los requerimientos quirúrgicos. En la Tabla 2.2 se

muestran la resistencia a la compresión para estructuras obtenidas mediante la técnica de réplica de una plantilla polimérica. Se observan valores de resistencia a la compresión en el rango de 0.27-0.45 MPa para estructuras híbridas biopolímeros-cerámicos y hasta 0.55 MPa para estructuras que incorporan aglutinantes en la síntesis para optimizar sus propiedades mecánicas.

Tabla 2.2. Propiedades mecánicas y texturales de estructuras matriz fabricadas mediante la técnica de réplica de una plantilla polimérica.

Biomaterial	Porosidad	Aglutinante	Resistencia a la compresión (MPa)	Área superficial (m ² ·g ⁻¹)	Referencias
BG (15Na ₂ O:40CaO:45P ₂ O ₅) (reforzado con HA)	85-97 %	--	0.01-0.17	--	⁵¹
Bioglass® 45S5 (Totalmente cerámico)	89-92%	PVA*	0.27-0.42	--	⁵²
BG (50SiO ₂ :2.6CaO:5.9Na ₂ O: 4P ₂ O ₅ :12K ₂ O:5.3MgO:0.2B ₂ O ₃)	61-68 %	PVA/PLA	0.45-0.55	--	⁵³
MBG-Zr (80SiO ₂ :15CaO:5P ₂ O ₅ : (x-15CaO)Zr)	89-91%	--	0.05-0.21	220-320	⁵⁴
MBG (80SiO ₂ :15CaO:5P ₂ O ₅)	94%	--	0.06-0.25	--	⁵⁵
Bioglass® 45S5 (Parcialmente cerámico)	80-85 %	PHB**	0.15-0.30	--	⁵⁶
Bioglass® 45S5 (Parcialmente cerámico)	79-85 %	PLA	0.20-0.45	--	^{57,58}
Bioglass® 45S5	--	PLC***/ quitosano	0.20	--	⁵⁹
Bioglass® 45S5	90-92 %	PVA/ celulosa	0.01-0.06 0.10	--	⁶⁰ ⁶¹
MBG/SBA-15	86-95 %	--	0.01-0.08	19-203	⁴⁰

*Alcohol polivinílico (PVA, por Polyvinyl alcohol)

**Ácido polihidroxitúrico (PHB, por Polyhydroxybutyrate)

***Policaprolactona (PLC, por Poly(ε-caprolactona))

3.1. Estrategias para la optimización de estructuras macroporosas obtenidas por el método de réplica de una plantilla polimérica

Un desafío importante para el desarrollo de estructuras basadas en biocerámicas con éxito clínico es superar su carácter frágil y baja resistencia a la fractura. Para alcanzar esto, una estrategia prometedora es revestir o infiltrar la estructura con un polímero biodegradable (aglutinante), proveyendo así a la fase inorgánica (biocerámica) de una fase orgánica que aumente la tenacidad y conseguir así propiedades más parecidas a las del hueso⁶².

Entre los polímeros sintéticos, disponibles para este fin, se encuentra el PLA⁵³, PLC⁶³, PVA⁶⁴ y los polímeros naturales como el alginato⁶⁵, celulosa⁶⁰, gelatina⁶⁶ o colágeno⁶⁷.

El revestimiento y la infiltración de una estructura biomimética altamente porosa con un polímero bioresorbible, para reforzar sus propiedades mecánicas, es especialmente ventajosa debido a su simplicidad en el procesamiento y la versatilidad de biopolímeros sintéticos y naturales disponibles.

3.1.1. Incorporación de PVA como agente aglutinante

Entre los polímeros sintéticos, el PVA es uno de los pocos polímeros vinílicos solubles en agua con características de gran interés para aplicaciones médicas. Actualmente es utilizado en áreas como la química de los alimentos, los productos farmacéuticos, en la industria cosmética, del papel y textil, entre otras. Entre sus aplicaciones más interesantes, para el área biotecnológica, se encuentran su utilización como agente estabilizante como sustrato para formar películas y recubrimientos. Además, su alta flexibilidad de cadena se traduce en la posibilidad de preparar soluciones altamente concentradas⁶⁸⁻⁷⁰.

En el campo de la biomedicina, el PVA se utiliza en la preparación de hidrogeles y membranas para el desarrollo de lentes de contactos⁷⁰, piel y páncreas artificial^{71,72}, hemodiálisis⁷³, así como para materiales médicos implantables para reemplazar el cartílago y el menisco^{74,75}.

En el procesado de materiales cerámicos el PVA aporta a las mezclas precursoras una propiedades de mayor plasticidad que se traduce en una mejores propiedades mecánicas^{64,76}. Bertolla y col.⁶¹ sintetizaron y caracterizaron unas estructuras híbridas basadas en BG e recubiertas con PVA y celulosa por la técnica de réplica de espuma, encontrándolas 10 veces más resistentes a la tracción en comparación con las no recubiertas. La mejora en las propiedades mecánicas fue de 0.01 a 0.10 MPa.

3.1.2. Recubrimiento de biopolímero colágeno

Actualmente, el colágeno constituye un biomaterial predominante en aplicaciones biomédicas, incluyendo reparación y regeneración ósea⁷⁷. El colágeno tipo I se destaca por su biocompatibilidad debido a sus propiedades hidrofílicas, hemostáticas, baja respuesta inflamatoria (inmunogénica) del huésped y por su estructura fibrilar nanoestructurada que le aporta alta resistencia y estabilidad. Además, a diferencia de otros biopolímeros naturales, los colágenos fibrilares muestran características moleculares adicionales que son esenciales para la adecuada mineralización de la matriz y para el reconocimiento celular que regula las interacciones celulares en la superficie del biomaterial⁷⁷⁻⁸⁰.

El colágeno, como muchas otras proteínas, se distingue por tener varios niveles de orden estructural. Jerárquicamente, parte de una estructura primaria formada por la unión de secuencias de aminoácidos a lo largo de una cadena llamada

polipeptídica. La unión de los aminoácidos se da mediante un enlace covalente (C-N) entre el grupo amino (NH₂) de un aminoácido y el grupo carboxilo (COOH) de otro. Los principales aminoácidos del colágeno son la glicina (Gly), la prolina (Pro) y la hidroxiprolina (Hyp), que representan más del cincuenta por ciento del total de aminoácidos constituyentes⁸¹.

La estructura secundaria del colágeno es producto de la configuración espacial de la cadena polipeptídica que resulta de la formación de puentes de hidrógeno entre péptidos, dando lugar a la denominada hélice alfa (cadena α). Mientras que la unión de 3 cadenas α -polipeptídicas conforman la estructura terciaria que recibe el nombre de tropocolágeno. En el colágeno tipo I, dos de las cadenas son denominadas como $\alpha 1$ con una composición de aminoácidos idéntica y una cadena $\alpha 2$ con una composición distinta. La abundancia de la glicina tiene un papel fundamental en la triple configuración gly-pro-hyp, que determina la configuración de la cadena debido a la alta rigidez de sus residuos con estructuras en forma de anillo^{78,82}.

Finalmente, la estructura cuaternaria se caracteriza por la repetición de la unidad estructural supramolecular, compuesta por muchos paquetes de triples hélices en un entramado específico que constituyen las fibrillas de colágeno (Ver Figura 2.9). Estas comprenden un ensamblaje de moléculas de tropocolágeno organizadas periódicamente a lo largo de la dirección axial, formando escalones desfasados \approx 67 nm (distancia D) entre sí. Esto genera un patrón característico de zonas de hueco con 35 nm de longitud y zonas de superposición con 32 nm de longitud dentro de la fibrilla^{83,84}. En el hueso, los cristales de HA se ordenan en los espacios entre las moléculas de colágeno a lo largo de las fibrillas nanoestructuradas^{78,85,86}.

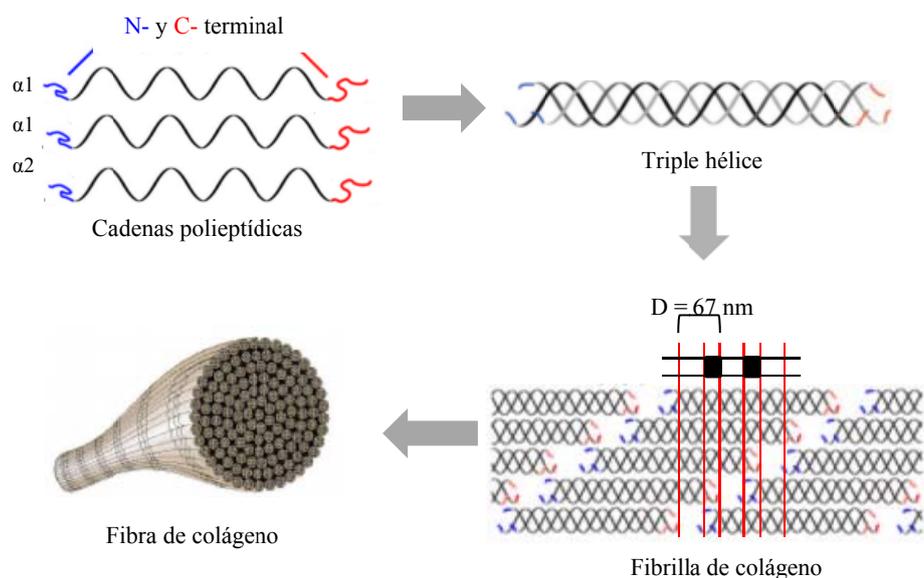


Figura 2.9. Esquema de la disposición jerárquica del colágeno.

Además, diferentes estudios sugieren que el colágeno tipo I promueve la adhesión celular al poseer secuencias GFOGER (glicina–fenilalanina–hidroxiprolina–glicina–glutamato–arginina), las cuales son reconocidas principalmente por las integrinas, proteínas que median el reconocimiento celular^{87,88}.

La principal fuente de extracción de colágeno tipo I ha sido hasta el momento a partir de los residuos de especies bovinas y de la piel, huesos y cartílagos de cerdo⁸⁹. En su uso como biomaterial la macro y microestructura del colágeno está relacionada directamente con su función y sus propiedades. El nivel jerárquico se puede obtener sintéticamente en el laboratorio a partir moléculas de tropocolágeno por un proceso denominado fibrilogénesis⁹⁰.

La fibrillogénesis es el proceso con el que se obtienen las fibrillas de colágeno con su particular organización (distancia D). Para ello se deben controlar una serie de parámetros, como la concentración de monómero de colágeno, la composición y concentración de las sales, la temperatura de incubación, el tiempo y el pH⁹¹⁻⁹⁴.

El presente capítulo tiene como objetivo desarrollar nuevas estructuras matriz híbridas cerámico-biopolímero con porosidad dual, macro-nano. Se pretende obtener estructuras matriz biomiméticas con mejores propiedades texturales y mecánicas que las estructuras previamente publicadas⁴⁰. Para ello se va a investigar la utilización de PVA como agente aglutinante de la fase cerámica. Además, una vez obtenida la estructura cerámica se va a incorporar un recubrimiento de colágeno fibrilar nanoestructurado.

4. Fabricación de matrices biomiméticas híbridas cerámico-biopolímero

4.1. Procedimiento experimental

La metodología desarrollada por nuestro grupo de investigación para la obtención de estructuras macroporosas consiste en impregnar una esponja de poliuretano en una suspensión del precursor particulado SBA-15 en un sol MBG⁴⁰.

Esta estrategia utiliza el sol MBG como agente aglutinante para consolidar las partículas de SBA-15 y mejorar la bioactividad del material al incorporar los elementos Ca y P en la composición. Además, a diferencia de los BG, tanto la SBA-15 como el MBG le confieren a la estructura altos valores de superficie, que presenta poros ordenados en la escala nanométrica.

4.1.1. Síntesis del precursor de sílice tipo SBA-15

La síntesis de la SBA-15 se llevó a cabo mediante un tratamiento hidrotérmico, de acuerdo al método propuesto por Zhao y col⁹⁵. Se pesan 1.92 g del copolímero de bloque (HO[CH₂CH₂O]₂₀-[CH₂CH(CH₃)O]₇₀-[CH₂CH₂O]₂₀H), comercializado con el nombre de Pluronic® (P123, 435465 Sigma-Aldrich) y se disuelve en un matraz bola con una mezcla de 45 mL agua desionizada (DIH₂O) y 30 mL de ácido clorhídrico (HCl, 37 % en peso, 131020 Panreac, PA-ACS-ISO) 4M. La mezcla se mantiene en un baño termostático a 40 °C ± 1 °C con agitación a 1000 rpm durante 2 h. Una vez completa la disolución del copolímero, se reduce la velocidad de agitación a 600 rpm y se añaden 4.25 mL de TEOS (14082, Alfa-Aesar). Se mantiene durante 24 h con temperatura y agitación constante. Posteriormente, el precipitado resultante se transfiere a un reactor de vidrio pyrex que se deposita en una estufa a 80 °C y se deja envejecer durante 24 h. Una vez finalizada esta etapa, el precipitado se filtra, se lava con 250 mL de DIH₂O y se coloca en un crisol para proceder a secarlo en una estufa manteniendo las condiciones anteriores, 80 °C durante 24 h. Finalmente, se somete a un tratamiento térmico a 500 °C durante 6 h, utilizando una rampa de velocidad de 1 °C·min⁻¹.

4.1.2. Síntesis del sol MBG

La síntesis del sol MBG, en el sistema composicional 80SiO₂-15CaO-5P₂O₅, se realizó sobre la base del protocolo planteado por Yan y col.⁹⁶. La síntesis consiste en disolver 4 g del polímero director de estructura P123 en 60 mL de etanol absoluto (AnalaR Normapur) y 1 mL de HCl 0.5 M durante 1 h. Una vez completada la disolución del P123, se procede a la adición de 1.4 g de nitrato de calcio tetrahidratado (Ca(NO₃)₂·4H₂O, C4955 Sigma-Aldrich), 685 µL de trietil fosfato (TEP, (C₂H₅O)₃PO, 538728 Sigma-Aldrich) y 7.125 mL de TEOS. Los reactivos se añaden de forma consecutiva con intervalos de 1 h para la adición de

cada reactivo y se mantienen en agitación constante a 500 rpm durante 6 h a temperatura ambiente.

4.1.3. Procesado de las estructuras macroporosas híbridas biopolímero-cerámico

El procesado de la estructura se realizó usando la técnica de réplica a partir una espuma de poliuretano (BULPREN® S28133) como plantilla. La suspensión precursora se llevó a cabo mezclando partículas de sílice tipo SBA-15 en un sol MBG en una proporción de 8 y 92 % volumen, respectivamente, como se ha publicado anteriormente por nuestro grupo⁴⁰.

En este trabajo, se incorporó como novedad, una solución acuosa de PVA al 2 % (Mw 89.000 - 98.000; 99 +% de hidrolizado, Sigma-Aldrich), que se llevó a cabo calentando 100 mL de DIH₂O a 120 °C y añadiendo 2 g de PVA. La disolución se mantiene bajo vigorosa agitación (1200 rpm) y transcurridas 24 h se deja enfriar. Las piezas de espuma de 7 mm de espesor y 12 mm de diámetro, se lavaron en DIH₂O y se secaron antes de su uso. Una vez secas, se sumergieron durante 5 minutos en la solución de PVA y se exprimieron para eliminar el exceso de líquido. A continuación, las piezas se sumergieron durante 5 min en la suspensión de mezcla biocerámica preparada con anticipación. El exceso de la mezcla se eliminó oprimiendo la espuma y la capa aplicada se dejó evaporar a 50 °C durante 24 h. Se repitió el mismo procedimiento tres veces. Después del secado, las piezas se trataron térmicamente dos veces usando una velocidad de calentamiento de 1°C·min⁻¹ con dos etapas térmicas: 400 °C y 800 °C. El tiempo de retención a 400 °C fue de 1 h, y a 800 °C fue de 2 h para el primer tratamiento y de 6 h para el segundo. Las piezas finales de cerámica se denominaron SP8PVA.

Se utilizó una solución de colágeno tipo I (BD Biosciences) de $3.1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ de densidad para preparar la suspensión fibrilar de colágeno. Para la formación de fibrillas nanoestructuradas se siguió el protocolo desarrollado en nuestro grupo⁹⁷, donde el autoensamblaje de las moléculas de colágeno se consigue usando una disolución tampón fosfato de Na^+/K^+ ($\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$, Sigma-Aldrich) con una fuerza iónica de 200 mM, ajustando el pH a 7.40 y dejándolo 24 h a 34 °C. Posteriormente, la solución de colágeno se lava con DIH_2O para eliminar las sales.

El revestimiento de colágeno de las piezas cerámicas preparadas se llevó a cabo añadiendo 100 μL de la suspensión de colágeno fibrilar en cada lado de la pieza (200 μL por pieza) seguido de dos diferentes protocolos de secado, liofilización, previa congelación a -80 °C (SP8PVA-CFD) y secado a temperatura y atmósfera ambiente (SP8PVA-CRT). Finalmente, ambos tipos de materiales revestidos con colágeno fibrilar nanoestructurado, se reticularon utilizando un tratamiento dehidrotermal (DHT, por Dehydrothermal treatment) a 150 °C bajo vacío durante 24 h, para estabilizar el colágeno⁹⁸.

4.1.4. Caracterización físico-química de las matrices biomiméticas híbridas biopolímero-cerámico

Para la caracterización estructural y textural de las estructuras se emplearon las siguientes técnicas: Difracción de rayos X (XRD, por X-ray diffraction), difracción de rayos X de bajo ángulo (SAXRD, por Small angle x-ray difraction), análisis termogravimétrico (TGA, por Thermogravimetric analysis), calorimetría diferencial de barrido (DSC, por Differential scanning calorimetry), espectroscopia infrarroja con transformada de Fourier (FT-IR, por Fourier transform infrared spectroscopy) y fisisorción de N_2 . Las estructuras también se examinaron con un microscopía electrónico de barrido (SEM, por Scanning electron microscope) y

mediante (EDX, por Energy-dispersive X-ray spectroscopy). También se tomaron una serie de medidas de las dimensiones de las estructuras finales para evaluar la porosidad y densidad que presentaban. Además, las estructuras procesadas se sometieron a ensayos de compresión, donde se les aplicó una carga axial hasta producir la densificación de los macroporos de la estructura. Tanto las técnicas como las condiciones utilizadas se describen en el Anexo 2.

También se realizó un análisis de imagen para determinar el tamaño de los macroporos y espesor de las paredes de las estructuras finales utilizando el programa ImageJ 1.50 i. Para ello se hicieron diferentes medidas tanto del espesor como del tamaño de los poros a partir de las micrografías obtenidas por SEM donde el espesor se determinó midiendo el grosor de las paredes y el diámetro de poro se determinó haciendo un promedio de los valores de longitud del eje menor y mayor. Para las determinaciones se tomaron medidas de al menos 100 medidas y a partir de ellas se obtuvo el valor promedio y su desviación estándar.

Las observaciones de las fibrillas de colágeno después del proceso de autoensamblaje se realizaron usando microscopía electrónica de transmisión de barrido (STEM, por Scanning transmission electron microscopy) de la suspensión de colágeno. Para ello, se colocan 20 μ L de la suspensión de colágeno fibrilar nanoestructurado en una rejilla de cobre recubierta de carbón y se dejó reposar 5 min para que las fibrillas se adhirieran a la rejilla. Posteriormente, las muestras se fijaron usando una solución de glutaraldehído ($C_5H_8O_2$)/DIH₂O al 1 % (v/v) y se tiñeron negativamente usando una solución de ácido fosfotúngstico al 1 % (v/v) ($W_{12}O_{40}H_3P$, HT152 Sigma-Aldrich)/DIH₂O ajustada a pH 7.4 con hidróxido de sodio (NaOH, 30620 Riedel-de-Häen).

4.1.5. Ensayos de bioactividad *in vitro*

El ensayo de bioactividad se llevó a cabo por inmersión de las estructuras procesadas en SBF⁹⁹. El protocolo para la preparación de SBF se puede consultar en la sección de Anexos. Antes del ensayo, las estructuras se esterilizaron exponiéndolas 10 min a radiación ultravioleta (UV), en una campana de flujo laminar, y las soluciones se filtraron usando un filtro bacteriostático de 0.2 μm (Biofil). Después de la esterilización, las estructuras se sumergieron en 12 mL de SBF que estaba contenido en un Falcon de 50 mL, y se incubaron durante 24, 72 y 168 horas a 36.5 °C y con una velocidad de agitación de 60 rpm. Después del tratamiento en SBF, las muestras se lavaron con DIH₂O durante 15 min, se secaron en una estufa a 50 °C durante 24 h y se almacenaron en un desecador. La evaluación de la bioactividad se llevó a cabo mediante SEM, análisis FT-IR y XRD.

4.2. Resultados y discusión

4.2.1. Caracterización físico-química de las estructuras macroporosas híbridas biopolímero-cerámico

Basándose en un trabajo previo, donde se procesaron estructuras biocerámicas macroporosas mediante la réplica de la morfología de espuma de poliuretano⁴⁰, se optimizó el procesado de las estructuradas incorporando en el protocolo una solución de PVA. Las estructuras cilíndricas reticuladas resultantes pueden observarse en la Figura 2.10. Se obtienen estructuras finales con dimensiones de aproximadamente 9.2 mm de base y 5.4 mm de espesor, 0.27 g·cm⁻³ de densidad y 88 % de porosidad, valores similares a los presentados por las estructuras libres de PVA. Después del tratamiento térmico, se confirmó la eliminación completa de la espuma de poliuretano y del PVA mediante análisis TGA y DSC (Figura 2.11).

Además, la cantidad de colágeno incorporada por estructura, 0.73 % en peso de colágeno con respecto al de contenido total, es lo suficientemente pequeña como para no afectar la apariencia macroscópica de las piezas, preservando al mismo tiempo la porosidad abierta e interconectividad de la estructura biocerámica.

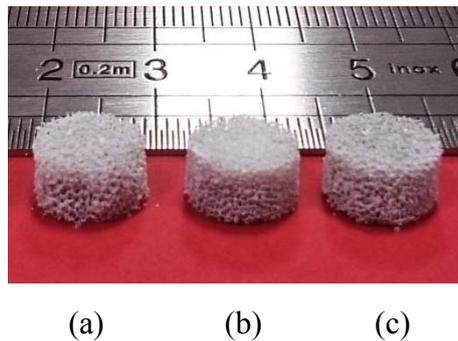


Figura 2.10. Fotografía digital de las matrices biomiméticas (a) SP8PVA, (b) SP8PVA-CFD y (c) SP8PVA-CRT.

La suspensión precursora de colágeno que se utilizó para el revestimiento de las estructuras SP8PVA fue expuesta a un proceso de fibrillogénesis *in vitro*. La eficacia del proceso se evaluó comprobando la formación de fibrillas de colágeno nanoestructurado mediante STEM. La Figura 2.13 a muestra nanofibrillas con tamaños homogéneos, que presentan un diámetro de ≈ 100 nm. Con una mayor ampliación (Ver Figura 2.13 b), se pueden observar los espacios característicos para el colágeno fibrilar denominados distancia D. La existencia de bandas claras (overlap) y oscuras (gap) que se repiten de forma regular y que son perpendiculares al eje de la fibra hacen referencia a la disposición escalonada de las moléculas de tropocolágeno dentro de la fibra⁸³.

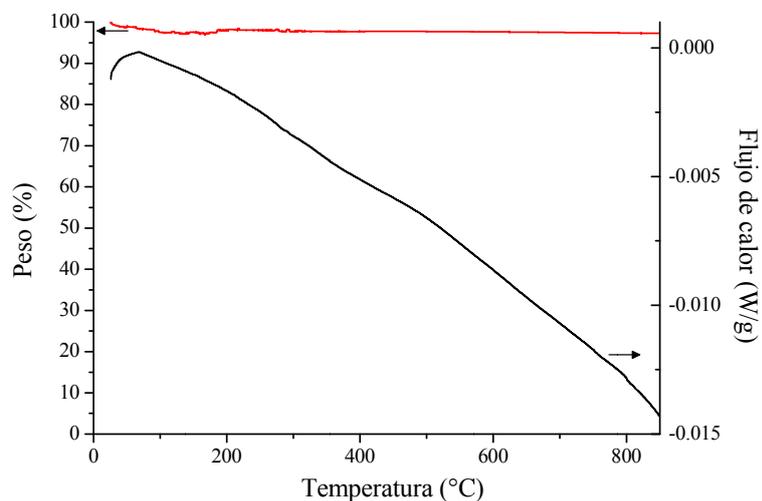


Figura 2.11. Pérdida de masa (línea roja) y flujo de calor (línea negra) para las la estructura final SP8PVA.

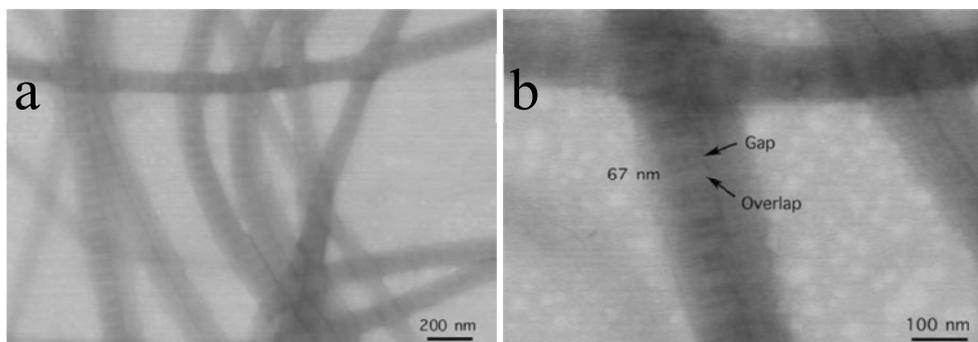


Figura 2.13. Micrografías STEM de tinción negativa de la suspensión precursora de colágeno fibrilar usada para infiltrar las estructuras SP8PVA. (a) Imagen general donde se observan las nanofibrillas y (b) ampliación de la imagen donde se observa la estructura periódica (distancia D, zonas gap y overlap) del autoensamblaje del tropocolágeno.

Siguiendo el mismo protocolo utilizado para la fabricación de estructuras matriz, después de la fibrilogénesis, la suspensión de colágeno se congeló, liofilizó y analizó por espectroscopia FT-IR. El reactivo de colágeno monomérico liofilizado se usó como control. En la Figura 2.14 se muestran los espectros de infrarrojos que identifican las vibraciones de la huella digital de colágeno^{100,101}. Las bandas de absorción más prominentes de los espectros están relacionadas con los grupos amidas, a $3400\text{-}3300\text{ cm}^{-1}$ (amida A), $1660\text{-}1630\text{ cm}^{-1}$ (amida I), $1560\text{-}1530\text{ cm}^{-1}$ (amida II) y 1239 cm^{-1} (amida III), respectivamente. Aunque las bandas de colágeno características principales están presentes en ambos espectros, se detectan diferencias importantes entre ellos.

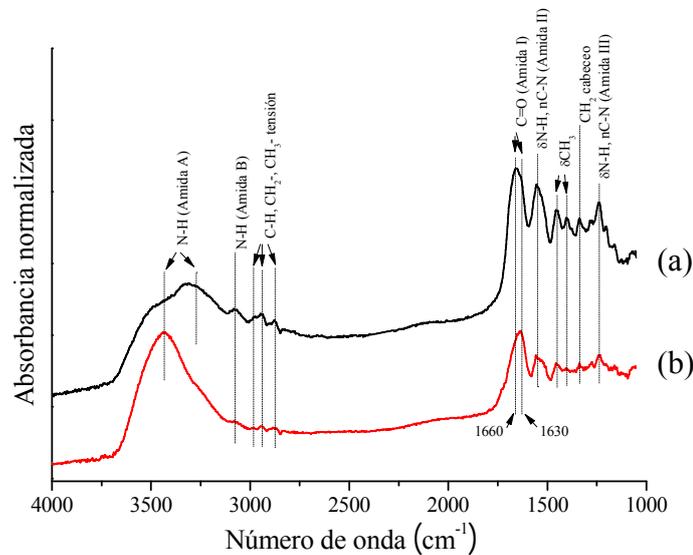


Figura 2.14. Espectro FT-IR para la suspensión precursora del colágeno (a) antes y (b) después de la fibrilogénesis *in vitro*, respectivamente.

Después del proceso de fibrillogénesis, se observa que el pico a 3340 cm^{-1} , correspondiente a la vibración de estiramiento de N-H (Amida A), se ensancha y se desplaza a una frecuencia menor de 3315 cm^{-1} . En general, los cambios espectrales que se observan después de la formación de fibrillas son una mejor definición de todos los picos, especialmente, las vibraciones de estiramiento correspondientes a N-H (Amida B) a 3083 cm^{-1} y C-H, CH_2 - y CH_3 - a 2980 y 2850 cm^{-1} , son claramente más intensas para el colágeno fibrilar. Particularmente, la banda que se presenta a 1660 cm^{-1} y que corresponde a la Amida II, está estrechamente relacionada con el proceso de autoensamblaje de colágeno. Después de la fibrillogénesis, en el espectro FT-IR, se observa un incremento en la relación de intensidades de las absorbancias $1660\text{ cm}^{-1}/1630\text{ cm}^{-1}$. Esto se ha demostrado previamente en experimentos *in vitro* de autoensamblaje térmico para el monómero de colágeno tipo I¹⁰². Además, en el espectro del colágeno monomérico después de la fibrillogénesis, ocurre un desplazamiento de la banda asignada a la amida II de 1550 cm^{-1} a 1555 cm^{-1} . Todos estos eventos se asocian con el aumento de interacciones intermoleculares de colágeno que resultan como consecuencia de la estructura nanofibrilar que adopta el colágeno^{102,103}.

Los resultados de ambas técnicas nos indican que el proceso de fibrillogénesis realizado en el laboratorio ha sido efectivo. Los monómeros de colágeno son capaces de organizarse *in vitro* en una estructura ordenada característica de las fibrillas nativas, a partir del protocolo utilizado. Además, es importante considerar que, en este trabajo, el precursor soluble de atelocolágeno purificado y el método utilizado para reticular el colágeno, reduce las posibilidades de presentar problemas de inmunogenicidad, ventaja añadida que se relaciona con la biocompatibilidad del material y su posterior traducción clínica. Por un lado, estudios previos señalan que un precursor soluble de colágeno purificado y tratado enzimáticamente reduce la

inmunogenicidad, en comparación con precursores de colágeno biológico no purificado¹⁰⁴. Además, el método de reticulado DHT utilizado en nuestro protocolo evita el uso de reactivos químicos de entrecruzamiento tales como aldehídos, isocianatos y carbodiimidas, que pueden producir toxicidad y respuestas inflamatorias¹⁰⁵.

Continuando con la caracterización de las estructuras obtenidas, la Figura 2.15 se muestran los análisis XRD. Los picos agudos correspondientes a la reflexión (100) que se obtiene por SAXRD, se detectan para las tres muestras. Esta reflexión es característica de la SBA-15⁹⁵ y de los materiales que presentan nanoporos ordenados en su estructura, sin embargo, para los materiales revestidos con colágeno se observa que este pico es menos intenso y presenta un cambio de posición y un ligero ensanchamiento, en comparación con la estructura no revestida. En los diagramas de XRD se observa una banda difusa a $2\theta \approx 22$ que indica el carácter vítreo de las estructuras fabricadas y la ausencia de eventos de cristalización hasta los $800\text{ }^{\circ}\text{C}$ ¹⁰⁶, resultado que se confirmó durante el análisis térmico (Ver Figura 2.12).

Los análisis de FT-IR de las estructuras procesadas en este trabajo muestran las bandas características de un BG de silicato (Ver Figura 2.16). Se observan los principales modos vibracionales de tensión Si-O-Si en el rango $1000\text{-}1300\text{ cm}^{-1}$, compuesto por dos modos ópticos transversales, una más intenso centrado a 1100 cm^{-1} y un hombro localizado a 1240 cm^{-1} ^{107,108}. Las vibraciones de flexión simétrica de los enlaces Si-O-Si alrededor de los 800 cm^{-1} , característica de la formación de anillos en la matriz vítrea, y las vibraciones de flexión asimétrica Si-O-Si a los 460 cm^{-1} , están claramente identificados.

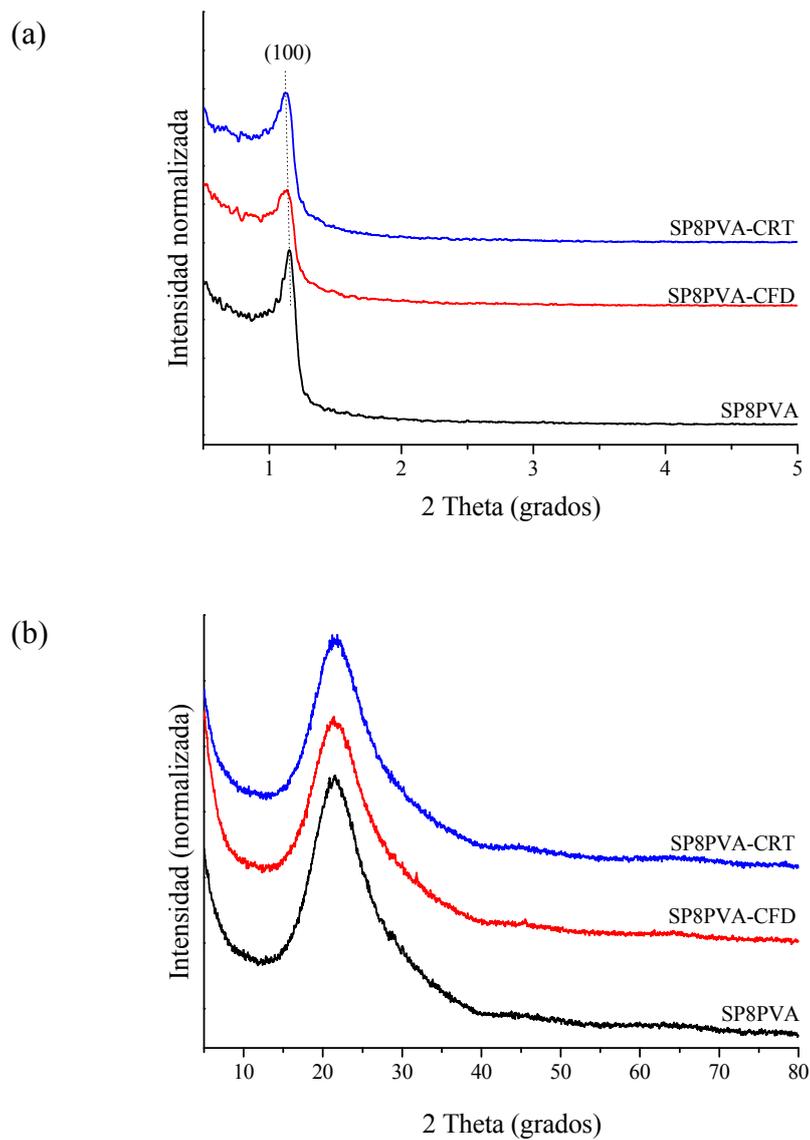


Figura 2.15. Difractogramas (a) SAXRD y (b) XRD para las matrices biomiméticas procesadas.

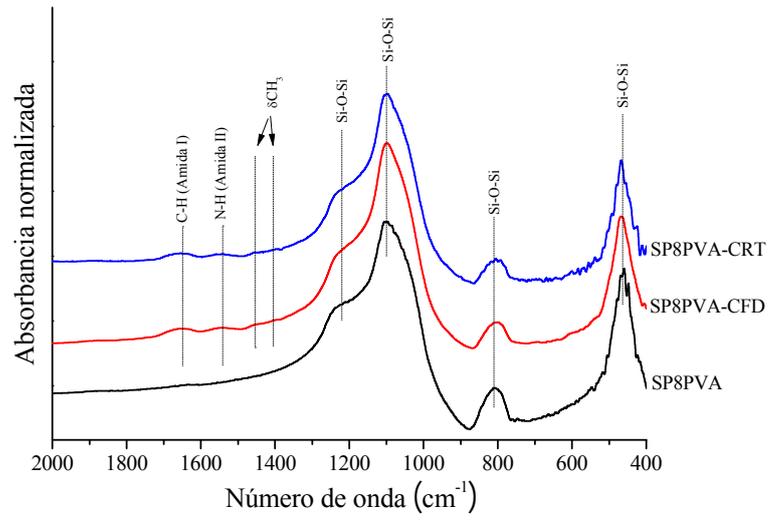


Figura 2.16. Análisis FT-IR para las matrices biomiméticas ensayadas.

Los espectros de las estructuras matriz finales indican que no existen residuos orgánicos de la espuma de poliuretano o del PVA, confirmando su eliminación completa después del tratamiento térmico. En los espectros FT-IR de las estructuras infiltradas con colágeno se observa la presencia de nuevas bandas correspondientes a la Amida I a 1659 cm^{-1} , Amida II a 1550 cm^{-1} y las bandas de absorción a 1452 y 1403 cm^{-1} , atribuido a la vibración de flexión de CH_3 -^{109,110}.

Las morfologías de las estructuras no revestidas (SP8PVA) y revestidas con colágeno (SP8PVA-CFD y SP8PVA-CRT) se observaron mediante SEM (Figura 2.17). Todas las estructuras exhiben una red macroporosa interconectada que indica que el revestimiento de colágeno aplicado no afecta significativamente ni el tamaño de los macroporos ni la interconectividad de estos, como se ha mencionado anteriormente.

El análisis de imágenes de las micrografías obtenidas de SP8PVA, SP8PVA-CFD y SP8PVA-CRT indica un tamaño de macroporos promedio de 297, 312 y 310 μm y un grosor de pared de poro de 49, 50 y 50 μm , respectivamente. Un mayor aumento de las secciones transversales sugiere que el revestimiento se distribuye homogéneamente y que el colágeno se adhiere firmemente a la superficie de la estructura. Además, no se observan residuos o indicaciones de que el revestimiento se haya desgarrado durante el corte transversal de las estructuras procesadas. Las micrografías con mayor aumento muestran la existencia de una película similar al tejido sobre la superficie de las estructuras recubiertas, que se acompaña de algunos efectos de carga evidentes en el contraste que se observa en las imágenes.

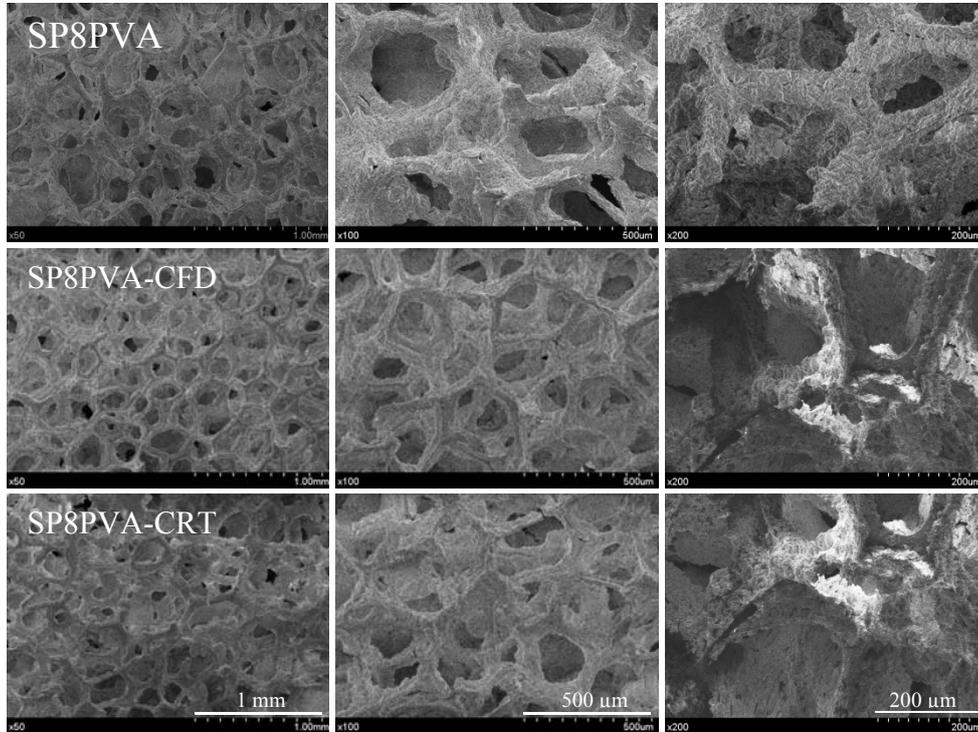


Figura 2.17. Micrografías SEM de red macroporosa y la microestructura de las paredes de los poros a diferentes magnificaciones.

En la Figura 2.18 se muestran micrografías SEM a altas magnificaciones que permiten comparar el sustrato superficial de las estructuras revestidas de colágeno con el SP8PVA (sin revestimiento). Se observa como el colágeno forma láminas delgadas que cubren la superficie rugosa de la estructura (flechas en las micrografías), sin embargo, existen diferencias significativas en la textura entre los materiales recubiertos por colágeno congelado-liofilizado y colágeno secado a temperatura ambiente. Es evidente una mayor porosidad y textura para la muestra recubierta de colágeno congelado-liofilizado, donde las nanofibras de colágeno forman una red visible para el SP8PVA-CFD.

En general, las micrografías SEM sugieren una fuerte adhesión del biopolímero al sustrato cerámico. Esto puede ser consecuencia de presentar puntos isoeléctricos (pI) opuestos. Al incorporar la suspensión de fibrillas de colágeno (pH \approx 7), cuyas moléculas de colágeno presentan una carga positiva (pI \approx 7.5) ¹¹¹, en un sustrato cerámico cuyo pI está alrededor de 3⁹⁵, puede generarse una interacción electrostática fuerte entre las moléculas de colágeno y el sustrato durante el proceso de adsorción.

En la Figura 2.19 a se muestran las isothermas de adsorción y desorción de N₂ correspondientes a las estructuras procesadas SP8PVA, SP8PVA-CFD y SP8PVA-CRT, respectivamente. Todas las isothermas obtenidas por fisisorción de N₂ son tipo IV y exhiben un ciclo de histéresis tipo I característico de la condensación capilar que ocurren en materiales mesoporosos. Las distribuciones de diámetro de poro determinadas por el método BJH que se muestran en la Figura 2.19 b indican distribuciones monodispersas con un diámetro medio de poro entre 4 y 5 nm. También se observa una disminución del volumen de poro para las estructuras revestidas de colágeno, especialmente para la estructura SP8PVA-CRT.

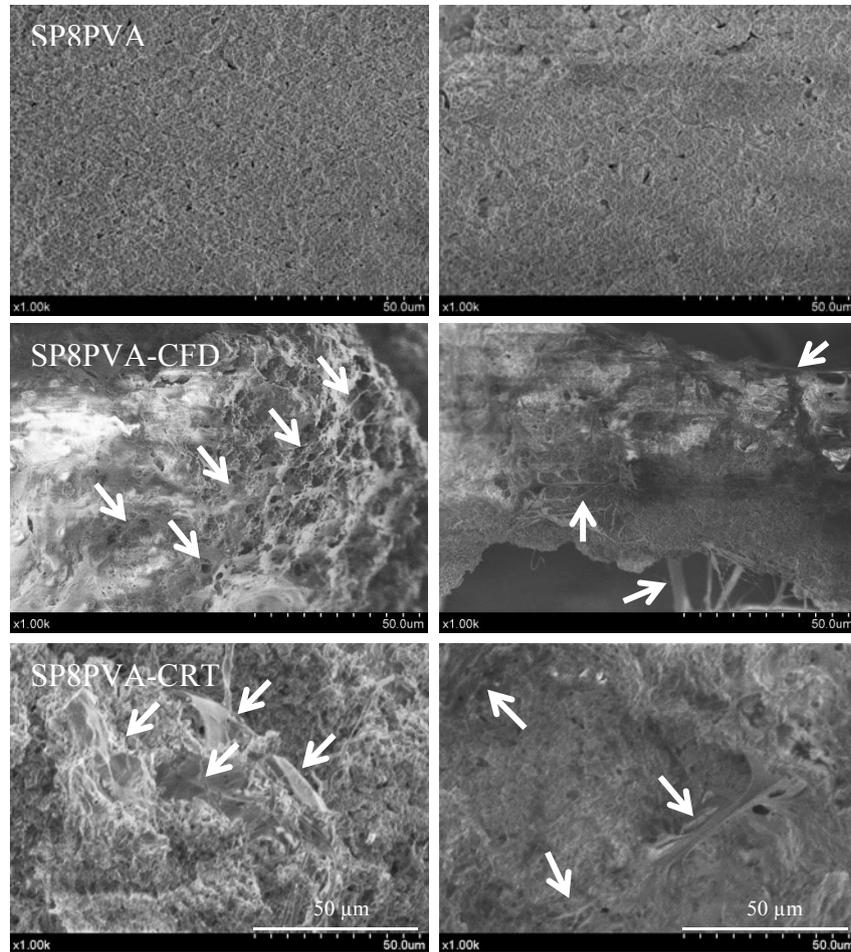


Figura 2.18. Micrografías SEM a altas magnificaciones de las superficies de las tres estructuras procesadas. La superficie rugosa de la estructura sin revestimiento SP8PVA. Flechas en las micrografías SP8PVA-CFD y SP8PVA-CRT indican las nanofibrillas de colágeno y los puntos donde estas se han adherido a la superficie de la estructura matriz.

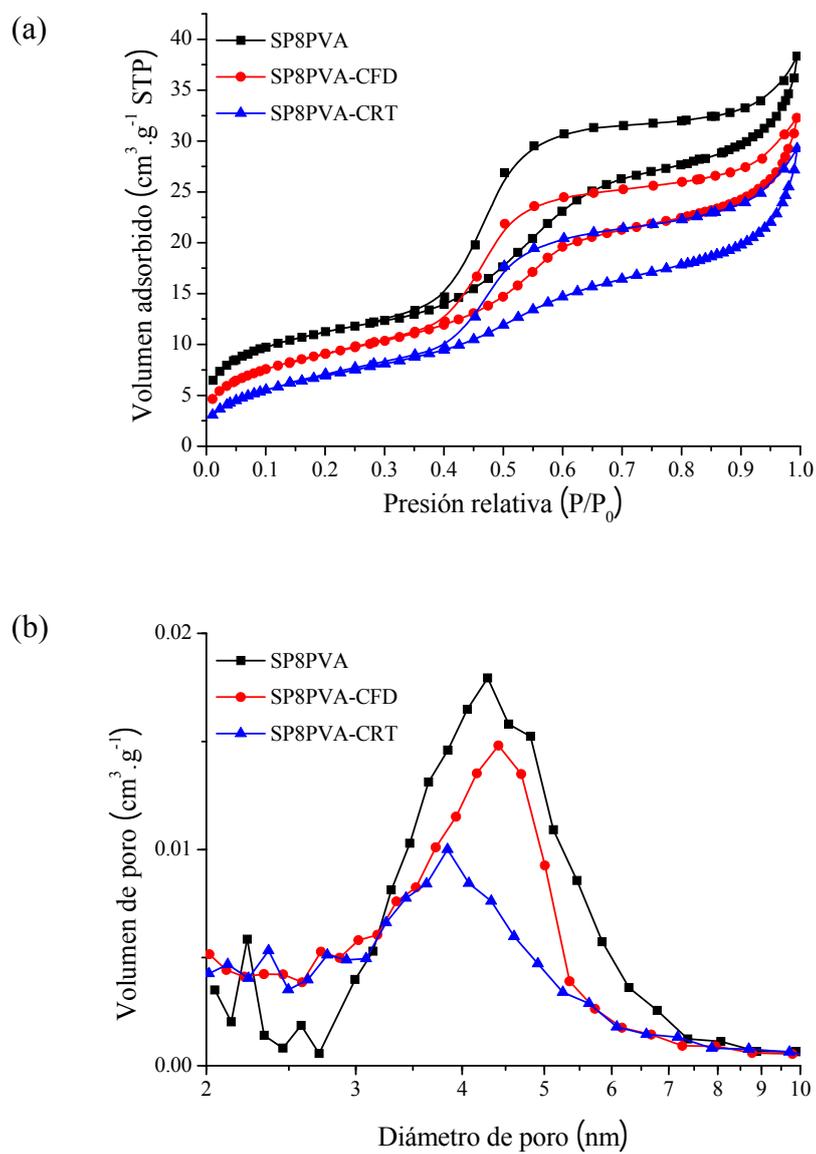


Figura 2.19. Fisisorción de N_2 para las estructuras procesadas. (a) Isothermas y (b) distribución BJH de diámetro de poro, respectivamente.

La Tabla 2.3 presenta la superficie específica calculada por el método BET (S_{BET}), el volumen total y diámetro de nanoporos, obtenidos por análisis de fisisorción de N_2 , para las tres estructuras procesadas.

Tabla 2.3. Parámetros texturales de las estructuras procesadas.

Matriz biomimética	Área superficial específica ($\text{m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$)	Volumen total de nanoporo ($\text{cm}^3 \cdot \text{g}^{-1}$)	Diámetro de poro (nm)
SP8PVA	42	0.06	4.3
SP8PVA-CFD	32	0.04	4.4
SP8PVA-CRT	25	0.03	3.8

Si bien, se mencionó antes que la incorporación de PVA no afectaba los valores de densidad y porosidad total con respecto a las estructuras libres de tensioactivo, si se observan modificaciones en otros parámetros texturales nanoscópicos, como el área superficial y el volumen de nanoporos. Estos parámetros se ven significativamente afectados mostrando una drástica disminución de más del 50 % con respecto a las estructuras libres de PVA, que presentaban una S_{BET} de $130 \text{ m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$. Sin embargo, el área superficial que presenta el SP8PVA, $42 \text{ m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$, sigue siendo excepcional con respecto a las estructuras macroporosas basadas en BG convencionales sintetizados por el método de fusión^{41,52}.

Publicaciones anteriores que informan sobre estructuras macroporosas a base de BG y MBG fabricados mediante la técnica de réplica, con o sin aglutinante, se recogen en la Tabla 2.2. Sin embargo, aunque en la bibliografía no se han encontrado datos específicos sobre el área superficial de estas estructuras, se puede inferir valores de superficie específica bajos. Por un lado, el valor de área superficial para el Bioglass® 45S5 particulado, vidrio que se sintetiza

generalmente por fusión, varía entre 0.15 y 2.70 m²·g⁻¹, según el tamaño de partícula que oscila entre 4 y 248 μm, por lo que podemos estimar una superficie máxima de 2.7 m²·g⁻¹ para estructuras fabricadas a partir de este precursor ¹¹². Para el caso de los BG por sol-gel se esperan superficies mayores, alrededor de los ≈ 100 m²·g⁻¹, sin embargo, los valores no se presentan en las publicaciones, lo que puede sugerir que las áreas obtenidas no son relevantes. Por otro lado, debe considerarse que los materiales después de un tratamiento térmico tienden a presentar una disminución en sus propiedades texturales. En este contexto, las áreas superficiales que presentan las estructuras procesadas SP8PVA, SP8PVA-CFD y SP8PVA-CRT de 42, 32 y 25 m²·g⁻¹, respectivamente, siguen siendo aceptables y relevantes para su uso en ingeniería tisular que, como se mencionó antes, requieren materiales con altas áreas superficiales que favorezcan su bioactividad.

El comportamiento mecánico de las estructuras procesadas con y sin revestimiento de colágeno se evaluó mediante el ensayo de resistencia a compresión uniaxial. En la Figura 2.20 se muestran las curvas obtenidas de la resistencia a la compresión (tensión) frente a la deformación de las estructuras SP8PVA, SP8PVA-CFD y SP8PVA-CRT, mientras que en la Figura 2.21 se observan los histogramas de las mismas. Como se puede observar, la resistencia a la compresión de las estructuras revestidas de colágeno es significativamente mayor que de la estructura SP8PVA, donde el efecto del revestimiento sobre la resistencia mecánica es más importante para la estructura SP8PVA-CRT.

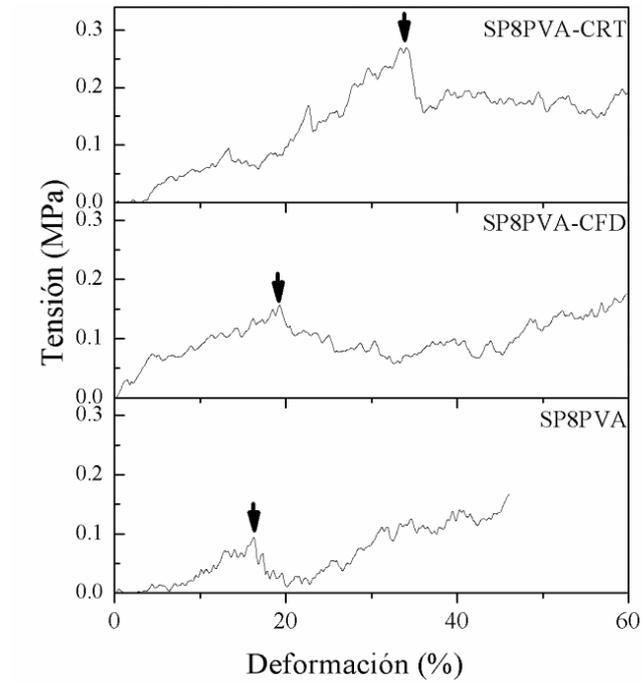


Figura 2.20. Curvas de tensión frente a la deformación de las estructuras procesadas.

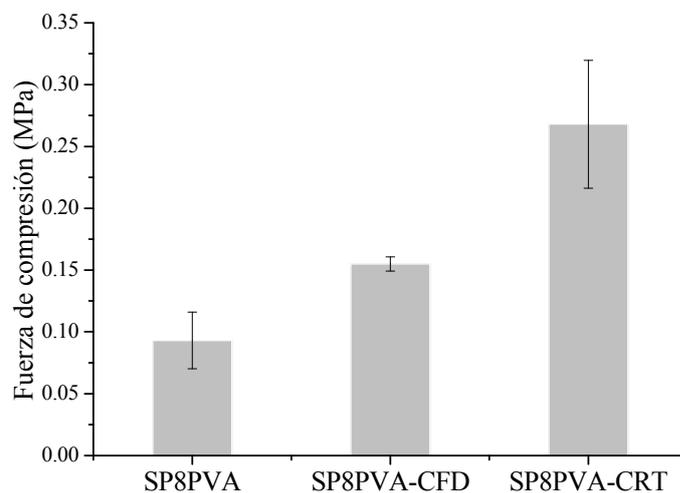


Figura 2.21. Histogramas de los valores promedios de resistencia a la compresión de las estructuras procesadas, con sus correspondientes desviaciones estándar.

Es importante señalar que el valor de resistencia a la compresión obtenido para la estructura no recubierta SP8PVA (0,09 MPa) es superior a la misma formulación precursora inorgánica preparada sin PVA (0,04 MPa) como se informó previamente por nuestro grupo^{40,113}. Además, es interesante observar que la estructura SP8PVA se rompió completamente y se desagregó en pequeñas piezas (partículas) durante el ensayo mecánico, mientras que las estructuras revestidas con colágeno nanofibrilar fueron capaces de mantener de alguna manera la integridad de la pieza (compactación) a pesar de ser comprimido (Figura 2.22).

Por lo que, aunque es evidente la disminución de las propiedades texturales para las estructuras procesados con PVA, se compensan con un importante incremento del 40 % en los valores de resistencia a la compresión cuando se compara con las

mismas estructuras procesadas sin PVA. Además, las estructuras revestidas de colágeno presento una resistencia a la compresión 7 veces mayor.

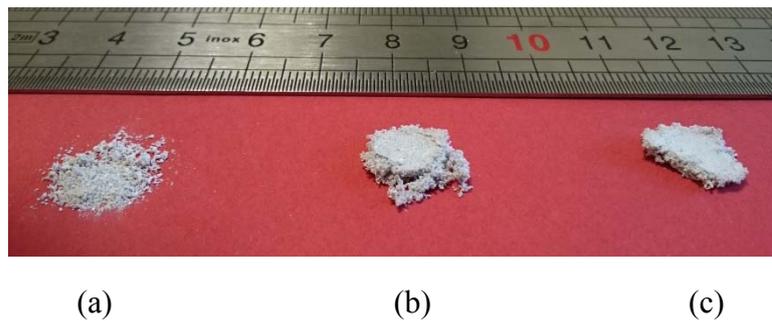


Figura 2.22. Fotografías digitales del (a) SP8PVA (sin revestimiento), y de las estructuras revestidas de colágeno (b) SP8PVA-CFD y (c) SP8PVA-CRT, después del ensayo de resistencia a la compresión, respectivamente.

Como se revisó anteriormente, revestir una estructura tridimensional con un polímero puede rellenar microfisuras y huecos puntuales generados durante su procesamiento transformando su carácter débil y quebradizo en un material más fuerte y resistente⁶². Y aunque existen una gran cantidad de polímeros sintéticos, como poliésteres, poliláctidos o poliglicólidos, y sus copolímeros y polihidroxicanoatos^{53,63,114}, que mejoran las propiedades mecánicas de las estructuras, presentan varios inconvenientes para su aplicación a la regeneración ósea como la baja bioactividad⁴⁹, la liberación de productos de la degradación ácida y la falta de importantes señales biológicas de superficie, indispensables para el reconocimiento celular¹¹⁵. En este sentido, una alternativa prometedora son los biopolímeros de origen natural como el alginato¹¹⁴, quitosano¹¹⁶, seda¹¹⁷, celulosa^{60,116}, gelatina^{67,118} o colágeno¹¹⁹. Respecto al rendimiento mecánico de

estructuras fabricadas mediante la técnica de réplica basada en el Bioglass® 45S5, revestirlas con PVA y celulosa, mejoró la resistencia a la compresión de 0,02 a 0,06 MPa y hasta 0.1 MPa^{60,61} (Ver Tabla 2.2).

En este trabajo, el revestimiento de colágeno le proporcionó a las estructuras mejores propiedades mecánicas (hasta 0.3 MPa de tensión-deformación) y un apariencia más flexible. Estos resultados confirman que el revestimiento de colágeno es una estrategia efectiva para mejorar significativamente la estabilidad mecánica de las estructuras macroporosas procesadas por el método de réplica. Dicha estabilidad mecánica, observada en las estructuras revestidas de colágeno bajo la influencia de una carga mecánica, se debe a que el biopolímero fibrilar puentea las grietas que se desarrollan en la estructura, aumentando así la resistencia general a la propagación de la grieta⁶². Por lo tanto, cuando una estructura sin revestimiento se somete a una ensayo de compresión, sufre fracturas sucesivas en puntos de la estructura contiguos a las piezas de carga del ensayo que se propagan produciendo una ruptura total de la estructura en trozos y partículas pequeñas (Ver Figura 2.22 a). En contraste, las estructuras revestidas con colágeno presentan un comportamiento de deformación dúctil y, de alguna manera, una densificación de la estructura, como puede apreciarse en la Figura 2.22 b y c.

Vale la pena recordar, que la mejora significativa en las propiedades mecánicas de las estructuras, fue producida usando una cantidad muy pequeña (0.73 % de colágeno en peso respecto al contenido total) de colágeno fibrilar. Estos resultados alientan la investigación futura para estudiar cómo el aumento del contenido de colágeno podría mejorar la resistencia a la compresión y otros parámetros mecánicos.

4.2.2. Ensayos de bioactividad in vitro en SBF

Las micrografías de SEM de los tres tipos de estructuras procesadas después de 24 h de tratamiento en SBF muestran en su superficie la nucleación característica de CaP (Ver Figura 2.23). Distintivamente, se observan morfologías con tamaño de partículas más fino y homogéneo sobre la superficie de la estructura revestida con colágeno liofilizado. También se observaron abundantes morfologías de partículas agregadas sobre la estructura revestida con colágeno secado a temperatura ambiente. La Figura 2.23 se observa cómo el aumento en el tiempo de tratamiento, de 24 a 72 h, produce una reducción visible del tamaño de los macroporos como resultado del crecimiento del CaP en las paredes de las estructuras ensayadas, siendo particularmente evidente para la estructura SP8PVA-CFD.

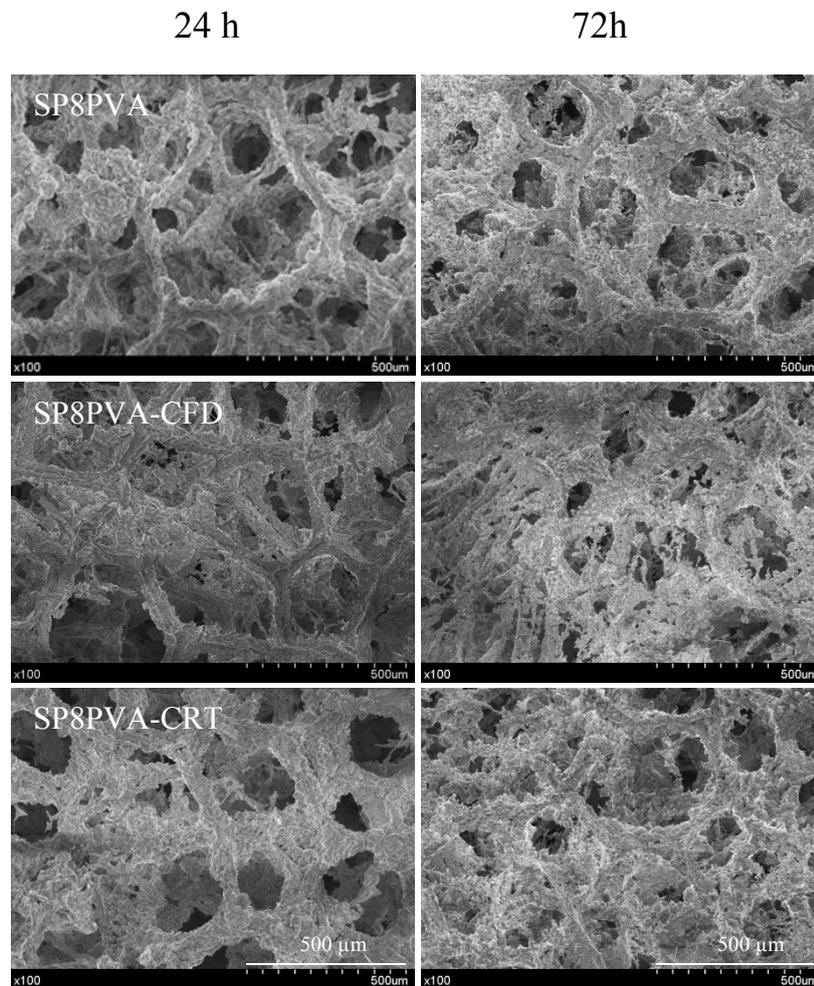


Figura 2.23. Comparación de micrografías SEM la de superficie de las estructuras, después de 24 y 72 h de tratamiento con SBF, mostrando una reducción del tamaño de macroporos creciente con el tiempo, debido a la deposición en fase mineral.

La Figura 2.24 muestra micrografías de SEM a alta magnificación de las superficies de las estructuras después de 168 h de tratamiento en SBF, donde se observa que la superficie de la estructura sin revestimiento, SP8PVA, exhibe morfologías de coliflor típicas de la cristalización del CaP. En el caso de las estructuras revestidos con colágeno, las partículas de HA cristalina no forman agregados redondos, sino que en su lugar, decoran las nanofibras de colágeno. Por otro lado, el análisis EDX de dichas superficies indica relaciones de intensidad de señal P/Si y Ca/Si mayores para las estructuras revestidos con colágeno en comparación con la SP8PVA, lo que sugiere una formación de capa de CaP más gruesa y homogénea sobre los materiales revestidos con colágeno (Ver Figura 2.25).

La disposición de cristales de CaP a lo largo de las fibras de colágeno, en lugar de una formación de agregados más grande, como se muestra para el SP8PVA, sugiere que el colágeno sirve de plantilla para la nucleación de HA. Ensayos previos de bioactividad *in vitro* utilizando cerámica revestida de colágeno han señalado conclusiones similares¹²⁰. Esta es una propiedad particular del colágeno, ya que la bibliografía sugiere que el uso de biopolímeros alternativos como la celulosa⁶⁰ y la gelatina¹²¹, retardan ligeramente la formación de HA en ensayos de bioactividad similares al descrito en este apartado.

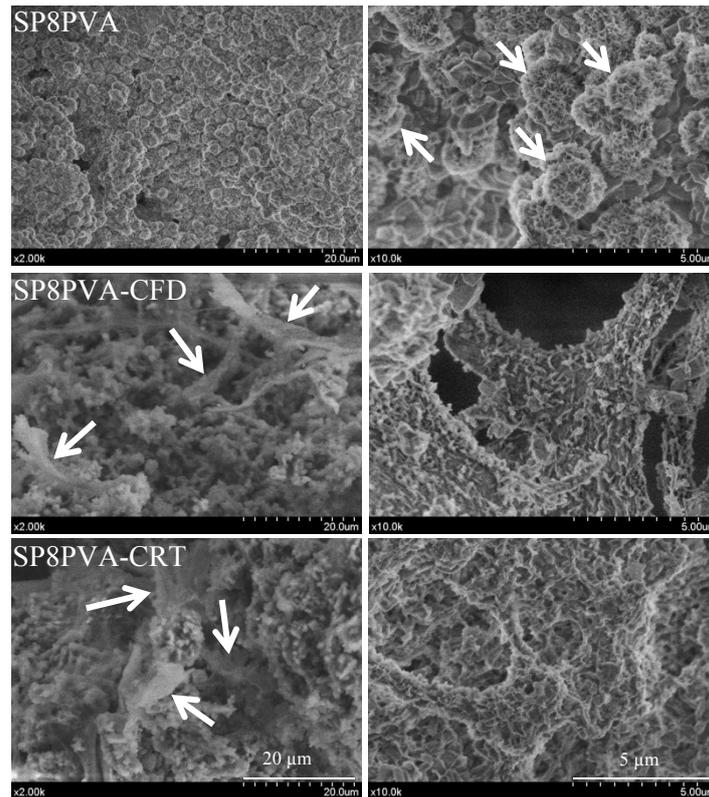


Figura 2.24. Micrografías SEM a diferentes magnificaciones de las superficies de las estructuras ensayadas después de 168 h de tratamiento en SBF. Las flechas en la imagen SP8PVA de alta magnificación indican las morfologías típicas de agregados de CaP cristalino. Las flechas en las micrografías para SP8PVA-CFD y SP8PVA-CRT a baja magnificación señalan las nanofibras del colágeno, respectivamente. A mayores aumentos, a la derecha, las fibras de colágeno aparecen completamente decoradas con cristales de CaP.

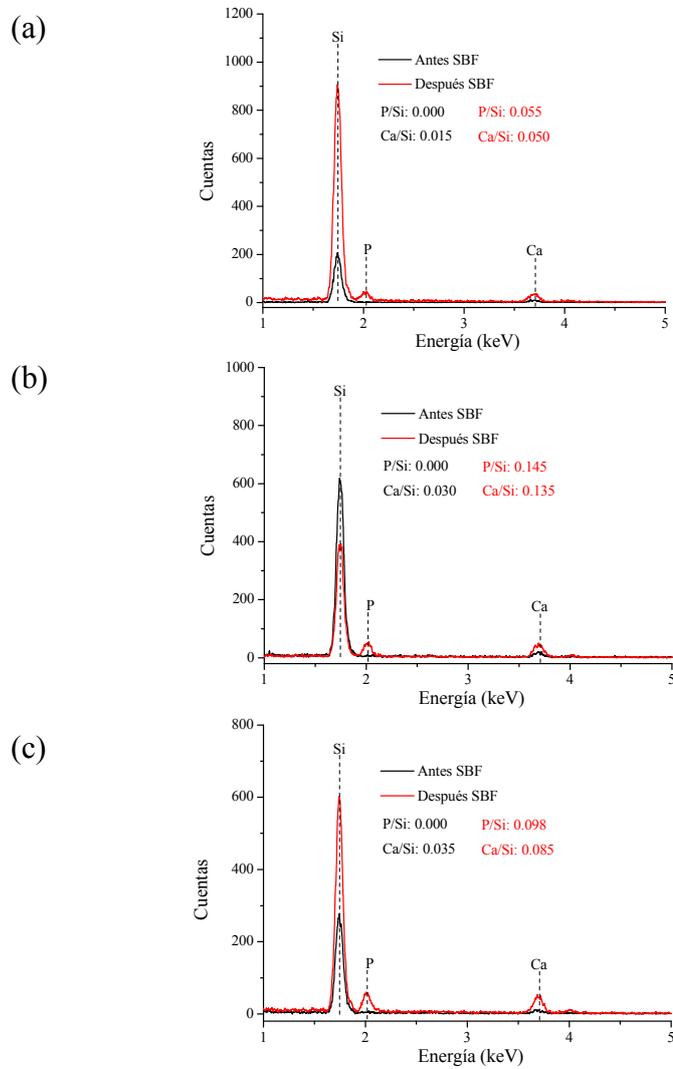


Figura 2.25. Análisis EDX para la superficies de las estructuras (a) SP8PVA, (b) SP8PVA-CFD y (c) SP8PVA-CRT, respectivamente, antes y después de 168 h de tratamiento en SBF. Dentro de cada gráfico se presentan las relaciones de intensidades P/Si y Ca/Si, antes (negro) y después (rojo), del tratamiento en SBF, para cada una de las estructuras ensayas.

Las estructuras ensayadas también se analizaron por FT-IR y XRD después de 24, 72 y 168 h de tratamiento en SBF para evaluar su bioactividad *in vitro*. La Figura 2.26 muestra los resultados de los análisis de FT-IR, mientras que en la Figura 18 se pueden observar los resultados de los análisis XRD. En los espectros FT-IR solo se destacan las nuevas bandas detectadas en comparación con los espectros de las estructuras no tratados con SBF. El pico a 1630 cm^{-1} , asignado a la vibración de los enlaces O-H, indica la presencia de agua retenida dentro de las muestras después del tratamiento de inmersión. El pico a 1070 cm^{-1} corresponde al modo de tensión asimétrico del enlace P-O, mientras que las bandas a 563 y 602 cm^{-1} son características del fosfato cristalino¹²²⁻¹²⁴. La formación de especies de fosfato en la superficie de los tres tipos de estructuras ensayadas es detectada por FT-IR después de 24 h de inmersión en SBF. Cuando se aumenta el tiempo de tratamiento a 168 h, se observa la definición definitiva de los picos distintivos a 563 y 602 cm^{-1} , indicador de la naturaleza cristalina de las fases de fosfato presente.

Los difractogramas de XRD confirman la deposición de partículas de HA cristalina en la superficie de las estructuras después del tratamiento en SBF (Ver Figura 2.27). Después de las 72 h de inmersión en SBF, las estructuras revestidas de colágeno muestran en su difractograma los picos característicos del HA (ficha JCPDS 9-432). Con el aumento en el tratamiento de inmersión, los cristales de HA crecen en todas las muestras, incluyendo el material sin revestimiento de colágeno, SP8PVA.

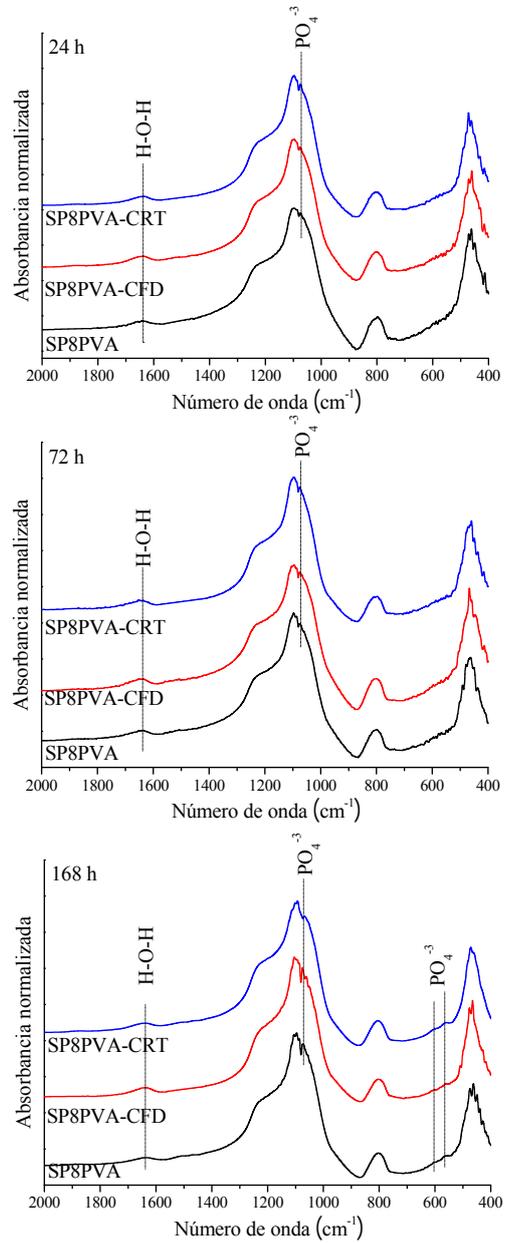


Figura 2.26. Análisis FT-IR de las estructuras estudiadas después de 24, 72 y 168 h de tratamiento en SBF.

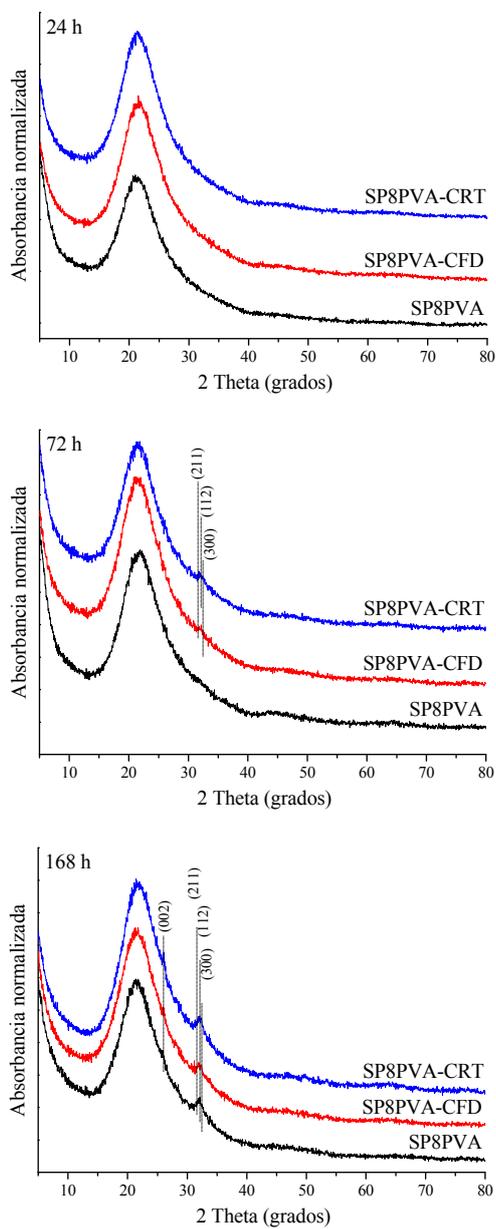


Figura 2.27. Análisis XRD de las estructuras estudiadas después de 24, 72 y 168 h de tratamiento en SBF.

Como puede observarse, el recubrimiento de colágeno fibrilar nanoestructurado no sólo no inhibe la respuesta bioactiva de las estructuras reticuladas sino que también promueve la mineralización de HA en la superficie del material. Tanto los resultados de SEM como XRD indican que, después de las primeras 72 h de tratamiento en SBF, el HA empieza a depositarse en la superficie de las estructuras revestidas con colágeno. Por un lado, en los difractogramas se detectan picos incipientes que corresponden al HA cristalina y, por otro lado, en las micrografías se observa un espesamiento de la pared de la estructura. Este no es un comportamiento inesperado para el colágeno tipo I estructurado, que puede servir como una plantilla para controlar la nucleación y el crecimiento de HA cristales, como sugieren las micrografías de SEM que se muestran en la Figura 2.24^{125,126}. De hecho, algunos autores sugieren que el colágeno tiene la capacidad de secuestrar de grandes cantidades de iones de calcio, fosfato y carbonato, que precipitan espontáneamente en cristales de HA¹²⁵.

Si bien es cierto que en la bibliografía hay numerosas estructuras matriz con diferentes composiciones y técnicas para su uso en ingeniería tisular, no se ha encontrado ningún trabajo previo con la composición, técnica de procesamiento y de optimización que se indican en este trabajo de Tesis.

Además, las nuevas estructuras híbridas altamente porosas desarrolladas en este trabajo presentan propiedades muy interesantes para aplicaciones en ingeniería de tejidos óseos. La formulación química inorgánica que favorece el proceso de osteogénesis¹²⁷, las propiedades texturales que proporcionan mayor reactividad¹²⁸, la mejora significativa en la resistencia a la compresión y la mineralización de HA en la superficie del material, producto del revestimiento de colágeno.

5. Conclusiones

Se han procesado estructuras matriz macroporosas nanoestructuradas mediante la técnica de réplica a base de una mezcla de partículas de sílice tipo SBA-15 y un sol MBG, optimizadas con la incorporación de PVA.

- Las matrices biomiméticas obtenidas son tridimensionales, con alta superficie específica, formada por macroporos abiertos e interconectados y con una nanoporosidad ordenada bien definida.
- Las estructuras obtenidas han sido revestidas con una pequeña capa de colágeno fibrilar (0.73 % de colágeno en peso respecto al contenido total). La incorporación de colágeno produce una mejora de la resistencia a la compresión de hasta 0.3 MPa, a la vez que mantiene relevantes propiedades texturales. El ensayo de bioactividad *in vitro* indica que el revestimiento de colágeno fibrilar nanoestructurado activa la cinética de la mineralización de HA.
- En base a los resultados presentado podemos afirmar que, en este trabajo se han obtenido estructuras matriz con porosidad dual macro-nano que mimetizan la estructura ósea, consistente en una organización jerárquica que se forma por la combinación ordenada de HA y colágeno. Los resultados de este capítulo se han publicado en un artículo que lleva por título “High Surface Area Biopolymeric-Ceramic Scaffolds for Hard Tissue Engineering”. El artículo se puede encontrar en la sección de Anexos (Anexo 3) y corresponde a la siguiente referencia: Romero-Sánchez, L. B, S. Borrego-González, and Díaz-Cuenca A. 2017. “High Surface Area Biopolymeric-Ceramic Scaffolds for Hard Tissue Engineering.” *Biomedical Physics & Engineering Express* 3 (3). IOP Publishing: 035012. doi:10.1088/2057-1976/aa7001.

7. Referencias

- (1) Krafts, K. P. Tissue Repair. *Organogenesis* **2010**, 6 (4), 225–233.
- (2) Hermoso de Mendoza, M. T. Classification of Osteoporosis: Risk Factors. Clinical Manifestations and Differential Diagnosis. *An. Sist. Sanit. Navar.* **2003**, 26 (Suppl. 3), 29–52.
- (3) Brown, M. L.; O'Connor, M. K.; Hung, J. C.; Hayostek, R. J. The Art of Bone Scintigraphy-Technical Aspects. *J. Nucl. Med.* **1991**, 32 (12), 2332–2341.
- (4) Sommerfeldt, D.; Rubin, C. Biology of Bone and How It Orchestrates the Form and Function of the Skeleton. *Eur. Spine J.* **2001**, 10 (Suppl. 2), 86–95.
- (5) Bigi, A.; Cojazzi, G.; Panzavolta, S.; Ripamonti, A.; Roveri, N.; Romanello, M.; Suarez, K. N.; Moro, L. Chemical and Structural Characterization of the Mineral Phase from Cortical and Trabecular Bone. *J. Inorg. Biochem.* **1997**, 68 (1), 45–51.
- (6) Hadjidakis, D. J.; Androulakis, I. I. Bone Remodeling. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **2006**, 1092, 385–396.
- (7) Cooper, L. F. Biologic Determinants of Bone Formation for Osseointegration: Clues for Future Clinical Improvements. *J. Prosthet. Dent.* **1998**, 80 (4), 439–449.
- (8) Duplomb, L.; Dagouassat, M.; Jourdon, P.; Heymann, D. Concise Review : Embryonic Stem Cells : A New Tool to Study Osteoblast and Osteoclast Differentiation. *Stem Cells* **2007**, 25 (3), 544–552.
- (9) Bielby, R.; Jones, E.; McGonagle, D. The Role of Mesenchymal Stem Cells in Maintenance and Repair of Bone. *Inj. Int. J. Care Inj.* **2007**, 38 (Suppl. 1), S26–S32.
- (10) Bonewald, L. F.; Johnson, M. L. Osteocytes, Mechanosensing and Wnt Signaling. *Bone* **2008**, 42 (4), 606–615.

- (11) Forriol, F. Growth Factors in Cartilage and Meniscus Repair. *Inj. Int. J. Care Inj.* **2009**, *40* (Suppl. 3), S12–S16.
- (12) Nakanishi, K.; Sakiyama, T.; Imamura, K. On the Adsorption of Proteins on Solid Surfaces, a Common but Very Complicated Phenomenon. *J. Biosci. Bioeng.* **2001**, *91* (3), 233–244.
- (13) Bernabéu Martínez, E.; López-Oliva Muñoz, F.; Larena Pellejero, A.; Tur Gil, A.; de la Piedra Gordo, M. C.; Montero Escobar, M. Estudio de La Composición Ósea Para Su Apropiaada Regeneración Con Materiales Implantados. *Patol. del Apar. Locomot.* **2006**, *4* (3), 202–207.
- (14) Wegst, U. G. K.; Bai, H.; Saiz, E.; Tomsia, A. P.; Ritchie, R. O. Bioinspired Structural Materials. *Nat. Mater.* **2014**, *14* (1), 23–36.
- (15) Fernandez-Tresguerres Hernandez-Gil, I.; Alobera Gracia, M. A.; del Canto Pingarrón, M.; Blanco Jerez, L. Bases Fisiológicas de La Regeneración Ósea II. El Proceso de Remodelado. *Med. Oral Patol. Oral Cir. Bucal* **2006**, *11* (2), E151–E157.
- (16) Albrektsson, T.; Johansson, C. Osteoinduction, Osteoconduction and Osseointegration. *Eur. Spine J.* **2001**, *10* (Suppl. 2), 96–101.
- (17) Blokhuis, T. J.; Arts, J. J. C. Bioactive and Osteoinductive Bone Graft Substitutes: Definitions, Facts and Myths. *Inj. Int. J. Care Inj.* **2011**, *42* (Suppl. 2), S26–S29.
- (18) Fernández-Montes Moraleda, B. Optimización de Materiales Para Regeneración Ósea . Estudio de Las Interacciones de Hidroxiapatita Con Proteínas Y Preparación de Andamios Porosos ., 2013.
- (19) Staiger, M. P.; Pietak, A. M.; Huadmai, J.; Dias, G. Magnesium and Its Alloys as Orthopedic Biomaterials: A Review. *Biomaterials* **2006**, *27* (9), 1728–1734.
- (20) Milosev, I. Metallic Materials for Biomedical Applications: Laboratory and Clinical Studies. *Pure Appl. Chem.* **2011**, *83* (2), 309–324.
- (21) Giannoudis, P. V.; Dinopoulos, H.; Tsiridis, E. Bone Substitutes: An Update. *Inj. Int. J. Care Inj.* **2005**, *36* (Suppl. 3), S20–S27.

- (22) Alvarez Barreto, J. F. Regeneración Ósea a Través de La Ingeniería de Tejidos: Una Introducción Osseous Regeneration through Tissue Engineering : *Redalyc.org* **2009**, 13.
- (23) Cancedda, R.; Dozin, B.; Giannoni, P.; Quarto, R. Tissue Engineering and Cell Therapy of Cartilage and Bone. *Matrix Biol.* **2003**, 22 (1), 81–91.
- (24) Fernández Jaén, T. F.; Baró Pazos, F.; Fernández Jiménez, A.; Guillén Vicente, M.; Guillén García, P. Conceptos Actuales de La Fisiopatología de Las Tendinopatías. Ingeniería Tisular. *Apunt. Med. l'Esport* **2010**, 45 (168), 259–264.
- (25) NIBIB. Ingeniería de Tejidos Y Medicina Regenerativa. *Instituto Nacional de Bioingeniería e Imágenes Biomédicas*. 2013.
- (26) Bonassar, L. J.; Vacanti, C. A. Tissue Engineering: The First Decade and Beyond. *J. Cell. Biochem. Suppl.* **1998**, 30-31, 297–303.
- (27) O'Brien, F. J. Biomaterials & Scaffolds for Tissue Engineering. *Mater. Today* **2011**, 14 (3), 88–95.
- (28) Matassi, F.; Nistri, L.; Paez, D. C.; Innocenti, M. New Biomaterials for Bone Regeneration. *Clin. Cases Miner. Bone Metab.* **2011**, 8 (1), 21–24.
- (29) Salgado, A. J.; Coutinho, O. P.; Reis, R. L. Bone Tissue Engineering: State of the Art and Future Trends. *Macromol. Biosci.* **2004**, 4 (8), 743–765.
- (30) Navarro, M.; Del Valle, S.; Martínez, S.; Zeppetelli, S.; Ambrosio, L.; Planell, J. a.; Ginebra, M. P. New Macroporous Calcium Phosphate Glass Ceramic for Guided Bone Regeneration. *Biomaterials* **2004**, 25, 4233–4241.
- (31) Hench, L. L.; Xynos, I. D.; Polak, J. M. Bioactive Glasses for in Situ Tissue Regeneration. *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* **2004**, 15 (4), 543–562.
- (32) Rezwan, K.; Chen, Q. Z.; Blaker, J. J.; Boccaccini, A. R. Biodegradable and Bioactive Porous Polymer/inorganic Composite Scaffolds for Bone Tissue Engineering. *Biomaterials* **2006**, 27, 3413–3431.

- (33) Mouriño, V.; Boccaccini, A. R. Bone Tissue Engineering Therapeutics: Controlled Drug Delivery in Three-Dimensional Scaffolds. *J. R. Soc. Interface* **2010**, *7*, 209–227.
- (34) Xu, C.; Su, P.; Chen, X.; Meng, Y.; Yu, W.; Xiang, A. P.; Wang, Y. Biocompatibility and Osteogenesis of Biomimetic Bioglass-Collagen-Phosphatidylserine Composite Scaffolds for Bone Tissue Engineering. *Biomaterials* **2011**, *32* (4), 1051–1058.
- (35) Lao, J.; Dieudonné, X.; Fayon, F.; Montouillout, V.; Jallot, E. Bioactive Glass–gelatin Hybrids: Building Scaffolds with Enhanced Calcium Incorporation and Controlled Porosity for Bone Regeneration. *J. Mater. Chem. B* **2016**, *4* (14), 2486–2497.
- (36) Mikos, A. G.; Temenoff, J. S. Formation of Highly Porous Biodegradable Scaffolds for Tissue Engineering. *Electron. J. Biotechnol.* **2000**, *3* (2), 1995–2000.
- (37) Oh, S. H.; Kang, S. G.; Kim, E. S.; Cho, S. H.; Lee, J. H. Fabrication and Characterization of Hydrophilic Poly(lactic-Co-Glycolic Acid)/poly(vinyl Alcohol) Blend Cell Scaffolds by Melt-Molding Particulate-Leaching Method. *Biomaterials* **2003**, *24* (22), 4011–4021.
- (38) Wu, X.; Liu, Y.; Li, X.; Wen, P.; Zhang, Y.; Long, Y.; Wang, X.; Guo, Y.; Xing, F.; Gao, J. Preparation of Aligned Porous Gelatin Scaffolds by Unidirectional Freeze-Drying Method. *Acta Biomater.* **2010**, *6* (3), 1167–1177.
- (39) Bose, S.; Vahabzadeh, S.; Bandyopadhyay, A. Bone Tissue Engineering Using 3D Printing. *Mater. Today* **2013**, *16* (12), 496–504.
- (40) Ramiro-Gutiérrez, M. L.; Will, J.; Boccaccini, A. R.; Díaz-Cuenca, A. Reticulated Bioactive Scaffolds with Improved Textural Properties for Bone Tissue Engineering: Nanostructured Surfaces and Porosity. *J. Biomed. Mater. Res. - Part A* **2014**, *102* (9), 2982–2992.
- (41) Detsch, R.; Alles, S.; Hum, J.; Westenberger, P.; Sieker, F.; Heusinger, D.; Kasper, C.; Boccaccini, A. R. Osteogenic Differentiation of Umbilical Cord and Adipose Derived Stem Cells onto Highly Porous 45S5 Bioglass®-Based Scaffolds. *J. Biomed. Mater. Res. - Part A* **2015**, *103* (3), 1029–1037.

- (42) El-Gendy, R.; Kirkham, J.; Newby, P. J.; Mohanram, Y.; Boccaccini, A. R.; Yang, X. B. Investigating the Vascularization of Tissue-Engineered Bone Constructs Using Dental Pulp Cells and 45S5 Bioglass® Scaffolds. *Tissue Eng. Part A* **2015**, *21* (13-14), 2034–2043.
- (43) Gerhardt, L.; Boccaccini, A. R. Bioactive Glass and Glass-Ceramic Scaffolds for Bone Tissue Engineering. *Materials (Basel)*. **2010**, *3* (7), 3867–3910.
- (44) Xynos, I. D.; Hukkanen, M. V. J.; Batten, J. J.; Buttery, L. D.; Hench, L. L.; Polak, J. M. Bioglass® 45S5 Stimulates Osteoblast Turnover and Enhances Bone Formation in Vitro: Implications and Applications for Bone Tissue Engineering. *Calcif. Tissue Int.* **2000**, *67* (4), 321–329.
- (45) Xynos, I. D.; Edgar, A. J.; Buttery, L. D. K.; Hench, L. L.; Polak, J. M. Gene-Expression Profiling of Human Osteoblasts Following Treatment with the Ionic Products of Bioglass® 45S5 Dissolution. *J. Biomed. Mater. Res.* **2001**, *55* (2), 151–157.
- (46) Hench, L. L.; Splinter, R. J.; Allen, W. C.; Greenlee, T. K. Bonding Mechanisms at the Interface of Ceramic Prosthetic Materials. *J. Biomed. Mater. Res. Symp.* **1971**, *5* (6), 117–141.
- (47) Wu, C.; Chang, J. Multifunctional Mesoporous Bioactive Glasses for Effective Delivery of Therapeutic Ions and Drug/growth Factors. *J. Control. release* **2014**, *193*, 1–14.
- (48) Wu, C.; Zhang, Y.; Zhou, Y.; Fan, W.; Xiao, Y. A Comparative Study of Mesoporous Glass/silk and Non-Mesoporous Glass/silk Scaffolds: Physiochemistry and in Vivo Osteogenesis. *Acta Biomater.* **2011**, *7* (5), 2229–2236.
- (49) Jones, J. R. New Trends in Bioactive Scaffolds: The Importance of Nanostructure. *J. Eur. Ceram. Soc.* **2009**, *29* (7), 1275–1281.
- (50) Chen, Q.; Roether, J. A.; Boccaccini, A. R. Tissue Engineering Scaffolds from Bioactive Glass and Composite Materials. *Top. Tissue Eng.* **2008**, *4* (6), 1–27.

- (51) Callcut, S.; Knowles, J. C. Correlation between Structure and Compressive Strength in a Reticulate Glass-Reinforced Hydroxyapatite Foam. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **2002**, *13* (5), 485–489.
- (52) Chen, Q. Z.; Thompson, I. D.; Boccaccini, A. R. 45S5 Bioglass®-Derived Glass-Ceramic Scaffolds for Bone Tissue Engineering. *Biomaterials* **2006**, *27* (11), 2414–2425.
- (53) Mantsos, T.; Chatzistavrou, X.; Roether, J. A.; Hupa, L.; Arstila, H.; Boccaccini, A. R. Non-Crystalline Composite Tissue Engineering Scaffolds Using Boron-Containing Bioactive Glass and poly(D,L-Lactic Acid) Coatings. *Biomed. Mater.* **2009**, *4* (5), 055002.
- (54) Zhu, Y.; Zhang, Y.; Wu, C.; Fang, Y.; Yang, J.; Wang, S. The Effect of Zirconium Incorporation on the Physiochemical and Biological Properties of Mesoporous Bioactive Glasses Scaffolds. *Microporous Mesoporous Mater.* **2011**, *143* (2-3), 311–319.
- (55) Wu, C.; Zhang, Y.; Zhu, Y.; Friis, T.; Xiao, Y. Structure-Property Relationships of Silk-Modified Mesoporous Bioglass Scaffolds. *Biomaterials* **2010**, *31* (13), 3429–3438.
- (56) Hadjizadeh, A.; Doillon, C. J. In Vitro Biocompatibility of 45S5 Bioglass®-Derived Glass-Ceramic Scaffolds Coated with poly(3-Hydroxybutyrate). *J. Tissue Eng. Regen. Med.* **2009**, *3*, 139–148.
- (57) Bretcanu, O.; Boccaccini, A. R.; Salih, V. Poly-DL-Lactic Acid Coated Bioglass® Scaffolds: Toughening Effects and Osteosarcoma Cell Proliferation. *J. Mater. Sci.* **2012**, *47* (15), 5661–5672.
- (58) Řehořek, L.; Chlup, Z.; Meng, D.; Yunos, D. M.; Boccaccini, A. R.; Dlouhý, I. Response of 45S5 Bioglass® Foams to Tensile Loading. *Ceram. Int.* **2013**, *39* (7), 8015–8020.
- (59) Yao, Q.; Nooeaid, P.; Roether, J. A.; Dong, Y.; Zhang, Q.; Boccaccini, A. R. Bioglass®-Based Scaffolds Incorporating Polycaprolactone and Chitosan Coatings for Controlled Vancomycin Delivery. *Ceram. Int.* **2013**, *39* (7), 7517–7522.

- (60) Li, W.; Garmendia, N.; Pérez de Larraya, U.; Ding, Y.; Detsch, R.; Grünewald, A.; Roether, J. A.; Schubert, D. W.; Boccaccini, A. R. 45S5 Bioactive Glass-Based Scaffolds Coated with Cellulose Nanowhiskers for Bone Tissue Engineering. *RSC Adv.* **2014**, *4* (99), 56156–56164.
- (61) Bertolla, L.; Dlouhý, I.; Philippart, A.; Boccaccini, A. R. Mechanical Reinforcement of Bioglass®-Based Scaffolds by Novel Polyvinyl-Alcohol/microfibrillated Cellulose Composite Coating. *Mater. Lett.* **2014**, *118*, 204–207.
- (62) Philippart, A.; Boccaccini, A. R.; Fleck, C.; Schubert, D. W.; Roether, J. A. Toughening and Functionalization of Bioactive Ceramic and Glass Bone Scaffolds by Biopolymer Coatings and Infiltration: A Review of the Last 5 Years. *Expert Rev. Med. Devices* **2015**, *12* (1), 93–111.
- (63) Fereshteh, Z.; Nooeaid, P.; Fathi, M.; Bagri, A.; Boccaccini, A. R. The Effect of Coating Type on Mechanical Properties and Controlled Drug Release of PCL/zein Coated 45S5 Bioactive Glass Scaffolds for Bone Tissue Engineering. *Mater. Sci. Eng. C* **2015**, *54*, 50–60.
- (64) Pereira, M. M.; Jones, J. R.; Orefice, R. L.; Hench, L. L. Preparation of Bioactive Glass-Polyvinyl Alcohol Hybrid Foams by the Sol-Gel Method. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **2005**, *16* (11), 1045–1050.
- (65) Erol, M. M.; Mouriño, V.; Newby, P.; Chatzistavrou, X.; Roether, J. A.; Hupa, L.; Boccaccini, A. R. Copper-Releasing, Boron-Containing Bioactive Glass-Based Scaffolds Coated with Alginate for Bone Tissue Engineering. *Acta Biomater.* **2012**, *8* (2), 792–801.
- (66) Ho, C.; Huang, S.; Wei, C.; Ding, S. In Vitro Degradation and Angiogenesis of Porous Calcium Silicate-Gelatin Composite Scaffold. *J. Mater. Chem. B* **2016**, *4*, 505–512.
- (67) Bellucci, D.; Sola, a.; Gentile, P.; Ciardelli, G.; Cannillo, V. Biomimetic Coating on Bioactive Glass-Derived Scaffolds Mimicking Bone Tissue. *J. Biomed. Mater. Res. - Part A* **2012**, *100 A* (12), 3259–3266.
- (68) Mansur, H. S.; Costa, H. S. Nanostructured Poly(vinyl Alcohol)/bioactive Glass and Poly(vinyl Alcohol)/chitosan/bioactive Glass Hybrid Scaffolds for Biomedical Applications. *Chem. Eng. J.* **2008**, *137* (1), 72–83.

- (69) Jiang, S.; Liu, S.; Feng, W. PVA Hydrogel Properties for Biomedical Application. *J. Mech. Behav. Biomed. Mater.* **2011**, *4* (7), 1228–1233.
- (70) Baker, M. I.; Walsh, S. P.; Schwartz, Z.; Boyan, B. D. A Review of Polyvinyl Alcohol and Its Uses in Cartilage and Orthopedic Applications. *J. Biomed. Mater. Res. - Part B Appl. Biomater.* **2012**, *100 B* (5), 1451–1457.
- (71) Burczak, K.; Gamian, E.; Kochman, A. Long-Term in Vivo Performance and Biocompatibility of Poly (vinyl Alcohol) Hydrogel Macrocapsules for Hybrid- Type Artificial Pancreas. *Biomaterials* **1996**, *17* (24), 2351–2356.
- (72) Kamoun, E. A.; Chen, X.; Mohy Eldin, M. S.; Kenawy, E. S. Crosslinked Poly(vinyl Alcohol) Hydrogels for Wound Dressing Applications: A Review of Remarkably Blended Polymers. *Arab. J. Chem.* **2015**, *8* (1), 1–14.
- (73) Paul, W.; Sharma, C. P. Polyacrylonitrile-Reinforced Poly(vinyl Alcohol) Membranes: Mechanical and Dialysis Performance. *J. Appl. Polym. Sci.* **1995**, *57* (12), 1447–1454.
- (74) Oka, M. Biomechanics and Repair of Articular Cartilage. *J. Orthop. Sci.* **2001**, *6*, 448–456.
- (75) Kobayashi, M.; Toguchida, J.; Oka, M. Preliminary Study of Polyvinyl Alcohol-Hydrogel (PVA-H) Artificial Meniscus. *Biomaterials* **2003**, *24* (4), 639–647.
- (76) Coletta, D. J.; Lozano, D.; Rocha-Oliveira, A. A.; Mortarino, P.; Bumaguin, G. E.; Vitelli, E.; Vena, R.; Missana, L.; Jammal, M. V.; Portal-Núñez, S.; Pereira, M.; Esbrit, P.; Feldman, S. Characterization of Hybrid Bioactive Glass-Polyvinyl Alcohol Scaffolds Containing a PTHrP-Derived Pentapeptide as Implants for Tissue Engineering Applications. *Open Biomed. Eng. J.* **2014**, *8*, 20–27.
- (77) Glowacki, J.; Mizuno, S. Collagen Scaffolds for Tissue Engineering. *Biopolymers* **2008**, *89* (5), 338–344.
- (78) Ferreira, A. M.; Gentile, P.; Chiono, V.; Ciardelli, G. Collagen for Bone Tissue Regeneration. *Acta Biomater.* **2012**, *8* (9), 3191–3200.

- (79) Ramos, M.; Zamora, V.; Rodríguez, G.; Sibaja, M.; Madrigal-Carballo, S.; Lopretti, M. Andamiajes Tridimensionales Tipo Esponjas Basados En Bioconjugados Colágeno-Quitosano Como Potencial Biomaterial Para Aplicaciones En Ingeniería de Tejidos. *Rev. del Lab. Tecnológico del Uruguay* **2012**, No. 7, 43–48.
- (80) Ramshaw, J. A. M. Biomedical Applications of Collagens. *J. Biomed. Mater. Res. - Part B Appl. Biomater.* **2016**, *104* (4), 665–675.
- (81) Shoulders, M. D.; Raines, R. T. Collagen Structure and Stability. *Annu Rev Biochem* **2010**, *78*, 929–958.
- (82) Friess, W. Collagen - Biomaterial for Drug Delivery. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **1998**, *45* (2), 113–136.
- (83) Chapman, J. A.; Tzaphlidou, M.; Meek, K. M.; Kadler, K. E. The Collagen Fibril-A Model System for Studying the Staining and Fixation of a Protein. *Electron Microsc. Rev.* **1990**, *3* (1), 143–182.
- (84) Fratzl, P.; Weinkamer, R. Nature's Hierarchical Materials. *Prog. Mater. Sci.* **2007**, *52* (8), 1263–1334.
- (85) Cui, F. Z.; Li, Y.; Ge, J. Self-Assembly of Mineralized Collagen Composites. *Mater. Sci. Eng. R Reports* **2007**, *57*, 1–27.
- (86) Nudelman, F.; Pieterse, K.; Geroge, A.; Bomans, P. H. H.; Friedrich, H.; Brylka, L. J.; Hilbers, P. A. J.; de With, G.; Sommerdijk, N. A. J. M. The Role of Collagen in Bone Apatite Formation in the Presence of Hydroxyapatite Nucleation Inhibitors. *Nat. Mater.* **2010**, *9* (12), 1004–1009.
- (87) Knight, C. G.; Morton, L. F.; Peachey, A. R.; Tuckwell, D. S.; Farndale, R. W.; Barnes, M. J. The Collagen-Binding A-Domains of Integrins $\alpha 1\beta 1$ and $\alpha 2\beta 1$ Recognize the Same Specific Amino Acid Sequence, GFOGER, in Native (triple-Helical) Collagens. *J. Biol. Chem.* **2000**, *275* (1), 35–40.
- (88) Von Der Mark, K.; Park, J.; Bauer, S.; Schmuki, P. Nanoscale Engineering of Biomimetic Surfaces: Cues from the Extracellular Matrix. *Cell Tissue Res.* **2010**, *339* (1), 131–153.

- (89) Gomez-Guillen, M. C.; Gimenez, B.; Lopez-Caballero, M. E.; Montero, M. P. Functional and Bioactive Properties of Collagen and Gelatin from Alternative Sources: A Review. *Food Hydrocoll.* **2011**, *25* (8), 1813–1827.
- (90) Nam, K.; Sakai, Y.; Funamoto, S.; Kimura, T.; Kishida, A. Engineering a Collagen Matrix That Replicates the Biological Properties of Native Extracellular Matrix. *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* **2011**, *22* (15), 1963–1982.
- (91) Gross, J.; Highberger, J. H.; Schmitt, F. O. Extraction of Collagen From Connective Tissue By Neutral Salt Solutions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1955**, *41* (1), 1–7.
- (92) Gross, J.; Kirk, D. The Heat Precipitation of Collagen from Neutral Salt Solutions: Some Rate-Regulating Factors. *J. Biol. Chem.* **1958**, *233* (2), 355–361.
- (93) Wood, G. C.; Keech, M. K. The Formation of Fibrils from Collagen Solutions. *Biochem. J.* **1960**, *75* (3), 588–598.
- (94) Kadler, K. E.; Holmes, D. F.; Trotter, J. A.; Chapman, J. A. Collagen Fibril Formation. *J. Biochem.* **1996**, *316*, 1–11.
- (95) Zhao, D.; Feng, J.; Huo, Q.; Melosh, N.; Fredrickson, G. H.; Chmelka, B. F.; Stucky, G. D. Triblock Copolymer Syntheses of Mesoporous Silica with Periodic 50 to 300 Angstrom Pores. *Science (80-.)*. **1998**, *279*, 548–552.
- (96) Yan, X.; Yu, C.; Zhou, X.; Tang, J.; Zhao, D. Highly Ordered Mesoporous Bioactive Glasses with Superior In Vitro Bone-Forming Bioactivities. *Angew Chem Int Ed* **2004**, *43*, 5980–5984.
- (97) Borrego González, S. Nanostructured Biomaterials for Application in Bone Healing, 2016.
- (98) Gorham, S. D.; Light, N. D.; Diamond, A. M.; Willins, M. J.; Bailey, A. J.; Wess, T. J.; Leslie, N. J. Effect of Chemical Modifications on the Susceptibility of Collagen to Proteolysis. II. Dehydrothermal Crosslinking. *Int. J. Biol. Macromol.* **1992**, *14* (3), 129–138.

- (99) Kokubo, T.; Takadama, H. How Useful Is SBF in Predicting in Vivo Bone Bioactivity? *Biomaterials* **2006**, *27* (15), 2907–2915.
- (100) Doyle, B. B. Infrared Spectroscopy of Collagen and Collagen-Like Polypeptides. *Biopolymers* **1975**, *14*, 937–957.
- (101) Silva Júnior, Z. S.; Botta, S. B.; Ana, P. A.; França, C. M.; Santos Fernandes, K. P.; Mesquita-Ferrari, R. A.; Deana, A.; Bussadori, S. K. Effect of Papain-Based Gel on Type I Collagen--Spectroscopy Applied for Microstructural Analysis. *Sci. Rep.* **2015**, *5* (July), 11448.
- (102) George, A.; Veis, A. FTIRS in H₂O Demonstrates That Collagen Monomers Undergo a Conformational Transition prior to Thermal Self-Assembly in Vitro. *Biochemistry* **1991**, *30* (9), 2372–2377.
- (103) Muyonga, J. H.; Cole, C. G. B.; Duodu, K. G. Fourier Transform Infrared (FTIR) Spectroscopic Study of Acid Soluble Collagen and Gelatin from Skins and Bones of Young and Adult Nile Perch (*Lates Niloticus*). *Food Chem.* **2004**, *86*, 325–332.
- (104) Ramshaw, J. A. M.; Werkmeister, J. A.; Glattauer, V. Collagen-Based Biomaterials. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews*. 1995, pp 335–382.
- (105) Delgado, L. M.; Bayon, Y.; Pandit, A.; Zeugolis, D. I. To Cross-Link or Not to Cross-Link? Cross-Linking Associated Foreign Body Response of Collagen-Based Devices. *Tissue Eng. Part B* **2015**, *21* (3), 298–313.
- (106) Warren, B. E.; Bischof, J. The Structure of Silica Glass by X-Ray Diffraction Studies. *J. Am. Ceram. Soc.* **1938**, *21* (2), 49–54.
- (107) Serra, J.; González, P.; Liste, S.; Serra, C.; Chiussi, S.; León, B.; Pérez-Amor, M.; Ylänen, H. O.; Hupa, M. FTIR and XPS Studies of Bioactive Silica Based Glasses. *J. Non. Cryst. Solids* **2003**, *332* (1-3), 20–27.
- (108) Aguiar, H.; Serra, J.; González, P.; León, B. Structural Study of Sol-Gel Silicate Glasses by IR and Raman Spectroscopies. *J. Non. Cryst. Solids* **2009**, *355* (8), 475–480.

- (109) Belbachir, K.; Noreen, R.; Gouspillou, G.; Petibois, C. Collagen Types Analysis and Differentiation by FTIR Spectroscopy. *Anal. Bioanal. Chem.* **2009**, 395 (3), 829–837.
- (110) Radev, L.; Mostafa, N. Y.; Michailova, I.; Salvado, I. M. M.; Fernandes, M. H. V. In Vitro Bioactivity of Collagen/Calcium Phosphate Silicate Composites, Cross-Linked with Chondroitin Sulfate. *Int. J. Mater. Chem.* **2012**, 2 (1), 1–9.
- (111) Freudenberg, U.; Behrens, S. H.; Welzel, P. B.; Müller, M.; Grimmer, M.; Salchert, K.; Taeger, T.; Schmidt, K.; Pompe, W.; Werner, C. Electrostatic Interactions Modulate the Conformation of Collagen I. *Biophys. J.* **2007**, 92 (6), 2108–2119.
- (112) Sepulveda, P.; Jones, J. R.; Hench, L. L. Characterization of Melt-Derived 45S5 and Sol-Gel-Derived 58S Bioactive Glasses. *J. Biomed. Mater. Res.* **2001**, 58, 734–740.
- (113) Ramiro-Gutiérrez, M. L.; Santos-Ruiz, L.; Borrego-González, S.; Becerra, J.; Díaz-Cuenca, A. In Vitro Stimulation of MC3T3-E1 cells and Sustained Drug Delivery by a Hierarchical Nanostructured SiO₂-CaO-P₂O₅ Scaffold. *Microporous Mesoporous Mater.* **2016**, 229, 31–43.
- (114) Li, W.; Pastrama, M. I.; Ding, Y.; Zheng, K.; Hellmich, C.; Boccaccini, A. R. Ultrasonic Elasticity Determination of 45S5 Bioglass®-Based Scaffolds: Influence of Polymer Coating and Crosslinking Treatment. *J. Mech. Behav. Biomed. Mater.* **2014**, 40, 85–94.
- (115) Gunatillake, P. A.; Adhikari, R.; Gadegaard, N. Biodegradable Synthetic Polymers for Tissue Engineering. *Eur. Cells Mater.* **2003**, 5, 1–16.
- (116) Chen, C.; Li, H.; Pan, J.; Yan, Z.; Yao, Z.; Fan, W.; Guo, C. Biodegradable Composite Scaffolds of Bioactive Glass/chitosan/carboxymethyl Cellulose for Hemostatic and Bone Regeneration. *Biotechnol. Lett.* **2014**, 37 (2), 457–465.
- (117) Zhu, H.; Liu, N.; Feng, X.; Chen, J. Fabrication and Characterization of Silk Fibroin/bioactive Glass Composite Films. *Mater. Sci. Eng. C* **2012**, 32 (4), 822–829.

- (118) Goudouri, O. M.; Theodosoglou, E.; Kontonasaki, E.; Will, J.; Chrissafis, K.; Koidis, P.; Paraskevopoulos, K. M.; Boccaccini, A. R. Development of Highly Porous Scaffolds Based on Bioactive Silicates for Dental Tissue Engineering. *Mater. Res. Bull.* **2014**, *49* (1), 399–404.
- (119) Sarker, B.; Hum, J.; Nazhat, S. N.; Boccaccini, A. R. Combining Collagen and Bioactive Glasses for Bone Tissue Engineering: A Review. *Adv. Healthc. Mater.* **2015**, *4* (2), 176–194.
- (120) Chen, Q. Z.; Ahmed, I.; Knowles, J. C.; Nazhat, S. N.; Boccaccini, A. R.; Rezwan, K. Collagen Release Kinetics of Surface Functionalized 45S5 Bioglass®-Based Porous Scaffolds. *J. Biomed. Mater. Res. - Part A* **2008**, *86* (4), 987–995.
- (121) Li, W.; Wang, H.; Ding, Y.; Scheithauer, E. C.; Goudouri, O.; Grü, A.; Detsch, R.; Agarwal, S.; Boccaccini, A. R. Antibacterial 45S5 Bioglass®-Based Scaffolds Reinforced with Genipin Cross-Linked Gelatin for Bone Tissue Engineering. *J. Mater. Chem. B* **2015**, *3* (3), 3367–3378.
- (122) Koutsopoulos, S. Synthesis and Characterization of Hydroxyapatite Crystals: A Review Study on the Analytical Methods. *J. Biomed. Mater. Res.* **2002**, *62* (4), 600–612.
- (123) Salinas, A. J.; Vallet-Regí, M. Bioactive Ceramics: From Bone Grafts to Tissue Engineering. *RSC Adv.* **2013**, *3*, 11116–11131.
- (124) Charoensuk, T.; Sirisathitkul, C.; Boonyang, U.; Macha, I. J.; Santos, J.; Grossin, D.; Ben-Nissan, B. In Vitro Bioactivity and Stem Cells Attachment of Three-Dimensionally Ordered Macroporous Bioactive Glass Incorporating Iron Oxides. *J. Non. Cryst. Solids* **2016**, *452*, 62–73.
- (125) Wang, Y.; Azaïs, T.; Robin, M.; Vallée, A.; Catania, C.; Legriél, P.; Pehau-arnaudet, G.; Babonneau, F.; Nassif, N. The Predominant Role of Collagen in the Nucleation, Growth, Structure and Orientation of Bone Apatite. *Nat. Mater.* **2012**, *11* (8), 724–733.
- (126) Ye, B.; Luo, X.; Li, Z.; Zhuang, C.; Li, L.; Lu, L.; Ding, S.; Tian, J.; Zhou, C. Rapid Biomimetic Mineralization of Collagen Fibrils and Combining with Human Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cells for Bone Defects Healing. *Mater. Sci. Eng. C* **2016**, *68*, 43–51.

- (127) Hench, L. L.; Polak, J. M. Third-Generation Biomedical Materials. *Science* (80-.). **2002**, 295 (5557), 1014–1017.
- (128) López-Noriega, A.; Arcos, D.; Izquierdo-Barba, I.; Sakamoto, Y.; Terasaki, O.; Vallet-Regí, M. Ordered Mesoporous Bioactive Glasses for Bone Tissue Regeneration. *Chem. Mater.* **2006**, 18 (13), 3137–3144.

Materiales MBG con funcionalidad para la administración local de iones terapéuticos

1. Biomateriales como matrices para la administración local de iones terapéuticos

El equipo de investigación del Prof. D.Y. Zhao¹ sintetizaron en el 2004 los primeros MBG, combinando la química sol-gel del sistema multicomponente SiO₂-CaO-P₂O₅ con las bases de la química supramolecular de surfactantes. Esto dio lugar a una nueva generación de MBG altamente ordenados que exhiben comportamiento y bioactividad mejoradas, aumento de la cinética de mineralización y capacidad para albergar agentes activos que contribuyen a los procesos de reparación del tejido.

Así, esta reciente inclusión de mesoporosidad ordenada en los BG ha supuesto un avance significativo en estos materiales. Por un lado, los altos valores de área específica suponen una mayor reactividad que favorece el proceso bioactivo. Por otra parte, los MBG tienen un tamaño de partícula micrométrico que presentan en

su interior poros de tamaño nanométricos que pueden ser funcionalizados². La porosidad uniforme y elevado volumen de poro confieren a estos materiales la capacidad de actuar como sistemas administradores de fármacos, biomoléculas y/o agentes osteogénicos, al permitir la incorporación de altas dosis de antibióticos, antiinflamatorios, factores de crecimiento, etc²⁻⁷. Además, dado que la bioactividad es una cascada de eventos de superficie, el control de ésta a escala nanométrica, hace que sea posible imitar el proceso fisiológico de biomineralización que estimula la función de los osteoblastos para la regeneración⁸.

En este sentido, los MBG han recibido mucho interés en la ingeniería tisular por su rápida cinética bioactiva, que garantiza una unión estable y pronta con el tejido óseo, así como por sus propiedades texturales. Todas estas características hacen de estos materiales unos excelentes candidatos para ser utilizados como biomateriales precursores para procesar estructuras matriz biomiméticas para terapias de regeneración ósea⁹.

2. Incorporación de iones terapéuticos en la composición de los MBG

Recientemente, se ha avanzado en mejorar el impacto biológico de los MBG incorporando iones metálicos específicos en la red tridimensional del Si para su posterior administración controlada de especies inorgánicas con efecto biológico específico dependiendo del campo de aplicación biomédica.

Los elementos a incorporar en una matriz MBG se eligen generalmente entre los oligoelementos del cuerpo humano que tienen una función y actividad biológica significativa, como el Zr, Cu y el Zn. Estos minerales traza estimulan la formación ósea debido a que se ha visto que aumentan la proliferación de los osteoblastos e inhiben su apoptosis¹⁰⁻¹². Además, algunos de estos iones metálicos tienen efectos

terapéuticos adicionales, por ejemplo, el Cu, Zn y Ag tienen actividad antibiótica y anti-inflamatoria^{13,14}. Por otro lado, las especies inorgánicas presentan ventajas comparadas con las moléculas orgánicas, como los factores de crecimiento, ya que estos iones metálicos tienen la habilidad de interactuar con otros iones para favorecer las funciones biológicas, y al no suponer un riesgo de descomposición, ofrecen la posibilidad de ser procesados en las condiciones de fabricación típicas requeridas para la producción de estructuras macroporosas tridimensionales¹⁵.

Dado que se sabe que los oligoelementos son tóxicos a altas concentraciones, se requiere una administración local controlada de estos iones de un sistema portador adecuado. En este contexto, se sabe que la exposición del MBG (particulado o procesado) en un entorno fisiológico conlleva a una degradación progresiva del material que administra de manera controlada los iones de su composición¹⁶. En algunos estudios recientes se han preparado materiales MBG multifuncionales, en el sistema de composición $\text{SiO}_2\text{-CaO-P}_2\text{O}_5$, incorporando diferentes iones terapéuticos, siendo los objetivos principales aumentar el potencial osteogénico, angiogénico y la promoción de las propiedades antibacterianas de los MBG. En la Tabla 3.1 se presenta un resumen de los MBG con diferentes oligoelementos incorporados en su composición y correspondientes propiedades terapéuticas.

Tabla 3.1. Resumen de MBG en el sistema de composición SiO₂-CaO-P₂O₅ con iones metálicos adicionales.

Ion terapéutico	Composición	Sal inorgánica	Tipo de ensayo	Función biológica				Ref.
				M	O	B	A	
Fe	80Si:10Ca:5P:5Fe	FeCl ₃	<i>in vitro</i>	+	+			17
	80Si:5Ca:5P:10Fe							
	80Si:10Ca:5P:5Fe	Fe(NO ₃) ₃	<i>in vitro</i>	+				18
	80Si:5Ca:5P:10Fe *							
Mg	80Si:10Ca:5P:5Mg	MgCl ₂	<i>in vitro</i>	+	+			19
	80Si:14.25Ca:5P:0.75Mg	Mg(NO ₃) ₂	<i>in vitro</i>	+	+			20
	80Si:13.5Ca:5P:1.5Mg							
	80Si:12.75Ca:5P:2.25Mg							
	80Si:10Ca:5P:5Mg	Mg(NO ₃) ₂	<i>in vitro</i>	+				21
	80Si:5Ca:5P:10Mg							
80Si:0Ca:5P:15Mg								
Ce	79.8Si:15Ca:5P:0.2Ce *	Ce(NO ₃) ₃	<i>in vitro</i>	+				22
	79Si:15Ca:5P:1Ce *							
	78Si:15Ca:5P:2Ce *							
	76.5Si:15Ca:5P:3.5Ce *							
	79.8Si:15Ca:5P:0.2Ce *	Ce(NO ₃) ₃	<i>in vitro</i>	+				23
79Si:15Ca:5P:1Ce								
Zr	80Si:10Ca:5P:5Zr	ZrCl ₄	<i>in vitro</i>	+	+			19 24
Zn	80Si:14.925Ca:5P:0.075Zn	Zn(NO ₃) ₂	<i>in vitro</i>	+	+			20
	80Si:14.85Ca:5P:0.15Zn							
	80Si:14.775Ca:5P:0.225Zn							
	80Si:10Ca:5P:5Zn	Zn(NO ₃) ₂	<i>in vitro</i>	+				21
	79.6Si:15Ca:5P:0.4Zn *	Zn(NO ₃) ₂	<i>in vitro</i>	+				23
	78Si:15Ca:5P:2Zn *							
	79.6Si:15Ca:5P:0.4Zn *	Zn(NO ₃) ₂	<i>in vitro</i>	+				22
	78Si:15Ca:5P:2Zn *							
	76Si:15Ca:5P:4Zn *							
	73Si:15Ca:5P:7Zn *							
76Si:15Ca:5P:4Zn *	Zn(NO ₃) ₂	<i>in vitro</i>	+	+		+	25	
73Si:15Ca:5P:7Zn *								
70Si:23Ca:4P:3Zn	Zn(NO ₃) ₂	<i>in vitro</i>	+			+	26	
Sr	80Si:14.25Ca:5P:0.75Sr	Sr(NO ₃) ₂	<i>in vitro</i>	+	+			20
	80Si:13.5Ca:5P:1.5Sr							
	80Si:12.75Ca:5P:2.25Sr							
	80Si:10Ca:5P:5Sr	SrCl ₂	<i>in vitro</i>	+	+			19
	77.5Si:15Ca:5P:2.5Sr *	SrCl ₂	<i>in vitro</i>	+	+			27
	75Si:15Ca:5P:5Sr *							
	77.5Si:15Ca:5P:2.5Sr *	SrCl ₂	<i>in vitro</i> <i>in vivo</i>	+	+			28

Continuación Tabla 3.1. Resumen de MBG en el sistema de composición SiO₂-CaO-P₂O₅ con iones metálicos adicionales.

Ion terapéutico	Composición	Sal inorgánica	Tipo de ensayo	Función biológica				Ref.
				M	O	B	A	
Co	80Si:12.5Ca:5P:2.5Co *	CoCl ₂	<i>in vitro</i>	+	+	+		29
	80Si:12.5Ca:5P:2.5Co *	CoCl ₂	<i>in vitro</i>	+	+	+		
Ga	79.8Si:15Ca:5P:0.2Ga	Ga(NO ₃) ₃	<i>in vitro</i>	+				22
	79Si:15Ca:5P:1Ga							
	78Si:15Ca:5P:2Ga							
	76.5Si:15Ca:5P:3.5Ga							
	79.8Si:15Ca:5P:0.2Ga *	Ga(NO ₃) ₃	<i>in vitro</i>	+				23
B	75Si:15Ca:5P:5B	[CH ₃ (CH ₂) ₃ O] ₃ B	<i>in vitro</i>	+	+			22
	70Si:15Ca:5P:10B							
Eu	79Si:15Ca:5P:1Eu	Eu(NO ₃) ₃	<i>in vitro</i> <i>in vivo</i>	+	+			31
	78Si:15Ca:5P:2Eu							
	75Si:15Ca:5P:5Eu							
Ag	No indicada *	AgNO ₃	<i>in vitro</i>	+			+	32
								33
Cu	80Si:10Ca:5P:5Cu	CuCl ₂	<i>in vitro</i>	+	+	+	+	34

* No se puede confirmar la naturaleza vítrea de estos MBG. En algunos casos, se observa cristalinidad en el difractograma publicado y en otros casos no se presentan los datos de difracción.

M: Mineralización

O: Osteogénesis

B: Bactericida

A: Angiogénico

Los MBG incluyendo oligoelementos en su composición ofrecen una plataforma bioactiva multifuncional para terapias de regeneración del tejido óseo. Esta bioactividad mejorada se ha relacionado con distintos mecanismos. En primer lugar, se ha encontrado que la estructura mesoporosa y las altas áreas específicas de los MBG promueven la mineralización de HA favoreciendo la osteointegración de los materiales^{3,35,36}. Además, la HA superficial formada en los biomateriales induce la actividad osteoblástica, incluida la proliferación y diferenciación^{37,38}. Por otro lado, el Si es el elemento principal en MBG y los estudios indican que este ion tiene efecto estimulante sobre la diferenciación osteogénica de células osteoprogenitoras y además, favorece el proceso angiogénico que es el responsable de la vascularización³⁹⁻⁴⁴. Por lo tanto, es válido lanzar la hipótesis de que determinados iones administrados localmente, durante la degradación del material MBG, puedan tener un efecto terapéutico concreto, además de producir un efecto sinérgico en combinación con el Si, el Ca y el P, iones mayoritarios de su composición.

Por otro lado, la bibliografía sugiere que los iones metálicos incorporados en los MBG actúan como modificadores de la red tridimensional que forma el Si, interrumpiendo la distribución ordenada de SiO_4^{4-} de la reacción de auto ensamblaje, lo que puede dar lugar a posibles defectos estructurales en el conjunto atómico reduciendo la conectividad de la red de sílice⁴⁵⁻⁴⁷ (Ver Figura 3.1) y alterando significativamente sus propiedades texturales y naturaleza vítrea^{1,4,6,48,49}.

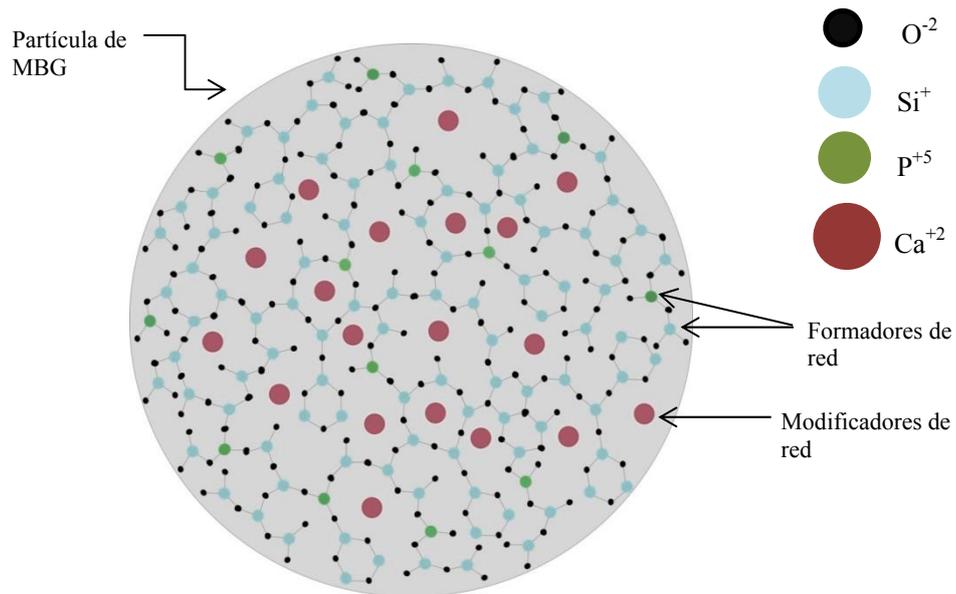


Figura 3.1. Esquema 2D de la estructura de red de los MBG.

Además, en la literatura se estima que estos posibles defectos en la matriz vítrea pueden estar relacionados con una mayor redisolución de los vidrios y administración local de los iones incorporados y, como consecuencia, un aumento en la bioactividad⁵⁰⁻⁵².

3. Interés del Cu como ion terapéutico

El Cu es un ion muy interesante para su aplicación en el campo de los biomateriales ya que es uno de los oligoelementos esenciales involucrados en la

salud general del organismo. Estudios en animales y humanos han demostrado que el Cu está implicado en la función de varias enzimas y han demostrado que es necesario para el crecimiento infantil, mecanismos de defensa, resistencia ósea, maduración de las células rojas y blancas, transporte de hierro, metabolismo del colesterol y glucosa, contractilidad miocárdica y el desarrollo del cerebro^{53,54}. La naturaleza esencial del Cu para los seres humanos se demostró por primera vez durante la década de los 60 en los niños malnutridos de Perú⁵⁵. Las manifestaciones clínicas más constantes de la deficiencia de Cu adquirida son anemia, neutropenia y anomalías óseas.

El papel del Cu en la formación e integridad ósea y mineralización esquelética es fundamental. El Cu desempeña una función catalítica clave como cofactor para la lisil oxidasa, una amina oxidasa extracelular dependiente de Cu que es importante en la primera etapa de la maduración (reticulación) del colágeno para formar fibrillas estables^{56,57}. Estudios en animales experimentales han demostrado que la deficiencia de Cu puede reducir en gran medida la actividad de lisil oxidasa en el hueso⁵⁸ y perjudicar la reticulación del colágeno en la matriz ósea orgánica conduciendo a una menor resistencia a la tracción⁵⁹⁻⁶¹.

Además estudios utilizando tanto el Cu en forma de sal soluble como de material nanoparticulado han mostrado evidencias de las propiedades antimicrobianas⁶², osteogénicas⁶³ y angiogénicas^{64,65}.

Recientemente se ha explorado la actividad del Cu en las terapias de regeneración tisular al incorporarlo a los biomateriales por diferentes rutas. En 1998, Kim y col.⁶⁶ sintetizaron un HA al que le incorporaron Cu (HA-Cu), no encontrando actividad antibacteriana evidente⁶⁶. Sin embargo, en el 2009, Yang y col.⁶⁷

sintetizaron un HA que contenía una mezcla de Cu y Ag, encontrando que estos iones exhibían actividad antibacteriana⁶⁷. Del mismo modo, otros investigadores publicaron la síntesis de TCP con Cu, observando actividad bacteriana mejorada en comparación con el TCP libre de Cu⁶⁸. El mismo año, Zhao y col.⁶⁹, ensayaron la actividad antibacteriana de nanocomposites de polieturano recubiertas por una HA modificada con Cu (HA-Cu) en *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*, encontrando un incremento en el efecto bactericida que atribuyeron a la presencia de Cu⁶⁹. Más recientemente, Shanmugam y Gopal, sintetizaron HA-Cu, por el método de co-precipitación, en el que Cu sustituyó una parte de Ca en el compuesto. Los resultados mostraron que el material reducía las colonias de *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* en más del 80 %, y al aumentaba la actividad antibacteriana contra cepas Gram-positivas y Gram-negativas⁷⁰.

Por otro lado, se sintetizaron y estudiaron fibras de vidrio a base de fosfato con iones de Cu para aplicaciones en cicatrización de heridas, concluyendo que el Cu tiene una fuerte y excelente propiedad antibacteriana. De igual forma, Hsieh y col.⁷¹ sintetizaron una película fina de Ta a la que le incorporaron de nanopartículas de Cu, encontrando que aparte de favorecer sus propiedades mecánicas mostraba buena biocompatibilidad y propiedades antibacterianas, lo que sugirió una excelente opción para revestir implantes metálicos para aplicaciones médicas⁷². Los mismos resultados fueron observados al hacer recubrimientos en aleaciones de Ti con Cu y HA-Cu. Además de encontrar que la actividad antibacteriana *in vitro* era eficazmente alta frente a la colonización bacteriana de la *Escherichia coli*, los ensayos *in vitro* e *in vivo* indicaron que los materiales recubiertos por Cu estimulaban la diferenciación osteogénica y la expresión de genes involucrados en el proceso angiogénico⁷³⁻⁷⁹.

Por otro lado, Giavaresi y col.⁸⁰ mezclaron partículas óseas alogénicas con ácido hialurónico enriquecido con Cu y las implantaron en ratas. Un mes después, el grupo expuesto al biomaterial con Cu, presentaba una densidad vascular más alta alrededor del implante, comparada con el grupo no expuesto a Cu. Ellos concluyeron que el Cu era un ion que tenía efectos angiogénicos al estimular la vascularización tisular y que sería adecuado como recurso en trasplantes de aloinjertos⁸⁰. También se incorporó Cu en matrices de polipropileno, para formar una película porosa delgada, que mostró una buena y rápida propiedad antibacteriana frente a *Staphylococcus aureus*, organismo que es resistente a la meticilina^{81,82}. Mientras que Gosau y col. añadieron Cu a un material de silicona para implantes mamarios y encontraron que tenían anti-adherencia y efecto antibacteriano contra *Staphylococcus epidermidis*^{83,84}.

En el 2011, se incorporó Cu al acero inoxidable de grado médico 317L recientemente desarrollado para aplicación ortopédica, obteniendo un nuevo material, el 317L-Cu, con fuerte actividad antimicrobiana y biocompatibilidad *in vitro* e *in vivo* que sugería ser un biomaterial apto para reducir las infecciones relacionadas con implantes⁸⁵. También encontraron que el 317L-Cu favorecía la diferenciación osteogénica mediante el aumento de la proliferación y adherencia de los osteoblastos, mejorando la actividad de la fosfatasa alcalina (ALP, por Alkaline phosphatase) y potenciando la expresión de genes relacionadas con el proceso osteogénico. Además, en los ensayos *in vivo*, observaron que el 317L-Cu aumentaba la formación de tejido óseo alrededor del implante y un incremento en el volumen y densidad mineral ósea, con respecto al 317L⁸⁶.

Dadas las excelentes propiedades antibacterianas y osteogénicas observadas en los biomateriales que contenían Cu, se ha continuado investigando. Así, el grupo de

investigación de Ren y col.⁸⁷, han ensayado la incorporación de Cu en implantes metálicos. Diseñaron y desarrollaron un acero inoxidable, 316L un material comúnmente utilizado para la fabricación de stents coronarios, que contenía Cu (316L-Cu). Encontraron que el 316L-Cu favorecía la adhesión de células endoteliales de vena umbilical humana (HUVEC, por Human umbilical vein endothelial cells) en la superficie del biomaterial, y que la migración y el crecimiento celular de co-cultivos, después de 24 y 72 h, eran más evidentes en comparación con el 316L. Estos autores concluyeron que el Cu contenido en estos aceros inoxidables mejora su bioadaptación con el tejido vascular y que estimulan el proceso angiogénico⁸⁷. En la misma línea, añadieron Cu en acero inoxidable 304 con aplicación en ortodoncia. En comparación con el acero inoxidable 304 convencional, el 304-Cu fue capaz de matar eficazmente la *Porphyromonas gingivalis*, que se reconoce generalmente como las bacterias principales que causan periimplantitis⁸⁸.

Barralet y col.⁸⁹ sintetizaron y estudiaron una estructura matriz biocerámica TCP. La estructura macroporosa se funcionalizó con sulfato de Cu (CuSO_4)⁸⁹. Los resultados de los ensayos *in vivo*, sugieren que el CuSO_4 a bajas concentraciones conduce a la formación de microvasos orientados a lo largo del eje de los macroporos (angiogénesis), favoreciendo así, la cicatrización de heridas. Por otro lado, Kong y col.⁴⁴ desarrollaron una biocerámica de silicato cálcico (CS, por Calcium silicate) que contenía Cu (CS-Cu), para su aplicación en ingeniería de tejidos. Encontraron que los iones de Cu en los extractos aumentaron los túbulos formados por HUVEC y mejoraron la expresión de factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF, por Vascular endothelial growth factor). Resultados similares fueron reportados por Tian y col. para una cerámica análoga⁹⁰.

En el contexto de los BG existen algunas investigaciones donde se ha ensayado incorporar iones Cu con el fin de potencializar su actividad en términos de regeneración de tejidos. El primer acercamiento está reportado por Erol y col.⁹¹, que fabricaron y caracterizaron una estructura matriz basada en vidrios de borosilicato, funcionalizada con Cu, con la finalidad de promover el potencial angiogénico⁹¹. Wang y col.^{92,93} fabricaron el mismo tipo de estructura e hicieron ensayos *in vivo*. Encontraron que el Cu estimulaba el aumento de la actividad de la ALP en células madre humanas mesenquimales (HBMSC, por Human bone marrow derived stem cells), que, a su vez, favorece la formación de vasos sanguíneos. De esta forma, corroboraron el efecto angiogénico de los iones Cu administrados localmente durante la degradación de la estructura. En esta misma línea, Zhao y col.⁹⁴ fabricaron microfibras de vidrio de borato con Cu, que mostraron una capacidad prometedora para estimular la angiogénesis y curar defectos de la piel, tanto *in vitro* como *in vivo*. El mismo año, D'Mello y col.⁹⁵ investigaron *in vivo* el efecto de una estructura de quitosano funcionalizada con Cu en regeneración ósea, y encontraron un aumento significativo en el volumen óseo de los defectos tratados con dichas estructuras de quitosano-Cu.

Por su parte, Theodorou y col.⁹⁶, sintetizaron y caracterizaron una estructura matriz biomimética vitrocerámica, basada en un BG de silicato que, además, contenía Mg y Cu. Encontraron que este biomaterial favorece la adherencia y proliferación a largo plazo de células madre de pulpa dental (DPSC, por Dental pulp stem cells) y bioactividad *in vitro*. Mientras tanto, Bejarano y col.⁹⁷ fabricaron otra estructura de PLA mezclado con partículas de BG ($60\text{SiO}_2\text{-}25\text{CaO-}11\text{Na}_2\text{O-}4\text{P}_2\text{O}_5$), al cual le incorporaron Cu, encontrando que estas estructuras presentaban actividad antibacteriana y favorecían la expresión de marcadores angiogénicos.

Con respecto a la incorporación de Cu en los MBG, la única aproximación publicada es un trabajo de Wu y col. (Ver Tabla 3.1)³⁴. Ellos fabricaron una estructura matriz de MBG con Cu en su composición, y encontraron que la administración local de iones Cu aumenta las expresiones génicas relacionadas con el osteogénesis, la actividad de ALP, la secreción del factor inducible por hipoxia (HIF, por Hypoxia-inducible factors) y VEGF en células HBMSC.

4. El proceso de angiogénesis

El término angiogénesis se refiere al proceso que conduce a la formación de nuevos vasos sanguíneos a partir de la vasculatura pre-existente^{98,99}. El proceso de pasos múltiples de la angiogénesis incluye la migración y proliferación de células endoteliales, la formación y organización de grupos celulares en estructuras tubulares que eventualmente se unirán, para finalmente madurar en vasos sanguíneos estables.

La angiogénesis es de vital importancia en eventos fisiológicos como el desarrollo embrionario, la regeneración endometrial y el crecimiento de la vasculatura y también en procesos patológicos como la metástasis o la diseminación del cáncer, ya que supone la construcción de nuevas vías para proveer de manera adecuada el oxígeno y los nutrientes^{98,100}. Por tanto, la angiogénesis tiene un papel fundamental en el desarrollo y mantenimiento del esqueleto y en la reparación de fracturas, así como para cualquier proceso de regeneración tisular¹⁰¹. Con el avance de las técnicas en biología molecular y celular se han podido caracterizar las moléculas y situaciones que afectan a este proceso (llamadas factores angiogénicos), lo cual constituye un acercamiento a entender su papel en el tejido óseo¹⁰². Probablemente, el más importante de ellos, porque desencadena la respuesta angiogénica, es la

hipoxia, definida como la deficiencia de oxígeno necesario para el normal funcionamiento del metabolismo celular aeróbico^{103,104}.

Durante la hipoxia se activa una cascada señalizadora que promueve la inducción o represión de la transcripción de una multitud de genes implicados en eventos tales como la angiogénesis, metabolismo de la glucosa y supervivencia/muerte celular, etc. La clave de esta respuesta a la hipoxia se encuentra en un factor de transcripción, el HIF que es un factor de transcripción α/β -heterodimérico que regula la adaptación celular a la falta de oxígeno^{105,106}. El HIF funciona como un heterodímero que comprende una subunidad β expresada constitutivamente y una subunidad α lábil, cuya expresión esta enormemente regulada. La síntesis del HIF-1 α está regulada por mecanismos independientes del oxígeno, mientras que la regulación de su degradación es dependiente de la concentración de oxígeno. Bajo condiciones de normoxia el HIF-1 α es hidroxilado mediante la acción de enzimas con dominios prolina-4-hidroxilasas denominado dominio polihidroxilasas (PHD, por Polyhydroxylase domain) y se une a la proteína supresora de tumores von Hippel-Lindau (pVHL, por von Hippel-Lindau tumor supresor protein). La proteína VHL es necesaria para unir la ubiquitina y así, el complejo ubiquitina-HIF-1 α es reconocido por el proteosoma y degradado (Ver Figura 3.2)^{107,108}.

Mientras que en condiciones de hipoxia, que se desencadena cuando la presión parcial de oxígeno está por debajo del 6 %, la degradación de HIF-1 α queda bloqueada por déficit de oxígeno, el HIF-1 α se acumula y se trasloca dentro del núcleo de la célula donde se dimeriza con el HIF-1 β e interactúa con otros cofactores para el ensamblaje del complejo de transcripción del HIF-1. Este factor de transcripción es crucial para regular la expresión del VEGF¹⁰⁹. Además del VEGF, existen distintas moléculas implicadas en la regulación positiva de la

angiogénesis, incluyendo diversos factores de crecimiento, citoquinas y hormonas¹⁰⁴. Pero actualmente se reconoce al sistema que incluye al VEGF y sus receptores como el principal regulador de las células endoteliales vasculares y de la formación de vasos sanguíneos.

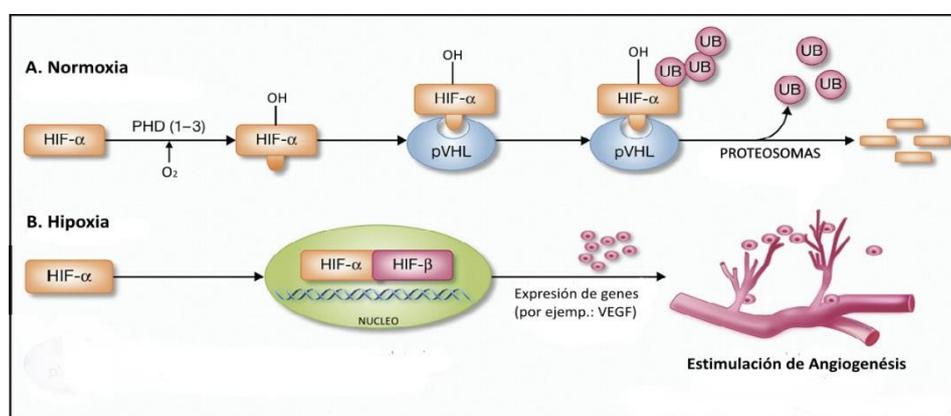


Figura 3.2. Esquema del mecanismos de regulación del HIF-1 α bajo condiciones de normoxia e hipoxia (Figura modificada de Rahimi, 2012¹¹⁰).

La angiogénesis también está regulada por metales exógenos, derivados del ambiente, incluyendo al Cd, Ni, V y As y metales endógenos como el Cu, Fe, Zn, que regulan la actividad de proteínas esenciales¹¹¹. En los años 80, se reconoce al Cu como un factor modulador de la angiogénesis y se concluye que es imprescindible para la formación de nuevos vasos sanguíneos¹¹². McAuslen y Reilly^{113,114} fueron los primeros en desarrollar la hipótesis de que la actividad angiogénica del Cu se debe a su capacidad para inducir la migración de células endoteliales. Ellos observaron que el Cu inducía la migración de las células endoteliales de aorta bovina (BAEC, por Bovine aortic endothelial cells), mientras que otros iones de metales de transición como el Zn, a las mismas

concentraciones, no tenían ningún efecto de motilidad celular¹¹³. A partir de estos primeros resultados, se empezaron a desarrollar más ensayos para determinar cuál era el rol del Cu en el proceso de angiogénesis.

4.1. Propiedades angiogénicas del Cu

El Cu es un metal de transición esencial en el cuerpo humano cuya química de coordinación y propiedades redox lo convierte en un elemento fundamental para numerosas funciones de transporte y reacciones catalíticas en las células vivas y sus organelos, particularmente en la mitocondria, así como en órganos con alta actividad metabólica como el hígado, el riñón, el cerebro y el corazón¹¹⁵. El Cu se incorpora a partir de la dieta y la absorción tiene lugar en las células epiteliales del intestino delgado a través de difusión facilitada¹¹⁶⁻¹¹⁸. El Cu extracelular es reducido a Cu^{+1} por enzimas reductasas que se encuentran en la membrana plasmática para luego ser captados por la proteína CTR1 hacia el citoplasma¹¹⁹. En condiciones de homeostasis celular los niveles estimados de Cu libre en el citoplasma se encuentra en concentraciones por debajo de $1 \times 10^{-18} \text{ M}^{120}$.

Luego de atravesar la membrana plasmática, los iones Cu^{+1} son transportados al aparato de Golgi, a la mitocondria, y a las cuproenzimas citosólicas por medio de diversos chaperones que actúan como escoltas quelando al Cu para protegerlos de los mecanismos de detoxificación celular y cuya función es distribuir y transferir el Cu a blancos celulares específicos, que se describen a continuación¹²⁰⁻¹²² (Ver Figura 3.3):

- La metaloproteínas de Cu para la superóxido dismutasa (CCS, por Copper chaperone for superoxide dismutase) le ceden los iones Cu a la enzima reductora dismutasa Cu/Zn que tiene actividad peroxidasa (SOD1, por Superoxide dismutase), que degrada el radical libre

conocido como superóxido^{123,124}. Ya que el Cu puede cambiar su estado de oxidación aceptando o donando electrones, y tanto el Cu⁺¹ como el Cu⁺² son igualmente activos y pueden participar en reacciones que generan radicales superóxidos (O₂⁻) y peróxido de hidrógeno (H₂O₂) que comprometen las funciones celulares y contribuye a la actividad redox incontrolada de Cu, esta enzima cataliza la dismutación del O₂⁻ a H₂O₂ y O₂. Mediante la eliminación del radical O₂⁻, la CuZnSOD disminuye el riesgo de formación de radical hidroxilo (-OH) a través de la reacción de Haber-Weiss.

- La metalchaperona de Cu proteína antioxidante 1 (ATOX 1, por Antioxidant protein 1) transfiere estos iones metálicos hacia las enzimas de trifosfato de adenosina (ATP, por Adenosine triphosphate) encargadas del transporte de Cu, ATP7A y ATP7B, que lo exportan al aparato de Golgi^{125,126}. La ATP7A sirve de almacenamiento transitorio hasta su cesión al transportador ATP7B, que lo vehiculiza desde el citoplasma al interior del aparato de Golgi donde cede a cada molécula de apoceruloplasmina seis átomos de cobre y la transforma en holoceruloplasmina y, en esta forma, pasa al plasma. En cambio, cuando el Cu está en exceso en el interior del citoplasma, el transportador ATP7B modifica su situación y se coloca en una zona post-Golgi donde facilita la eliminación de vesículas con alto contenido de Cu al canalículo biliar.
- La chaperona de Cu para la citocromo c oxidasa subunidad 17 (COX 17, por Cytochrome c oxidase) es una proteína ubicada en el citoplasma y en el espacio intermembranal que transporta los iones Cu desde el citoplasma a las proteínas de membrana que sintetizan para el

citocromo oxidasa (SCO, por Synthesis cytochrome oxidase) SCO1 y SCO2, las cuales son homólogas y cuya función es incorporar el Cu en la citocromo-c-oxidasa que corresponde al complejo IV de la cadena respiratoria¹²⁷. El citocromo c oxidasa cataliza el paso terminal de la respiración empleando electrones que provienen del citocromo c para reducir el oxígeno molecular a agua. Este complejo tiene dos subunidades que contienen cobre, un centro binuclear CuA y un centro CuB, que son codificados por el genoma mitocondrial y que son necesarias para que se lleve a cabo la transferencia de electrones.

Bajo condiciones de normoxia estos mecanismos para quelar y regular el Cu son de gran importancia para evitar la toxicidad del Cu iónico por altas concentraciones, sin embargo, se ha observado que estas rutas se ven alteradas bajo condiciones de hipoxia. Primeramente hay un incremento en la captación de Cu lo que se relaciona con un aumento en la expresión de CTR1 y un aumento en la expresión y tráfico de ATP7A, para la óptima actividad de la enzima ceruloplasmina Cu-dependiente^{128,129}. Curiosamente, en contraste con el aumento de la expresión de CTR1 y ATP7A, White y col.¹²⁹, encontraron que la expresión de otras proteínas de unión de Cu en el citoplasma disminuyen en respuesta a la hipoxia^{128,129}. Sin embargo, otros autores¹³⁰ indican que también se sobre expresa la proteína COX 17 induciendo cambios en la actividad de la COX y por lo tanto, en la capacidad oxidativa y de la mitocondria. En cualquiera de los casos, esto representa la primera evidencia de que las vías de distribución de Cu intracelular pueden ser reguladas diferencialmente en respuesta al estrés ambiental, y sugiere que el Cu puede ser distribuido selectivamente a la vía secretora en respuesta a la hipoxia.

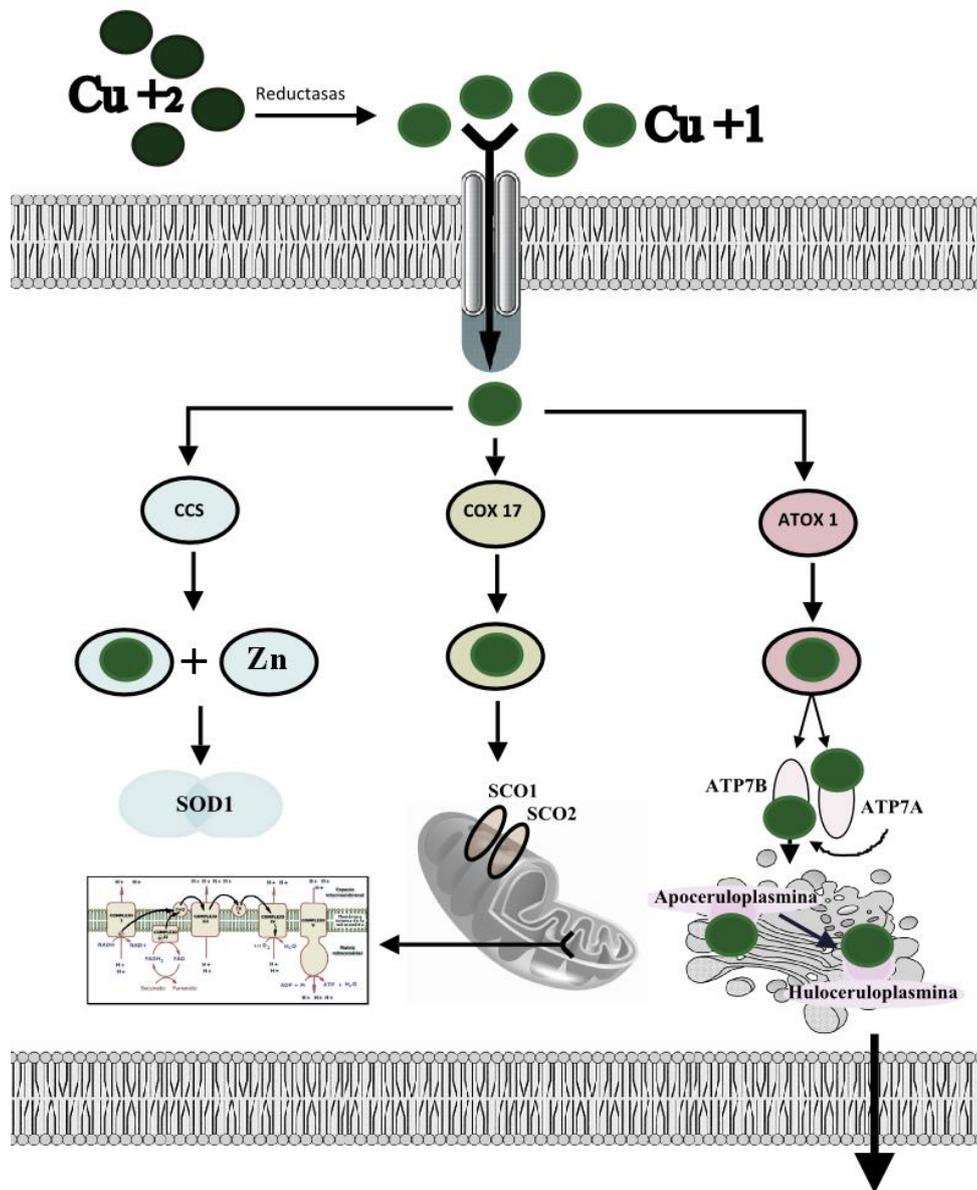


Figura 3.3. Esquema de las vías de tráfico intracelular del Cu.

Algunas de las primeras pistas de que el Cu y sus metalchaperonas estaban estrechamente relacionadas con el proceso de hipoxia surgieron al encontrar una alta concentración de ceruloplasmina sérica, el principal aglutinante de Cu en el suero, durante el desarrollo de xenoinjerto de tumores y regresión de los mismos en conejos¹³¹. Se encontraron niveles de ceruloplasmina de 4 a 8 veces mayor de lo normal durante la progresión del tumor maligno, manteniéndose en concentraciones altas durante la metástasis, mientras que con la regresión del mismo, los niveles ceruloplasmina volvieron a la normalidad. En sistemas humanos, el metabolismo del Cu también es alterado durante el desarrollo de tumores malignos¹³²⁻¹³⁴, por ejemplo, en el caso de carcinoma de mama¹³², se ha demostrado que el aumento de los niveles de Cu en suero es proporcional a la gravedad de la enfermedad. Esta asociación se fortaleció aún más cuando se descubrió que sales de Cu estimulaban la migración y diferenciación de las células endoteliales un 95 % en cultivos de BAEC¹¹². Estudios posteriores determinaron que altos niveles de Cu inducía la vascularización en córneas de conejo, además, en este modelo se encontró, que la deficiencia de Cu, inhibía dicha vascularización¹³⁵.

Estos hallazgos se extendieron a otros sistemas, y en la actualidad existen numerosos ensayos *in vitro* e *in vivo* que han estudiado la influencia de la bioactividad e influencia del Cu en la producción de los factores que están involucrados en la iniciación de la angiogénesis, incluyendo VEGF¹³⁶, HIF-1 α ¹³⁷, el factor de crecimiento de fibroblastos 1 (FGF, por Fibroblast growth factor) FGF-1¹³⁸ y angiogenina¹³⁹, por mencionar algunos. Sen y col.¹³⁶ fueron los primeros en demostrar que el Cu estimulaba la expresión de VEGF de cultivo de keratinocitos *in vitro* adicionando concentraciones de CuSO₄. También encontraron que administrando CuSO₄ vía tópica en heridas cutáneas en roedores se aceleraba la cicatrización de las heridas, que asociaron con el incremento de la expresión de

VEGF. Jiang y col.¹³⁷ demostraron que la suplementación de la dieta con niveles fisiológicamente relevante de Cu invierte la miocardiopatía hipertrófica causada por la sobrecarga de presión inducida por la constricción de la aorta ascendente en un modelo de ratón. Ellos concluyen que la suplementación de Cu activa la expresión de VEGF y la angiogénesis. Los resultados sobre la influencia del Cu en la expresión del VEGF sugirieron la investigación de queladores de Cu como compuestos anti-angiogénicos en las terapias de tumores. Fue el mismo grupo quienes obtuvieron resultados positivos usando el tetratiomolibdato (TM, por Tetrathiomolybdate) para remover el Cu en pacientes con cáncer metastásicos, encontrando que estabilizaba el avance de la enfermedad¹³⁷. En modelos experimentales se ha observado que el tratamiento con TM inhibe la angiogénesis, necrosis tumoral y suprime la metástasis para el cáncer de cabeza y cuello. En la actualidad se evalúa su acción para tratamientos en cáncer de mama, esófago, próstata y colorectal¹⁴⁰.

Más recientemente, se ha demostrado que el Cu es capaz de regular la acción biológica del HIF-1 α asegurando la formación de la transcripción del complejo HIF-1, y activando de este modo la expresión de genes angiogénicos específicos, incluyendo VEGF. Por otro lado, el exceso de Cu bajo condiciones de normoxia, puede estabilizar HIF-1 α , el componente limitante de la velocidad de la formación de HIF-1, que conduce a su acumulación en el citoplasma, su translocación al núcleo donde se acomplejara para formar el factor de transcripción de HIF-1 y por lo tanto que se desencadene la angiogénesis^{141,142}.

Aunque es evidente que el Cu está relacionado con el proceso de angiogénesis el mecanismo no está claramente dilucidado. Algunos autores sugieren que el exceso de Cu citoplasmático bajo condiciones de normoxia inhibe la actividad de PDH,

dando lugar a la estabilización de la HIF-1 α que desencadenaría el proceso de angiogénesis¹⁴¹. Mientras que otros proponen que el exceso de Cu incrementa el consumo de oxígeno disponible aumentando la producción de especies reactivas del oxígeno (ROS, por Reactive oxygen specie)^{136,142} y de óxido nítrico (NO)¹³⁶ y desencadenando una hipoxia local. Aunado a esto, otros investigadores han encontrado sobre expresión en la proteína mitocondrial COX 17, lo cual puede interferir en la actividad normal de la mitocondria. El Cu en exceso inhibe el funcionamiento adecuado de la COX y por lo tanto provoca una disfunción general de la mitocondria que llevaría a una pérdida del control respiratorio aumentando el estrés oxidativo, el hinchamiento y colapso mitocondrial que sería interpretado como una hipoxia general¹³⁰.

Cabe considerar, que en la literatura hay opiniones controversiales acerca de la contribución de la función mitocondrial y la regulación de la HIF-1^{143,144}. Bajo condiciones de hipoxia, la mitocondria tiene disponible menor cantidad de oxígeno y la producción de energía decrece, aumenta la producción de NO y ROS en la célula, lo cual contribuye a disminuir la velocidad de respiración. La idea más generalizada sugiere que bajos niveles de oxígeno induce cambios en la estructura, función y dinámica de la mitocondria que contribuiría a estabilizar la HIF-1 como un mecanismo celular de adaptación a la hipoxia¹⁴⁵. La bibliografía nos indica que el Cu es reconocido como un factor con implicaciones severas en el proceso de angiogénesis, por inhibir la actividad de la PHD y por estar involucrado tanto en la producción de NO y ROS, así como afectar la actividad enzimática de los queladores de Cu y alterar la actividad regular de la COX, una de las proteínas que está estrechamente comprometida con la respiración celular.

Como se ha mencionado, el Cu es un co-factor angiogénico, que está íntimamente relacionado con las rutas de activación de la angiogénesis y que por lo tanto está involucrado en la formación de nuevos vasos por la interacción con las células endoteliales y musculares lisas, dando lugar a la migración celular, invasión, proliferación y la formación de estructuras tubulares.

4.2. La angiogénesis en terapias de regeneración ósea

Para las terapias de regeneración tisular, especialmente para defectos de huesos grandes, los biomateriales deben ser capaces, no solo de promover la osteogénesis, sino además deben estimular el proceso de angiogénesis para una adecuada vascularización¹⁴⁶⁻¹⁴⁹. En el campo de la ingeniería tisular este es un concepto que ha empezado a estudiarse relativamente pronto. La angiogénesis, que sería la responsable de inducir la vascularización en el tejido óseo, representa una contribución fundamental para el éxito de la regeneración y el crecimiento de nuevo tejido porque son los vasos sanguíneos los que proporcionan el oxígeno y nutrientes necesarios para la supervivencia de las células^{98,100,150,151}.

Desde hace años se conoce que algunos biomateriales son capaces de promover el proceso de angiogénesis sin necesidad de añadirles factores de crecimiento involucrados en dicho proceso. Por ejemplo, el Bioglass® 45S5^{152,153}, es el biomaterial cuyas propiedades angiogénicas han sido más exhaustivamente estudiadas. Se ha demostrado que los iones liberados durante la degradación del Bioglass® 45S5 son capaz de estimular la secreción de factores de crecimiento como el VEGF y FGF básico, así como de estimular la angiogénesis en células endoteliales *in vitro*¹⁵³⁻¹⁵⁵. Sin embargo, debido a la composición tan variada del vidrio, es complicado determinar el rol pro-angiogénico de cada uno de los iones

que se van administrando en el ambiente conforme ocurre la degradación del biomaterial¹⁵².

Recientemente, en un sistema más sencillo, se evaluó la capacidad angiogénica del ion Si administrado durante la degradación de cerámicas de CS^{42-44,156-158}. Li y col.⁴³ investigaron los efectos de los iones resultantes de la degradación de CS sobre el VEGF y sobre la proteína morfogenética ósea 2 (BMP-2, por Bone Morphogenetic Protein) en co-cultivos de células HUVEC y de células HBMSC, encontrando que el Si regula la expresión del VEGF y que estimula la diferenciación osteogénica de las HBMSC y la vascularización en HUVEC. El mismo año, este mismo grupo sintetizó un CS-Cu con la intención de mejorar las propiedades angiogénicas que ya habían observado anteriormente en el CS. Concluyeron que existe una contribución sinérgica entre Cu y el Si, que aumenta la expresión de los factores angiogénicos y estimula la neovascularización, sugiriendo que el CS-Cu es un material notablemente adecuado para la regeneración de vasos sanguíneos en ingeniería tisular⁴⁴.

Así, hay evidencia reciente en la literatura que el Si, producto de la redisolución de las biocerámicas y BG, es un ion que estimula la regeneración del hueso al actuar como un factor angiogénico que regula e induce la neovascularización¹⁵⁸, sin embargo, es importante hacer notar los escasos estudios de las propiedades angiogénicas de los MBG en el sistema SiO₂-CaO-P₂O₅. Como se mencionó antes, estos MBG son típicamente utilizados como matrices para funcionalizarlos con factores pro-angiogénicos y/o con iones terapéuticos que promueven la angiogénesis^{15,147,159}. Y aunque en la bibliografía se indica que estos MBG altamente ordenados pueden favorecer la angiogénesis, principalmente por el efecto del Si, es evidente la falta de ensayos significativos en el que evalúen las

propiedades angiogénicas propias del MBG en el sistema $\text{SiO}_2\text{-CaO-P}_2\text{O}_5$ y de los productos de su redisolución. Por todo ello, la incorporación de Cu a materiales MBG se presenta como una opción muy interesante y prometedora para mejorar las propiedades de estos biomateriales.

5. Matrices MBG incluyendo Cu en su composición

En los puntos anteriores se ha explicado el interés de los MBG como una matriz administradora de iones terapéuticos en el proceso de su biodegradación. Asimismo, se ha detallado la importancia del Cu como un oligoelemento con numerosas propiedades de interés en las terapias de regeneración tisular.

La ruta de síntesis más utilizada para incorporar iones terapéuticos en la composición de los MBG en la propia síntesis sol-gel. Como se mencionó antes, esta técnica es particularmente útil porque permite la síntesis directa de materiales multicomponentes. Los precursores se mezclan a nivel molecular y se integran durante la formación de la red vítrea¹⁶⁰.

El proceso de impregnación, es otro método para incorporar metales dentro de un material poroso. Este método consiste en el llenado de los poros de la superficie del material con una solución del precursor metálico (normalmente una sal), en el que el volumen generalmente es el necesario para llenar el volumen de poros. Posteriormente el material impregnado se somete a un tratamiento térmico para eliminar determinados componentes de los precursores, mientras el ion metálico permanece en el interior de los poros del material. La impregnación es el método clásico de preparación de catalizadores a nivel industrial, sin embargo, es útil para cualquier material que presente una superficie porosa¹⁶¹. Como los materiales MBG derivados del proceso sol-gel se caracterizan por presentar micro/nano poros

y alta área superficial, son candidatos oportunos para incorporar iones en su composición mediante el método de impregnación¹⁶².

En este capítulo se abordará la incorporación de Cu en el sistema 80SiO₂-15CaO-5P₂O₅ por dos rutas de síntesis diferentes. Por un lado, se sintetizará el material MBG-Cu en una única etapa en el proceso sol-gel. Por otro lado, se ensayará la incorporación de Cu en el material MBG utilizando una segunda etapa de impregnación.

Considerando que las condiciones de síntesis influyen directamente en las propiedades físico-químicas del material, se caracterizará la microestructura de los biomateriales sintetizados en este capítulo con el fin de esclarecer el mecanismo en el que los iones metálicos, en este caso el Cu, se incorporan en la matriz vítrea o en los poros del material. También se evaluará el mecanismo de degradación del MBG, bioactividad y liberación de los iones que lo componen en función del método de síntesis.

5.1. Procedimiento experimental

5.1.1. Síntesis del material MBG libre de Cu

La síntesis del sol MBG se puede consultar en el Capítulo 2. La síntesis se apoya en el método sol-gel, la química supramolecular utilizando surfactantes y el proceso EISA. El sol se transfiere a un cristalizador y mantiene 72 h a temperatura ambiente para que se lleve a cabo el proceso EISA, que dará lugar a la formación de un gel. Posteriormente, el gel se somete a un proceso de envejecimiento en una estufa a 80 ° C durante 72 h para eliminar el agua. Finalmente, para eliminar los nitratos del reactivo de calcio y del tensoactivo, el gel recibe un tratamiento térmico a 700 °C durante 2 h, usando una rampa de velocidad de 1 °C·min⁻¹.

5.1.2. Síntesis de materiales MBG incluyendo Cu en una única etapa

En la ruta sol-gel se sigue el mismo procedimiento utilizado para la síntesis del MBG, con la variación de que se incorporan diferentes cantidades nitrato de cobre ($\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, 61194 Sigma-Aldrich) directamente en el sol (Ver Figura 3.4). Los nitratos, de Ca y de Cu, se añaden al mismo tiempo, respetando las condiciones de síntesis indicadas en el procedimiento para la síntesis del MBG (Ver Capítulo 2). El resultado es un material particulado color oscuro. En la Tabla 3.2 se observan las composiciones teóricas de los materiales sintetizados y las cantidades de reactivos añadidos para cada caso.

Tabla 3.2. Nomenclatura, composición teórica y proporción de precursores para cada uno de los materiales sintetizados por el método sol-gel.

Nomenclatura	Composición (mol)	TEOS (mL)	TEP (μL)	$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (g)	$\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (g)
SG-MBG-0.5Cu	$80\text{SiO}_2:14.5\text{CaO}:5\text{P}_2\text{O}_5:0.5\text{CuO}$	7.125	685	1.3696	0.0483
SG-MBG-2.5Cu	$80\text{SiO}_2:12.5\text{CaO}:5\text{P}_2\text{O}_5:2.5\text{CuO}$	7.125	685	1.1807	0.2416
SG-MBG-5Cu	$80\text{SiO}_2:10\text{CaO}:5\text{P}_2\text{O}_5:5\text{CuO}$	7.125	685	0.9446	0.4832

5.1.3. Síntesis de materiales MBG incluyendo Cu utilizando una segunda etapa de impregnación

En esta ruta de síntesis se parte del material particulado MBG $80\text{SiO}_2:15\text{CaO}:5\text{P}_2\text{O}_5$ sintetizado anteriormente por la ruta sol-gel, como se indica en la sección 2.1, el cual se impregnará con una solución acuosa de $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (Ver Figura 3.4). La solución para impregnar se obtiene disolviendo en 3 mL de DIH_2O , diferentes cantidades de $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ necesarias para una composición teórica de 0.5, 2.5 y 5 % mol (Ver Tabla 3.3) y se

añade por goteo, con ayuda de una bureta, en 2 g de MBG particulado. El material impregnado adquiere un color azul claro durante la impregnación. Después se seca en estufa a 80 °C durante 24 h y posteriormente es calcinado 700 °C durante 2 h, con una rampa de velocidad de 1 °C·min⁻¹, resultando un material particulado de color negro.

Tabla 3.3. Nomenclatura, composición teórica y proporción de precursores para cada uno de los materiales sintetizados por el método de impregnación.

Nomenclatura	Composición (mol)	Cu(NO ₃) ₂ ·3H ₂ O (g) disuelto en DIH ₂ O
I-MBG-0.5Cu	80SiO ₂ :14.5CaO:5P ₂ O ₅ :0.5CuO	0.0377
I-MBG-2.5Cu	80SiO ₂ :12.5CaO:5P ₂ O ₅ :2.5CuO	0.1899
I-MBG-5Cu	80SiO ₂ :10CaO:5P ₂ O ₅ :5CuO	0.3798

La nomenclatura empleada indica con un SG y/o I el método de síntesis del material, que corresponden a los métodos de sol-gel e impregnación, respectivamente. El porcentaje molar de Cu incorporado se indica justamente antes del metal.

5.1.4. Caracterización de los materiales

Para comprender la estructura de los MBG y su potencialidad como matriz para la administración de iones terapéuticos es necesario un conocimiento profundo de sus propiedades físico-químicas, las cuales están determinadas en gran medida por el método que se haya seguido para su preparación.

En este trabajo se emplearán las siguientes técnicas para la caracterización física y química de los materiales: XRF, XRD, SAXRD, fisisorción de N₂, espectroscopia

FT-IR, RAMAN y SEM. Estas técnicas se describen en la sección de Anexos, asimismo se indican las condiciones utilizadas.

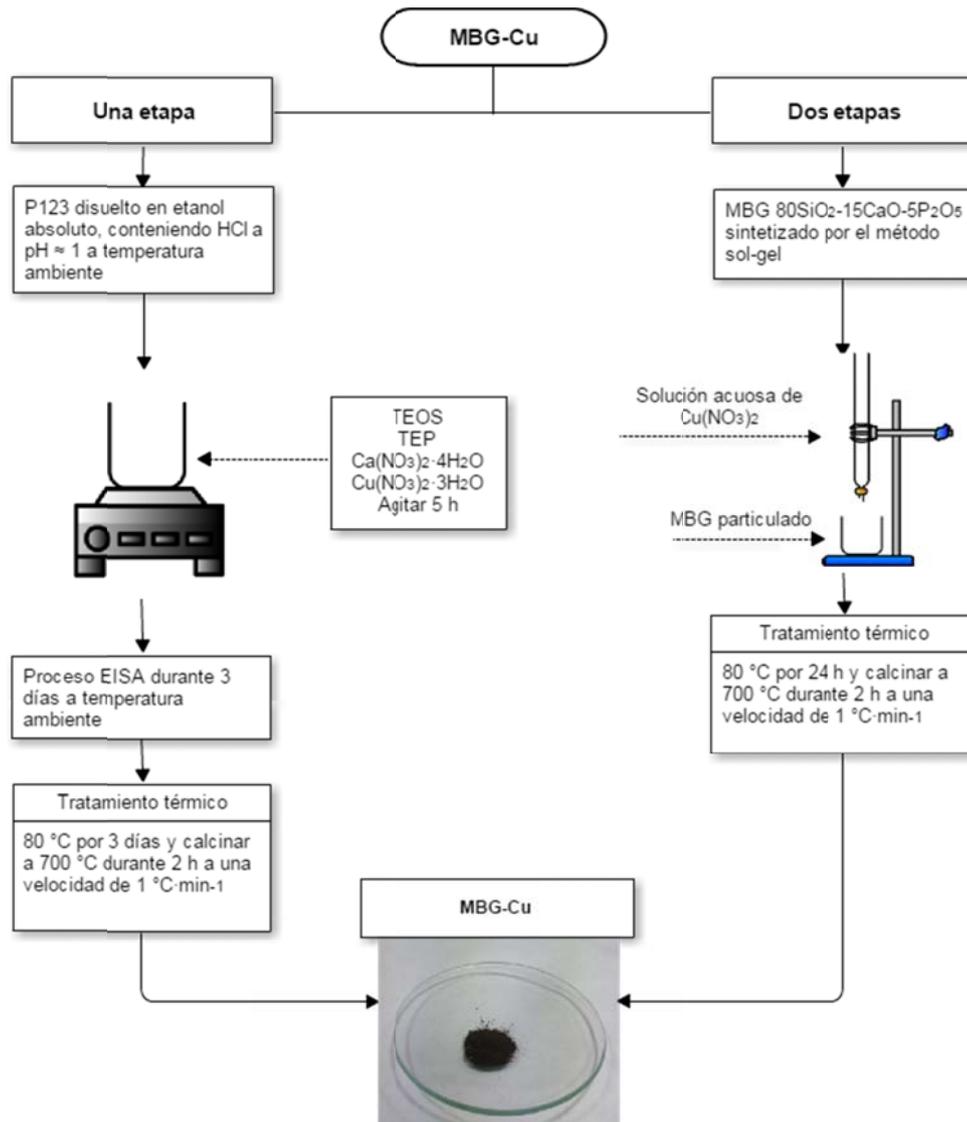


Figura 3.4. Esquema de las distintas etapas de las rutas de síntesis utilizadas.

5.1.5. Ensayos de biodegradabilidad y bioactividad

Los ensayos de biodegradación y bioactividad se acompañaron de un seguimiento de los iones liberados al medio en el proceso de degradación de los materiales. Se realizaron diferentes experimentos *in vitro*, tomando como referencia el MBG libre de Cu. Se comparan ambos tipos de MBG-Cu entre sí para evaluar la influencia del método de síntesis en la potencialidad del MBG como matriz administradora de iones. Los detalles de cada uno de los ensayos se describen más adelante. Se midió la cantidad de sílice disuelta mediante espectrofotometría de ultravioleta visible (UV-Vis), y en algunos casos también por espectrometría de masas de plasma de acoplamiento inducido (ICP-MS, por Inductively coupled plasma-mass spectrometry). La bioactividad se evaluó mediante análisis de EDX. Las condiciones de medidas y protocolos experimentales de los métodos se detallan en la sección de Anexos.

5.2. Resultados y discusión

En la caracterización de los materiales, para todos los casos, se tomó como referencia el MBG en el sistema $80\text{SiO}_2\text{-}15\text{CaO-}5\text{P}_2\text{O}_5$, para contrastar y evaluar los resultados obtenidos de los MBG-Cu, en sus diferentes composiciones y métodos de síntesis.

5.2.1. Caracterización físico-química de los materiales

El análisis químico de la composición elemental de los materiales se realizó usando fluorescencia de rayos X (XRF, X-ray fluorescence), y se presentan en la Tabla 3.4, expresados como óxidos. En los resultados encontramos una buena relación entre la composición nominal, calculada a partir de los reactivos precursores de la síntesis, y la composición molar real. También se observa que la retención de fósforo en el material ha sido poco efectivo durante el proceso de síntesis utilizado.

Tabla 3.4. Composición química de los materiales sintetizados, cuantificados mediante XRF.

Muestra	Composición nominal				Composición real			
	SiO ₂	CaO	P ₂ O ₅	CuO	SiO ₂	CaO	P ₂ O ₅	CuO
MBG	80	15.0	5	--	86.3	12.5	1.2	--
SG-MBG-0.5Cu	80	14.5	5	0.5	85.6	12.8	0.8	0.8
SG-MBG-2.5Cu	80	12.5	5	2.5	82.8	13.5	0.9	2.8
SG-MBG-5Cu	80	10.0	5	5.0	79.5	13.3	0.9	6.4
I-MBG-0.5Cu	80	14.5	5	0.5	84.6	13.0	1.1	1.3
I-MBG-2.5Cu	80	12.5	5	2.5	82.1	13.8	1.0	3.1
I-MBG-5Cu	80	10.0	5	5.0	77	14.7	1.1	6.7

El MBG presenta difractogramas característicos de los materiales vítreos con mesoporosidad ordenada (Ver Figura 3.5). El SAXRD nos indica que los poros del material están ordenados, es decir, que existe una periodicidad en la distribución de sus canales, ya que se puede observar un pico principal bien definido a $2\Theta = 1.18^\circ$ asociado al plano de reflexión (100), correspondiente a una simetría 2D-hexagonal con un grupo espacial $p6mm^{5,163}$. Para este tipo de estructura normalmente se pueden observar tres picos de Bragg a lo largo del intervalo 2Θ que son indexados como (100), (110), (200). El hecho de que no se observen todos los picos de difracción indica menor grado de orden que otros materiales como la SBA-15. Para los ángulos convencionales, únicamente se aprecia la señal del halo amorfo, una zona de reflexión difusa centrado en $2\Theta \approx 23^\circ$ característico de los materiales vítreos, que indica que no existen planos cristalográficos pero si la evidencia de un cierto orden de moléculas a corto alcance, en el rango de los tetraedros del silicio.

En la Figura 3.5, también se observan los diagramas de SAXRD y XRD de las diferentes composiciones de los MBG-Cu sintetizados por el método sol-gel en comparación con el vidrio de referencia. Los patrones de SAXRD de las muestras modificadas con Cu indican que los materiales conservan la formación de la estructura hexagonal ordenada, sin embargo, el orden de los poros se ve afectado ya que la intensidad del pico principal en el plano (100) es menor conforme aumenta la cantidad de Cu. Este comportamiento puede atribuirse a una reducción en la periodicidad¹⁶⁴. También se observa un pequeño desplazamiento del plano (100), lo cual sugiere una modificación en los parámetros de la celda.

En el diagrama de XRD a alto ángulo se observa el efecto del incremento en el contenido de Cu con la aparición de nuevas señales de difracción, correspondientes al CuO. En el patrón de difracción que corresponde a la muestra SG-MBG-0.5Cu no se observa ninguna fase atribuida a este metal y el patrón es análogo al MBG de referencia (0 % mol Cu). Este último indica, por tanto que, bajo las condiciones de medición utilizadas y el límite de detección del instrumento, estas fases no se detectan. Para el SG-MBG-2.5Cu se pueden intuir unos pequeños picos anchos que corresponderían a fases de Cu, sin embargo no están definidos, lo cual sugiere que las especies de Cu están poco ordenadas o se trata de partículas muy pequeñas bien dispersas en la matriz vítrea del material. Sin embargo, que para el SG-MBG-5Cu es evidente la presencia de especies cristalinas en el material. Los principales picos de difracción que se observan en el diagrama para el MBG-5Cu, corresponden a la fase cristalina del CuO que son a $2\theta = 35^\circ$ y 40° , indexados como (002) y (111), respectivamente, (PDF entry: 48-1548)¹⁶⁵. Esto nos sugiere que al aumentar la cantidad de Cu por encima del 5 % mol, este cristaliza, anulando su carácter amorfo e interfiriendo en el orden estructural del material.

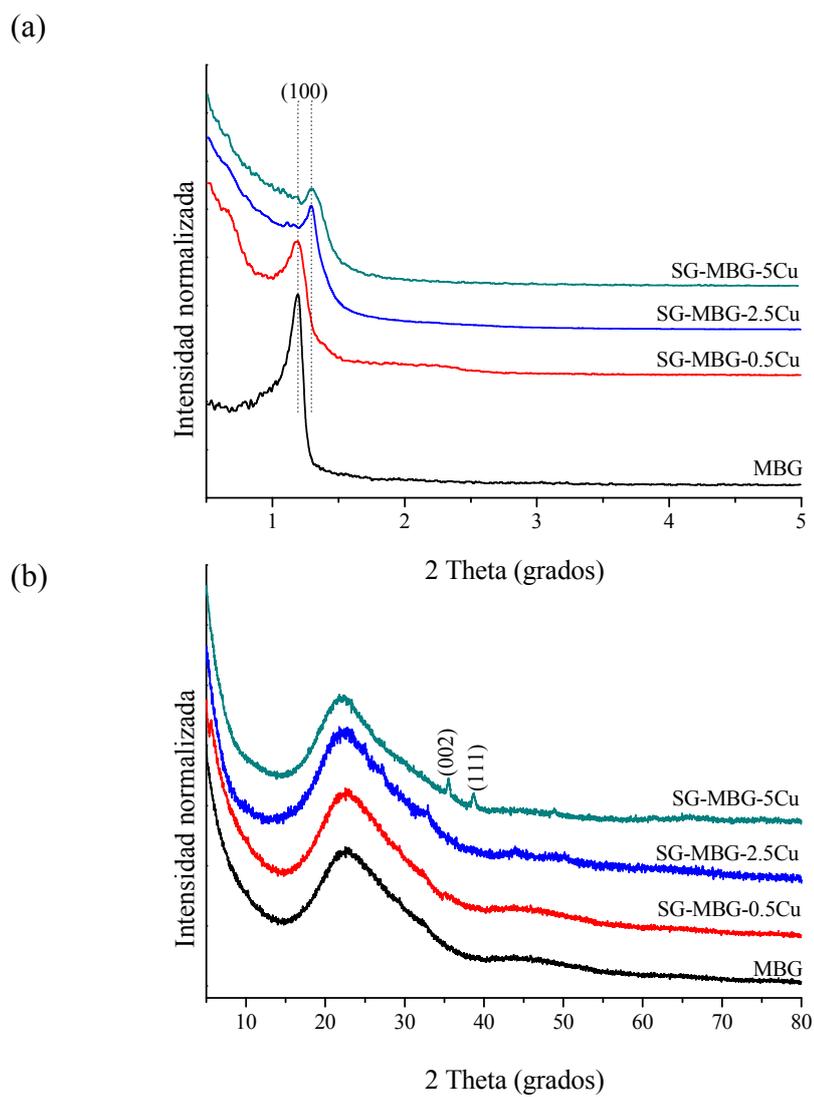


Figura 3.5. Difractogramas de (a) SAXRD y (b) XRD para SG-MBG-Cu, en todas sus composiciones, en comparación con el MBG.

Los SAXRD y XRD de los materiales preparados por el método de impregnación se observan en la Figura 3.6. En los diagramas SAXRD se observa claramente una disrupción en el ordenamiento a nivel de poro, que se traduce en la disminución y desplazamiento del pico a bajo ángulo. Estos resultados sugieren que los cristales de CuO se sitúan dentro de los mesoporos del material MBG. Los picos estrechos y bien definidos que se observan en el difractograma XRD denotan un mayor grado de cristalinidad

Al comparar los métodos de síntesis entre sí (Ver Figura 3.7) podemos observar que por el método de impregnación se genera una fase de CuO con mayor cristalinidad. Mientras que por el método sol-gel, es posible lograr una incorporación de Cu en la matriz de sílice. De esta forma, la dispersión homogénea en la matriz vítrea y la cristalización de CuO da lugar a cristales más pequeños o dispersos.

Las isothermas obtenidas para los materiales sintetizados por el método sol-gel e impregnación se muestran en la Figura 3.8 a y b, respectivamente. Como cabría esperar para un material mesoporoso, son isothermas de tipo IV y en todas ellas se puede apreciar la curva de histéresis tipo H1, características de canales de poro delgados, cilíndricos e independientes, con una distribución de diámetro de poro estrecha ^{1,163,166}. Esto es un indicativo de que la incorporación de CuO por el método sol-gel no provoca un colapso de la red de sílice. Para el caso de los materiales impregnados no se identifica ningún retraso en la rama de desorción de la isoterma, que señala que los mesoporos principales permanecen abiertos y que no se forma ninguna constricción significativa en los poros después de la calcinación.

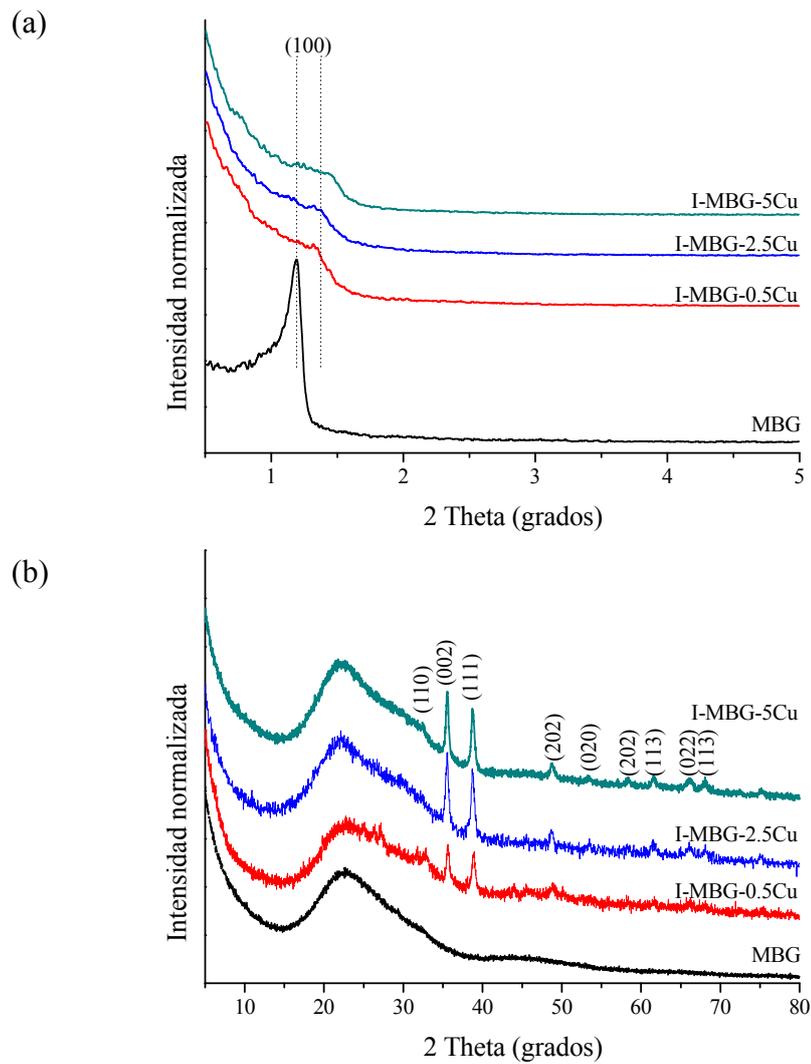


Figura 3.6. Difractogramas de (a) SAXRD y (b) XRD para I-MBG-Cu, en todas sus composiciones, en comparación con el MBG.

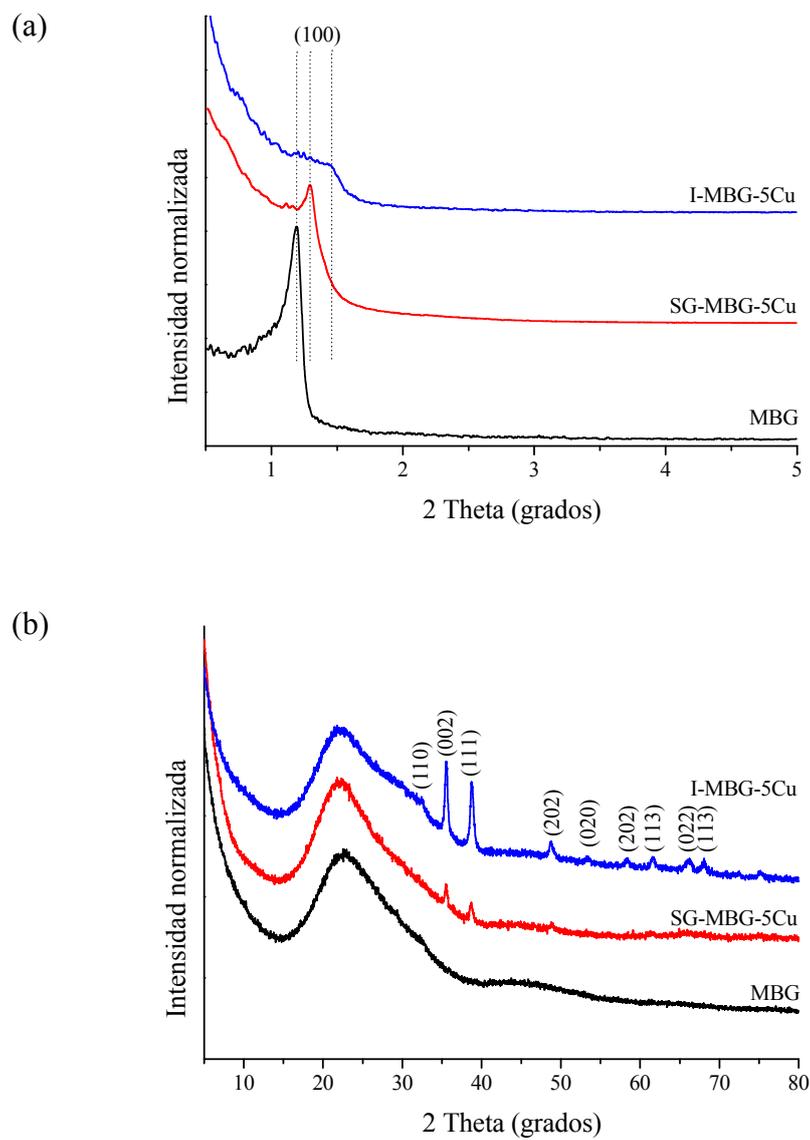


Figura 3.7. Comparación de los patrones de (a) SAXRD y (b) XRD para el MBG-5Cu sol-gel e impregnación, en comparación con el MBG.

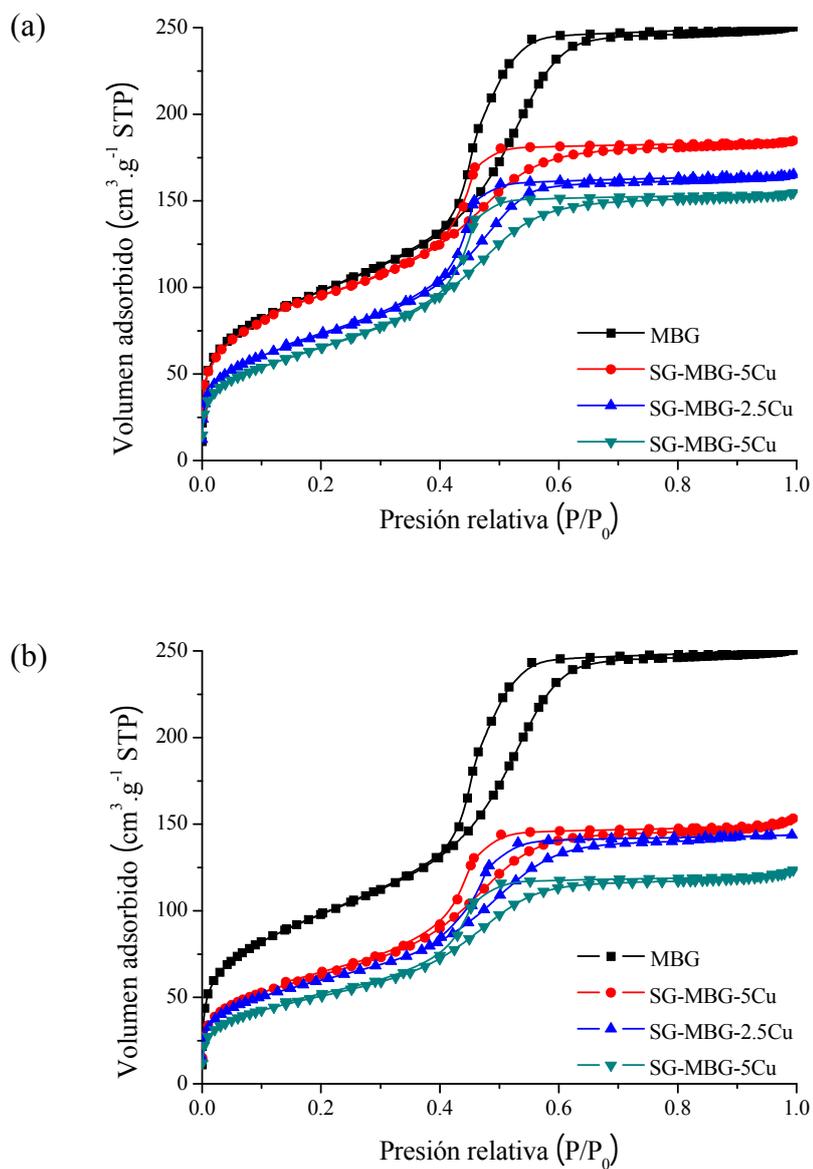


Figura 3.8. Isothermas de los MBG-Cu 0.5, 2.5 y 5, sintetizados por el método (a) sol-gel y (b) impregnación, respectivamente.

Los parámetros texturales obtenidos mediante fisisorción de N₂ se han presentado en la Tabla 3.5. Es evidente que la capacidad de adsorción disminuye para las muestras con Cu incorporado en su composición. Para todos los materiales se observa una tendencia a disminuir la superficie específica S_{BET} y el volumen y el diámetro de poro, conforme aumenta la cantidad de Cu presente. Sin embargo, la reducción observada es más clara para los materiales impregnados.

Tabla 3.5. Parámetros texturales de los materiales sintetizados.

Muestra	Área superficial específica (m ² ·g ⁻¹)	Volumen de poro (cm ³ ·g ⁻¹)	Diámetro de poro (nm)
MBG	372 ± 16	0.38 ± 0.01	4.25
SG-MBG-0.5Cu	270 ± 11	0.30 ± 0.04	3.92
SG-MBG-2.5Cu	260 ± 14	0.26 ± 0.02	3.79
SG-MBG-5Cu	237 ± 4	0.24 ± 0.02	3.75
I-MBG-0.5Cu	219 ± 13	0.22 ± 0.01	3.66
I-MBG-2.5Cu	185 ± 11	0.21 ± 0.02	3.61
I-MBG-5Cu	163 ± 14	0.19 ± 0.02	3.68

Para el MBG-Cu sintetizado por el método sol-gel la disminución en los parámetros texturales puede atribuirse a un deterioro del nivel de organización por la presencia de Cu, ya que podría estar causando alteraciones en la organización del material debido a la diferencia de valencia y diámetro del átomo de Cu. Para el caso de MBG-Cu sintetizado por el método de impregnación, esta disminución sugiere la localización de los precursores de óxidos dentro de los mesoporos del MBG.

En la Figura 3.9 se muestra la distribución BJH de diámetro de poro de todos los materiales sintetizados, en comparación con el material de referencia. Todas las distribuciones corresponden a un perfil similar, en ella se pueden observar picos estrechos, evidencia de la uniformidad estructural de las muestras. MBG libre de

Cu presenta una distribución de diámetro de poro monodispersa centrada alrededor de 4.26 nm, mientras que las muestras con Cu en su composición presentan valores entre 3.6 y 4 nm. Para el caso de los materiales en los que el Cu se ha incorporado por impregnación, la cristalización del CuO no decrece de forma importante la accesibilidad de los nanoporos del material.

Las muestras se han analizado por espectroscopia FT-IR y en la Figura 3.10 se presentan los espectros obtenidos para los materiales SG-MBG-5Cu e I-MBG-5Cu, representativos del resto de materiales, y en comparación con el material de referencia MBG libre de Cu. Todos los infrarrojos muestran las bandas de absorción características para la sílice amorfa. El espectro típico de los vidrios basados en Si presentan tres bandas que corresponden a los modos vibracionales del grupo Si-O-Si que se encuentran alrededor de 1300 y 400 cm^{-1} ^{167,168}. La banda que aparece 460 cm^{-1} está asociada al modo vibracional de flexión asimétrica Si-O-Si, mientras que la banda alrededor de los 800 cm^{-1} corresponde a las vibraciones de flexión simétricas del mismo enlace.

La banda principal y más intensa, del espectro FT-IR para la sílice, corresponde al modo vibracional de tensión localizado a 1070 cm^{-1} , donde los átomos de O se mueven en dirección opuesta a los átomos de Si vecinos y aproximadamente en paralelo con respecto a las líneas de Si-Si. Esta banda principal exhibe una estructura adicional en la región de 1200 cm^{-1} de la cual no ha sido explicada satisfactoriamente hasta la fecha^{168,169}. Algunos autores sugieren que la banda y el hombro de más altas frecuencias de vibración corresponden a los modos vibracionales de tensión asimétricas del enlace Si-O-Si en sus componentes ópticas longitudinal (LO) y transversal (TO), respectivamente, mientras que la banda a menor frecuencia corresponde a la tensión simétrica de dicho enlace¹⁷⁰.

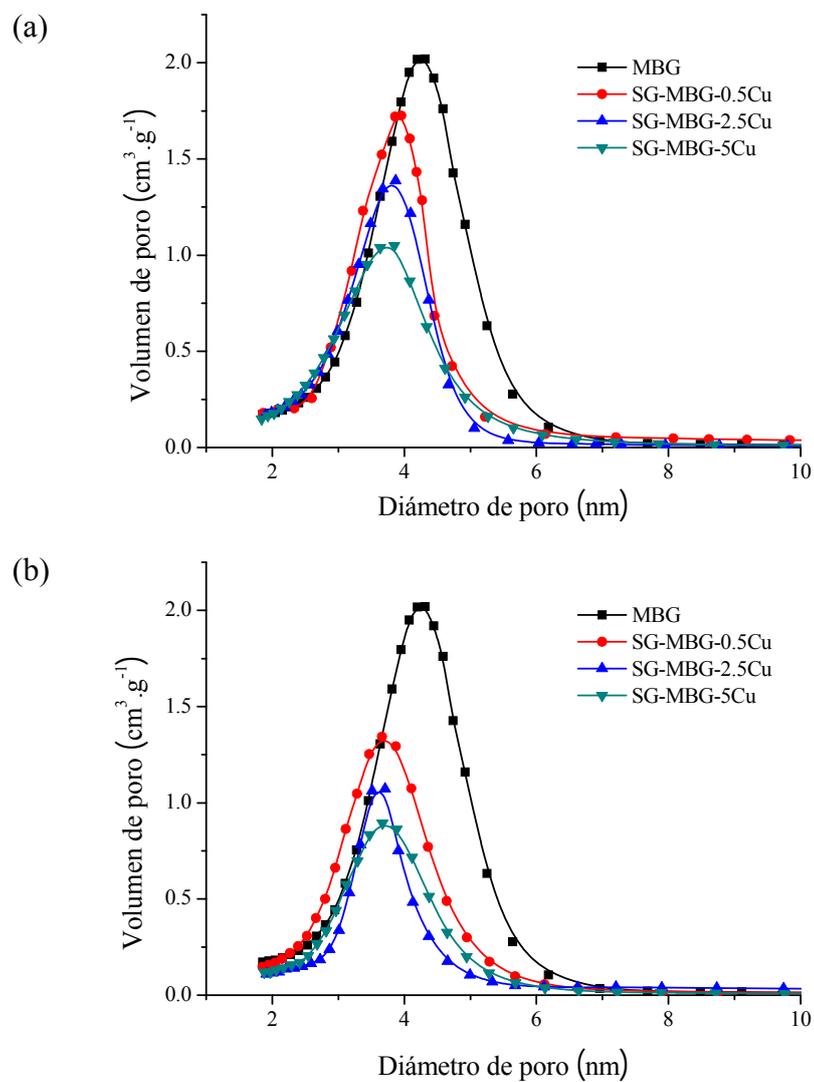


Figura 3.9. Distribuciones BJH de diámetro de poro de los materiales MBG-Cu sintetizados por el método (a) sol-gel e (b) impregnación, respectivamente, obtenidas a partir de la rama de adsorción de la isoterma.

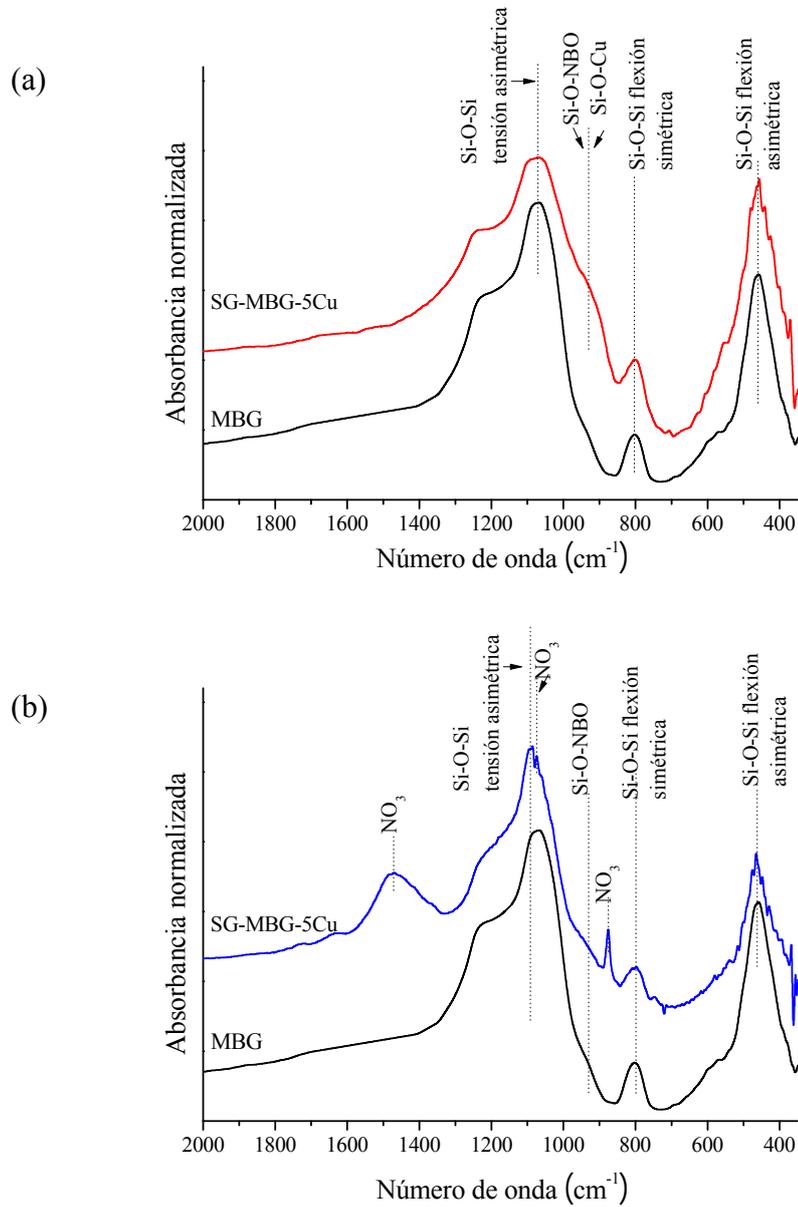


Figura 3.10. Espectros FT-IR para MBG-5Cu (a) sol-gel e (b) impregnación, en contraste con el MBG de referencia.

Para el SG-MBG-Cu se observa un ensanchamiento mayor en las subbandas a $\approx 1200 \text{ cm}^{-1}$, este es otro indicador de mayor desorden estructural, causado por la interacción entre las especies metálicas y la matriz vítrea. También se observa un pequeño desplazamiento en la banda principal que se puede atribuir a la variación de ángulo de enlaces de Si-O-Si, que se ve afectado según el catión metálico que se incorpora en la estructura vítrea.

Otra banda menos intensa alrededor de 965 cm^{-1} corresponde a la frecuencia de vibración de tensión de los grupos Si-O-NBO¹⁷¹⁻¹⁷³. Este tipo de enlace está estrechamente relacionado con la incorporación de óxidos a la sílice vítrea. Los óxidos que penetra en la red poseen un metal más o menos voluminoso y una cierta cantidad de oxígeno. A causa de esta incorporación las unidades SiO₄ se rompen en parte, desapareciendo parcialmente los enlaces Si-O-Si y apareciendo en su lugar grupos Si-O-NBO, en tanto que los iones metálicos se sitúan en los huecos que quedan por esta causa en la red. En los espectros FT-IR obtenidos para el SG-MBG-Cu, esta banda se ensancha ligeramente. Detalle que confirma la aparición de un desorden en la estructura. Por otro lado, algunos autores indican que esta banda puede ser producto de la formación y vibración de enlaces Si-O-Cu^{174,175}. Por lo que, para el caso del SG-MBG-Cu, esta banda se puede atribuir a una contribución parcial de las vibraciones de Si-O-NBO y Si-O-Cu. En los espectros FT-IR para el I-MBG-Cu, se observan las principales bandas asignadas a la red de sílice. También se observa la aparición de nuevas bandas de absorción a 876, 1070 y 1470 cm^{-1} , que están asociadas a especies de N-O, de residuos de la especie nitrato del precursor que no se han eliminado durante el tratamiento de calcinación¹⁷⁵.

En la Figura 3.11 se presentan los espectros Raman de los MBG-5Cu SG e I que son representativos del resto de materiales. Los espectros Raman muestran resultados complementarios a los obtenidos por análisis de FT-IR, ofreciendo información de cómo se organiza la estructura química de los materiales.

De manera general se observa que todos los espectros mantienen similitudes en los picos que se detectan. En este sentido, se identifican los principales modos vibracionales de las especies químicas que componen la red vítrea, cuya unidad estructural básica son los tetraedros de sílice enlazados por oxígenos. Las líneas principales son observadas a 1070 cm^{-1} y a 800 cm^{-1} y corresponden a las continuas vibraciones asimétricas de tensión y flexión, respectivamente, de los oxígenos en configuración tetraedral (Si-O-Si). Mientras que la línea que aparece a los 956 cm^{-1} se le atribuye a la presencia de especies Si-O-NBO que, como se indicó anteriormente está relacionada con el desorden estructural de la matriz vítrea^{168,176-178}

Otra característica del espectro Raman de vidrios a base de SiO_2 , es la presencia de una banda ancha centrada alrededor de los 440 cm^{-1} adscrita a las vibraciones de flexión de los enlaces Si-O-Si (ω_1) que están formando ≥ 5 anillos en la red vítrea. y otra aguda a $\approx 495\text{ cm}^{-1}$. Estas bandas se asocian a movimientos de los átomos de O y a la conformación de anillos en la estructura de la matriz vítrea y se asignan a los modos vibracionales simétricos de tensión y flexión del enlace Si-O-Si, respectivamente. También presenta unas bandas a los 490 y 600 cm^{-1} , denominadas “líneas de defectos”, D_1 y D_2 , que están asociadas a la presencia de anillos de cuatro y tres miembros, respectivamente^{177,179}.

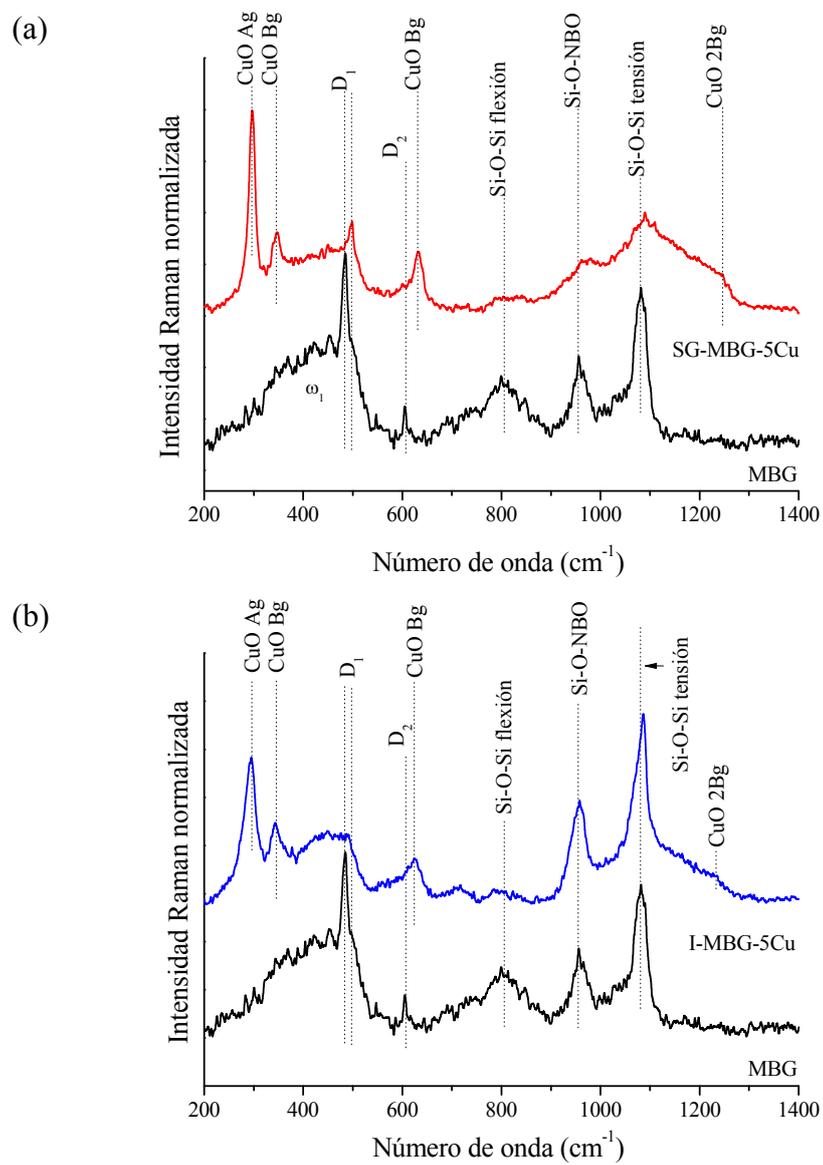


Figura 3.11. Espectros Raman para los MBG-5Cu (a) sol-gel e (b) impregnación, en contraste con el de vidrio de referencia.

En los espectros Raman obtenidos para las muestras MBG-Cu sintetizadas por sol-gel se observa que las bandas correspondientes a las vibraciones de tensión de SiO_4 ($800\text{-}1100\text{ cm}^{-1}$) que conforman la matriz de sílice vítrea se ensanchan, desplazándose ligeramente y disminuyendo en intensidad. Algunos autores sugieren que la incorporación de Cu en sílice por el método sol-gel, da lugar a la formación de silicato de cobre, y que estos cambios en Raman son producidos por la vibración de tensión de ciclosilicatos, con anillos de seis miembros (Si_6O_{18})^{160,180}. Esto pudiera ser un indicativo de que el Cu incorporado por el método sol-gel interactúa estrechamente con la red vítrea. Para las muestras MBG-Cu sintetizadas por el método de impregnación, las bandas correspondientes a los tetraedros se conservan sin cambio aparente. Mientras que, las bandas que aparecen a bajas frecuencias que corresponden a los modos de vibración de flexión y tensión de los O-Si-O que se encuentran conformando anillos, se observa una disminución en la intensidad de la banda para todas las muestras que contienen Cu, lo cual pudiera deberse a interferencias de CuO en la dispersión Raman y que las intensidades del óxido solapan o disimulen la banda de la sílice vítrea a $\approx 490\text{ cm}^{-1}$.

Por otro lado, todos los materiales con Cu se presentan bandas asociadas a CuO. Los espectros exhiben nuevas líneas a 296 , 344 y 629 cm^{-1} , que corresponden a los tres principales modos activos del CuO de fonones ópticos de los tipos Ag y Bg¹⁸¹⁻¹⁸³.

El CuO, tiene una estructura monoclinica y pertenece al grupo espacial de simetría C_{2h}^6 con dos moléculas por celda unidad. Posee nueve fonones ópticos pero sólo tres de ellos son activos en Raman: Ag + 2Bg y corresponden sólo a la vibración de

los átomos de oxígeno¹⁸⁴. La frecuencia Raman de 296 cm^{-1} corresponde al modo de vibración Ag del CuO, mientras que las frecuencias a 347 y 630 cm^{-1} , corresponden al modo Bg según se reporta en la literatura. Aparte de los tres principales modos de vibración anteriores, Wang y col.⁹³ describen una banda ensanchada a altas frecuencias ($\approx 1150\text{ cm}^{-1}$) que se relaciona con el acoplamiento entre fonones y que está asociada a una simetría Bg, que varía según la morfología y tamaño de CuO partículas. En los espectros que corresponden al MBG-Cu se observa una banda ancha alrededor de 1200 cm^{-1} que correspondería a una dispersión multifotónica (2Bg) y que sería un indicio de la formación de CuO nanoestructurado. A partir de estos espectros también se descarta la presencia de Cu₂O, debido a la ausencia de picos para una frecuencia Raman de 225 cm^{-1} , correspondiente a los modos de oscilación característicos del óxido cuproso.

La morfología y textura de la superficie de los MBG-Cu SG e I fueron analizadas por SEM. En la Figura 3.12 se muestran las micrografías obtenidas para el MBG-5Cu, por ambos métodos de síntesis, representativas del resto de los materiales. En las micrografías se puede observar una superficie homogénea, rugosa y porosa sin encontrar cambios evidentes. En las micrografías a mayores magnificaciones se puede observar una porosidad más regular y ordenada para el SG-MBG-5Cu. Para el caso del I-MBG-5Cu es importante destacar que no se ha podido observar la presencia de morfologías atribuidas a agregados o partículas de CuO.

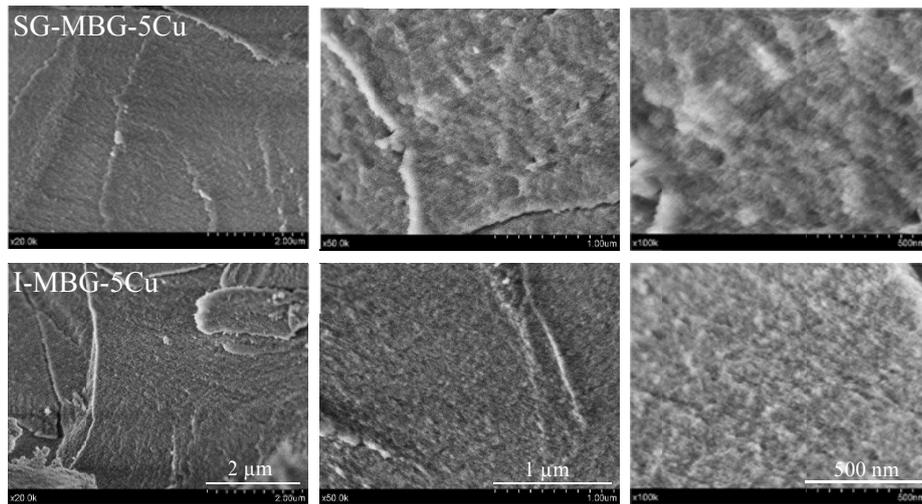
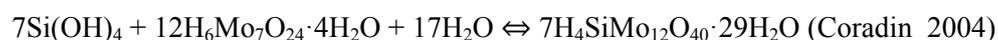


Figura 3.12. Micrografías de SEM de la superficie de materiales MBG-5Cu obtenidas por sol-gel e impregnación.

5.2.2. Ensayo de biodegradabilidad

El ensayo de biodegradación y bioactividad se llevó a cabo monitorizando las concentraciones de sílice disuelta. Para cuantificar el Si iónico se diseñó un protocolo, basándose principalmente en la aplicación del método colorímetro del complejo azul (Heteropoli blue method). Sin embargo, se optó por las modificaciones descritas por Khaler, que se lleva a cabo a valores de pHs más altos (2.4-2.7), para evitar interferencias con el fósforo, y que utiliza como reductor el sulfito de sodio (Na_2SO_3) en lugar del ácido aminonaftolsulfónico del método del azul heteropoli¹⁸⁵.

El método se basa en la reacción de la sílice con el molibdato de amonio en condiciones ácidas para producir un heteropoliácido, ácido silico-12-molibdico, un complejo de color amarillo llamado comúnmente como ácido molibsilísico.



Posteriormente, se reduce el complejo de silicomolibdato con Na_2SO_3 al azul de molibdeno de composición $\text{H}_8\text{Si}(\text{MoO}_7)_6\text{H}_2\text{O}$, cuya absorbancia tiene el máximo en la región espectral de 600-800 nm¹⁸⁵.

5.2.2.1. Protocolo para la determinación de Si por el método UV-Vis

Para la preparación de las soluciones, se usaron molibdato de amonio tetrahidratado ($(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, Sigma-Aldrich, grado 81 %), Na_2SO_3 (Sigma-Aldrich, 97 % anhídrido), solución de silicato de sodio (Sigma-Aldrich) y HCl (Panreac, 37 % en peso).

Para obtener la solución 0.24 M de HCl al 37 % se añaden 2 mL de HCl en un matraz volumétrico y se afora a 100 mL con DIH_2O . Mientras que para las soluciones al 0.08 M de $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ y al 1.35 M de Na_2SO_3 , se prepararon disolviendo 10.2 y 17 g en DIH_2O , respectivamente, y se afora en un matraz volumétrico de 100 mL.

A 500 μL de muestra, se adiciona 250 μL de HCL 0.24 M y posteriormente 250 μL de $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}\cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0.08 M. Se deja reposar 1.5 min para que se forme el complejo de silicomolibdato. Después de este tiempo se añade 500 μL de Na_2SO_3 1.35 M para reducir el complejo. Se deja reposar 3.5 min y se mide inmediatamente, ya que la lectura posterior a este tiempo puede provocar una disminución en la respuesta del análisis, debido a que el complejo de silicomolibdato tiene un tiempo de vida estable de 5 min. Para el blanco se sigue el mismo procedimiento, reemplazando la solución de $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}\cdot 4\text{H}_2\text{O}$ por DIH_2O . La concentración de silicio disuelto en la muestra se obtiene por comparación de una curva de calibración.

5.2.2.2. Curva de calibrado para la determinación de Si por el método UV-Vis

Previamente al análisis de una muestra problema se realizó una curva de calibrado a partir de una solución de concentración conocida. Se preparó una solución patrón, disolviendo 642 μL de silicato de sodio en 1 L de DIH_2O , obteniendo una concentración de $100 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$. A partir de esta solución patrón se hicieron las diluciones correspondientes y se realizó un barrido en un intervalo entre 400 a 800 nm, donde se esperaba encontrar el λ máximo de absorción. Los espectros de absorción obtenidos se observan en la Figura 3.13.

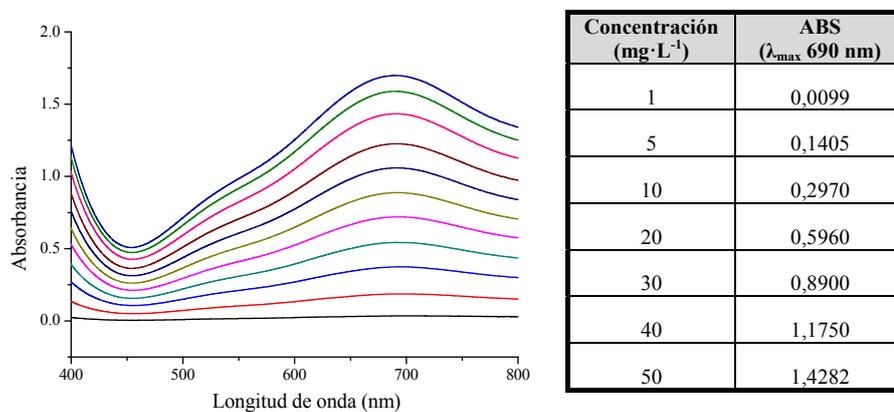


Fig. 3.13. Análisis UV-Vis para distintas concentraciones del compuesto patrón en DIH₂O.

Se tomó la λ de mayor absorción a 690 nm para establecer la curva de calibración y la linealidad de la misma. Como se observa en la Figura 3.14 a, la recta pierde la linealidad a 100 mg·L⁻¹ y la regresión lineal es baja. Sin embargo, se observa un rango lineal en el intervalo de 1 a 50 mg·L⁻¹, donde la correlación (r^2) es prácticamente la unidad.

Las concentraciones de silicio se calcularon por comparación de la curva de calibración que relaciona las absorbancias de los patrones con su contenido de fenol (Ver Figura 3.14 b). La curva de calibración se utilizó para concentraciones inferiores a 50 mg·L⁻¹. En cuanto a las muestras que excedían dicha concentración, fueron diluidas y posteriormente analizadas.

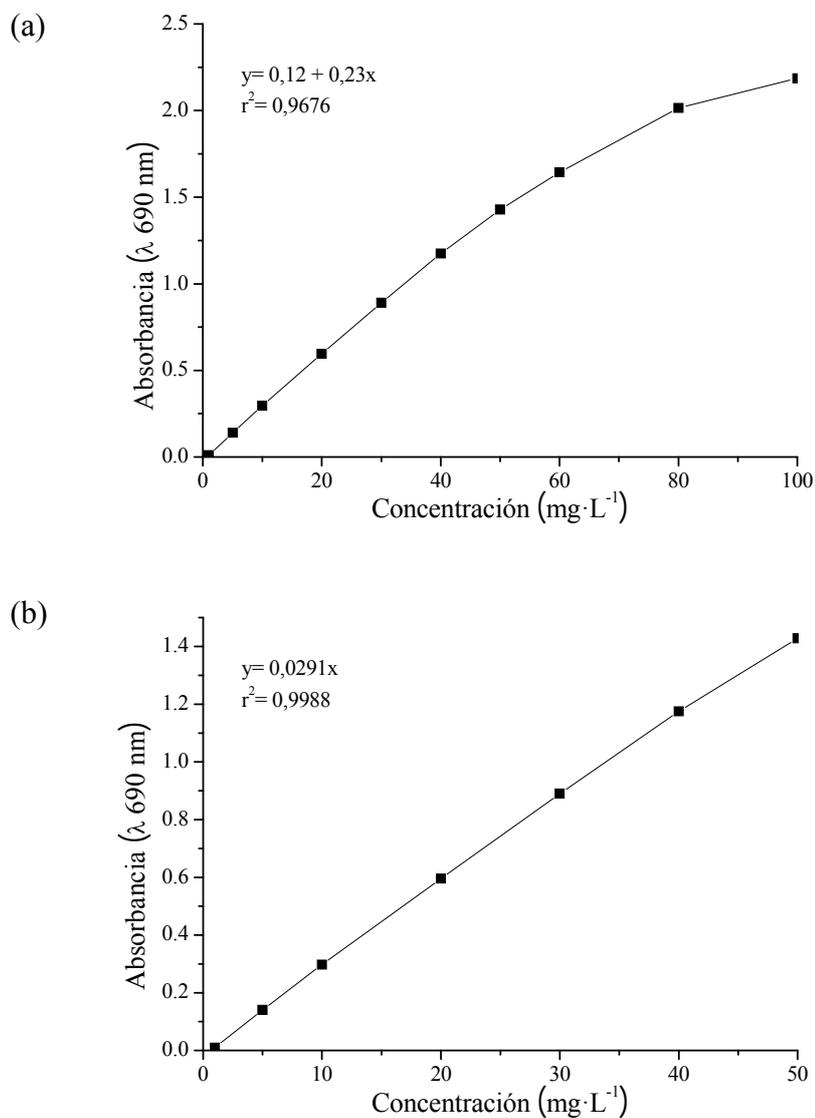


Figura 3.14. Curva de calibrado para determinación de Si iónico en DIH_2O . Los patrones de sílice disuelta se presentan en un intervalo de (a) 0 – 100 y (b) 0 – 50 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$, respectivamente.

5.2.2.3 Seguimiento de la degradación de MBG en DIH₂O utilizando el método UV-Vis

Se ensayaron diferentes relaciones m/v (1, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200 mg·mL⁻¹) de material particulado MBG en DIH₂O para evaluar su efecto en la velocidad de degradación. El ensayo se realizó por duplicado. Se pesó cierta masa de la muestra para obtener la concentración mg·mL⁻¹ correspondiente, considerando un volumen constante de 1.5 mL de DIH₂O, se introduce en un eppendorf de 2 mL y se le añade el DIH₂O. Se traslada a una estufa a 36.5 °C a 60 rpm. Cada 24 h, hasta completar 8 días, se centrifugó durante 3 min a 5000 rpm para tomar una alícuota de 500 µL y se reemplaza la cantidad de volumen por DIH₂O nueva. De la alícuota recogida, se midió la cantidad de Si disuelto por espectrofotometría UV-Vis, empleando el método evaluado en la sección anterior. A partir de la cantidad de los iones de Si en DIH₂O, se calculó la cantidad de masa de Si disuelta y, asumiendo una degradación homogénea y a partir de los datos de composición molar teórica, el porcentaje de degradación total del material. Los datos se recopilan en la Tabla 3.6.

Tabla 3.6. Análisis por UV-Vis de la concentración de Si en DIH₂O cada 24 h, durante 8 días, para diferentes relaciones MBG/DIH₂O m/v.

Relación m/v (mg·mL ⁻¹)	Tiempo en DIH ₂ O (días)	Concentración		% Degradación por día	Acumulativo	
		mg·mL ⁻¹ Si	mg Si		mg Si	% degradación
1	1	81,3	0,12	23,0	0,12	23,0
	2	20,6	0,04	7,8	0,16	30,8
	3	10,5	0,03	5,0	0,19	35,8
	4	18,8	0,06	10,6	0,25	46,4
	5	13,2	0,05	8,7	0,29	55,1
	6	7,9	0,03	6,0	0,32	61,1
	7	6,2	0,03	5,3	0,35	66,4
	8	5,1	0,03	4,8	0,38	71,2

Continuación Tabla 3.6. Análisis por UV-Vis de la concentración de Si en DIH₂O cada 24 h, durante 8 días, para diferentes relaciones MBG/DIH₂O m/v.

Relación m/v (mg·mL ⁻¹)	Tiempo en DIH ₂ O (días)	Concentración		% Degradación por día	Acumulativo	
		mg·mL ⁻¹ Si	mg Si		mg Si	% degradación
5	1	168,9	0,25	9,6	0,25	9,6
	2	72,0	0,14	5,4	0,40	15,0
	3	44,7	0,11	4,2	0,51	19,2
	4	44,9	0,13	5,1	0,64	24,3
	5	42,7	0,15	5,6	0,79	29,9
	6	38,1	0,15	5,8	0,95	35,7
	7	36,3	0,16	6,2	1,11	41,9
	8	32,6	0,16	6,2	1,27	48,0
10	1	189,3	0,28	5,3	0,28	5,3
	2	147,0	0,30	5,6	0,58	11,0
	3	149,6	0,38	7,2	0,96	18,2
	4	88,6	0,26	4,8	1,22	23,0
	5	101,8	0,38	7,1	1,60	30,1
	6	78,8	0,31	5,9	1,91	36,0
	7	74,3	0,33	6,3	2,25	42,4
	8	46,4	0,23	4,3	2,48	46,7
20	1	202,5	0,30	2,9	0,30	2,9
	2	194,3	0,39	3,7	0,69	6,5
	3	134,6	0,34	3,2	1,03	9,7
	4	191,7	0,58	5,4	1,60	15,1
	5	171,2	0,60	5,7	2,20	20,8
	6	152,8	0,61	5,8	2,81	26,6
	7	117,2	0,53	5,0	3,34	31,5
	8	106,9	0,53	5,0	3,88	36,6
30	1	143,5	0,22	1,4	0,22	1,4
	2	146,6	0,29	1,8	0,51	3,2
	3	150,8	0,38	2,4	0,89	5,6
	4	194,9	0,58	3,7	1,47	9,2
	5	190,3	0,67	4,2	2,14	13,4
	6	169,5	0,68	4,3	2,81	17,7
	7	162,5	0,73	4,6	3,55	22,3
	8	173,4	0,87	5,5	4,41	27,7

Continuación Tabla 3.6. Análisis por UV-Vis de la concentración de Si en DIH₂O cada 24 h, durante 8 días, para diferentes relaciones MBG/DIH₂O m/v.

Relación m/v (mg·mL ⁻¹)	Tiempo en DIH ₂ O (días)	Concentración		% Degradación por día	Acumulativo	
		mg·mL ⁻¹ Si	mg Si		mg Si	% degradación
40	1	120,0	0,18	0,8	0,49	0,8
	2	112,7	0,23	1,1	1,16	1,9
	3	100,6	0,25	1,2	1,83	3,1
	4	183,2	0,55	2,6	3,48	5,7
	5	185,8	0,65	3,1	5,42	8,8
	6	176,9	0,71	3,3	7,48	12,1
	7	179,1	0,81	3,8	9,78	15,9
	8	193,6	0,97	4,6	12,50	20,5
50	1	109,8	0,16	0,6	0,16	0,6
	2	116,0	0,23	0,9	0,75	1,5
	3	124,0	0,31	1,2	1,51	2,7
	4	162,4	0,49	1,8	2,68	4,5
	5	179,2	0,63	2,4	4,24	6,9
	6	184,2	0,74	2,8	6,06	9,7
	7	175,2	0,79	3,0	7,99	12,6
	8	202,0	1,01	3,8	10,35	16,4
60	1	109,0	0,16	0,5	0,16	0,51
	2	74,3	0,15	0,5	0,47	0,98
	3	92,3	0,23	0,7	0,95	1,71
	4	172,4	0,52	1,6	2,04	3,33
	5	170,1	0,60	1,9	3,22	5,21
	6	192,6	0,77	2,4	4,80	7,63
	7	146,7	0,66	2,1	6,18	9,71
	8	200,1	1,00	3,1	8,26	12,85
70	1	91,9	0,14	0,4	0,14	0,4
	2	65,8	0,13	0,4	0,40	0,7
	3	55,3	0,14	0,4	0,66	1,1
	4	145,6	0,44	1,2	1,48	2,3
	5	143,4	0,50	1,4	2,41	3,6
	6	161,5	0,65	1,7	3,62	5,4
	7	151,5	0,68	1,8	4,89	7,2
	8	186,0	0,93	2,5	6,59	9,7

Continuación Tabla 3.6. Análisis por UV-Vis de la concentración de Si en DIH₂O cada 24 h, durante 8 días, para diferentes relaciones MBG/DIH₂O m/v.

Relación m/v (mg·mL ⁻¹)	Tiempo en DIH ₂ O (días)	Concentración		% Degradación por día	Acumulativo	
		mg·mL ⁻¹ Si	mg Si		mg Si	% degradación
80	1	93,2	0,14	0,3	0,14	0,3
	2	57,3	0,11	0,3	0,33	0,6
	3	40,0	0,10	0,2	0,51	0,8
	4	146,6	0,44	1,0	1,25	1,9
	5	143,5	0,50	1,2	2,10	3,1
	6	156,8	0,63	1,5	3,16	4,5
	7	152,0	0,68	1,6	4,31	6,2
	8	176,3	0,88	2,1	5,80	8,2
90	1	100,2	0,15	0,3	0,15	0,3
	2	80,2	0,16	0,3	0,37	0,7
	3	52,4	0,13	0,3	0,57	0,9
	4	143,6	0,43	0,9	1,26	1,8
	5	140,8	0,49	1,0	2,02	2,9
	6	163,1	0,65	1,4	3,04	4,2
	7	153,9	0,69	1,5	4,13	5,7
	8	181,6	0,91	1,9	5,55	7,6
100	1	108,7	0,16	0,3	0,16	0,3
	2	45,6	0,09	0,2	0,29	0,5
	3	52,5	0,13	0,2	0,49	0,7
	4	141,8	0,43	0,8	1,10	1,5
	5	133,1	0,47	0,9	1,77	2,4
	6	167,6	0,67	1,3	2,73	3,7
	7	154,7	0,70	1,3	3,70	5,0
	8	197,1	0,99	1,9	5,11	6,8
150	1	102,3	0,15	0,2	0,15	0,2
	2	34,8	0,07	0,1	0,23	0,3
	3	35,0	0,09	0,1	0,33	0,4
	4	129,9	0,39	0,5	0,77	0,9
	5	126,5	0,44	0,6	1,27	1,4
	6	159,6	0,64	0,8	1,99	2,2
	7	163,8	0,74	0,9	2,82	3,2
	8	187,3	0,94	1,2	3,88	4,3

Continuación Tabla 3.6. Análisis por UV-Vis de la concentración de Si en DIH₂O cada 24 h, durante 8 días, para diferentes relaciones MBG/DIH₂O m/v.

Relación m/v (mg·mL ⁻¹)	Tiempo en DIH ₂ O (días)	Concentración		% Degradación por día	Acumulativo	
		mg·mL ⁻¹ Si	mg Si		mg Si	% degradación
200	1	132,1	0,20	0,2	0,20	0,2
	2	36,7	0,07	0,1	0,27	0,3
	3	23,6	0,06	0,1	0,33	0,3
	4	135,7	0,41	0,4	0,72	0,7
	5	127,7	0,45	0,4	1,16	1,1
	6	153,5	0,61	0,6	1,75	1,7
	7	153,5	0,69	0,7	2,42	2,3
	8	175,1	0,88	0,8	3,27	3,2

En este primer ensayo se observa un aumento en la degradación del material al disminuir la relación MBG/DIH₂O m/v. Esta tendencia se observa claramente en la Figura 3.15 en la que se representó el porcentaje de degradación acumulativa del MBG particulado frente al tiempo de inmersión. A partir del gráfico, se encontró que el porcentaje de degradación del material es dependiente de la concentración utilizada para la incubación. Así, a menor relación MBG/DIH₂O m/v, mayor es la concentración de sílice disuelta y el porcentaje de degradación. Por lo tanto, esta dependencia es un punto importante a considerar en los ensayos de bioactividad. Es evidente que a altas relaciones MBG/DIH₂O m/v, hay un menor grado de degradación del material que está relacionado con un proceso de saturación de la solución. Los mejores perfiles de evolución para evaluar biodegradabilidad se observan para relaciones menores a 50 mg·mL⁻¹.

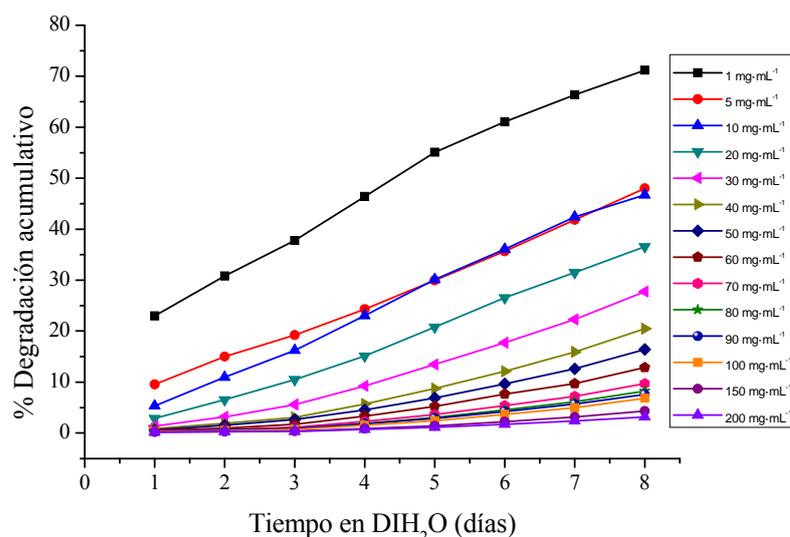


Figura 3.15. Perfil y porcentaje de degradación acumulativo del MBG en DIH₂O durante 8 días de ensayo para diferentes concentraciones.

5.2.2.4. Evolución de la degradación de MBG en DIH₂O con respecto al tiempo utilizando el método de UV-Vis

Del resultado anterior, se eligieron las concentraciones 5, 10, 15 y 20 mg·mL⁻¹ para ampliar el tiempo de ensayo hasta 23 días. Se mantuvieron las mismas condiciones del ensayo. Las diferentes relaciones MBG/H₂O m/v muestran la misma tendencia evolutiva en el tiempo. Como se muestra en la Figura 3.16, la concentración de Si administrado alcanza un nivel estable ≥ 15 días. Se observa una curva que, en los primeros 7 días, el porcentaje de degradación muestra un perfil lineal y a partir de los 15 días evoluciona lentamente en el tiempo. Este comportamiento podemos atribuirlo a que el medio de incubación se satura disminuyendo la velocidad de reactividad superficial.

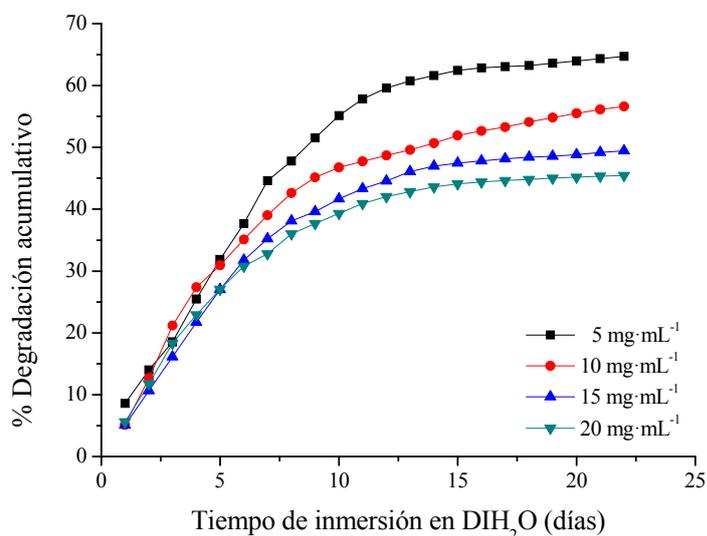


Figura 3.16. Evolución de la degradación del MBG en DIH₂O durante 23 días de ensayo según la concentración de partida.

5.2.2.5. Seguimiento de la degradación de los MBG-5Cu en DIH₂O utilizando el método de UV-Vis

Posteriormente, se procedió a evaluar los materiales incluyendo Cu en su composición por el método directo sol-gel e impregnación, por espectrofotometría UV-Vis, siguiendo el protocolo y las condiciones de los ensayos anteriores. El experimento se llevó a cabo durante 8 días y se eligieron las relaciones MBG-Cu/DIH₂O m/v de 10 y 20 mg·mL⁻¹, para compararlas con el MBG libre de Cu. Los resultados se observan en la Tabla 3.7 y en Figura 3.17, donde se detallan los datos recopilados durante el ensayo y se representa el porcentaje de degradación con respecto al tiempo, respectivamente. Se encontraron perfiles análogos, donde el SG-MBG-Cu presenta un porcentaje de degradación ligeramente mayor, con respecto al I-MBG-Cu y al MBG libre de Cu.

Tabla 3.7 Análisis por UV-Vis de la concentración de Si en DIH₂O cada 24 h, durante 8 días, para diferentes relaciones MBG-Cu/DIH₂O m/v.

Muestra y relación m/v (mg·mL ⁻¹)	Tiempo en DIH ₂ O	Concentración		% Degradación por día	Acumulativo	
		mg·mL ⁻¹ Si	mg Si		mg Si	% degradación
SG-MBG-5Cu 10 mg·mL ⁻¹	1	101,1	0,15	0,2	2,92	2,9
	2	135,6	0,27	0,4	5,21	8,1
	3	175,6	0,44	0,9	8,44	16,6
	4	145,7	0,44	1,3	8,40	25,0
	5	115,4	0,40	1,7	7,77	32,7
	6	82,5	0,33	2,0	6,34	39,1
	7	51,6	0,23	2,3	4,46	43,6
	8	45,0	0,22	2,5	4,32	47,9
I-MBG-5Cu 10 mg·mL ⁻¹	1	88,7	0,13	0,1	2,56	2,6
	2	229,3	0,46	0,6	8,82	11,4
	3	141,5	0,35	0,9	6,80	18,2
	4	98,8	0,30	1,2	5,70	23,9
	5	82,5	0,29	1,5	5,55	29,4
	6	61,8	0,25	1,8	4,76	34,2
	7	55,7	0,25	2,0	4,82	39,0
	8	37,2	0,19	2,2	3,58	42,6
SG-MBG-5Cu 20 mg·mL ⁻¹	1	255,6	0,38	0,4	3,69	3,7
	2	449,9	0,90	1,3	8,65	12,3
	3	224,3	0,56	1,8	5,39	17,7
	4	197,4	0,59	2,4	5,70	23,4
	5	137,3	0,48	2,9	4,62	28,0
	6	123,6	0,49	3,4	4,75	32,8
	7	69,5	0,31	3,7	3,01	35,8
	8	61,2	0,31	4,0	2,94	38,8
I-MBG-5Cu 20 mg·mL ⁻¹	1	222,8	0,33	0,3	3,21	3,2
	2	419,0	0,84	1,2	8,06	11,3
	3	312,7	0,78	2,0	7,52	18,8
	4	211,7	0,64	2,6	6,11	24,9
	5	103,1	0,36	2,9	3,47	28,4
	6	81,8	0,33	3,3	3,15	31,5
	7	55,7	0,25	3,5	2,41	33,9
	8	60,0	0,30	3,8	2,89	36,8

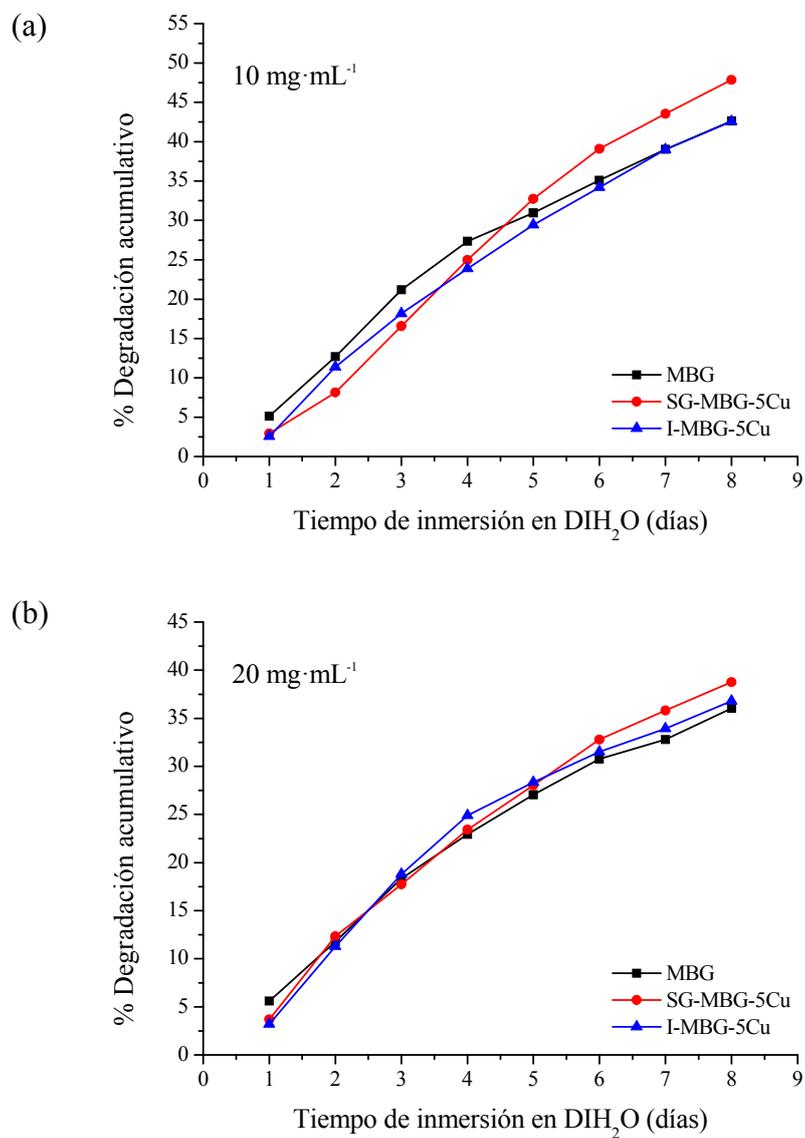


Figura 3.17. Perfiles de degradación de los materiales MBG-5Cu SG e I en DIH₂O durante 8 días a una concentración de (a) 10 y (b) 20 mg·mL⁻¹.

5.2.2.6. Seguimiento de la degradación de los materiales MBG-Cu utilizando en método ICP-MS

Para dar un seguimiento y evaluar los perfiles de los iones Si, Ca, P y Cu, liberados durante la degradación de los materiales MBG-Cu sol-gel e impregnación se analizaron por el método ICP-MS. El ensayo se llevó a cabo en una solución tampón de fosfato salino (PBS, por Phosphate buffer saline) para tener una aproximación a una solución biológica. La preparación del tampón se encuentra en la sección de Anexos. Se pesaron 2 g de los materiales SG-MBG-5Cu e I-MBG-5Cu en 15 mL de PBS, obteniendo una concentración de $133 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$. Durante el experimento, se tomaron alícuotas 5 mL cada 24 h, durante 6 días, reemplazando el volumen por nuevo PBS. A partir de la alícuota, se midieron los iones de Ca, Cu, P y Si disueltos en disolución.

Los resultados se muestran en la Tabla 3.8, donde se observa las concentraciones encontradas para los iones cada 24 h y el acumulativo. El análisis de las concentraciones diaria de los iones Ca y Cu indica una mayor disolución de estos iones los primeros días con una tendencia a disminuir, mientras que la concentración diaria de Si y P parece ir en aumento. En los resultados acumulativos se observa que el material I-MBG-5Cu libera una cantidad mayor de Cu en comparación con el material SG-MBG-5Cu. A partir de la concentración de Si iónico en PBS se estimó la masa, y a partir de este dato se determinó el porcentaje de degradación del material, de acuerdo a la composición molar teórica y considerando una degradación homogénea. Estos resultados se muestran en la Tabla 3.9

En la Figura 3.18, se observa que tienen un perfil de degradación en PBS similar entre los materiales MBG-Cu. Al sexto día y a una concentración de $133 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$

los materiales SG-MBG-5Cu e I-MBG-5Cu presentan una degradación acumulativa de 2.43 y 2.34 %, respectivamente. Este resultado se ajusta a los obtenidos por espectrofotometría UV-Vis. Extrapolando los valores obtenidos para el material MBG en DIH₂O para las concentraciones ensayadas de 100 y 150 mg·mL⁻¹ se obtuvieron 3.7 y 2.2 %, respectivamente

Tabla 3.8. Análisis por ICP-MS de la concentración de Ca, Cu, P y Si, encontrados disueltos en PBS, después de transcurrir los tiempos de experimento, 1, 2, 3, 4, 5 y 6 días, para el MBG-Cu SG e I.

Muestra	Tiempo en PBS (días)	Diario				Acumulativo			
		mg Si	mg Ca	mg P	mg Cu	mg Si	mg Ca	mg P	mg Cu
SG-MBG-5Cu	1	1,00	2,18	0,00571	0,00095	1,00	2,18	0,00571	0,00095
	2	1,41	2,00	0,00861	0,00065	2,41	4,17	0,01432	0,00160
	3	1,92	1,67	0,01361	0,00025	4,32	5,85	0,02793	0,00185
	4	2,92	1,23	0,02735	0,00038	7,25	7,08	0,05528	0,00222
	5	3,89	0,88	0,04270	0,00047	11,13	7,95	0,09798	0,00269
	6	5,70	0,89	0,05180	0,00070	16,83	8,84	0,14978	0,00339
I-MBG-5Cu	1	1,05	2,27	0,00681	0,00375	1,05	2,27	0,00681	0,00375
	2	1,56	1,57	0,01000	0,00264	2,61	3,85	0,01681	0,00639
	3	2,13	1,34	0,01786	0,00209	4,73	5,18	0,03467	0,00848
	4	2,90	1,01	0,03498	0,00119	7,63	6,19	0,06965	0,00966
	5	4,03	0,47	0,08295	0,00088	11,66	6,65	0,15260	0,01054
	6	4,55	0,95	0,06721	0,00094	16,21	7,60	0,21981	0,01148

Tabla 3.8. Seguimiento por ICP-MS de la concentración de Si y el porcentaje de degradación diario y acumulativo, encontrados en PBS cada 24 h, durante los 6 días del ensayo.

Muestra	Tiempo en PBS (días)	Diario		Acumulativo	
		mg Si	% degradación	mg Si	% degradación
SG-MBG-5Cu	1	1,00	0,14	1,000	0,14
	2	1,41	0,20	2,410	0,35
	3	1,92	0,28	4,330	0,62
	4	2,92	0,42	7,250	1,04
	5	3,89	0,56	11,140	1,61
	6	5,70	0,82	16,840	2,43
I-MBG-5Cu	1	1,05	0,14	1,05	0,15
	2	1,56	0,29	2,61	0,38
	3	2,13	0,43	4,73	0,68
	4	2,90	0,58	7,63	1,10
	5	4,03	0,72	11,66	1,68
	6	4,55	0,86	16,21	2,34

El análisis de los materiales mediante EDX después de los 6 días de tratamiento se muestra en la Figura 3.19. Antes de los análisis, el material particulado se lava con DIH_2O durante 15 min ayudándose con un agitador rotatorio para que el lavado fuera uniforme. Posteriormente la muestra se recupera centrifugando y se seca en la estufa a 50 °C durante 24 h y se colocan en un desecador. Los análisis muestran que, a los 6 días, ambos materiales presentan un aumento significativo de la intensidad relativa de los elementos Ca y P, con respecto al Si. Este resultado indica el crecimiento de fases de fosfato de calcio en la superficie de los materiales, característico de los materiales bioactivos⁵¹. Por lo que, mediante EDX, se confirma la bioactividad de los materiales, destacándose el SG-MBG-Cu.

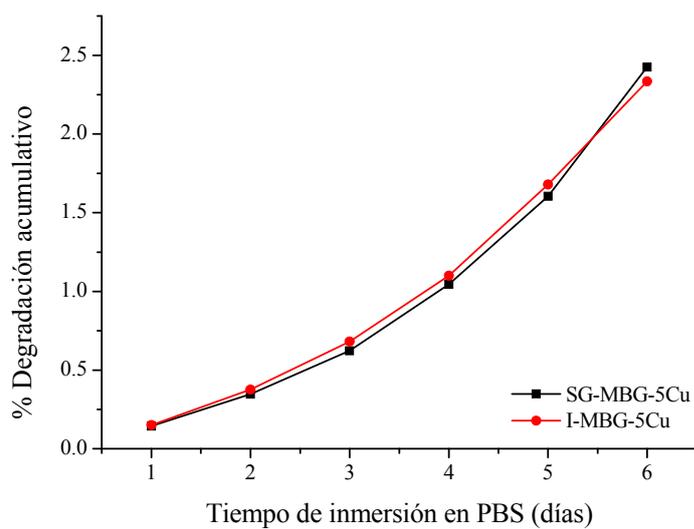


Figura 3.18. Degradación de los materiales SG-MBG-5Cu e I-MBG-5Cu en PBS durante 6 días de ensayo.

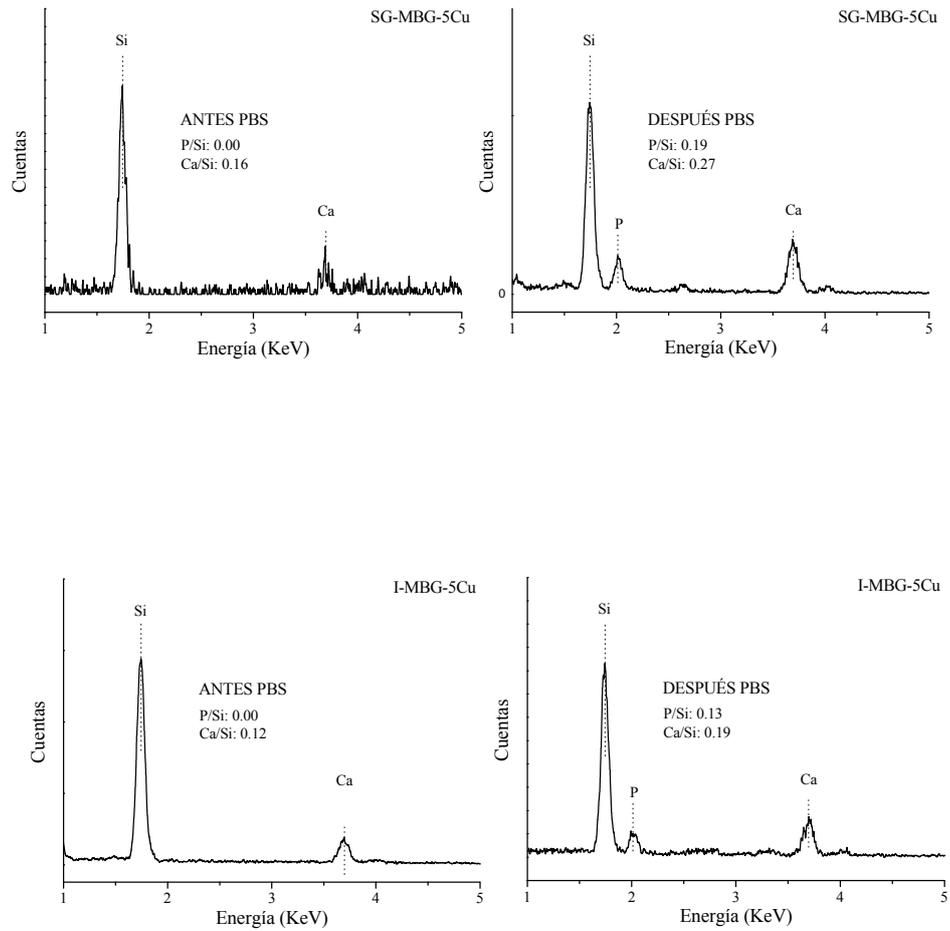


Figura 3.19. Análisis de EDX y relaciones de intensidades para el SG-MBG-5 e I-MBG-5Cu antes y después de los 6 días de tratamiento en PBS.

5.3. Conclusiones

En este capítulo se ha estudiado la incorporación del Cu en la composición del MBG por dos rutas diferentes. Los MBG-Cu obtenidos se han caracterizado evaluando sus propiedades físico-químicas.

- La ruta de una única etapa en el proceso sol-gel permitió una incorporación homogénea del Cu dentro de la red tridimensional que conforma el Si. Los análisis de FT-IR y Raman apuntan a la presencia de enlaces Si-O-Cu. Esto nos sugiere, que aunque el Cu se comporta como un ion modificador dentro de la red vítrea, en cierta medida el método posibilitó la formación de enlaces característicos de los CuSiO_3 . Los análisis de XRD nos indican que al incorporar un 5% mol en la composición del MBG se generan cristales de CuO pequeños o dispersos en la matriz vítrea.
- Durante este trabajo se demostró la viabilidad de utilizar el método de impregnación como ruta alterna para incorporar iones terapéuticos en forma de óxidos dentro de los poros de los MBG. La incorporación de Cu utilizando una segunda etapa de impregnación generó la formación de cristales de CuO más grandes. Además, no se encontraron indicios de formación de ningún enlace Si-O-Cu.
- Los resultados de la caracterización físico-química indican que la incorporación de Cu por las rutas de síntesis ensayas no producen cambios drásticos en los valores de área específica, ni el volumen ni diámetro de poro del material MBG.
- Con los ensayos realizados sobre la biodegradación de los MBG encontramos que la velocidad de degradación de los materiales en DIH_2O es dependiente de la concentración de partida en el medio de incubación.

Además los resultados indican que los materiales presentan un perfil de degradación lineal hasta los 15 días, y partir de ese tiempo se observa una tendencia a alcanzar el equilibrio de reacción por cambios en el gradiente de concentración del medio de incubación.

- Los resultados sobre la biodegradación de los materiales SG-MBG-5Cu e I-MBG-5Cu muestran un perfil de degradación análogo al MBG, de acuerdo a la concentración de Si encontrada en el medio de incubación por UV-Vis. En los análisis por ICP-MS se encontró que durante la degradación del material I-MBG-5Cu en PBS hay mayor liberación de Cu al medio. Esto último que es más fácil la disolución de los cristales CuO que se han formado en los poros del material I-MBG-5Cu que la disolución del Cu incorporado en la matriz de sílice.
- El conjunto de las características observadas en los SG-MBG-Cu e I-MBG-Cu, como son sus propiedades texturales, biodegradabilidad, bioactividad, incluyendo la liberación del ion Cu, sugiere que son materiales muy interesantes para su aplicación en terapias de regeneración tisular.

6. Referencias

- (1) Yan, X.; Yu, C.; Zhou, X.; Tang, J.; Zhao, D. Highly Ordered Mesoporous Bioactive Glasses with Superior In Vitro Bone-Forming Bioactivities. *Angew Chem Int Ed* **2004**, *43*, 5980–5984.
- (2) Vallet-Regí, M. Ordered Mesoporous Materials in the Context of Drug Delivery Systems and Bone Tissue Engineering. *Chem. - A Eur. J.* **2006**, *12* (23), 5934–5943.
- (3) Yan, X.; Huang, X.; Yu, C.; Deng, H.; Wang, Y.; Zhang, Z.; Qiao, S.; Lu, G.; Zhao, D. The in-Vitro Bioactivity of Mesoporous Bioactive Glasses. *Biomaterials* **2006**, *27* (18), 3396–3403.

- (4) Xia, W.; Chang, J. Well-Ordered Mesoporous Bioactive Glasses (MBG): A Promising Bioactive Drug Delivery System. *J. Control. Release* **2006**, *110* (3), 522–530.
- (5) López-Noriega, A.; Arcos, D.; Izquierdo-Barba, I.; Sakamoto, Y.; Terasaki, O.; Vallet-Regí, M. Ordered Mesoporous Bioactive Glasses for Bone Tissue Regeneration. *Chem. Mater.* **2006**, *18* (13), 3137–3144.
- (6) Zhao, L.; Yan, X.; Zhou, X.; Zhou, L.; Wang, H.; Tang, J.; Yu, C. Mesoporous Bioactive Glasses for Controlled Drug Release. *Microporous Mesoporous Mater.* **2008**, *109* (1-3), 210–215.
- (7) López-Noriega, A.; Arcos, D.; Vallet-Regí, M. Functionalizing Mesoporous Bioglasses for Long-Term Anti-Osteoporotic Drug Delivery. *Chem. - A Eur. J.* **2010**, *16* (35), 10879–10886.
- (8) Alcaide, M.; Portolés, P.; López-Noriega, a.; Arcos, D.; Vallet-Regí, M.; Portolés, M. T. Interaction of an Ordered Mesoporous Bioactive Glass with Osteoblasts, Fibroblasts and Lymphocytes, Demonstrating Its Biocompatibility as a Potential Bone Graft Material. *Acta Biomater.* **2010**, *6* (3), 892–899.
- (9) Wu, C.; Chang, J. Mesoporous Bioactive Glasses: Structure Characteristics, Drug/growth Factor Delivery and Bone Regeneration Application. *Interface Focus* **2012**, *2*, 292–306.
- (10) Beattie, J. H.; Avenell, A. Trace Element Nutrition and Bone Metabolism. **1992**, No. 1992, 167–188.
- (11) Palacios, C. The Role of Nutrients in Bone Health, from A to Z. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **2006**, *46*, 621–628.
- (12) Habibovic, P.; Barralet, J. E. Bioinorganics and Biomaterials: Bone Repair. *Acta Biomater.* **2011**, *7* (8), 3013–3026.
- (13) Lang, C.; Murgia, C.; Leong, M.; Tan, L.; Perozzi, G.; Knight, D.; Ruffin, R.; Zalewski, P. Anti-Inflammatory Effects of Zinc and Alterations in Zinc Transporter mRNA in Mouse Models of Allergic Inflammation. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* **2007**, *292* (2), L577–L584.

- (14) Esteban-Tejeda, L.; Malpartida, F.; Esteban-Cubillo, A.; Pecharromán, C.; Moya, J. S. Antibacterial and Antifungal Activity of a Soda-Lime Glass Containing Copper Nanoparticles. *Nanotechnology* **2009**, *20* (50), 505701–505706.
- (15) Mourino, V.; Cattalini, J. P.; Boccaccini, A. R. Metallic Ions as Therapeutic Agents in Tissue Engineering Scaffolds: An Overview of Their Biological Applications and Strategies for New Developments. *J. R. Soc. Interface* **2012**, *9* (68), 401–419.
- (16) Shirtliff, V. J.; Hench, L. L. Bioactive Materials for Tissue Engineering Scaffolds. *Expert Rev. Med. Devices* **2005**, *2* (3), 303–317.
- (17) Wu, C.; Fan, W.; Zhu, Y.; Gelinsky, M.; Chang, J.; Cuniberti, G.; Albrecht, V.; Friis, T.; Xiao, Y. Multifunctional Magnetic Mesoporous Bioactive Glass Scaffolds with a Hierarchical Pore Structure. *Acta Biomater.* **2011**, *7* (10), 3563–3572.
- (18) Li, X.; Wang, X.; Hua, Z.; Shi, J. One-Pot Synthesis of Magnetic and Mesoporous Bioactive Glass Composites and Their Sustained Drug Release Property. *Acta Mater.* **2008**, *56* (13), 3260–3265.
- (19) Zhu, Y.; Li, X.; Yang, J.; Wang, S.; Gao, H.; Hanagata, N. Composition–structure–property Relationships of the CaO–MxOy–SiO₂–P₂O₅ (M = Zr, Mg, Sr) Mesoporous Bioactive Glass (MBG) Scaffolds. *J. Mater. Chem.* **2011**, *21* (25), 9208.
- (20) Wang, X.; Li, X.; Ito, A.; Sogo, Y. Synthesis and Characterization of Hierarchically Macroporous and Mesoporous CaO–MO–SiO₂–P₂O₅ (M = Mg, Zn, Sr) Bioactive Glass Scaffolds. *Acta Biomater.* **2011**, *7* (10), 3638–3644.
- (21) Li, X.; Wang, X.; He, D.; Shi, J. Synthesis and Characterization of Mesoporous CaO–MO–SiO₂–P₂O₅ (M = Mg, Zn, Cu) Bioactive Glasses/composites. *J. Mater. Chem.* **2008**, *18*, 4103.
- (22) Salinas, A. J.; Shruti, S.; Malavasi, G.; Menabue, L.; Vallet-Regí, M. Substitutions of Cerium, Gallium and Zinc in Ordered Mesoporous Bioactive Glasses. *Acta Biomater.* **2011**, *7* (9), 3452–3458.

- (23) Shruti, S.; Salinas, A. J.; Lusvardi, G.; Malavasi, G.; Menabue, L.; Vallet-Regi, M. Mesoporous Bioactive Scaffolds Prepared with Cerium-, Gallium- and Zinc-Containing Glasses. *Acta Biomater.* **2013**, *9* (1), 4836–4844.
- (24) Zhu, Y.; Zhang, Y.; Wu, C.; Fang, Y.; Yang, J.; Wang, S. The Effect of Zirconium Incorporation on the Physiochemical and Biological Properties of Mesoporous Bioactive Glasses Scaffolds. *Microporous Mesoporous Mater.* **2011**, *143* (2-3), 311–319.
- (25) Sanchez-Salcedo, S.; Shruti, S.; Salinas, A. J.; Malavasi, G.; Menabue, L.; Vallet-Regi, M. In Vitro Antibacterial Capacity and Cytocompatibility of SiO₂-CaO-P₂O₅ Meso-Macroporous Glass Scaffolds Enriched with ZnO. *J. Mater. Chem. B* **2014**, *2* (30), 4836–4847.
- (26) Atkinson, I.; Anghel, E. M.; Predoana, L.; Mocioiu, O. C.; Jecu, L.; Raut, I.; Munteanu, C.; Culita, D.; Zaharescu, M. Influence of ZnO Addition on the Structural, in Vitro Behavior and Antimicrobial Activity of Sol-gel Derived CaO-P₂O₅-SiO₂ Bioactive Glasses. *Ceram. Int.* **2016**, *42* (2), 3033–3045.
- (27) Wu, C.; Zhou, Y.; Lin, C.; Chang, J.; Xiao, Y. Strontium-Containing Mesoporous Bioactive Glass Scaffolds with Improved Osteogenic/cementogenic Differentiation of Periodontal Ligament Cells for Periodontal Tissue Engineering. *Acta Biomater.* **2012**, *8* (10), 3805–3815.
- (28) Zhang, Y.; Wei, L.; Chang, J.; Miron, R. J.; Shi, B.; Yi, S.; Wu, C. Strontium-Incorporated Mesoporous Bioactive Glass Scaffolds Stimulating in Vitro Proliferation and Differentiation of Bone Marrow Stromal Cells and in Vivo Regeneration of Osteoporotic Bone Defects. *J. Mater. Chem. B* **2013**, *1* (41), 5711.
- (29) Wu, C.; Zhou, Y.; Fan, W.; Han, P.; Chang, J.; Yuen, J.; Zhang, M.; Xiao, Y. Hypoxia-Mimicking Mesoporous Bioactive Glass Scaffolds with Controllable Cobalt Ion Release for Bone Tissue Engineering. *Biomaterials* **2012**, *33* (7), 2076–2085.
- (30) Wu, C.; Miron, R.; Sculean, A.; Kaskel, S.; Doert, T.; Schulze, R.; Zhang, Y. Proliferation, Differentiation and Gene Expression of Osteoblasts in Boron-Containing Associated with Dexamethasone Deliver from

- Mesoporous Bioactive Glass Scaffolds. *Biomaterials* **2011**, 32 (29), 7068–7078.
- (31) Wu, C.; Xia, L.; Han, P.; Mao, L.; Wang, J.; Zhai, D.; Fang, B.; Chang, J.; Xiao, Y. Europium-Containing Mesoporous Bioactive Glass Scaffolds for Stimulating in Vitro and in Vivo Osteogenesis. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2016**, 8 (18), 11342–11354.
- (32) Lin, H.; Zhang, J.; Qu, F.; Jiang, J.; Jiang, P. In Vitro Hydroxyapatite-Forming Ability and Antimicrobial Properties of Mesoporous Bioactive Glasses Doped with Ti/Ag. *J. Nanomater.* **2013**, 1–8.
- (33) Gargiulo, N.; Cusano, A. M.; Causa, F.; Caputo, F.; Netti, P. A. Silver-Containing Mesoporous Bioactive Glass with Improved Antibacterial Properties. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **2013**, 24 (9), 2129–2135.
- (34) Wu, C.; Zhou, Y.; Xu, M.; Han, P.; Chen, L.; Chang, J.; Xiao, Y. Copper-Containing Mesoporous Bioactive Glass Scaffolds with Multifunctional Properties of Angiogenesis Capacity, Osteostimulation and Antibacterial Activity. *Biomaterials* **2013**, 34 (2), 422–433.
- (35) Zhu, Y.; Wu, C.; Ramaswamy, Y.; Kockrick, E.; Simon, P.; Kaskel, S.; Zreiqat, H. Preparation, Characterization and in Vitro Bioactivity of Mesoporous Bioactive Glasses (MBGs) Scaffolds for Bone Tissue Engineering. *Microporous Mesoporous Mater.* **2008**, 112 (1-3), 494–503.
- (36) Wu, C.; Zhang, Y.; Zhou, Y.; Fan, W.; Xiao, Y. A Comparative Study of Mesoporous Glass/silk and Non-Mesoporous Glass/silk Scaffolds: Physicochemistry and in Vivo Osteogenesis. *Acta Biomater.* **2011**, 7 (5), 2229–2236.
- (37) El-Ghannam, A.; Ducheyne, P.; Shapiro, I. M. Formation of Surface Reaction Products on Bioactive Glass and Their Effects on the Expression of the Osteoblastic Phenotype and the Deposition of Mineralized Extracellular Matrix. *Biomaterials* **1997**, 18 (4), 295–303.
- (38) Olmo, N.; Martín, A. I.; Salinas, A. J.; Turnay, J.; Vallet-Regí, M.; Lizarbe, M. A. Bioactive Sol-Gel Glasses with and without a Hydroxycarbonate Apatite Layer as Substrates for Osteoblast Cell Adhesion and Proliferation. *Biomaterials* **2003**, 24 (20), 3383–3393.

- (39) Carlisle, E. M. Silicon : A Possible Factor in Bone Calcification. *Science* (80-.). **1970**, *167* (3916), 279–280.
- (40) Zhou, Y.; Wu, C.; Xiao, Y. The Stimulation of Proliferation and Differentiation of Periodontal Ligament Cells by the Ionic Products from Ca₇Si₂P₂O₁₆ Bioceramics. *Acta Biomater.* **2012**, *8* (6), 2307–2316.
- (41) Wu, C.; Chang, J.; Wei, F. Bioactive Mesoporous Calcium-Silicate Nanoparticles with Excellent Mineralization Ability, Osteostimulation, Drug-Delivery and Antibacterial Properties for Filling Apex Roots of Teeth. *J. Mater. Chem.* **2012**, *22* (33), 16801–16809.
- (42) Li, H.; Chang, J. Bioactive Silicate Materials Stimulate Angiogenesis in Fibroblast and Endothelial Cell Co-Culture System through Paracrine Effect. *Acta Biomater.* **2013**, *9* (6), 6981–6991.
- (43) Li, H.; Xue, K.; Kong, N.; Liu, K.; Chang, J. Silicate Bioceramics Enhanced Vascularization and Osteogenesis through Stimulating Interactions between Endothelia Cells and Bone Marrow Stromal Cells. *Biomaterials* **2014**, *35* (12), 3803–3818.
- (44) Kong, N.; Lin, K.; Li, H.; Chang, J. Synergy Effects of Copper and Silicon Ions on Stimulation of Vascularization by Copper-Doped Calcium Silicate. *J. Mater. Chem. B* **2014**, *2*, 1100–1110.
- (45) Vallet-Regí, M.; Ragel, C. V.; Salinas, A. J. Glasses with Medical Applications. *Eur. J. Inorg. Chem.* **2003**, *2003*, 1029–1042.
- (46) Martin, R. A.; Yue, S.; Hanna, J. V.; Lee, P. D.; Newport, R. J.; Smith, M. E.; Jones, J. R. Characterizing the Hierarchical Structures of Bioactive Sol-Gel Silicate Glass and Hybrid Scaffolds for Bone Regeneration. *Philos. Trans. R. Soc. A* **2012**, *370*, 1422–1443.
- (47) Hoppe, A.; Güldal, N. S.; Boccaccini, A. R. A Review of the Biological Response to Ionic Dissolution Products from Bioactive Glasses and Glass-Ceramics. *Biomaterials* **2011**, *32* (11), 2757–2774.
- (48) García, A.; Cicuéndez, M.; Izquierdo-Barba, I.; Arcos, D.; Vallet-Regí, M. Essential Role of Calcium Phosphate Heterogeneities in 2D-Hexagonal and

- 3D-Cubic SiO₂-CaO-P₂O₅ Mesoporous Bioactive Glasses. *Chem. Mater.* **2009**, *21* (22), 5474–5484.
- (49) Zhao, S.; Li, Y.; Li, D. Synthesis of CaO-SiO₂-P₂O₅ Mesoporous Bioactive Glasses with High P₂O₅ Content by Evaporation Induced Self Assembly Process. *J Mater Sci Mater Med* **2011**, *22*, 201–208.
- (50) Gunawidjaja, P. N.; Lo, A. Y. H.; Izquierdo-Barba, I.; García, A.; Arcos, D.; Stevansson, B.; Grins, J.; Vallet-Regí, M.; Edén, M. Biomimetic Apatite Mineralization Mechanisms of Mesoporous Bioactive Glasses as Probed by Multinuclear ³¹P, ²⁹Si, ²³Na and ¹³C Solid-State NMR. *J. Phys. Chem. C* **2010**, *114* (45), 19345–19356.
- (51) Jones, J. R. Reprint of: Review of Bioactive Glass: From Hench to Hybrids. *Acta Biomater.* **2015**, *9*, 4457–4486.
- (52) Vichery, C.; Nedelec, J. Bioactive Glass Nanoparticles: From Synthesis to Materials Design for Biomedical Applications. *Materials (Basel)*. **2016**, *9* (4), 288.
- (53) Solomons, N. W. Biochemical, Metabolic, and Clinical Role of Copper in Human Nutrition. *J. Am. Coll. Nutr.* **1985**, *4* (1), 83–105.
- (54) Danks, D. M. Copper Deficiency in Humans. *Ann Rev Nutr* **1988**, *8* (2), 235–257.
- (55) Cordano, A.; Baertl, J. M.; Graham, G. G. Copper Deficiency in Infancy. *Pediatrics* **1964**, *34*, 324–336.
- (56) Tuderman, L.; Myllylä, R.; Kivirikko, K. I. Mechanism of the Prolyl Hydroxylase Reaction. *Eur. J. Biochem.* **1977**, *80* (2), 341–348.
- (57) O'Dell, B. L. Roles for Iron and Copper in Connective Tissue Biosynthesis. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* **1981**, *294*, 91–104.
- (58) Siegel, R. C.; Page, R. C.; Martin, G. R. The Relative Activity of Connective Tissue Lysyl Oxidase and Plasma Amine Oxidase on Collagen and Elastin Substrates. *BBA - Gen. Subj.* **1970**, *222* (2), 552–555.

- (59) Rucker, R. B.; Riggins, R. S.; Laughlin, R.; Chan, M. . .; Chen, M.; Tom, K. Effects of Nutritional Copper Deficiency on the Biomechanical Properties of Bone and Arterial Elastin Metabolism in the Chick. *J. Nutr.* **1975**, *105* (8), 1062–1070.
- (60) Farquharson, C.; Duncan, A.; Robins, S. P. The Effects of Copper Deficiency on the Pyridinium Crosslinks of Mature Collagen in the Rat Skeleton and Cardiovascular System. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **1989**, *192* (42973), 166–171.
- (61) Jonas, J.; Burns, J.; Abel, E. W.; Cresswell, M. J.; Strain, J. J.; Paterson, C. R. Impaired Mechanical Strength of Bone in Experimental Copper Deficiency. *Ann Nutr Metab* **1993**, *37*, 245–252.
- (62) Vincent, M.; Hartemann, P.; Engels-Deutsch, M. Antimicrobial Applications of Copper. *Int. J. Hyg. Environ. Health* **2016**, *219* (7), 585–591.
- (63) Rodríguez, J. . .; Ríos, S.; González, M. Modulation of the Proliferation and Differentiation of Human Mesenchymal Stem Cells by Copper. *J. Cell. Biochem.* **2002**, *85*, 92–100.
- (64) Nasulewicz, A.; Mazur, A.; Opolski, A. Role of Copper in Tumour Angiogenesis--Clinical Implications. *J. Trace Elem. Med. Biol.* **2004**, *18*, 1–8.
- (65) Harris, E. D. A Requirement for Copper in Angiogenesis. *Nutr. Rev.* **2004**, *62* (2), 60–64.
- (66) Kim, T. N.; Feng, Q. L.; Kim, J. O.; Wu, J.; Wang, H.; Chen, G. C.; Cui, F. Z. Antimicrobial Effects of Metal Ions (Ag⁺, Cu²⁺, Zn²⁺) in Hydroxyapatite. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **1998**, *9*, 129–134.
- (67) Yang, H.; Xiao, B.; Xu, K. Synthesis and Characterization of Ag/Cu/HAP with Platelet Morphology. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **2009**, *20* (3), 785–792.
- (68) Matsumoto, N.; Sato, K.; Yoshida, K.; Hashimoto, K.; Toda, Y. Preparation and Characterization of B-Tricalcium Phosphate Co-Doped with

- Monovalent and Divalent Antibacterial Metal Ions. *Acta Biomater.* **2009**, *5* (8), 3157–3164.
- (69) Zhao, C. X.; Zhang, W. D.; Mai, A. P.; Huang, X. M.; Ouyang, Y. S. Synthesis and Characterization of Waterborne Polyurethane/Cu(II)-Loaded Hydroxyapatite Nanocomposites with Antibacterial Activity. *J. Nanosci. Nanotechnol.* **2011**, *11* (8), 6779–6787.
- (70) Shanmugam, S.; Gopal, B. Copper Substituted Hydroxyapatite and Fluorapatite: Synthesis, Characterization and Antimicrobial Properties. *Ceram. Int.* **2014**, *40* (10), 15655–15662.
- (71) Hsieh, J. H.; Wang, C. M.; Li, C. Deposition and Characterization of TaN-Cu Nanocomposite Thin Films. *Surf. Coatings Technol.* **2006**, *200*, 3179–3183.
- (72) Liu, P. C.; Hsieh, J. H.; Li, C.; Chang, Y. K.; Yang, C. C. Dissolution of Cu Nanoparticles and Antibacterial Behaviors of TaN-Cu Nanocomposite Thin Films. *Thin Solid Films* **2009**, *517* (17), 4956–4960.
- (73) Heidenau, F.; Mittelmeier, W.; Detsch, R.; Haenle, M.; Stenzel, F.; Ziegler, G.; Gollwitzer, H. A Novel Antibacterial Titania Coating: Metal Ion Toxicity and in Vitro Surface Colonization. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **2005**, *16* (10), 883–888.
- (74) Zhang, E.; Li, F.; Wang, H.; Liu, J.; Wang, C.; Li, M.; Yang, K. A New Antibacterial Titanium-Copper Sintered Alloy: Preparation and Antibacterial Property. *Mater. Sci. Eng. C* **2013**, *33* (7), 4280–4287.
- (75) Ren, L.; Ma, Z.; Li, M.; Zhang, Y.; Liu, W.; Liao, Z.; Yang, K. Antibacterial Properties of Ti-6Al-4V-xCu Alloys. *J. Mater. Sci. Technol.* **2014**, *30* (7), 699–705.
- (76) Wu, Q.; Li, J.; Zhang, W.; Qian, H.; She, W.; Pan, H.; Wen, J.; Zhang, X.; Liu, X.; Jiang, X. Antibacterial Property, Angiogenic and Osteogenic Activity of Cu-Incorporated TiO₂ Coating. *J. Mater. Chem. B* **2014**, *2* (39), 6738–6748.

- (77) Bai, B.; Zhang, E.; Dong, H.; Liu, J. Biocompatibility of Antibacterial Ti-Cu Sintered Alloy: In Vivo Bone Response. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **2015**, *26* (12), 1–12.
- (78) Huang, Y.; Zhang, X.; Zhao, R.; Mao, H.; Yan, Y.; Pang, X. Antibacterial Efficacy, Corrosion Resistance, and Cytotoxicity Studies of Copper-Substituted Carbonated Hydroxyapatite Coating on Titanium Substrate. *J. Mater. Sci.* **2015**, *50* (4), 1688–1700.
- (79) Yu, L.; Jin, G.; Ouyang, L.; Wang, D.; Qiao, Y.; Liu, X. Antibacterial Activity, Osteogenic and Angiogenic Behaviors of Copper-Bearing Titanium Synthesized by PIII&D. *J. Mater. Chem. B* **2016**, *4* (7), 1296–1309.
- (80) Giavaresi, G.; Torricelli, P.; Fornasari, P. M.; Giardino, R.; Barbucci, R.; Leone, G. Blood Vessel Formation after Soft-Tissue Implantation of Hyaluronan-Based Hydrogel Supplemented with Copper Ions. *Biomaterials* **2005**, *26* (16), 3001–3008.
- (81) Delgado, K.; Quijada, R.; Palma, R.; Palza, H. Polypropylene with Embedded Copper Metal or Copper Oxide Nanoparticles as a Novel Plastic Antimicrobial Agent. *Lett. Appl. Microbiol.* **2011**, *53* (1), 50–54.
- (82) Ahmad, Z.; Vargas-Reus, M. A.; Bakhshi, R.; Ryan, F.; Ren, G. G.; Oktar, F.; Allaker, R. P. Antimicrobial Properties of Electrically Formed Elastomeric Polyurethane-Copper Oxide Nanocomposites for Medical and Dental Applications. *Methods Enzymol.* **2012**, *509*, 87–99.
- (83) Gosau, M.; Prantl, L.; Feldmann, M.; Kokott, A.; Hahnel, S.; Burgers, R. The Effects of Copper Additives on the Quantity and Cell Viability of Adherent Staphylococcus Epidermidis in Silicone Implants. *Biofouling* **2010**, *26* (3), 359–365.
- (84) Gosau, M.; Bürgers, R.; Vollkommer, T.; Holzmann, T.; Prantl, L. Effectiveness of Antibacterial Copper Additives in Silicone Implants. *J. Biomater. Appl.* **2013**, *28* (2), 187–198.
- (85) Chai, H.; Guo, L.; Wang, X.; Fu, Y.; Guan, J.; Tan, L.; Ren, L.; Yang, K. Antibacterial Effect of 317L Stainless Steel Contained Copper in Prevention

- of Implant-Related Infection in Vitro and in Vivo. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **2011**, 22 (11), 2525–2535.
- (86) Ren, L.; Wong, H. M.; Yan, C. H.; Yeung, K. W. K.; Yang, K. Osteogenic Ability of Cu-Bearing Stainless Steel. *J. Biomed. Mater. Res. - Part B Appl. Biomater.* **2015**, 103 (7), 1433–1444.
- (87) Ren, L.; Xu, L.; Feng, J.; Zhang, Y.; Yang, K. In Vitro Study of Role of Trace Amount of Cu Release from Cu-Bearing Stainless Steel Targeting for Reduction of in-Stent Restenosis. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **2012**, 23 (5), 1235–1245.
- (88) Zhang, D.; Ren, L.; Zhang, Y.; Xue, N.; Yang, K.; Zhong, M. Antibacterial Activity against *Porphyromonas Gingivalis* and Biological Characteristics of Antibacterial Stainless Steel. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* **2013**, 105, 51–57.
- (89) Barralet, J.; Gbureck, U.; Habibovic, P.; Vorndran, E.; Gerard, C.; Doillon, C. J. Angiogenesis in Calcium Phosphate Scaffolds by Inorganic Copper Ion Release. **2009**, 15 (7).
- (90) Tian, T.; Wu, C.; Chang, J. Preparation and in Vitro Osteogenic, Angiogenic and Antibacterial Properties of Cuprorivaite (CaCuSi₄O₁₀, Cup) Bioceramics. *RSC Adv.* **2016**, 6 (51), 45840–45849.
- (91) Erol, M. M.; Mouriño, V.; Newby, P.; Chatzistavrou, X.; Roether, J. A.; Hupa, L.; Boccaccini, A. R. Copper-Releasing, Boron-Containing Bioactive Glass-Based Scaffolds Coated with Alginate for Bone Tissue Engineering. *Acta Biomater.* **2012**, 8 (2), 792–801.
- (92) Wang, H.; Zhao, S.; Zhou, J.; Shen, Y.; Huang, W.; Zhang, C.; Rahaman, M. N.; Wang, D. Evaluation of Borate Bioactive Glass Scaffolds as a Controlled Delivery System for Copper Ions in Stimulating Osteogenesis and Angiogenesis in Bone Healing. *J. Mater. Chem. B* **2014**, 2 (48), 8547–8557.
- (93) Wang, H.; Zhao, S.; Xiao, W.; Xue, J.; Shen, Y.; Zhou, J.; Huang, W.; Rahaman, M. N.; Zhang, C.; Wang, D. Influence of Cu Doping in Borosilicate Bioactive Glass and the Properties of Its Derived Scaffolds. *Mater. Sci. Eng. C* **2016**, 58, 194–203.

- (94) Zhao, S.; Li, L.; Wang, H.; Zhang, Y.; Cheng, X.; Zhou, N.; Rahaman, M. N.; Liu, Z.; Huang, W.; Zhang, C. Wound Dressings Composed of Copper-Doped Borate Bioactive Glass Microfibers Stimulate Angiogenesis and Heal Full-Thickness Skin Defects in a Rodent Model. *Biomaterials* **2015**, *53*, 379–391.
- (95) D’Mello, S.; Elangovan, S.; Hong, L.; Ross, R. D.; Summer, D. R.; Salem, A. K. Incorporation of Copper into Chitosan Scaffolds Promotes Bone Regeneration in Rat Calvarial Defects. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* **2015**, *103* (5), 1044–1049.
- (96) Theodorou, G. S.; Kontonasaki, E.; Theocharidou, A.; Bakopoulou, A.; Bousnaki, M.; Hadjichristou, C.; Papachristou, E.; Papadopoulou, L.; Kantiranis, N. A.; Chrissafis, K.; Paraskevopoulos, K. M.; Koidis, P. T. Sol-Gel Derived Mg-Based Ceramic Scaffolds Doped with Zinc or Copper Ions: Preliminary Results on Their Synthesis, Characterization, and Biocompatibility. *Int. J. Biomater.* **2016**, 1–11.
- (97) Bejarano, J.; Detsch, R.; Boccaccini, A. R.; Palza, H. PDLLA Scaffolds with Cu and Zn-Doped Bioactive Glasses Having Multifunctional Properties for Bone Regeneration. *J. Biomed. Mater. Res. A* **2016**, 1–11.
- (98) Klagsbrun, M.; D’Amore, P. A. Regulators of Angiogenesis. *Annu. Rev. Physiol* **1991**, *53* (47), 217–239.
- (99) Carmeliet, P.; Jain, R. K. Molecular Mechanisms and Clinical Applications of Angiogenesis. *Nature* **2011**, *473* (7347), 298–307.
- (100) Carmeliet, P.; Jain, R. K. Angiogenesis in Cancer and Other Diseases. *Nature* **2000**, *407*, 249–257.
- (101) Soker, S.; Machado, M.; Atala, A. Systems for Therapeutic Angiogenesis in Tissue Engineering. *World J. Urol.* **2000**, *18* (1), 10–18.
- (102) Folkman, J. Angiogenesis: An Organizing Principle for Drug Discovery? *Nat. Rev. Drug Discov.* **2007**, *6*, 273–286.
- (103) Cassavaugh, J.; Lounsbury, K. M. Hypoxia-Mediated Biological Control. *J. Cell. Biochem.* **2011**, *112* (3), 735–744.

- (104) Pugh, C. W.; Ratcliffe, P. J. Regulation of Angiogenesis by Hypoxia: Role of the HIF System. *Nat. Med.* **2003**, *9* (6), 677–684.
- (105) Manalo, D. J.; Rowan, A.; Lavoie, T.; Natarajan, L.; Kelly, B. D.; Ye, S. Q.; Garcia, J. G. N.; Semenza, G. L. Transcriptional Regulation of Vascular Endothelial Cell Responses to Hypoxia by HIF-1. *Blood* **2005**, *105* (2), 659–669.
- (106) Schofield, C. J.; Ratcliffe, P. J. Oxygen Sensing by HIF Hydroxylases. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2004**, *5* (5), 343–354.
- (107) Maxwell, P. H.; Wiesener, M. S.; Chang, G. W.; Clifford, S. C.; Vaux, E. C.; Cockman, M. E.; Wykoff, C. C.; Pugh, C. W.; Maher, E. R.; Ratcliffe, P. J. The Tumour Suppressor Protein VHL Targets Hypoxia-Inducible Factors for Oxygen-Dependent Proteolysis. *Nature* **1999**, *399*, 271–275.
- (108) Tanimoto, K.; Makino, Y.; Pereira, T.; Poellinger, L. Mechanism of Regulation of the Hypoxia-Inducible Factor-1 Alpha by the von Hippel-Lindau Tumor Suppressor Protein. *Embo J* **2000**, *19* (16), 4298–4309.
- (109) Oladipupo, S.; Hu, S.; Kovalski, J.; Yao, J.; Santeford, A.; Sohn, R. E.; Shohet, R.; Maslov, K.; Wang, L. V.; Arbeit, J. M. VEGF Is Essential for Hypoxia-Inducible Factor-Mediated Neovascularization but Dispensable for Endothelial Sprouting. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2011**, *108* (32), 13264–13269.
- (110) Rahimi, N. The Ubiquitin-Proteasome System Meets Angiogenesis. *Mol. Cancer Ther.* **2012**, *11* (3), 538–548.
- (111) D'Andrea, L. D.; Romanelli, A.; Di Stasi, R.; Pedone, C. Bioinorganic Aspects of Angiogenesis. *Dalt. Trans.* **2010**, *39* (33), 7625–7636.
- (112) Ziche, M.; Jones, J.; Gullino, P. M. Role of Prostaglandin E1 and Copper in Angiogenesis. *J. Natl. Cancer Inst.* **1982**, *69* (2), 475–482.
- (113) McAuslan, B. R.; Reilly, W. Endothelial Cell Phagokinesis in Response to Specific Metal Ions. *Exp. Cell Res.* **1980**, *130*, 147–157.
- (114) McAuslan, B. R.; Reilly, W. G.; Hannan, G. N.; Gole, G. A. Angiogenic Factors and Their Assay: Activity of Formyl Methionyl Leucyl

- Phenylalanine, Adenosine Diphosphate, Heparin, Copper, and Bovine Endothelium Stimulating Factor. *Microvasc. Res.* **1983**, *26*, 323–338.
- (115) Kim, B.; Nevitt, T.; Thiele, D. J. Mechanisms for Copper Acquisition, Distribution and Regulation. *Nat. Chem. Biol.* **2008**, *4* (3), 176–185.
- (116) Turnlund, J. R. Human Whole-Body Copper Metabolism. *Am. J. Clin. Nutr.* **1998**, *67* (Suppl. 5), 960S – 964S.
- (117) Tapiero, H.; Townsend, D. M.; Tew, K. D. Trace Elements in Human Physiology and Pathology. Copper. *Biomed. Pharmacother.* **2003**, *57* (9), 386–398.
- (118) Zimmnicka, A. M.; Ivy, K.; Kaplan, J. H. Acquisition of Dietary Copper: A Role for Anion Transporters in Intestinal Apical Copper Uptake. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **2011**, *300* (3), C588–C599.
- (119) Hassett, R.; Kosman, D. J. Evidence for Cu(II) Reduction as a Component of Copper Uptake by *Saccharomyces Cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry*. 1995, pp 128–134.
- (120) O'Halloran, T. V.; Culotta, V. C. Metallochaperones, an Intracellular Shuttle Service for Metal Ions. *J. Biol. Chem.* **2000**, *275* (33), 25057–25060.
- (121) Pufahl, R. A.; Singer, C. P.; Peariso, K. L.; Lin, S.; Schmidt, P. J.; Fahrni, C. J.; Culotta, V. C.; Penner-Hahn, J. E.; O'Halloran, T. V. Metal Ion Chaperone Function of the Soluble Cu(I) Receptor Atx1. *Science* (80-.). **1997**, *278*, 853–856.
- (122) Puig, S.; Thiele, D. J. Molecular Mechanisms of Copper Uptake and Distribution. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2002**, *6* (2), 171–180.
- (123) Wong, P. C.; Waggoner, D.; Subramaniam, J. R.; Tessarollo, L.; Bartnikas, T. B.; Culotta, V. C.; Price, D. L.; Rothstein, J.; Gitlin, J. D. Copper Chaperone for Superoxide Dismutase Is Essential to Activate Mammalian Cu/Zn Superoxide Dismutase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2000**, *97* (6), 2886–2891.

- (124) Caruano-Yzermans, A. L.; Bartnikas, T. B.; Gitlin, J. D. Mechanisms of the Copper-Dependent Turnover of the Copper Chaperone for Superoxide Dismutase. *J. Biol. Chem.* **2006**, *281* (19), 13581–13587.
- (125) Lin, S.; Pufahl, R. A.; Dancis, A.; O'Halloran, T. V.; Cullota, C. V. A Role for the *Saccharomyces Cerevisiae* ATX1 Gene in Copper Trafficking and Iron Transport. *J. Biol. Chem.* **1997**, *272* (14), 9215–9220.
- (126) Urso, E.; Maffia, M. Behind the Link between Copper and Angiogenesis: Established Mechanisms and an Overview on the Role of Vascular Copper Transport Systems. *J. Vasc. Res.* **2015**, *52* (3), 172–196.
- (127) Bertinato, J.; L' Abbé, M. R. Maintaining Copper Homeostasis: Regulation of Copper-Trafficking Proteins in Response to Copper Deficiency or Overload. *J. Nutr. Biochem.* **2004**, *15* (6), 316–322.
- (128) Zimnicka, A. M.; Tang, H.; Guo, Q.; Kuhr, F. K.; Oh, M. J.; Wan, J.; Chen, J.; Smith, K. A.; Fraidenburg, D. R.; Choudhury, M. S. R.; Levitan, I.; Machado, R. F.; Kaplan, J. H.; Yuan, J. X. Upregulated Copper Transporters in Hypoxia-Induced Pulmonary Hypertension. *PLoS One* **2014**, *9* (3), 1–14.
- (129) White, C.; Kambe, T.; Fulcher, Y. G.; Sachdev, S. W.; Bush, A. I.; Fritsche, K.; Lee, J.; Quinn, T. P.; Petris, M. J. Copper Transport into the Secretory Pathway Is Regulated by Oxygen in Macrophages. *J Cell Sci* **2009**, *122* (9), 1315–1321.
- (130) Craig, P.; Wood, C.; McClelland, G. B. Oxidative Stress Response and Gene Expression with Acute Copper Exposure in Zebrafish (*Danio Rerio*). *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* **2007**, *293* (5), 1882–1892.
- (131) Ungar-Waron, H.; Gluckman, A.; Spira, E.; Waron, M.; Trainin, Z. Ceruloplasmin as a Marker of Neoplastic Activity in Rabbits Bearing the VX-2 Carcinoma. *Cancer Res.* **1978**, *38* (5), 1296–1299.
- (132) Schapira, M. The Presence of Caeruloplasmin in Cancer of the Breast and Female Genital Organs. *J. R. Coll. Gen. Pract.* **1972**, *22* (119), 383–386.

- (133) Coates, R. J.; Weiss, N. S.; Daling, J. R.; Rettmer, R. L.; Warnick, G. R. Cancer Risk in Relation to Serum Copper Levels. *Cancer Res.* **1989**, *49* (15), 4353–4356.
- (134) Chan, A.; Wong, F.; Arumanayagam, M. Serum Ultrafiltrable Copper, Total Copper and Caeruloplasmin Concentrations in Gynaecological Carcinomas. *Ann Clin Biochem* **1993**, *30*, 545–549.
- (135) Raju, K. S.; Alessandri, G.; Ziche, M.; Gullino, P. M. Ceruloplasmin, Copper Ions, and Angiogenesis. *J. Natl. Cancer Inst.* **1982**, *69* (5), 1183–1188.
- (136) Sen, C. K.; Khanna, S.; Venojarvi, M.; Trikha, P.; Ellison, E. C.; Hunt, T. K.; Roy, S. Copper-Induced Vascular Endothelial Growth Factor Expression and Wound Healing. *Am. J. Physiol.* **2002**, *282* (5), H1821–H1827.
- (137) Jiang, Y.; Reynolds, C.; Xiao, C.; Feng, W.; Zhou, Z.; Rodriguez, W.; Tyagi, S. C.; Eaton, J. W.; Saari, J. T.; Kang, Y. J. Dietary Copper Supplementation Reverses Hypertrophic Cardiomyopathy Induced by Chronic Pressure Overload in Mice. *J. Exp. Med.* **2007**, *204* (3), 657–666.
- (138) Landriscina, M.; Bagalá, C.; Mandinova, A.; Soldi, R.; Micucci, I.; Bellum, S.; Prudovsky, I.; Maciag, T. Copper Induces the Assembly of a Multiprotein Aggregate Implicated in the Release of Fibroblast Growth Factor 1 in Response to Stress. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276* (27), 25549–25557.
- (139) Soncin, F.; Guitton, J. D.; Cartwright, T.; Badet, J. Interaction of Human Angiogenin with Copper Modulates Angiogenin Binding to Endothelial Cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1997**, *236* (3), 604–610.
- (140) Brewer, G. J. Copper Lowering Therapy with Tetrathiomolybdate as an Antiangiogenic Strategy in Cancer. *Curr. Cancer Drug Targets* **2005**, *5* (3), 195–202.
- (141) Martin, F.; Linden, T.; Katschinski, D. M.; Oehme, F.; Flamme, I.; Mukhopadhyay, C. K.; Eckhardt, K.; Tröger, J.; Barth, S.; Camenisch, G.; Wenger, R. H. Copper-Dependent Activation of Hypoxia-Inducible Factor (

- HIF)– 1 : Implications for Ceruloplasmin Regulation. *Blood* **2005**, *105* (12), 4613–4619.
- (142) Van Heerden, D.; Vosloo, A.; Nikinmaa, M. Effects of Short-Term Copper Exposure on Gill Structure, Metallothionein and Hypoxia-Inducible Factor-1 α (HIF-1 α) Levels in Rainbow Trout (*Oncorhynchus Mykiss*). *Aquat. Toxicol.* **2004**, *69* (3), 271–280.
- (143) Srinivas V.; Leshchinsky I.; HHS Public Access. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276* (25), 21995–21998.
- (144) Vaux, E. C.; Metzen, E.; Yeates, K. M.; Ratcliffe, P. J. Regulation of Hypoxia-Inducible Factor Is Preserved in the Absence of a Functioning Mitochondrial Respiratory Chain Regulation of Hypoxia-Inducible Factor Is Preserved in the Absence of a Functioning Mitochondrial Respiratory Chain. *Blood J.* **2001**, *98* (2), 296–302.
- (145) Solaini, G.; Baracca, A.; Lenaz, G.; Sgarbi, G. Hypoxia and Mitochondrial Oxidative Metabolism. *Biochim. Biophys. Acta* **2010**, *1797* (6-7), 1171–1177.
- (146) Rahaman, M. N.; Day, D. E.; Sonny Bal, B.; Fu, Q.; Jung, S. B.; Bonewald, L. F.; Tomsia, A. P. Bioactive Glass in Tissue Engineering. *Acta Biomater.* **2011**, *7* (6), 2355–2373.
- (147) Perez, R. A.; Seo, S. J.; Won, J. E.; Lee, E. J.; Jang, J. H.; Knowles, J. C.; Kim, H. Therapeutically Relevant Aspects in Bone Repair and Regeneration. *Mater. Today* **2015**, *18* (10), 573–589.
- (148) Moon, J. J.; West, J. L. Vascularization of Engineered Tissues: Approaches to Promote Angio-Genesis in Biomaterials. *Curr. Top. Med. Chem.* **2008**, *8* (4), 300–310.
- (149) Naderi, H.; Matin, M. M.; Bahrami, A. R. Review Paper: Critical Issues in Tissue Engineering: Biomaterials, Cell Sources, Angiogenesis, and Drug Delivery Systems. *J. Biomater. Appl.* **2011**, *26*, 383–417.
- (150) Adams, R. H.; Alitalo, K. Molecular Regulation of Angiogenesis and Lymphangiogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2007**, *8* (6), 464–478.

- (151) Herbert, S. P.; Stainier, D. Y. R. Molecular Control of Endothelial Cell Behaviour during Blood Vessel Morphogenesis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2011**, *12* (9), 551–564.
- (152) Gorustovich, A. A.; Roether, J. A.; Boccaccini, A. R. Effect of Bioactive Glasses on Angiogenesis: A Review of In Vitro and In Vivo Evidences. *Tissue Eng. Part B* **2010**, *16* (2), 199–207.
- (153) Day, R. M. Bioactive Glass Stimulates the Secretion of Angiogenic Growth Factors and Angiogenesis in Vitro. *Tissue Eng.* **2005**, *11* (5), 768–777.
- (154) Keshaw, H.; Forbes, A.; Day, R. M. Release of Angiogenic Growth Factors from Cells Encapsulated in Alginate Beads with Bioactive Glass. *Biomaterials* **2005**, *26* (19), 4171–4179.
- (155) Kent Leach, J.; Kaigler, D.; Wang, Z.; Krebsbach, P. H.; Mooney, D. J. Coating of VEGF-Releasing Scaffolds with Bioactive Glass for Angiogenesis and Bone Regeneration. *Biomaterials* **2006**, *27* (17), 3249–3255.
- (156) Li, H.; Chang, J. Stimulation of Proangiogenesis by Calcium Silicate Bioactive Ceramic. *Acta Biomater.* **2013**, *9* (2), 5379–5389.
- (157) Ho, C.; Huang, S.; Wei, C.; Ding, S. In Vitro Degradation and Angiogenesis of Porous Calcium Silicate-Gelatin Composite Scaffold. *J. Mater. Chem. B* **2016**, *4*, 505–512.
- (158) Saghiri, M. A.; Asatourian, A.; Orangi, J.; Sorenson, C. M.; Sheibani, N. Functional Role of Inorganic Trace Elements in Angiogenesis-Part II: Cr, Si, Zn, Cu, and S. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* **2015**, *96*, 143–155.
- (159) Baino, F.; Fiorilli, S.; Vitale-Brovarone, C. Bioactive Glass-Based Materials with Hierarchical Porosity for Medical Applications: Review of Recent Advances. *Acta Biomater.* **2016**, *42*, 18–32.
- (160) Pérez-Robles, F.; García-Rodríguez, F. J.; Jiménez-Sandoval, S.; González-Hernández, J. Raman Study of Copper and Iron Oxide Particles Embedded in an SiO₂ Matrix. *J. Raman Spectrosc.* **1999**, *30* (12), 1099–1104.

- (161) Van Dillen, A. J.; Terörde, R. J. A. M.; Lensveld, D. J.; Geus, J. W.; de Jong, K. P. Synthesis of Supported Catalysts by Impregnation and Drying Using Aqueous Chelated Metal Complexes. *J. Catal.* **2003**, *216* (1-2), 257–264.
- (162) Ciriminna, R.; Fidalgo, A.; Pandarus, V.; Béland, F.; Ilharco, L. M.; Pagliaro, M. The Sol-Gel Route to Advanced Silica-Based Materials and Recent Applications. *Chem. Rev.* **2013**, *113* (8), 6592–6620.
- (163) Zhao, D.; Feng, J.; Huo, Q.; Melosh, N.; Fredrickson, G. H.; Chmelka, B. F.; Stucky, G. D. Triblock Copolymer Syntheses of Mesoporous Silica with Periodic 50 to 300 Angstrom Pores. *Science* (80-.). **1998**, *279*, 548–552.
- (164) Taghavimoghaddam, J.; Knowles, G. P.; Chaffee, A. L. SBA-15 Supported Cobalt Oxide Species: Synthesis, Morphology and Catalytic Oxidation of Cyclohexanol Using TBHP. *J. Mol. Catal. A Chem.* **2013**, *379*, 277–286.
- (165) MubarakAli, D.; Arunkumar, J.; Pooja, P.; Subramanian, G.; Thajuddin, N. Synthesis and Characterization of Biocompatibility of Tenorite Nanoparticles and Potential Property against Biofilm Formation. *Saudi Pharm. J.* **2015**, 1–24.
- (166) Kruk, M.; Jaroniec, M.; Sayari, A. Relations between Pore Structure Parameters and Their Implications for Characterization of MCM-41 Using Gas Adsorption and X-Ray Diffraction. *Chem. Mater.* **1999**, *11* (15), 492–500.
- (167) Galeener, F. L.; Lucovsky, G. Longitudinal Optical Vibration in Glasses: GeO₂ and SiO₂. *Phys. Rev. Lett.* **1976**, *37* (22), 1474–1478.
- (168) Aguiar, H.; Serra, J.; González, P.; León, B. Structural Study of Sol-Gel Silicate Glasses by IR and Raman Spectroscopies. *J. Non. Cryst. Solids* **2009**, *355* (8), 475–480.
- (169) Boyd, I. W. Deconvolution of the Infrared Absorption Peak of the Vibrational Stretching Mode of Silicon Dioxide: Evidence for Structural Order? *Appl. Phys. Lett.* **1987**, *51* (6), 418–420.

- (170) Matos, M. C.; Ilharco, L. M.; Almeida, R. M. The Evolution of TEOS to Silica-Gel and Glass by Vibrational Spectroscopy. *J. Non. Cryst. Solids* **1992**, 147-148, 232–237.
- (171) Awazu, K. Oscillator Strength of the Infrared Absorption Band near 1080 cm^{-1} in SiO_2 Lms. *J. Non. Cryst. Solids* **1999**, 260, 242–244.
- (172) Serra, J.; González, P.; Liste, S.; Serra, C.; Chiussi, S.; León, B.; Pérez-Amor, M.; Ylänen, H. O.; Hupa, M. FTIR and XPS Studies of Bioactive Silica Based Glasses. *J. Non. Cryst. Solids* **2003**, 332 (1-3), 20–27.
- (173) Jung, H. Y.; Gupta, R. K.; Oh, E. O.; Kim, Y. H.; Whang, C. M. Vibrational Spectroscopic Studies of Sol-Gel Derived Physical and Chemical Bonded ORMOSILs. *J. Non. Cryst. Solids* **2005**, 351 (5), 372–379.
- (174) Neumann, R.; Levin-Elad, M. Metal Oxide (TiO_2 , MoO_3 , WO_3) Substituted Silicate Xerogels as Catalysts for the Oxidation of Hydrocarbons with Hydrogen Peroxide. *J. Catal.* **1997**, 166 (2), 206–217.
- (175) Meibohm, M.; Otto, H. H.; Brockner, W. Vibrational Spectra of Copper Polysilicate, CuSiO_3 . **2009**, 1–9.
- (176) Wilmot, G. B. The Raman Spectra and Structure of Silica and the Soda-Silica Glasses, 1955.
- (177) Geissberger, A. E.; Galeener, F. L. Raman Studies of Vitreous SiO_2 versus Fictive Temperature. *Phys. Rev. B* **1983**, 28 (6), 3266–3271.
- (178) González, P.; Serra, J.; Liste, S.; Chiussi, S.; León, B.; Pérez-Amor, M. Raman Spectroscopic Study of Bioactive Silica Based Glasses. *J. Non. Cryst. Solids* **2003**, 320 (1-3), 92–99.
- (179) Tienderson, G. S.; Fleet, M. E. The Structure of Ti Silicate Glasses by Micro-Raman Spectroscopy. *Can. Mineral.* **1995**, 33, 399–408.
- (180) Mckeown, D. A.; Bell, I.; Kim, C. C. Raman Spectroscopy of Silicate Rings: Benitoite and the Three-Membered Ring. *Phys. Rev. B* **1993**, 48 (22), 357–365.

- (181) Hagemann, H.; Bill, H.; Sadowski, W.; Wlaker, E.; Francois, M. Raman Spectra of Single Crystal CuO. *Solid State Commun.* **1990**, *73* (6), 447–451.
- (182) Irving, J. C.; Chrzanowski, J.; Wei, T. Raman Scattering from Single Crystal of Cupric Oxide. *Phys. C* **1990**, *166* (6), 456–464.
- (183) Wang, W.; Zhou, Q.; Fei, X.; He, Y.; Zhang, P.; Zhang, G.; Peng, L.; Xie, W. Synthesis of CuO Nano- and Micro-Structures and Their Raman Spectroscopic Studies. *CrystEngComm* **2010**, *12* (7), 2232–2237.
- (184) Xu, J. F.; Ji, W.; Shen, Z. X.; Li, W. S.; Tang, S. H.; Ye, X. R.; Jia, D. Z.; Xin, X. Q. Raman Spectra of CuO Nanocrystals. *J. Raman Spectrosc.* **1999**, *30*, 413–415.
- (185) Kahler, H. L. Determination of Soluble Silica in Water: A Photometric Method. *Ind. Eng. Chem. Anal. Ed.* **1941**, *13* (8), 536–539.

Evaluación de la funcionalidad angiogénica de materiales MBG

1. Introducción

Al proceso de generación de nuevos vasos sanguíneos, derivados como extensiones de la vasculatura existente, se le conoce como angiogénesis. Las principales células implicadas son las células endoteliales, que recubren todos los vasos sanguíneos y que forman el canal del lecho vascular que posibilita la circulación sanguínea.

El proceso angiogénico comprende diversas etapas que se presentan de forma consecutiva y que se inicia con la vasodilatación y desestabilización del vaso preexistente. Esto da lugar a la degradación enzimática local de la membrana basal de los vasos, permitiendo a las células endoteliales escapar de su ubicación estable y migrar en dirección al estímulo mitogénico. Detrás de este frente migratorio, las células endoteliales proliferan para proporcionar el número necesario de células para hacer un nuevo vaso. El proceso finaliza con la organización en una estructura tridimensional tubular a partir de la cual se desarrollan vasos sanguíneos

funcionales. Los mecanismos son controlados por diversos factores que se unen a receptores de la membrana de las células endoteliales originando una cascada de fosforilaciones que activan la expresión de genes específicos involucrados en la proliferación del endotelio (Ver Tabla 4.1).

Tabla 4.1. Factores endógenos activadores e inhibidores de la angiogénesis(Carmeliet and Jain 2000; Tahergorabi and Khazaei 2012).

Factores proangiogénicos	Factores antiangiogénicos
Familia del VEGF	Interferones a y b
FGF (ácido y básico)	Angiostatina
Factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF, por Platelet derived growth factor) AA, AB, BB	Inhibidores tisulares de metaloproteinasas (TIMP, Tissue inhibitor of metalloprotease)
Angiogenina	Interleuquinas 10, 12 y 18
Ephirinas	Trombospondina
Timidina fosforilasa	Endostatina
Angiotropinas	Antitrombina antiangiogenica
Angiopoyetina-1 (ANG1)	Metalospondinas
Factor de crecimiento epidérmico (EGF, por Epidermal growth factor)	Inhibidores de los activadores de plasminógenos (PAI, por Plasminogen activator inhibitor)
Factor de crecimiento de hepatocitos (HGF, por Hepatocyte growth factor)	Factor de plaquetas 4 (PF-4, por Platelet factor 4)
Interleuquinas 1, 6 y 8	Angiopoyetina-2 (ANG2)
Factor de crecimiento similar a insulina (IGF-1, por Insuline-like growth factor 1)	Factor inducible por interferón 10 (PI-10, por Interferon-inducible protein 10)
Factor de necrosis tumoral α (TNF α , por Tumor necrosis factor alpha)	Receptores de VEGF receptor-1 (VEGF-1)
Integrinas avb3,avb5 y a5b1	Canstatina

Continuación Tabla 4.1. Factores endógenos activadores e inhibidores endógenos de la angiogénesis.

Factores proangiogénicos	Factores antiangiogénicos
Metaloproteinasas de la matriz (MMP, por Matrix metalloproteinases) 2, 9, 14, 15, 16, 17, 19 y 26	Factor derivado del epitelio pigmentado (PEDF, por Pigment epithelium-derived factor)
Factor de crecimiento transformante tipo b (TGFb, por Transforming growth factor beta)	Neuropilina 1 soluble (NP-1, por Neuropilin 1)
NO, COX-2	Angiotensina
Marcador vascular endotelial caderina (VE-Caderinas, por Vascular endothelial cadherin)	Prolactina
Factor estimulante de colonias de granulocitos (GCSF, por Granulocyte colony-stimulating factor)	
Molécula de adhesión de células endoteliales/plaquetas (PECAM, por Platelet-endothelial cell adhesion molecule)	
Heparina	
Catepsina	
Prostaglandina E	
Ceruloplasmina	
Uroquinasa tipo activador plasminógeno (uPA, por Urokinase-type plasminogen activator)	
Osteonectina	
Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas (NF-kB, por Nuclear factor kappa B)	
Gly-His-Lys	

Para que el proceso de angiogénesis se lleve a cabo de manera adecuada, debe existir un equilibrio dinámico entre aquellos mediadores químicos que promueven la angiogénesis (llamados factores proangiogénicos) y los que la inhiben (llamados factores antiangiogénicos) dentro del microambiente tisular. Se puede observar la complejidad de la angiogénesis en el número de factores involucrados en el proceso angiogénico. En la Tabla 1 se enumeran 28 grupos de factores proangiogénicos, y esta es sólo una lista parcial. Sin embargo, como se mencionó el Capítulo 3, el factor angiogénico de mayor relevancia es el VEGF o factor de permeabilidad, que promueve directamente la proliferación y diferenciación de las células endoteliales.

El estudio de cada uno de las fases implicadas en la formación de nuevos vasos sanguíneos, que incluye la disrupción de la membrana basal, la migración celular, la proliferación celular y la formación de tubos, se aborda mediante una serie de ensayos, tal y como se describen en el siguiente apartado.

1.1. Ensayos para evaluar la angiogénesis

La mayoría de los estudios de los inhibidores o estimuladores de la angiogénesis se basan en diversos modelos, tanto *in vitro* como *in vivo*. Las pruebas *in vitro* son muy valiosas, ya que proporcionan datos cuantitativos con relativa rapidez e incluyen la posibilidades de controlar diferentes parámetros y de estudiar etapas individuales del proceso. Además, son de menor costo y requieren menos esfuerzo, en comparación con los estudios *in vivo*.

1.1.1. Ensayos *in vitro*

Los ensayos *in vitro*, para evaluar la inhibición o estimulación de factores angiogénicos, se llevan a cabo empleando diferentes tipos de células endoteliales aisladas de capilares o vasos grandes. Las líneas celulares más utilizadas son las

células BAEC, las células endoteliales de pollo y las células endoteliales dérmicas micro vasculares humanas (HMVEC, por Human dermal microvascular endothelial cells) y las células HUVEC.

Los ensayos *in vitro* más comúnmente utilizados comprenden la proliferación, migración y formación de tubos de células endoteliales. A continuación, se describen brevemente dichos ensayos³⁻⁵.

1.1.1.1. Proliferación de células endoteliales

La proliferación celular es la medida del número de células que se dividen en un cultivo. Dentro del proceso de la angiogénesis, los ensayos de proliferación son altamente reproducibles, fáciles de realizar y de generar datos precisos y cuantificables. Los métodos para evaluar el proceso de proliferación celular incluyen el conteo celular directo, cuantificación de la síntesis de ácido desoxirribonucleico (ADN) o de división celular⁶. La forma más sencilla es evaluar el número de células mediante el recuento directo de células después del tratamiento con factores pro y/o anti angiogénicos.

1.1.1.2. Migración de células endoteliales

Durante el proceso de la angiogénesis, las células endoteliales son estimuladas para degradar la membrana basal y migrar al tejido circundante en respuesta a las quimiocinas angiogénicas, incluyendo la inducción del VEGF. Los ensayos que permiten medir la migración de las células endoteliales en respuesta a factores añadidos incluyen el ensayo de cierre de la herida y la invasión Transwell. La tasa y el alcance de la migración de las células endoteliales se sigue generalmente por microscopía óptica^{6,7}.

1.1.1.3. Diferenciación de células endoteliales

Los ensayos que simulan la formación de túbulos de tipo capilar se consideran representativos de las etapas posteriores de la angiogénesis. El método consiste en evaluar la capacidad de las células endoteliales para formar estructuras tridimensionales (formación de tubos) por medio de la estrecha unión de estas. Dichas formaciones son estudiadas por microscopía electrónica, mientras que el grado de diferenciación generalmente se sigue midiendo la actividad de ALP. La etapa de formación de tubo de la angiogénesis se puede modelar *in vitro* por cultivo de células endoteliales utilizando un biomaterial como sustrato o ECM. Para estos ensayos de diferenciación generalmente utilizan biomateriales tales como el colágeno tipo I y el producto comercial Corning® Matrigel® Matrix^{8,9}.

1.1.2. Ensayos *in vivo*

Es imprescindible que los resultados de los ensayos *in vitro* sean interpretados con gran precaución y se contrasten mediante sistemas *in vivo*, ya que no siempre se pueden correlacionar los datos *in vitro* en modelos complejos *in vivo*. Se puede encontrar que un agente, que tiene eficacia *in vitro*, no muestra actividad alguna *in vivo* y viceversa, algunos compuestos que muestran poca eficacia *in vitro*, tienen una fuerte actividad *in vivo*. A continuación se describen los ensayos *in vivo* más utilizados para evaluar factores angiogénicos³⁻⁵.

1.1.2.1. Ensayo de angiogénesis en la córnea

La córnea es el único tejido transparente avascular en el cuerpo, por lo que los vasos que penetran desde el limbo en el estroma corneal recién formados, son fácilmente visibles y pueden ser cuantificados¹⁰. Inicialmente este método estaba diseñado en conejos y ha sido adaptado para ratas y ratones¹¹. Para el experimento, se crea una cavidad en la córnea y las sustancias de ensayo se inyectan en micropuntos que estimulan o inhiben la formación de nuevos vasos sanguíneos.

Durante el ensayo, la densidad de microvasos se puede detectar a través de inmunohistoquímica, usando marcadores endoteliales, y la respuesta vascular puede ser cuantificada por análisis de imágenes por ordenador después de la perfusión de la córnea con tinta china.

1.1.2.2. Ensayo de la membrana corioalantoidea de embrión de pollo (CAM, por Chick chorioallantoic membrane)

El modelo de la CAM es utilizado como método piloto en los estudios de evaluación de la angiogénesis. El embrión de pollo es un sistema vivo, y aunque es simple, este modelo proporciona un sistema más fisiológico para análisis *in vivo*. En este método, las sustancias de ensayo (tanto estimuladores como inhibidores) se inyectan en la membrana extra-embriónica a través de una ventana que se dispone en la cáscara de huevo de los embriones de pollo.

Después del procedimiento de injerto, los cambios en la distribución y densidad de los vasos CAM se evalúan *in vivo* mediante un estereomicroscopio a intervalos regulares. El ensayo CAM es relativamente simple y económico y, por tanto, adecuado para estudios preliminares. La principal desventaja de este ensayo es que la CAM contiene ya una red vascular bien desarrollada que hace difícil discriminar entre capilares nuevos y ya existentes¹².

Los ensayos *in vivo* son absolutamente necesarios para evaluar en forma rigurosa el proceso de angiogénesis dentro de la complejidad de los organismos vivos. En este contexto, se siguen explorando e implementando nuevos modelos que permitan reducir las discrepancias entre los ensayos *in vitro* de cultivos celulares y el estudio de los organismos vivos.

En los últimos años, el pez cebra surge como un modelo alternativo y efectivo de alto rendimiento para evaluar la angiogénesis. Este modelo se abordará con más atención en la siguiente sección.

1.2 Pez cebra como modelo para evaluar la angiogénesis *in vivo*

El pez cebra (*Danio rerio*) es un pez tropical ampliamente utilizado en un gran número de áreas de conocimiento, consolidándose como un modelo animal fundamental para la investigación de los mecanismos de desarrollo y procesos de enfermedad, ya que su patrón de desarrollo es similar al de otros animales vertebrados^{13,14}.

El embrión de pez cebra no llega a medir más de 1 mm y se desarrolla fuera de la madre protegido por una membrana transparente llamada corion (Ver Figura 4.1). Las etapas de desarrollo embrionario son rápidas, su organogénesis ocurre en 24 horas post-fertilización (hpf, por hours post-fertilization) a estos tiempos ya se aprecia la segmentación del cerebro y se han formado estructuras como el tubo neural, la notocorda y los somitos (precursores de músculo y esqueleto). Los embriones eclosionan alrededor de las 72 hpf y se le puede mantener en el laboratorio en cajas de cultivo gracias a su reducido tamaño.

A las 120 hpf ya se han convertido en larvas y se han formado los órganos sensoriales como los ojos y los oídos. Asimismo, han aparecido el corazón, el hígado, los riñones y el páncreas, además de que los sistemas circulatorio, digestivo y nervioso son perfectamente funcionales. En este momento el pez es perfectamente capaz de responder a estímulos visuales, olfativos y mecánicos y comienza a nadar buscando alimento. En un mes se considera que es un juvenil y alcanza la edad adulta en tres meses. Un adulto mide aproximadamente 4 cm y

puede reproducirse de manera continua. El pez cebra llega al final de su vida entre los dos y los tres años y medio^{15,16}.

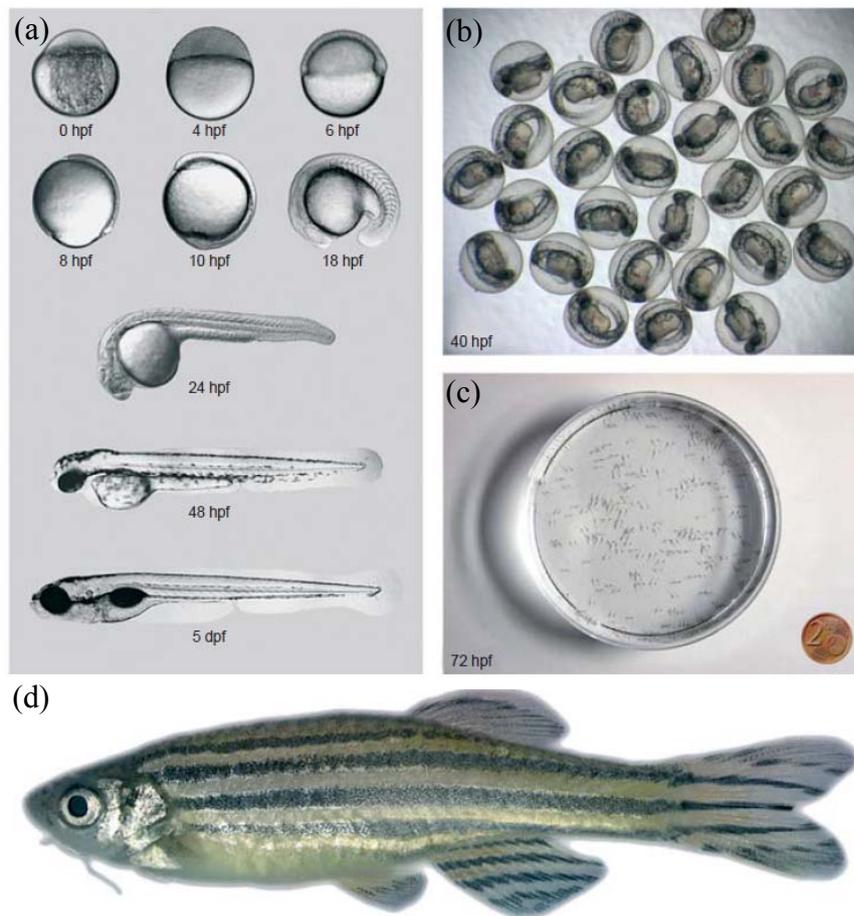


Figura 4.1. (a) Estadios en el desarrollo del pez cebra, (b) embriones dentro del corion y (c) embriones recién eclosionados, (d) pez cebra adulto (Figura tomada de Rojas Muñoz, 2007¹⁷).

Algunas de las ventajas del sistema de modelo animal pez cebra incluyen: a) fecundidad, ya que cada hembra es capaz de poner 200-300 huevos por semana, se les considera baratos para reproducirse en contraste con especies modelo de mamíferos tales como roedores, b) fertilización externa, que permite la manipulación de embriones fuera del útero, c) el rápido desarrollo de los embriones ópticamente transparentes, que permite la observación directa del desarrollo de los órganos internos y tejidos *in vivo* y de procesos patológicos, y d) muchos genes relacionados con enfermedades humanas tienen ortólogos en el pez cebra lo que le convierte en un modelo especialmente útil para estudios de toxicidad, detección de drogas, descubrimiento de nuevos fármacos y otros tipos de investigación clínica^{13,14,18-23}.

Además, el pez cebra tienen la capacidad de producir la línea germinal específica de tejido de peces transgénicos Tg(Fli-1:EGFP) (por Transgenic, friend leukemia integration-1:enhanced green fluorescent protein). Estos peces expresan la proteína fluorescente verde potenciada dirigida por el promotor para Fli-1, un conocido marcador de células endoteliales de ratón²⁴, que también se expresa durante el desarrollo vascular en embriones de pez cebra²⁵. Esta cualidad hacen de este organismo un sistema ideal para la obtención de imágenes de la formación de la vasculatura embrionaria y de los vasos sanguíneos de los peces adultos en tiempo real²⁶. En 1999 el Dr. Zhiyuan Gong y col.²⁷ de la Universidad Nacional de Singapur empezó a trabajar con el gen que codifica la proteína fluorescente verde (GFP por, Green fluorescent protein), extraída de la medusa bioluminiscente de Norteamérica llamada comúnmente gelatina cristal y de nombre científico *Aequorea Victoria*. Insertaron el gen en un embrión de pez cebra, integrándolo a su genoma y logrando con eso que el pez brillara tanto en luz blanca normal, como en luz ultravioleta. Estos fueron los primeros trabajos en el que se

reconocía la potencialidad de las proteínas fluorescentes y que permitió producir versiones nuevas, más brillantes y estables²⁶.

Bajo estas consideraciones, el pez cebra ha demostrado ser un poderoso sistema modelo de vertebrados para evaluar la angiogénesis^{16,28}. La vasculogénesis y la angiogénesis en el pez cebra, al igual que en otros vertebrados, involucra la diferenciación de hemangioblastos del mesodermo, la diferenciación de los angioblastos y de las células endoteliales, que ocurre entre las 0 y las 72 hpf²⁹. A las 24 hpf los procesos de vasculogénesis han concluido y han permitido que los hemangioblastos se hayan diferenciado y migrado hacia la línea media del embrión, donde una vez fusionados generan los principales vasos, incluyendo la aorta dorsal, los vasos subintestinales e intersegmentales y la vena caudal. Y a las 72 hpf los vasos angiogénicos, incluidos la extensión de los vasos intersegmentales en todo el tronco, ya están totalmente desarrollados^{15,16,28-30}.

El ensayo de angiogénesis adoptado con mayor éxito, en el modelo del pez cebra, sirve para identificar inhibidores o estimuladores del proceso de crecimiento de vasos intersegmentales³¹. Estos vasos intersegmentales brotan del tronco siguiendo un patrón bien definido³² y gracias a la permeabilidad de los embriones a sustancias adicionadas en el medio, la simple incubación de los embriones con fármacos o sustancias a ensayar, permite observar en un intervalo de 2 a 6 días, su potencial inhibidor o promotor del crecimiento de vasos intersegmentales y por lo tanto la actividad pro o anti angiogénica²⁹. Por ejemplo, en el 2002, Parng y col.¹⁶ se basaron en la inspección visual del patrón de los vasos intersegmentales para evaluar los efectos anti-angiogénicos de dos fármacos, SU5416 y flavopiridol. Expusieron embriones de pez cebra a 40 mM SU5416 y 9 mM de flavopiridol, y encontraron que el patrón de los vasos intersegmentales se perturbaba y que

disminuía la cantidad de vasos, con lo cual concluyeron que ambos compuestos presentaban efectos anti-angiogénicos.

Otro indicador dentro del modelo de pez cebra para evaluar las propiedades pro/anti angiogénicas de factores de crecimiento, fármacos, iones o moléculas, se constituye a partir de un grupo de vasos que crecen cerca del intestino conocido como vasos subintestinales³³. Estos vasos se encuentran en el plexo subintestinal del embrión de pez cebra en desarrollo³⁴ y generan una estructura en forma de cesta característica^{34,35}, que adquiere su forma madura aproximadamente a las 72 hpf (Ver Figura 4.2). Este lecho vascular comprende los vasos que vascularizan el intestino, hígado y páncreas y, como tal, representa un modelo ideal para investigar los primeros estadios de formación de vasos sanguíneos³⁶. Serbedzija y col. en 1999³⁷ utilizaron el modelo del pez cebra para evaluar las propiedades anti-angiogénicas de dos compuestos inhibidores, que habían sido probados anteriormente en roedores SU5416 y TNP470. Estos autores hicieron observaciones *in vivo* de los vasos subintestinales y demostraron que era un modelo viable para evaluar el proceso angiogénico. Los resultados fueron equivalentes a los obtenidos con los ensayos realizados en sistemas de mamíferos.

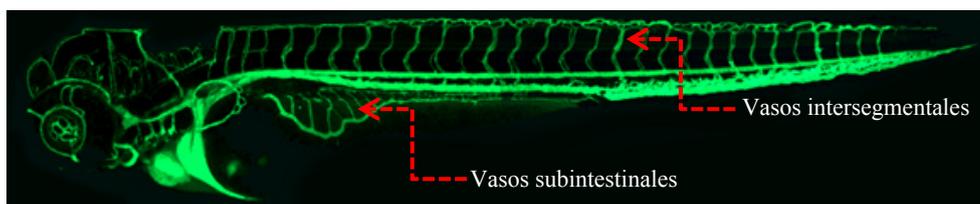


Figura 4.2. Vasculatura del pez cebra Tg(Fli-1:EGFP) donde se indica la ubicación de los vasos intersegmentales y subintestinales.

Además, el pez cebra tiene un alto grado de similitud genética con los vertebrados superiores, incluyendo a los humanos, el 70 % de los genes humanos tienen un homólogo en pez cebra. Esta homología aumenta hasta el 84 % cuando se trata de genes asociados a enfermedad, por lo que es un sistema muy versátil para la investigación de la enfermedad y el desarrollo³⁸.

Por lo comentado, el pez cebra ofrece un modelo para evaluar los procesos de la angiogénesis de una forma barata, rápida y efectiva, sin embargo, hay que destacar las escasas investigaciones de la evaluación de biomateriales en el modelo pez cebra. En relación con la evaluación de materiales, se encuentran algunas publicaciones donde se hace uso del modelo del pez cebra para evaluar la toxicidad de materiales nanoparticulados^{39,40}. Montazerolghaem y col.²³, proponen el modelo pez cebra, como un modelo para evaluar el efecto de los iones administrados durante la degradación de materiales BG. Sin embargo, no se ha encontrado ninguna publicación donde se evalúen concretamente las propiedades angiogénicas de los BG a partir del modelo pez cebra.

En este capítulo se utilizará el modelo del pez cebra para evaluar las propiedades angiogénicas de los materiales MBG como consecuencia de su degradación en los iones constituyentes. Los estudios se complementarán utilizando ensayos *in vitro* que nos permita evaluar la viabilidad y migración celular. Para ello se va a ensayar:

- MBG (80SiO₂-15CaO-5P₂O₅) como material control del experimento y para evaluar la funcionalidad angiogénica de los iones Si, Ca y P.
- SG-MBG-5Cu (80SiO₂-15CaO-5P₂O₅-5CuO) para evaluar el efecto adicional de la incorporación de Cu en la matriz vítrea en el proceso de angiogénesis.

Se harán dos tipos de ensayos. En el primero, se expondrán a embriones de pez cebra en medio que contenga los materiales particulados. En el segundo, se incorporarán dispersiones del material mediante la inyección directa en el vitelo del embrión.

2. Procedimiento Experimental

Tanto para los ensayos *in vitro* como *in vivo* se va a estudiar la incorporación de los materiales MBG y SG-MBG-5Cu en forma de micropartículas utilizando dispersiones del material en dos concentraciones. Las dispersiones de MBG y SG-MBG-5Cu se prepararon utilizando el medio de cultivo para los ensayos *in vitro* y utilizando el medio embrionario como solución dispersante para los ensayos *in vivo*. Se añadió la cantidad adecuada del material particulado y se trató con ultrasonido durante 15 min para favorecer la homogeneidad de la dispersión.

El medio de cultivo utilizado para los experimentos *in vitro* consiste en una solución comercial Medio de Cultivo Eagle Modificado de Dulbecco (DMEM, por Dulbecco's Modified Eagle's Medium) con $1\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ de glucosa y 10 % de suero fetal bovino (FBS, por Fetal Bovine Serum). Mientras que el medio embrionario llamado E3 que contiene 5 mM de NaCl, 0.17 mM de KCl, 0.33 mM de CaCl_2 y 0.33 mM de MgSO_4 .

Para tener un tamaño de partícula homogéneo los materiales se tamizaron previamente entre 10-32 μm . Antes de preparar las suspensiones se midió el tamaño de partícula para corroborar que se encontraba dentro del rango deseado. En la Figura 4.3 se muestra la distribución del tamaño de partícula de los materiales MBG y SG-MBG-5Cu después de tamizar a tamaños inferiores a 32 μm . La representación gráfica muestra una distribución del tamaño de partícula normal.

La distribución indica un percentil 50 (d_{50}) de 22 y 20 μm , para MBG y SG-MBG-5Cu, respectivamente.

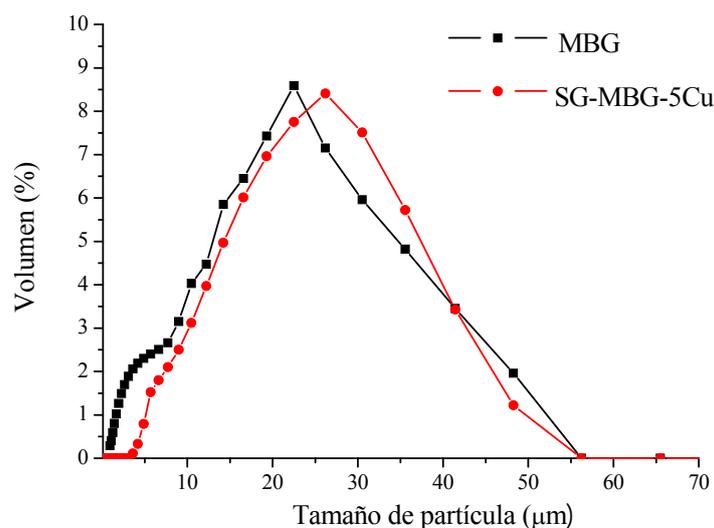


Figura 4.3. Distribución del tamaño de partícula del MBG y SG-MBG-5Cu.

Los resultados indican que el proceso de tamizado fue efectivo. El resto de la caracterización físico-química de los materiales MBG y SG-MBG-5Cu se han presentado en el Capítulo 3.

2.1. Ensayos *in vitro*

Para los ensayo *in vitro* se prepararon dispersiones de los materiales MBG y SG-MBG-5 Cu usando dos concentraciones diferentes, $100 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ y $300 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$. Las dispersiones preparadas se mantienen durante 5 días a $25 \text{ }^\circ\text{C}$ antes de usar.

2.1.1. Viabilidad celular

Se prepara una suspensión celular de 30 000 células·mL⁻¹ en medio de cultivo, utilizando células BAEC. En una placa de 24 pocillos se depositan 500 µL (15 000 células) de la suspensión preparada en cada pocillo y se mantiene a 37 °C un par de horas para que las células se adhieran adecuadamente a la placa. Posteriormente, se le añade 600 µL del medio del medio de cultivo que contiene los materiales a estudiar, previamente centrifugado, y se incuban a 37 °C.

Durante el ensayo, se cuentan las células de cada uno de los pocillos diariamente durante 7 días. Para llevar a cabo el conteo celular primero se retira el medio de cultivo, después se lavan las células con PBS y se le añade tripsina para separar las células adheridas al fondo del pocillo. Finalmente se recogen las células y se le añaden 10 mL de medio isotónico Coulter® Isoton® II Diluent. El conteo celular se llevó a cabo utilizando un equipo Beckman Coulter Z2 particle counter and size analyzer.

2.1.2 Migración celular

La preparación y condiciones de las dispersiones es igual que para el ensayo de viabilidad celular. Así como el mismo tipo de células.

Para este ensayo, las células se siembran en placas de 6 pocillos y se incuban a 37 °C hasta que llegan a confluencia, es decir, que formen una monocapa que cubra toda la superficie del pocillo. Posteriormente se realiza una brecha o herida en forma de cruz sobre esta monocapa con una punta de pipeta. Se lavan los pocillos con PBS para eliminar células o cúmulos de células que hayan podido quedarse en suspensión al hacer la herida y se añade un volumen de 1.5 mL en cada pocillo del medio de cultivo que contiene los materiales a estudiar.

Durante el ensayo se toman fotografías a las 0, 4 y 7 h con ayuda de un microscopio óptico para realizar un análisis de imagen y comparar el área libre de células de la herida de cada uno de los pocillos de ensayo con respecto al control. De este modo, la migración celular significaría una disminución en el área libre de células.

2.2. Ensayos *in vivo*

2.2.1. Obtención de embriones

Los peces cebras (*Danio rerio*) transgénicos Tg(Fli1:EGFP) utilizados en la generación de embriones para el estudio, se obtuvieron de Zebrafish International Resource Center (ZIRC, Eugene, OR, EEUU). El ensayo se realizó en la Facultad de Ciencias de la Universidad de Málaga (UMA), en los laboratorios del Departamento de Biología Celular, Genética y Fisiología.

Los peces cebras se encuentran en un cuarto climatizado a $27\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$. La reproducción se ve muy influenciada por factores externos como el tipo de alimentación o la iluminación. El mantenimiento de un ciclo circadiano será importante para la freza ya que la reproducción se produce a primeras horas de la mañana. La tarde anterior al día de la puesta, los ejemplares reproductores (2 hembras y 1 macho) se trasladan a una pecera que se encuentra dividida transversalmente (paridera) que impide que machos y hembras se encuentren. Además, el fondo de la paridera tiene una rejilla de plástico antiadherente adicional, que se extiende longitudinalmente, cuya función es proteger a los huevos de sus progenitores. A la mañana siguiente se retira el elemento que divide la paridera transversalmente y se les dejará 1 h para que se lleve a cabo el cortejo de apareamiento habitual, que da lugar a la expulsión y fecundación de los huevos.

Posteriormente, se retiran los huevos de las parideras con ayuda de una pipeta Pasteur y se disponen en placas de Petri. Con ayuda de una lupa se separan y desechan los huevos que no están fertilizados (Ver Figura 4.4). Los embriones fertilizados se lavan con lejía al 0.5 % durante 1 min para eliminar las bacterias. Se retira la lejía y se enjuagan por triplicado con medio E3 al 0.00003 % de azul de metileno fenicado por litro para evitar el crecimiento fúngico. Los embriones se mantienen en cajas de Petri dentro de una estufa a $27\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ durante 24 h.

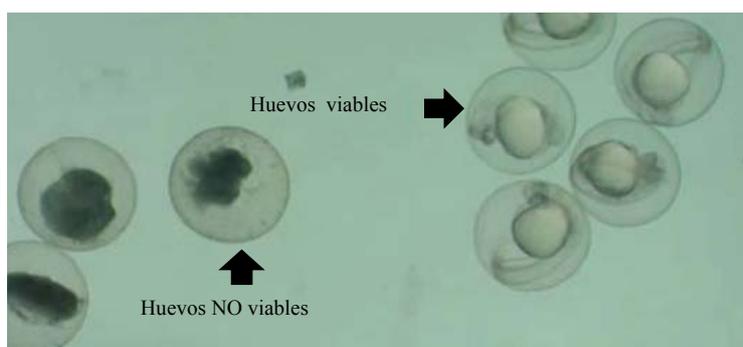


Figura 4.4. Fotografía mostrando embriones viables y no viables.

Por la mañana siguiente, cuando los embriones tienen 24 hpf, se seleccionan los embriones Tg(Fli1:EGFP), separando las transgénicos de los no-transgénicos (Ver Figura 4.5). La identificación se realiza colando los embriones en un portaobjeto y examinándolos en un microscopio de fluorescencia Nikon Microphot-FXA con filtro FITC equipado con una cámara digital DS-L1 Nikon (Chiyoda-Ku, Tokyo, Japan).

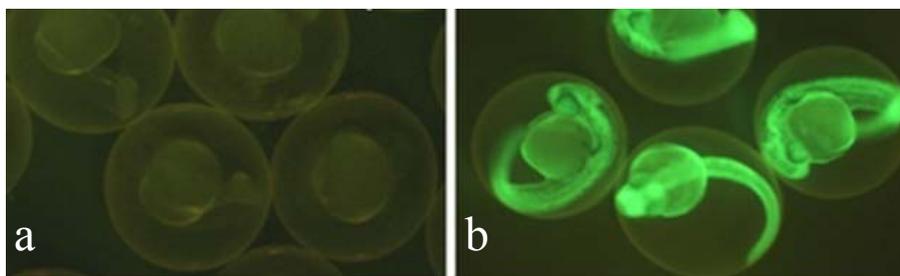


Figura 4.5. Fotografía de embriones a 24 hpf (a) no transgénicos y (b) transgénicos.

2.2.2. Ensayo tipo 1: Embriones expuestos a medios conteniendo MBG y SG-MBG-5Cu

Para los ensayos *in vivo* se estudió la incorporación de los materiales MBG y SG-MBG-5Cu en dos concentraciones de 300 y 3000 mg de material en 1 L de medio E3.

Como control positivo para evaluar el efecto del Cu se preparó una solución de CuCl_2 en medio E3 donde se encuentra el Cu completamente soluble en su forma iónica. Para ello se preparó una solución de $0.018 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de Cu, disolviendo 0.05 mg de $\text{CuCl}_2\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ en 1 L de medio E3.

Los embriones se trasladan a una placa de 6 pocillos, conteniendo 12 embriones por pocillo (Ver Figura 4.6). Se añaden 3 mL de las suspensiones preparadas (Ver Tabla 4.2) y se mantienen en la incubadora durante 5 días cambiando cada 24 h el medio constituido por el material correspondiente. Los medios recogidos diariamente se acumulan y se analizan por ICP-MS, para conocer la concentración de iones administrados durante los 5 días.

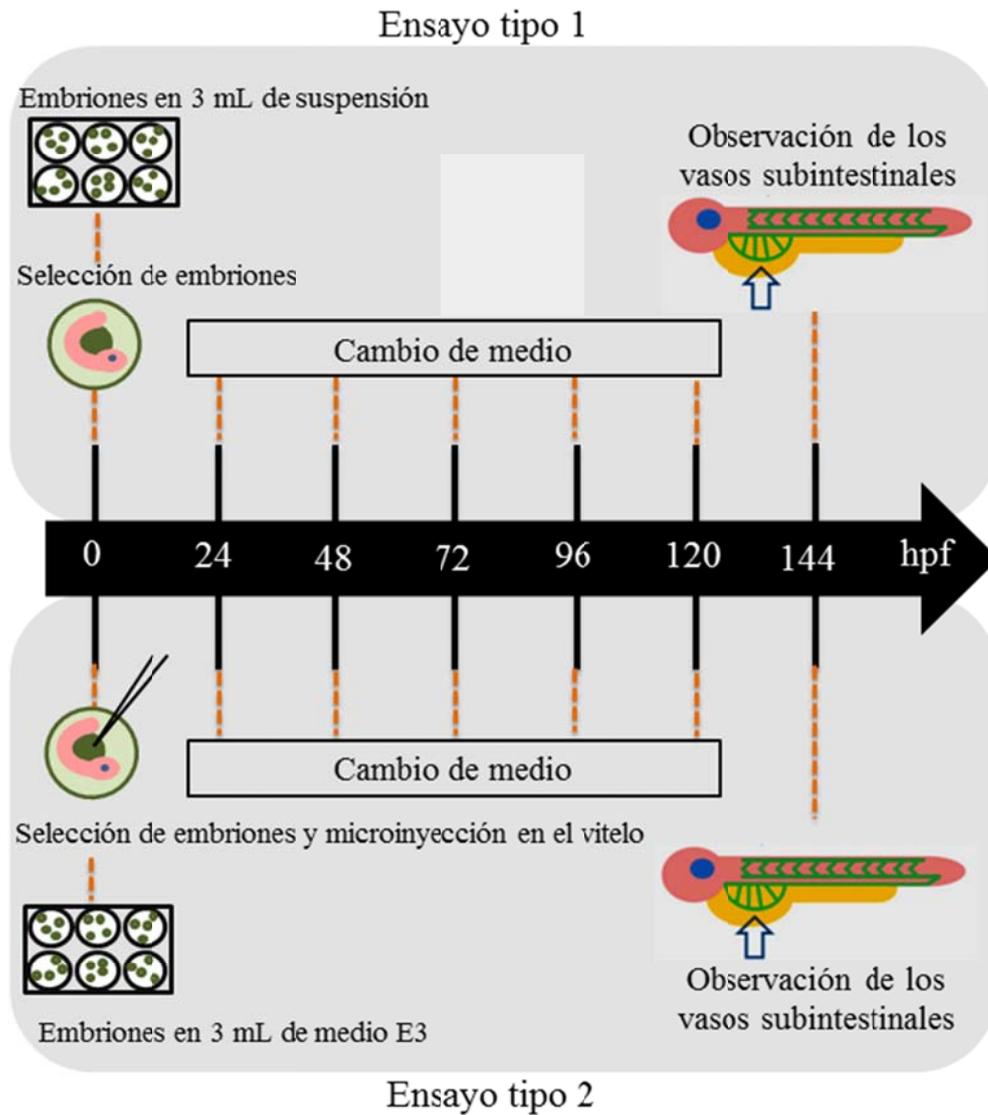


Figura 4.6. Esquema describiendo los 2 tipos de ensayo *in vivo* realizados.

Tabla 4.2. Soluciones y dispersiones preparadas para el ensayo tipo 1.

Muestra	Procedimiento
Control	Medio E3
Control positivo 0.05 mg·L ⁻¹ CuCl ₂ (0.018 mg/L Cu)	0.05 mg de la solución madre en 1000 mL de medio E3
MBG 300 mg·L ⁻¹	0.015 g de material particulado MBG en 50 mL de medio E3
MBG 3000 mg·L ⁻¹	0.15 g de material particulado MBG en 50 mL de medio E3
SG-MBG-5Cu 300 mg·L ⁻¹	0.015 g de material particulado MBG-Cu en 50 mL de medio E3
SG-MBG-5Cu 3000 mg·L ⁻¹	0.15 g de material particulado MBG-Cu en 50 mL de medio E3

Al quinto día de exposición (144 hpf), se anestesian los peces con tricafina 4 % y se toman fotografías en los vasos subintentinales con ayuda del microscopio de fluorescencia.

2.2.3. Ensayo tipo 2: Microinyección directa en vitelo de los materiales MBG y SG-MBG-5Cu

Primero se prepararon dispersiones de los materiales MBG y SG-MBG-5Cu en medio E3 en las mismas concentraciones que para el ensayo tipo 1. Los detalles se muestran en la Tabla 4.3.

A los embriones seleccionados para este ensayo se les hace una microinyección en el vitelo con ayuda de una lupa. La inyección se lleva a cabo utilizando agujas de vidrio, preparadas a partir de capilares de vidrio estirados con un equipo adecuado (pipette puller). La aguja se carga con 10 µL de la solución a inyectar (Ver Tabla 4.3), se une a un micromanipulador que está conectado a un tanque de nitrógeno. Se calibra la aguja para que a una presión de 650 hPa aproximadamente se obtenga una gota de 0.2 mm de diámetro y se punza al embrión atravesando el corion hasta llegar al vitelo. La cantidad final (ng) de material que se microinyecta se puede

observar en la Tabla 4.3, cálculo realizado a partir del volumen de la gota y considerando que, tanto las soluciones como las dispersiones son homogéneas.

Tabla 4.3. Soluciones y dispersiones preparadas para el ensayo tipo 2.

Muestra	Masa total de material microinyectado (ng)
Control	---
0.05 mg·L ⁻¹ CuCl ₂	0.0002
MBG 300 mg·L ⁻¹	1.26
MBG 3000 mg·L ⁻¹	12.6
SG-MBG-5Cu 300 mg·L ⁻¹	1.26
SG-MBG-5Cu 3000 mg·L ⁻¹	12.6

Los embriones inyectados se colocan a una placa de 6 pocillos, se añaden 3 mL de medio E3 y se mantienen en la incubadora por 5 días (Ver Figura 4.7). Al quinto día de exposición (144 hpf), se anestesian a los peces con tricafina al 4 % y se toman fotografías con ayuda de un microscopio fluorescente.

2.2.4. Evaluación de angiogénesis: Vasos subintestinales

Al quinto día de ensayo, los peces se anestesian y se trasladan a un portaobjeto excavado y son examinados con el microscopio de fluorescencia buscando cambios en la distribución de la vasculatura de los vasos subintestinales, por lo que se tomaran fotografías del saco vitelino de los peces (Ver Figura 4.8). Estos vasos comienzan a desarrollarse en el saco vitelino alrededor de las 48 hpf como venas bilaterales que se extienden hacia derecha e izquierda. Esta estructura vascular bilateral interviene en la captación y circulación de los nutrientes del saco vitelino hacia el embrión³⁴.

Estos vasos tienen múltiples conexiones con la arteria suprainestinal, brotan desde la vena cardinal común (conducto de Cuvier) y se conectan a la vena cardinal posterior. A las 72 hpf, los vasos subintestinales se han extendido por el saco vitelino, apareciendo como una cesta vascular con pequeños canales delimitados por las venas, que drenará las sinusoides hepáticas del hígado a través de las dos venas portales hepáticas durante el desarrollo temprano, al mismo tiempo se forma también un plexo vascular alrededor del intestino. A las 96 hpf, se reduce el tamaño del saco vitelo porque el embrión se alimenta de él y el caudal de los vasos subintestinales posterior izquierdo comienza a presentar una tendencia a degenerar desconectándose del caudal derecho formando segmentos independientes. La remodelación empieza aproximadamente a las 120 hpf y se produce de modo que los vasos posteriores desconectados del caudal izquierdo desembocan en las venas del caudal derecho a través de venas comunicantes que se encuentran lo largo de la pared del tubo digestivo ventral. A las 144 hpf los vasos subintestinales son un solo caudal que se prolongan por todo el vitelo transversalmente y todo el retorno venoso desde el intestino hasta el hígado ocurre a través de éste caudal³⁴ (Ver Figura 4.7).

En este trabajo la evaluación de la angiogénesis se realizara mediante el seguimiento de la evolución de los vasos subintestinales. Así, un efecto proangiogénico se define como un engrosamiento (vasodilatación) o aumento en el número de vasos subintestinales que se extienden transversalmente en el saco vitelino, mientras que, un efecto antiangiogénico será la reducción, deformación o ausencia total de los mismos. Asimismo, el fenotipo angiogénico consistirá en la ramificación y/o fusión de los vasos subintestinales. Durante la ensayo también se harán observaciones de la apariencia general del pez para detectar cambios o malformaciones.

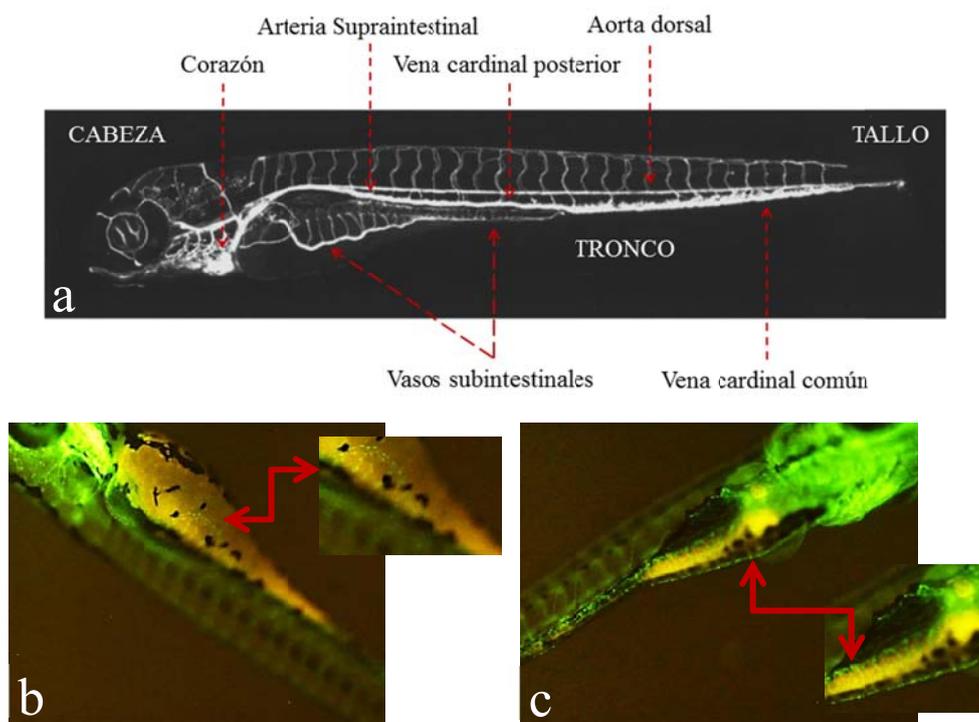


Figura 4.7. (a) Angiograma del pez cebra a las 144 hpf (modificado de Isogagi, 2001³⁴) y fotografías del saco vitelino característico de los peces donde se observan los vasos subintestinales a las (b) 72 y (c) 144 hpf .

2.2.5. Análisis estadístico y multivariante

El análisis estadístico se realizó mediante el software Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) versión 24. La significación estadística entre dos grupos se calculó mediante análisis de varianza (ANOVA, por Analysis of variance) de

pruebas bilaterales y se realizó con el programa de t de Student. La diferencia se consideró significativa cuando $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**) y $p < 0,001$ (***)).

Para conocer el grado de asociación entre las variables biológicas encontradas durante los ensayos (grosor de los vasos subintestinales, fenotipo, malformaciones) con las variables fisicoquímicas del ensayo (presencia de iones Ca, Si, P, y Cu), se aplicó un análisis de multivarianza. Las asociaciones lineales entre las variables se llevó a cabo utilizando el software SPSS, aplicando el principio de correlación de Pearson. En este tipo de análisis, los coeficientes factoriales próximos a 1 indican correlación entre las variables correspondientes.

2.2.6. Análisis de imagen

El análisis de imagen realizado para hacer el conteo de vasos subintestinales y para determinar el grosor de los vasos, se llevó a cabo utilizando el programa ImageJ 1.50i.

A cada pez se le hizo una fotografía en la zona del vitelo mediante fotomicroscopia, obteniéndose una imagen con el formato JPEG. Las dimensiones de la imagen son 1280 x 960 píxeles, los cuales se conservan al exportarla al ImageJ. Mediante la herramienta de zoom se eligió un factor de escala de 150 %, centrándose en la zona donde se encontraba el vitelo. Para determinar las medias del número y grosor de los vasos subintestinales se utilizaron 20 peces para cada ensayo. Los resultados obtenidos se representaron mediante un gráfico de distribución.

3. Resultados y discusión

3.1. Resultados de los ensayos *in vitro*

3.1.1 Viabilidad celular

Durante el ensayo, se sembraron 500 células en una placa y se cultivaron en medios que contienen materiales MBG y SG-MBG-5Cu en las dos concentraciones, 100 y 300 mg·L⁻¹. El conteo celular se llevó a cabo diariamente para evaluar la influencia de los materiales en la supervivencia celular. En la Figura 4.8 se muestra la curva de crecimiento celular de los cultivos con los diferentes medios ensayados durante 7 días de tratamiento.

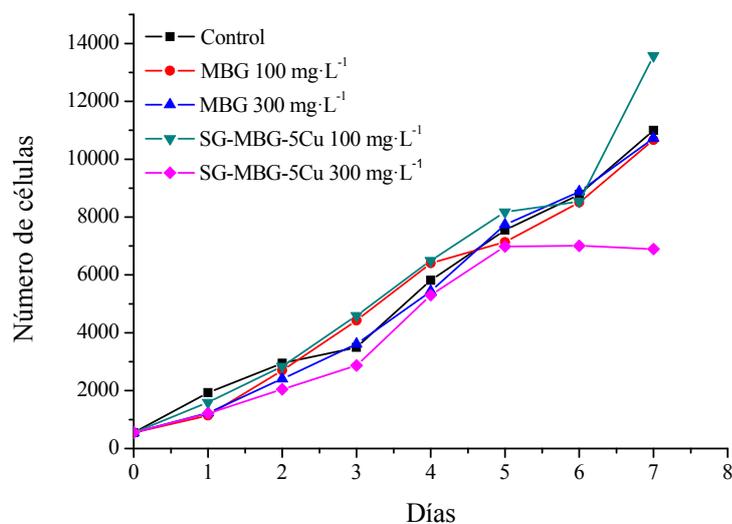


Figura 4.8. Curva de crecimiento celular de los cultivos conteniendo los materiales ensayados.

Los resultados nos indican una mejor respuesta de crecimiento celular en cultivo con medio que contenía SG-MBG-5Cu a bajas concentraciones ($100 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$), presentando 13572 células a los 7 días con relación a las 10998 células encontradas en el control. También se observa un efecto inhibitorio en el crecimiento celular para los cultivos con medio que contenía SG-MBG-5Cu a $300 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$. Para los materiales MBG a 100 y $300 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ se observa un cinética de crecimiento celular análoga al observado para el control.

3.1.2 Migración celular

El ensayo consistió en provocar una herida en un cultivo celular y estudiar la reparación de la misma por el cierre de la herida en función del tiempo. En la Figura 4.9 se muestran las fotografías a las 4 y 7 h donde se observa la migración celular a la herida en la monocapa para las células cultivadas con medios que contenían los materiales MBG y SG-MBG-5Cu a 100 y $300 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$. A partir de las fotografías se calculó el área libre de la herida para determinar el porcentaje de células que migran. Los resultados se observan en la Figura 4.10.

En los resultados no se aprecian diferencias significativas a las 4 h de ensayo, sin embargo a las 7 h las diferencias son evidentes. Como se puede observar en las Figuras 4.9 y 4.10, el ensayo de cierre de herida fue más efectivo para las células cultivadas en medios con MBG libre de Cu, siendo más significativo para el MBG a bajas concentraciones ($100 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$). La migración celular observa para las cultivos con SG-MBG-5Cu presentan un comportamiento similar al control.

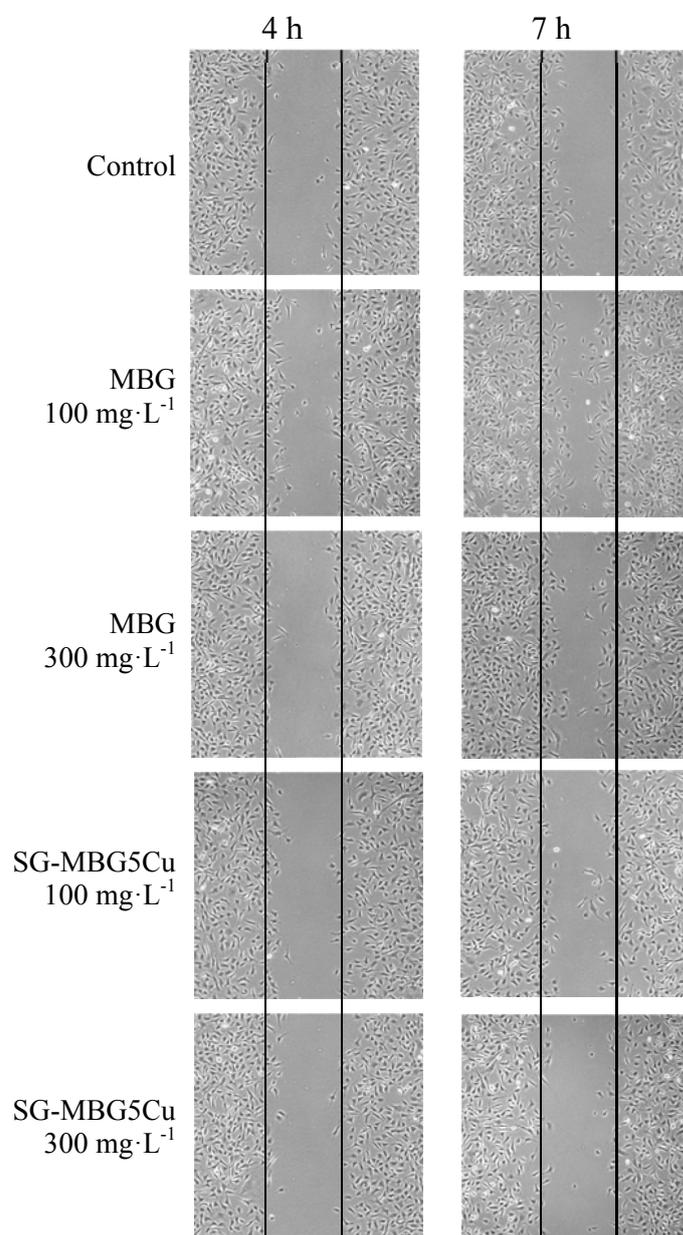


Figura 4.9. Ensayo de cierre de herida en la monocapa para las células cultivadas con medios que contenían los materiales ensayados, a las 4 y 7 h de tratamiento.

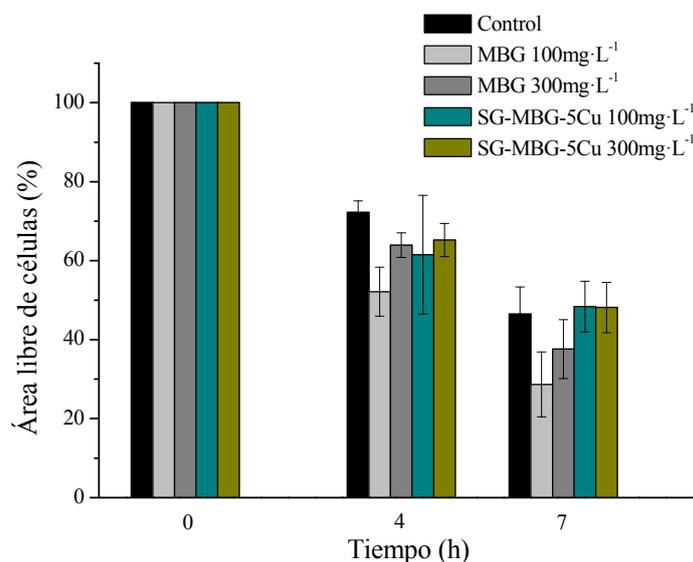


Figura 4.10. Porcentaje de área libre de células de la herida en la monocapa a las 4 y 7 h de cultivo en medios que contenían los materiales de ensayo.

3.2. Resultados de los ensayos *in vivo*

3.2.1. Ensayo tipo 1: Embriones expuestos a medios conteniendo MBG y SG-MBG-5Cu

Para determinar la concentración del ion Cu soluble en los medios de exposición se llevó a cabo un análisis ICP-MS. Para esta medida se acumularon todos los cambios de medio que se hicieron durante los 5 días que duró el ensayo. Los resultados del análisis se presentan en la Tabla 4.4. Se observa un ligero aumento en el pH, consecuencia de la disolución de los iones que componen el material.

Tabla 4.4. Análisis ICP-MS y pH de soluciones y dispersiones de exposición para el ensayo tipo 1.

Muestra	Concentración inicial del material (mg·L ⁻¹)	Concentración de iones (mg·L ⁻¹)				Porcentaje Degradación de los materiales* (%)	pH
		Si	P	Ca	Cu		
Medio E3	--	--	--	--	--	--	7.16
CuCl ₂	0.05	--	--	--	0.015	---	7.19
MBG	300	4.300	0.009	3.100	--	4.04	7.23
	3000	37.400	0.016	15.500	--	3.53	7.27
SG-MBG-5Cu	300	5.000	0.017	3.300	0.005	4.79	7.44
	3000	36.300	0.128	20.700	0.171	3.49	7.35

*Porcentaje de degradación de los materiales estimada a partir del análisis ICP-MS del ion Si

Los resultados indican la disolución al medio de iones Si, Ca, P y Cu como consecuencia de la degradación de los materiales. A partir de la cantidad de iones Si disueltos en solución se estimó la cantidad de SiO₂ disuelta como un indicador del grado de degradación del material. Durante el experimento, los materiales se disuelven en torno al 4 % de la masa total inicial.

Uno de los primeros cambios observados en los embriones que estuvieron expuestos a los materiales y a la solución de CuCl₂ fue el retraso en los tiempos de eclosión. Vicario-Parés y col.⁴⁰ ya habían hecho esta observación en el 2014, al encontrar un retraso en la eclosión de los embriones de pez cebra expuestos 72 h a 500 ppb de nanopartículas de CuO. También encontraron que por encima de esas concentraciones disminuía la tasa de eclosión aumentando las malformaciones o mortalidad de los peces.

En nuestro ensayo, se observa un 100 % de eclosión para los embriones control a las 72 hpf, hecho que afirman investigadores expertos en el modelo del pez cebra¹⁵. El mismo comportamiento se observa al utilizar la dispersión de los materiales a baja concentración y con el material que no contiene Cu, donde la eclosión de los embriones ocurre a los tiempos esperados. Sin embargo, para los embriones expuestos a medios que contienen Cu o el material MBG libre de Cu a altas concentraciones, la eclosión se retrasa (Ver Figura 4.8).

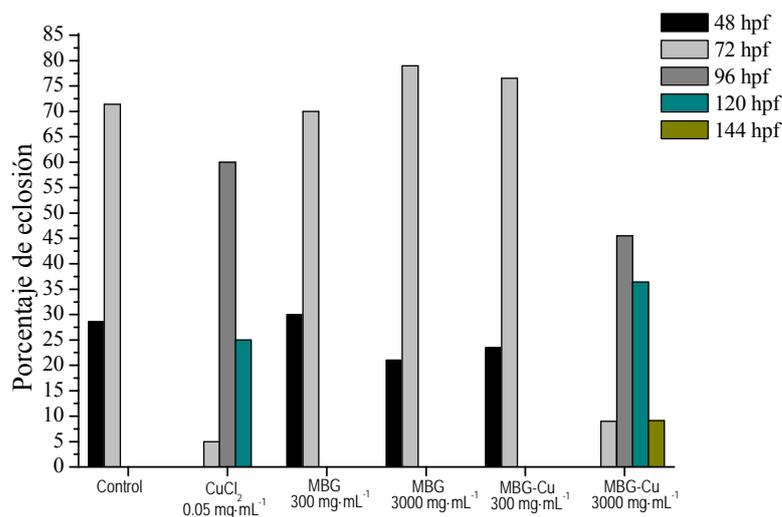


Figura 4.8. Representación del porcentaje de los embriones para los distintos medios con los materiales ensayados.

Los resultados nos indican que, por tanto, el efecto es dependiente de la dosis como de la composición del material y particularmente de la mayor o menor presencia del ion Cu. Específicamente, los embriones en medio que contenía 0.05 mg·L⁻¹ de

CuCl₂ (0.018 mg Cu L⁻¹) y 3000 mg·L⁻¹ de SG-MBG-5Cu (0.171 mg Cu L⁻¹) particulado, tardaron hasta 120 y 144 hpf, respectivamente, en eclosionar.

Los análisis de ICP-MS de concentración de iones Cu indican que aunque en el caso de la dispersión de 3000 mg·L⁻¹ SG-MBG-Cu hay significativamente más Cu en el medio (0.171 mg·mL⁻¹) que en la solución de 0.05 mg·L⁻¹ de CuCl₂ (0.015 mg·mL⁻¹), el retraso en el tiempo de eclosión es similar. Esto puede deberse a que el Cu, incorporado mediante la sal soluble, ha podido estar en solución a tiempos más tempranos que el Cu administrado por la degradación del material SG-MBG-5Cu.

En el 2012, Lin y col.⁴¹, publicaron un estudio sobre la acción de óxidos metálicos en forma de nanopartículas sobre la actividad del enzima de eclosión del pez cebra (ZHE1, por Zebrafish hatching enzyme). Esta enzima se expresa en las células de las glándulas de eclosión del vitelo de embriones a las 24 hpf y cataliza la digestión del corion^{41,42}. La ZHE1 es una metaloproteasa dependiente de Zn cuyo sitio activo de unión al Zn⁺² incluye tres residuos histidina^{42,43}. Estos autores sugieren que el Cu divalente tiene la capacidad de sustituir al Zn en los sitios activos y, como consecuencia, limitar o inhibir la actividad del enzima⁴¹. Los resultados indican que en el caso del Cu incorporado al medio mediante la sal soluble afecta la eclosión de los embriones de forma más severa que el Cu incorporado al medio por la degradación del material SG-MBG-5Cu.

Es importante destacar que, durante las exposiciones de medio al material SG-MBG-5Cu, se observó que se produce una agregación de las micropartículas de partida. Esta formación de agregados incrementa con la concentración y el tiempo de exposición. En las dispersiones con SG-MBG-5Cu, en especial para SG-MBG-

5Cu 3000 mg·L⁻¹ (0.171 mg Cu L⁻¹), se observa que las partículas se agregan y se adhieren al corion del embrión (Ver Figura 4.9). Mientras que en los medios con materiales MBG libre de Cu no se observó ningún tipo de agregación de partículas.

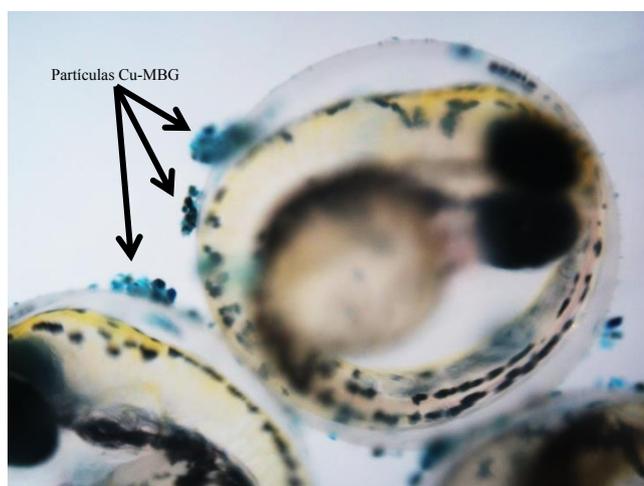


Figura 4.9. Embrión en medio E3 conteniendo 3000 mg SG-MBG-5Cu L⁻¹.

Es posible que el Cu sea capaz de reconocer sitios de unión, tales como los centros activos del ZHE1. Varios estudios sobre la evaluación de la toxicidad de óxidos metálicos nanoparticulados sugieren que, la agregación de nanopartículas en la superficie y en los canales del corión, interfiere con el transporte regular de la membrana. Los poros en el corion son necesarios para el oxígeno, nutrientes y para la eliminación de desechos. Lee y col.⁴⁵ hicieron medidas de los diámetros de los canales de poro de corion, estimándolos entre 0.5 y 0.7 μm. Con ello señalan que los tamaños de los canales del corion eran mayores que el de las nanopartículas y que esto les permitía la entrada al espacio coriónico mediante difusión pasiva. En

nuestro caso, es improbable, que las partículas del material hayan atravesado la membrana coriónica, ya que el tamaño de las partículas en suspensión, que se encuentra ente 10-32 μm , que es mucho mayor que el diámetro de los poros. Otros autores sugieren que la agregación de nanomateriales, observadas en estructuras tales como los nanotubos de carbón⁴⁶ o ZnO nanoparticulado⁴⁷, en la superficie del corion podrían reducir la entrada de oxígeno a través de estos canales. Como consecuencia a este efecto se produciría hipoxia que, a su vez, suma la causa de este retraso en la eclosión.

Con estos resultados podemos inferir que la superficie del corion tiene una afinidad o preferencia por el material que contiene Cu, lo cual puede deberse a su valencia, favoreciendo que las partículas del SG-MBG-5Cu se adhieran en la superficie coriónica produciendo un retraso en la eclosión de los embriones. En primera instancia, el retraso en la eclosión de los embriones podría atribuirse a la posible interferencia del Cu en la actividad enzimática de la ZHE1, ya que se observó el mismo fenómeno con la solución de CuCl_2 donde no hubo ninguna agregación de partículas en la superficie del corion. Sin embargo, no se pueden descartar que las partículas de Cu afecte la oxigenación del embrión, induciendo hipoxia por las perturbaciones osmoregulatorias en la membrana coriónica, que provoque un retraso en los tiempos de eclosión.

En la literatura se encuentran evidencias de que la eclosión de los embriones es muy sensible al Cu iónico y que este es muy tóxico para especies acuáticas. Se hizo una revisión bibliográfica para poder determinar la concentración a usar de CuCl_2 como control positivo del ensayo. Sin embargo, se encontraron discrepancias en la concentración letal media (LC50, por Lethal concentration 50 %) de CuCl_2 indicadas en la literatura para las larvas del pez cebra. Mientras algunos autores la

encuentran alrededor de $0.1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-148,49}$, otros le dan un valor de $3 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-140}$. Estos últimos⁴⁰, señalan que, utilizando $0.1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de CuCl_2 , solo el 40 % de los embriones eclosionan y que, a concentraciones más altas, ninguno de los embriones vivos tiene la capacidad de eclosionar por sí mismo. También se ha encontrado que los embriones menores de 24 hpf son más sensibles al Cu. En este sentido, Dave y col.⁵⁰ encontraron que embriones de 4 hpf expuestos a concentraciones de $0.128 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ durante 24 h mostraban un índice de mortalidad del 100 %, y que, a $0.001 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, el 50 % de los embriones no llegan a eclosionar. A concentraciones más bajas ($0.000125 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$), estos autores observaron retraso en la eclosión pero sin afectar la supervivencia de los embriones. Por otro lado, también se tomó como referencia los ensayos *in vitro* con BAEC realizados por McAuslen y Reilly⁵¹, para considerar las concentraciones de trabajo de CuCl_2 con efectos pro-angiogénicos. Estos autores observaron que el CuCl_2 estimulaba la motilidad celular en el intervalo de las concentraciones ensayadas ($0.013 - 13 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1} \text{ CuCl}_2$), y señalan como concentración ideal $0.27 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1} \text{ CuCl}_2$ (0.1 mg Cu L^{-1} y como concentración mínima efectiva $0.013 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de CuCl_2 ($0.006 \text{ mg Cu L}^{-1}$)).

Tras revisar esta información preliminar se eligió una concentración para el control positivo de $0.05 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de CuCl_2 ($0.018 \text{ mg Cu L}^{-1}$) que estando lejana al LC50 permitiera un 100 % de eclosión de los embriones y la exploración de concentraciones mínimas con efectos angiogénicos por Cu iónico. Igualmente, la elección de las concentraciones de los MBG y SG-MBG-5Cu, se realizó tras hacer una revisión de LC50 de CuO en forma de nanopartículas en pez cebra. Vicario-Perés y col.⁴⁰ realizaron un estudio comparando la toxicidad de diferentes óxidos metálicos nanoparticulados en embriones de pez cebra. Encontraron que a más de

10 mg·L⁻¹ de CuO aumentaba la mortalidad y las deformaciones en los peces que llegan a eclosionar. Por otro lado, Chan y col.⁵², han indicado que la exposición de embriones de pez cebra a nanopartículas de CuO (100 mg·L⁻¹), durante 5 días, disminuye el número de células endoteliales. Sin embargo, estos últimos señalan que, en el mismo ensayo pero realizado con nanopartículas de SiO₂, no da lugar a cambios antiangiogénicos ni tóxicos significativos. De acuerdo a esto, se eligieron las concentraciones de las suspensiones a utilizar en este ensayo. Se calculó la cantidad de material particulado de SG-MBG-5Cu equivalente al contenido 15 y 150 mg de CuO L⁻¹, que corresponde a 300 y 3000 mg de SG-MBG-5Cu L⁻¹. Aunque estas concentraciones son mayores que las utilizadas por otros autores, se ha tenido en consideración que nuestro material no está formado por nanopartículas y por tanto la cinética de redisolución de los materiales en iones sería más lenta. Para el vidrio MBG libre de Cu se utilizó la misma concentración para poder hacer una comparación adecuada.

Los resultados de este ensayo nos indica que las cantidades utilizadas no llegan a ser tóxicas, ya que en ningún caso hubo mortalidad ni malformaciones evidentes. En cuanto a la eclosión se dio en todos los medios ensayados, aunque tardía para el caso de CuCl₂ y SG-MBG-5Cu a altas concentraciones (Ver Figura 4.8). Un primer análisis de las fotografías sugiere que tras la adición de la solución de 0.05 mg·L⁻¹ de CuCl₂ no se observan cambios significativos en la cantidad y apariencia de los vasos subintestinales con respecto al control. Mientras que en los peces que estuvieron expuestos a las suspensiones de MBG y SG-MBG-5Cu es evidente un efecto de vasodilatación de los vasos subintestinales con respecto al control (Ver Figura 4.10).

Se obtuvieron una serie de imágenes del vitelo de los peces muestra de forma sistemática y se realizó un análisis de los vasos subintestinales observados en las imágenes tal como se detalla en la Tabla 4.5. Cabe mencionar, que en algunos peces no se alcanzan a observar claramente los vasos subintestinales por la estructura reticular que los envuelve¹⁵, y aunque se puede inferir la existencia de los vasos subintestinales en el vitelo, se descartaron para el análisis.

Tabla 4.5. Promedio del número y del grosor de los vasos subintestinales contabilizados en vitelo para el ensayo tipo 1.

Muestra	Promedio de número de vasos	Promedio del grosor de los vasos (μm)
Control	6.2 ± 1.5	6.03 ± 1.59
$0.05 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1} \text{ CuCl}_2$	7.3 ± 3.3	6.04 ± 1.52
$\text{MBG } 300 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$	8.1 ± 2.7	6.7 ± 1.70 **
$\text{MBG } 3000 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$	8.6 ± 2.5	6.82 ± 1.80 ***
$\text{SG-MBG-5Cu } 300 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$	10.6 ± 3.5	7.58 ± 2.31 ***
$\text{SG-MBG-5Cu } 3000 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$	6.8 ± 2.9	7.44 ± 1.89 ***

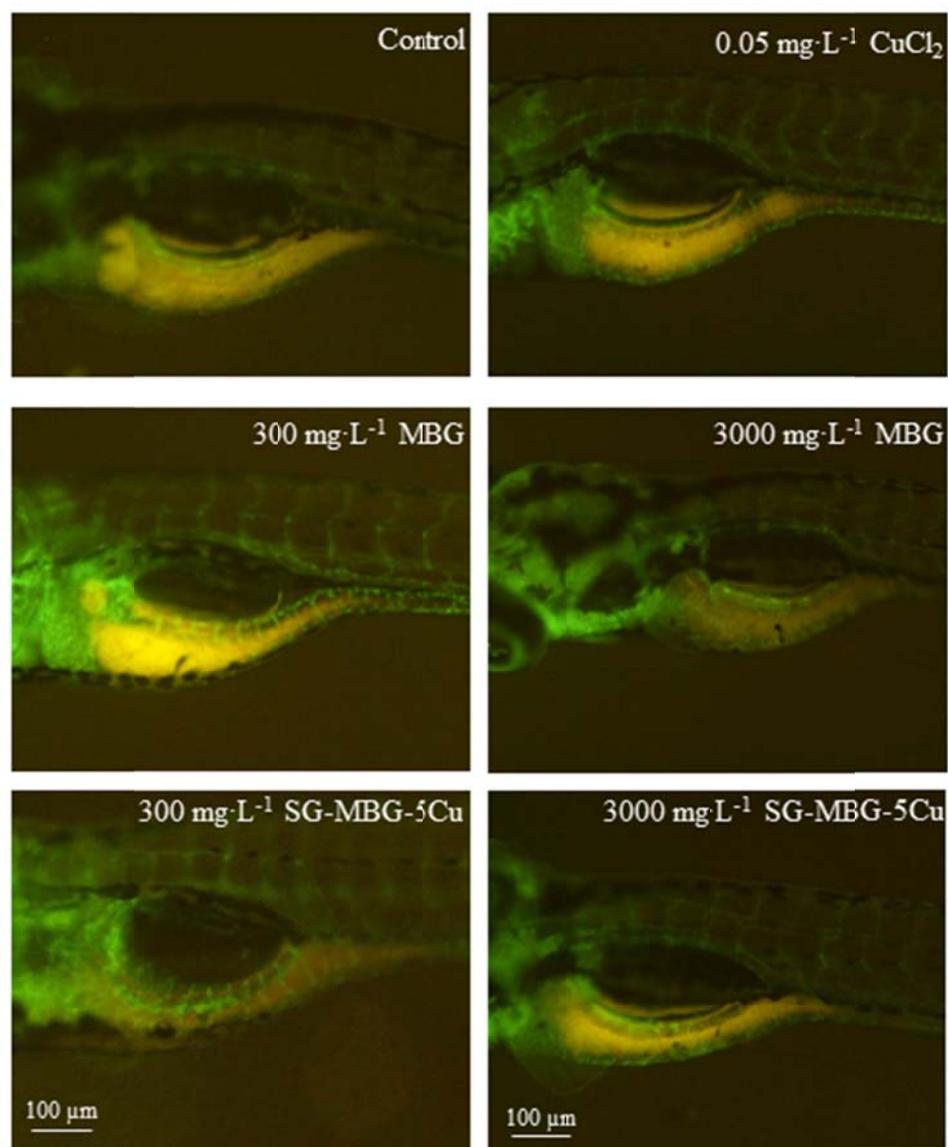


Figura 4.10. Fotos representativas de los vasos subintestinales de los peces a los 5 días de tratamiento de exposición de embriones en cada una de las soluciones y dispersiones utilizadas en el ensayo tipo 1.

Como se observa en la Tabla 4.5, los peces que estuvieron expuestos a las soluciones y dispersiones de los materiales MBG y SG-MBG-5Cu, presentan una mayor cantidad de vasos subintestinales. El mayor efecto se encuentra para los peces que estuvieron expuestos a $300 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ SG-MBG-5Cu ($0.005 \text{ mg Cu L}^{-1}$ y 5 mg Si L^{-1}). También se encontró que a altas concentraciones de SG-MBG-5Cu ($3000 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$), la cantidad de vasos subintestinales decrece, lo cual pudiera ser indicio de efectos tóxicos para esta concentración.

Respecto al grosor de los vasos subintestinales, los resultados se muestran también en la Tabla 4.5 donde aparece la media del grosor de los vasos subintestinales, con su correspondiente nivel de significación (p-valor) con respecto al control. En la Figura 4.11 se representan los resultados mediante una gráfica de distribución. Como se indica en la Tabla 4.5, se encontró un mayor engrosamiento en los vasos para los peces expuestos a $300 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ MBG-Cu ($0.005 \text{ mg CuL}^{-1}$ y 5 mg Si L^{-1}), donde el promedio del grosor de los vasos fue de 7.58 ± 2.31 en comparación con los 6 ± 1.59 del control.

En las distribuciones del grosor de los vasos no se observan cambios en el grosor de los vasos subintestinales de los peces expuestos $0.05 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ CuCl_2 . Mientras que los peces expuestos a los materiales MBG libre de Cu presentan un ligero engrosamiento en los vasos subintestinales dependiente de la dosis. El aumento en el grosor de los vasos es más evidente para los peces expuestos a $300 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ SG-MBG-5Cu. Igualmente, se observa que el grosor de los vasos encontrados para $3000 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ SG-MBG-5Cu son más gruesos que los vasos del control pero muy similar a los encontrados en los peces expuestos al material SG-MBG-5Cu a bajas concentraciones.

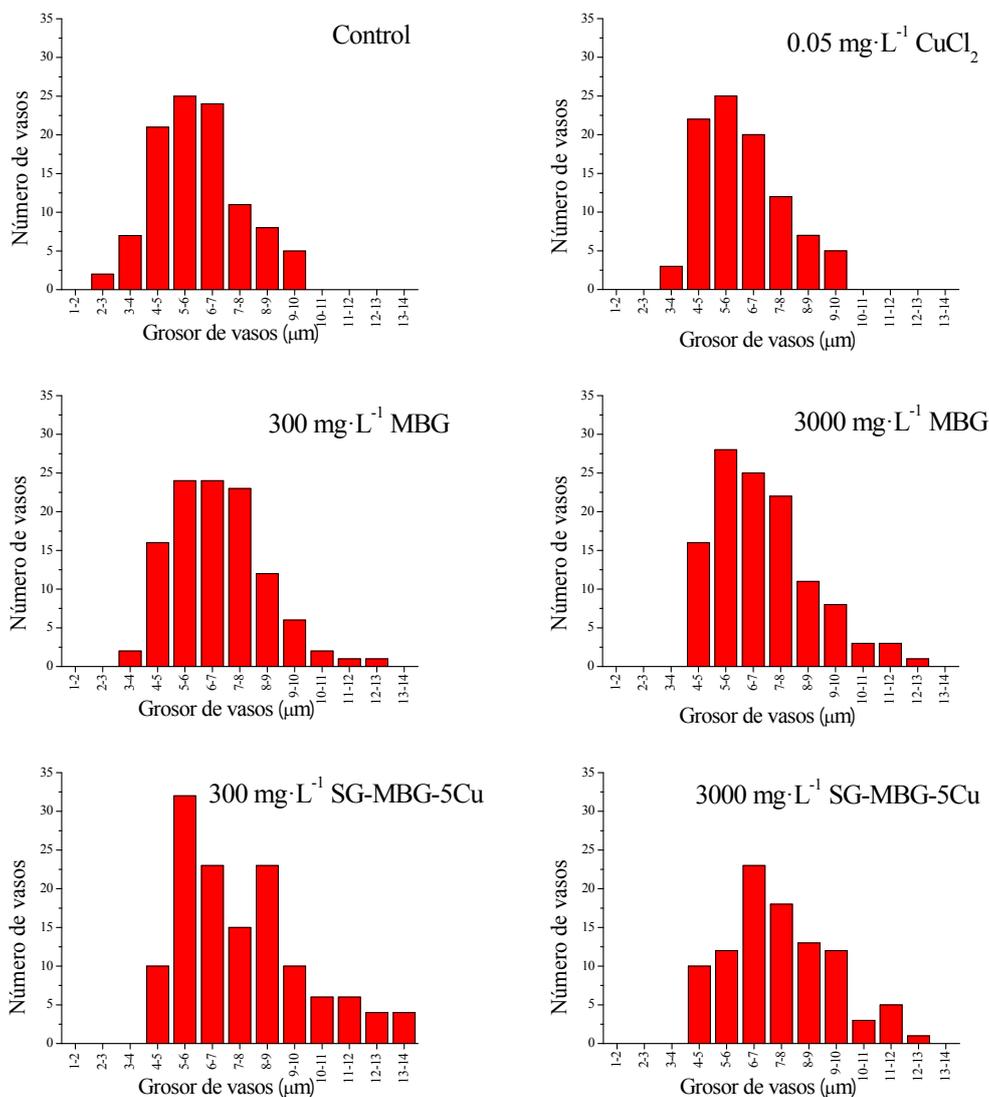


Figura 4.11. Gráfica de distribución del grosor de los vasos subintestinales de los peces a los 5 días de tratamiento en cada una de las soluciones y dispersiones utilizadas en el ensayo de exposición de embriones (Ensayo tipo 1).

En las dispersiones de MBG (300 y 3000 mg·L⁻¹) y SG-MBG-5Cu (300 mg·L⁻¹), se pueden apreciar una cantidad mayor de vasos subintestinales y con mayor grosor con respecto al control y al control positivo (0.05 mg·L⁻¹ CuCl₂). Basándonos en estos resultados podemos deducir que hay un efecto proangiogénico en ambos materiales, siendo más evidente para el material que contiene Cu MBG-5Cu. El mayor efecto angiogénico es observado para las dispersiones 300 mg·L⁻¹ SG-MBG-5Cu, mientras que a altas concentraciones (3000 mg·L⁻¹) este efecto se revierte. Aunque harían falta ensayar concentraciones intermedias para constatar este resultado, un primer análisis indicaría que la concentración 3000 mg·L⁻¹, supera la concentración efectiva, y aunque no se han observado casos de mortalidad ni de malformaciones, el efecto angiogénico parece disminuir.

Otro resultado obtenido en este ensayo fue la presencia de un fenotipo asociado con la vasodilatación y a la angiogénesis. Algunos peces expuestos a los materiales de estudio presentan ramificación en la vasculatura y la fusión de vasos subintestinales (Ver Figura 4.12). En la Figura 4.13 se representan mediante una gráfica de barras el porcentaje de peces que presentaron ese fenotipo. Las únicas diferencias significativas observadas son para las muestras a bajas concentraciones. En los peces expuestos a 300 mg·L⁻¹ SG-MBG-5Cu se observa un mayor porcentaje de peces que presentan este fenotipo.



Figura 4.12. Imagen representativa del fenotipo angiogénico.

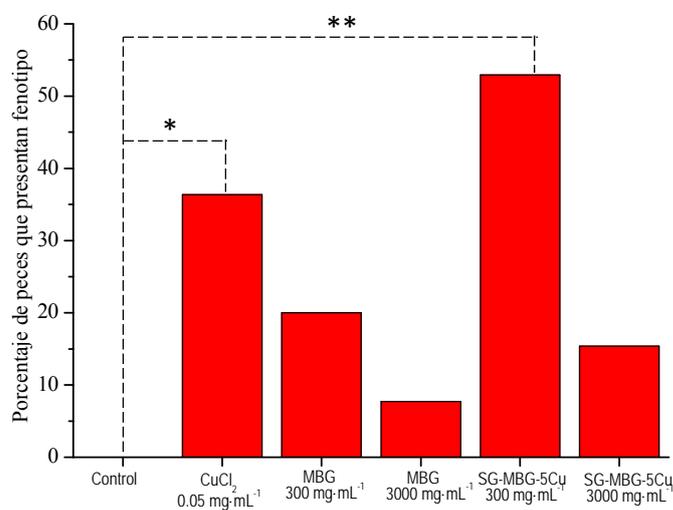


Figura 4.13. Porcentaje de peces que presentan el fenotipo angiogénico.

En este trabajo se ha comprobado que la degradación del material produce la liberación de iones Si, Ca, P y Cu al medio y que estos iones tienen una influencia significativa en la respuesta angiogénica en el modelo estudiado. Además, el primer análisis indica diferencias relevantes para los dos materiales estudiados MBG y SG-MBG-5Cu, siendo el efecto angiogénico más marcado para el caso del material que contiene Cu.

Para desglosar el efecto de la concentración de los distintos productos de redisolución de los materiales se realizó un análisis de multivarianza donde han considerado la concentración los iones Si, Ca, P y Cu medidas por ICP-MS y de la influencia de los parámetros medidos, grosor y fusión de los vasos subintestinales (fenotipo). El análisis de multivarianza es un método estadístico que se utiliza para determinar simultáneamente la contribución de varios factores en un resultado o evento, donde los coeficientes factoriales de correlación próximos a 1 nos indican una correlación lineal entre las variables. Los resultados del análisis se muestran en una matriz de correlación lineal que se puede observar en la Tabla 4.6.

Tabla 4.6. Matriz factorial de correlaciones lineales resultante del análisis de multivarianza.

Matriz factorial						
Variables	Grosor	Fenotipo	Si	Ca	P	Cu
Grosor	1	0.395	0.502	0.643	0.612	0.480
Fenotipo	0.395	1	-0.367	-0.407	-0.125	-0.116
Si	0.502	-0.367	1	0.755	0.679	0.584
Ca	0.643	-0.407	0.755	1	0.506	0.340
P	0.612	-0.125	0.679	0.506	1	0.981
Cu	0.480	-0.116	0.584	0.340	0.981	1

Como se puede observar, los resultados indican que el aumento en el grosor de los vasos subintestinales (vasodilatación) está relacionada con la degradación de todos los iones y que la presencia del fenotipo esta correlacionada linealmente con la vasodilatación de vasos subintestinales.

También hay que considerar que los procesos de degradación de los materiales particulados donde se liberan los iones de su composición, también pueden dar lugar a su parcial descomposición en partículas de tamaño más pequeño y como consecuencia, sufrir una posible internalización de las partículas en el pez cebra por otras vías como la ingestión o filtración de las branquias⁵³⁻⁵⁶.

3.2.2. Ensayo tipo 2: Microinyección directa en vitelo de materiales MBG y SG-MBG-5Cu

Como observación inicial es importante apuntar que en este tipo de ensayo y a diferencia con el ensayo tipo 1 no hubo ningún tipo de efecto en los tiempos de eclosión de los embriones, alcanzándose una tasa de eclosión del 100 % a las 72 h para todos los casos.

Y al igual que en el ensayo anterior se tomaron imágenes del saco vitelino de los peces buscando cambios en los vasos subintestinales. En la Figura 4.14 se observan fotos representativas de los peces microinyectados. El grosor de los vasos medidos se presenta en la Tabla 4.7 y mediante una gráfica de distribución en la Figura 4.15.

Tabla 4.7. Promedio del número y grosor de los vasos subintestinales medidos en el ensayo tipo 2.

Muestra	Promedio de número de vasos	Promedio del grosor de los vasos (μm)
Control	6.0 ± 1.5	5.57 ± 1.19
$0.05 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1} \text{ CuCl}_2$	6.1 ± 2.0	5.69 ± 1.20
$\text{MBG } 300 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$	6.3 ± 2.5	$5.98 \pm 1.39^*$
$\text{MBG } 3000 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$	6.1 ± 2.2	5.10 ± 0.87
$\text{SG-MBG-5Cu } 300 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$	6.8 ± 2.0	$6.16 \pm 1.37^{**}$
$\text{SG-MBG-5Cu } 3000 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$	6.5 ± 1.5	5.62 ± 1.51

En este ensayo no se observó varianza en el número de vasos para ninguna de los materiales ensayados con respecto al control. Sin embargo, si se observan algunas diferencias en el grosor de los vasos subintestinales. Al igual que en el ensayo anterior, para los peces inyectados con $0.05 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1} \text{ CuCl}_2$, no se observa efecto en el grosor de los vasos subintestinales. Mientras que para los peces inyectados con medios conteniendo materiales MBG y SG-MBG-5Cu a bajas concentraciones ($300 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) si se observa un ligero aumento en el grosor de los vasos subintestinales.

Para las concentraciones altas ($3000 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$: 12.6 ng) de los materiales MBG y SG-MBG-5Cu no se observan un efecto en el aumento y grosor de vasos subintestinales. Sin embargo, si se observó una degeneración en la apariencia general de los peces, especialmente para los peces que fueron inyectados con SG-MBG-5Cu. Aunque la dosis no llegó a ser letal, se observan cambios morfológicos en los peces, posiblemente debido a la estrés oxidativo⁵⁷. En la Figura 4.16, se muestra un pez con malformación de columna moderada (cifosis) y en la Figura 4.17, el porcentaje de peces que presentaron ese cambio.

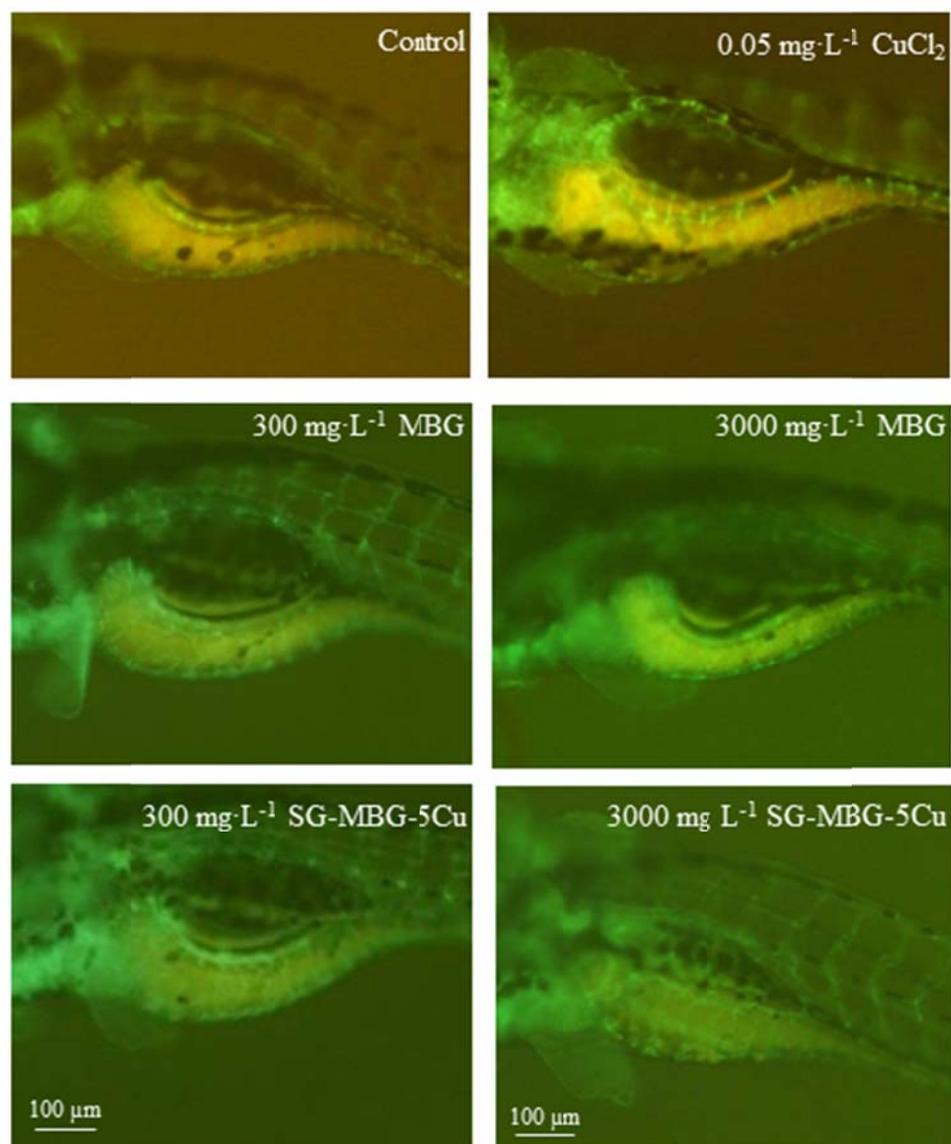


Figura 4.14. Imágenes representativas de los vasos subintestinales de los peces microinyectados a los 5 días de tratamiento en cada una de las soluciones y dispersiones utilizadas en el ensayo tipo 2.

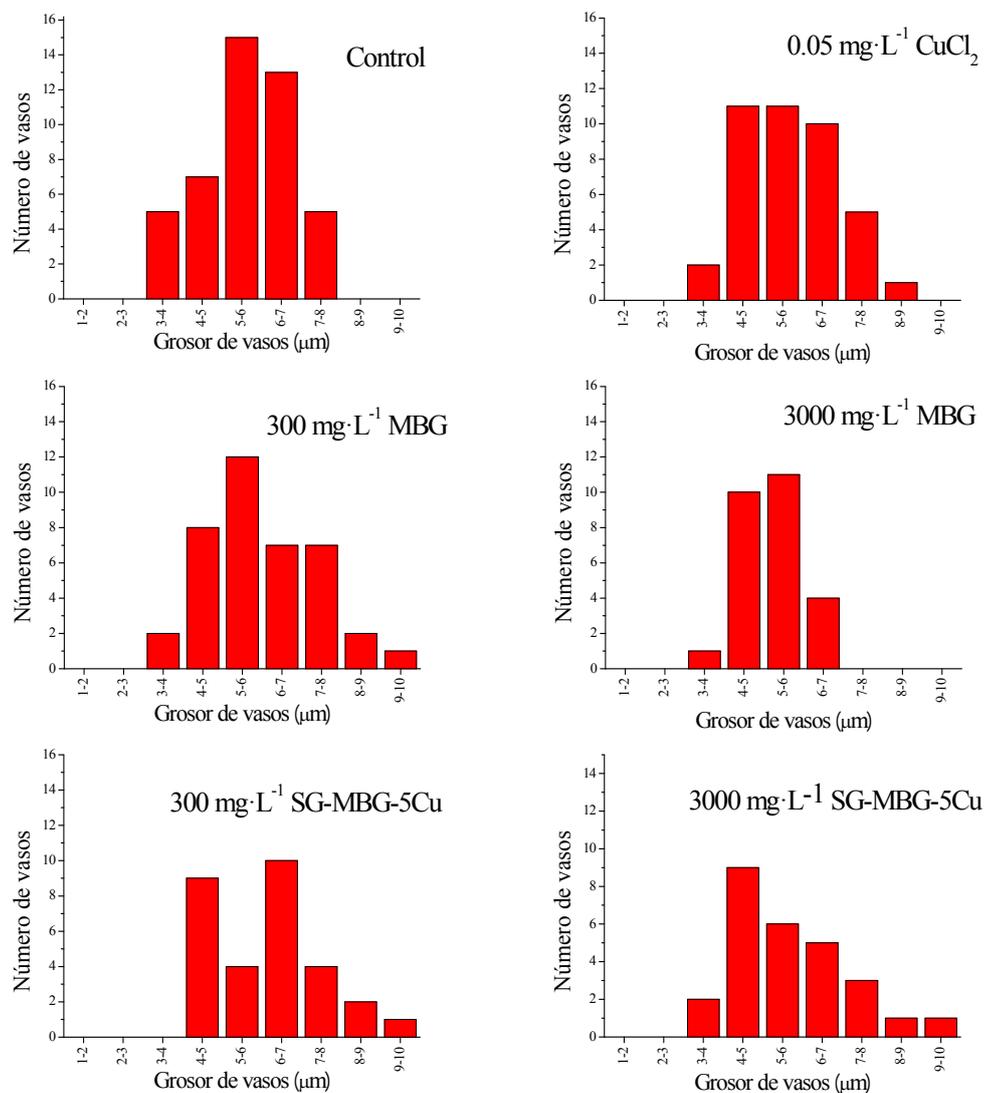


Figura 4.15. Gráfica de distribución del grosor de los vasos subintestinales de los peces a los 5 días de tratamiento en cada una de las soluciones y dispersiones utilizadas en el ensayo de microinyección en vitelo de embriones (Ensayo tipo 2).



Figura 4.16. Imagen representativa de un pez cebra que presentaba cifosis.

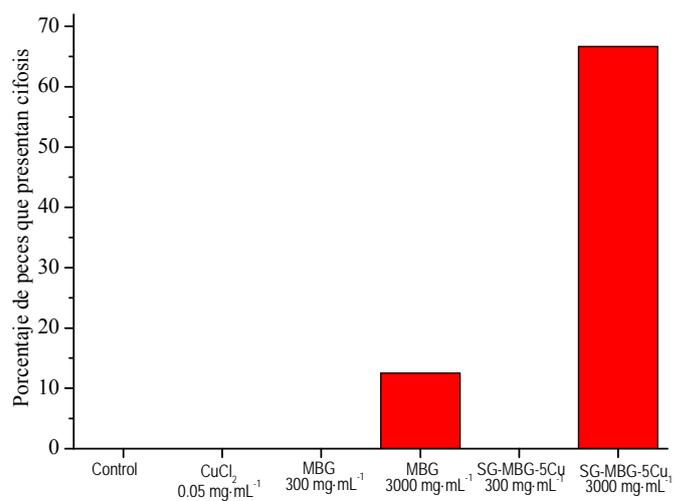


Figura 4.17. Porcentaje de peces que presentan cifosis.

Los resultados obtenidos sugieren que utilizando concentraciones de 3000 mg·mL⁻¹ tiene un impacto más severo en el pez cuando se introduce directamente en su organismo.

Como se ha mencionado antes, el Cu es un ion que favorece el proceso de angiogénesis pero también es un elemento muy reactivo que a altas concentraciones es tóxico y se manifiesta alterando el metabolismo de transporte electrónico en las mitocondrias, produciendo necrosis celular y estrés oxidativo. Para el caso de los peces microinyectados con la dispersión $3000 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ SG-MBG-5Cu, ese efecto pro-angiogénico desaparece y las malformaciones en la morfología del pez son evidentes, por lo que podemos deducir que esta concentración está por encima de la conveniente. Como una perspectiva futura, habría que considerar concentraciones intermedias para poder determinar la dosis adecuada a inyectar.

En ambos tipos de ensayo se observa un efecto proangiogénico de todos los administrados localmente por la degradación del material. Para el caso del ion Si, este efecto había sido observado anteriormente por otros autores en ensayos anteriores⁵⁸. Se ha encontrado que los productos de redisolución de Bioglass® 45S5 y de CS estimulan la secreción de factores de crecimiento angiogénicos en células HBMSC y HUVEC y lo correlacionan especialmente por la presencia de iones Si^{59-61} . Sin embargo, no está dilucidado el mecanismo por el que el Si genera el aumento de la expresión de factores y receptores angiogénicos. Anteriormente se mencionó que el grupo de Li y col.⁶² han realizado estudios sobre el rol del Si en la angiogénesis, a partir de la degradación de CS. Ellos sugieren que el Si, al igual que otros cationes como el Co, Cu y Ni, puede interactuar con los factores HIF-1 y la PDH e inhibir la degradación del HIF-1 α , bajo condiciones de normoxia^{56,59,63}. Aunque, como ellos mismos insisten en que hacen falta más estudios para comprobar esta hipótesis.

En el caso del Cu, existe evidencia, tanto *in vitro* como *in vivo* de que un exceso de Cu produce alteraciones en los mecanismos que regulan el Cu dentro de la

celula^{64,65}. Al igual que Si, algunos autores afirman que el Cu puede estabilizar la HIF-1 en condiciones de normoxia⁶⁶, pero también hay evidencia de que el Cu induce a una hipoxia local al interferir en la actividad normal de la mitocondria, incrementando el consumo de oxígeno y la producción de NOs y ROS, que terminaría desencadenando el proceso de angiogénesis^{57,66,67}. Por lo que, independientemente del mecanismo, se conoce que el Cu tiene efectos en sistemas vivos, inclusive a bajas concentraciones.

4. Conclusiones

El modelo de pez cebra combina la estabilidad de un sistema *in vitro* con la relevancia de un modelo vertebrado *in vivo*, y es efectivo para evaluar en breves tiempos las propiedades biológicas de los materiales particulados, como fármacos y nanopartículas. En estos ensayos se ha utilizado este modelo para evaluar la funcionalidad angiogénica de los materiales particulados MBG y SG-MBG-5Cu y el efecto los iones Si, Ca, P y Cu administrados al medio durante su degradación en el proceso angiogénico. Para ello se han analizado los cambios en la vasculatura de los vasos subintestinales del pez cebra.

En el ensayo tipo 1 se han incorporado los materiales particulados en el medio en el que se desarrolla el pez, mientras que en el ensayo tipo 2, los peces fueron microinyectados con las dispersiones preparadas, utilizando dos concentraciones, 300 y 3000 mg·L⁻¹ de los materiales. Los resultados obtenidos durante estos ensayos nos permiten extraer las siguientes conclusiones:

- El modelo *in vivo* y el criterio utilizado son eficaces para evaluar las propiedades angiogénicas para este tipo de biomateriales microparticulados.
- Ambos ensayos nos permiten afirmar que ambos biomateriales promueven el proceso de angiogénesis, siendo este efecto más evidente para el SG-MBG-5Cu. El MBG por sí solo tiene un efecto pro-angiogénico que se observa en el aumento en cantidad y grosor los vasos subintestinales de los peces expuestos al material, mientras que para el SG-MBG-5Cu el mismo efecto es observado pero en un porcentaje mayor.
- Los análisis ICP-MS permite correlacionar los efectos observados con la concentración de los productos de redisolución de los materiales en el medio y el análisis de multivarianza indica que la presencia de los iones es la responsable de los efectos observados.
- Los resultados nos indican que el efecto es más severo cuando el material se incorpora al pez mediante la microinyección, y que por lo mismo, las concentraciones utilizadas ($3000 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) durante el ensayo de microinyección podrían ser excesivas y cercanas a una concentración letal.
- Ambos tipos de ensayo sugieren que la dispersión de SG-MBG-5Cu a $3000 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ tiene efectos más severos que el MBG a la misma concentración, posiblemente debido a la presencia de Cu. Por un lado, el Cu iónico y particulado interfiere en la actividad de la ZEH1, retrasando los tiempos de eclosión de los embriones. Y en el ensayo de microinyección observamos que esa concentración inyectada en el pez provoca malformaciones en la morfología habitual del pez orientadas a las cabeza-vitelo-dorso.

- Todas las observaciones nos permiten afirmar que el sistema SiO₂-CaO-P₂O₅ es pro-angiogénico y que, cuando se incorpora Cu, el efecto se potencia. De igual forma, se observa que la contribución del Cu es pronunciada y evidente aun a bajas concentraciones. Lo que nos lleva a suponer que el Cu administrado durante la degradación de SG-MBG-5Cu particulado genera una hipoxia local que a concentraciones bajas favorece la expresión de los genes involucrados en el proceso de angiogénesis.
- Además, de los ensayos *in vitro* podemos concluir que los materiales MBG y SG-MBG-5Cu a concentraciones 100 y 300 mg·L⁻¹ no inhiben la supervivencia ni la migración *in vitro* de las células BAEC. Además, el material SG-MBG-5Cu a bajas concentración favorece el crecimiento celular, mientras que el MBG a bajas concentraciones estimula la migración celular.

Este trabajo representa un afianzamiento del modelo pez cebra para evaluar la funcionalidad angiogénica de biomateriales y una motivación para ampliar la utilización y desarrollo de estudios de angiogénesis de materiales MBG.

6. Referencias

- (1) Carmeliet, P.; Jain, R. K. Angiogenesis in Cancer and Other Diseases. *Nature* **2000**, *407*, 249–257.
- (2) Brewer, G. J. Copper Lowering Therapy with Tetrathiomolybdate as an Antiangiogenic Strategy in Cancer. *Curr. Cancer Drug Targets* **2005**, *5* (3), 195–202.
- (3) Tahergorabi, Z.; Khazaei, M. A Review on Angiogenesis and Its Assays. *Iran. J. Basic Med. Sci.* **2012**, *15* (6), 1110–1126.

- (4) Goodwin, A. M. In Vitro Assays of Angiogenesis for Assessment of Angiogenic and Anti-Angiogenic Agents. *Microvasc Res* **2007**, *74* (2-3), 172–183.
- (5) Staton, C. A.; Reed, M. W. R.; Brown, N. J. A Critical Analysis of Current in Vitro and in Vivo Angiogenesis Assays. *Int. J. Exp. Pathol.* **2009**, *90* (3), 195–221.
- (6) Staton, C. A.; Stribbling, S. M.; Tazzyman, S.; Hughes, R.; Brown, N. J.; Lewis, C. E. Current Methods for Assaying Angiogenesis in Vitro and in Vivo. *Int J Exp Path* **2004**, *85*, 233–248.
- (7) Pepper, M. S.; Belin, D.; Montesano, R.; Orci, L.; Vassalli, J. D. Transforming Growth Factor-Beta 1 Modulates Basic Fibroblast Growth Factor-Induced Proteolytic and Angiogenic Properties of Endothelial Cells in Vitro. *J. Cell Biol.* **1990**, *111* (2), 743–755.
- (8) Lawley, T. J.; Kubota, Y. Induction of Morphologic Differentiation of Endothelial Cells in Culture. *J. Invest. Dermatol.* **1989**, *93* (Suppl. 2), 59S – 61S.
- (9) Yang, S. Y.; Xin, X. H.; Zlot, C.; Ingle, G.; Fuh, G.; Li, B.; Moffat, B.; de Vos, A. M.; Gerritsen, M. E. Vascular Endothelial Cell Growth Factor-Driven Endothelial Tube Formation Is Mediated by Vascular Endothelial Cell Growth Factor Receptor-2, a Kinase Insert Domain-Containing Receptor. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **2001**, *21* (12), 1934–1940.
- (10) Gimbrone Jr., M. A.; Cotran, R. S.; Leapman, S. B.; Folkman, J. Tumor Growth and Neovascularization: An Experimental Model Using the Rabbit Cornea. *J. Natl. Cancer Inst.* **1974**, *52* (2), 413–427.
- (11) Kenyon, B. M.; Voest, E. E.; Chen, C. C.; Flynn, E.; Folkman, J.; D’Amato, R. J. A Model of Angiogenesis in the Mouse Cornea. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* **1996**, *37* (8), 1625–1632.
- (12) Liekens, S.; De Clercq, E.; Neyts, J. Angiogenesis: Regulators and Clinical Applications. *Biochem. Pharmacol.* **2001**, *61* (3), 253–270.
- (13) Dooley, K.; Zon, L. I. Zebrafish: A Model System for the Study of Human Disease. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **2000**, *10* (3), 252–256.

- (14) Lieschke, G. J.; Currie, P. D. Animal Models of Human Disease: Zebrafish Swim into View. *Nat. Rev. Genet.* **2007**, *8* (5), 353–367.
- (15) Kimmel, C. B.; Ballard, W. W.; Kimmel, S. R.; Ullmann, B.; Schilling, T. F. Stages of Embryonic Development of the Zebrafish. *Dev Dyn* **1995**, *203* (3), 253–310.
- (16) Parng, C.; Seng, W. L.; Semino, C.; McGrath, P. Zebrafish : A Preclinical Model for Drug Screening. *Assay Drug Dev. Technol.* **2002**, *1* (1), 41–48.
- (17) Rojas-Muñoz, A.; Miana, A. B.; Izpisúa Belmonte, J. C. El Pez Cebra, Versatilidad Al Servicio de La Biomedicina. *Investig. Cienc.* **2007**, 62–69.
- (18) Stainier, D. Y.; Fishman, M. C. The Zebrafish as a Model System to Study Cardiovascular Development. *Trends Cardiovasc. Med.* **1994**, *4* (5), 207–212.
- (19) Rubinstein, A. L. Zebrafish: From Disease Modeling to Drug Discovery. *Curr. Opin. Drug Discov. Devel.* **2003**, *6* (2), 218–223.
- (20) Dahm, R.; Geisler, R. Learning from Small Fry: The Zebrafish as a Genetic Model Organism for Aquaculture Fish Species. *Mar. Biotechnol.* **2006**, *8* (4), 329–345.
- (21) Kari, G.; Rodeck, U.; Dicker, A. P. Zebrafish: An Emerging Model System for Human Disease and Drug Discovery. *Clin. Pharmacol. Ther.* **2007**, *82* (1), 70–80.
- (22) Berghmans, S.; Murphey, R.; Wienholds, E.; Neubergh, D.; Kutok, J. L.; Fletcher, C. D. M.; Morris, J. P.; Liu, T. X.; Schulte-Merker, S.; Kanki, J. P.; Plasterk, R.; Zon, L. I.; Look, A. T. tp53 Mutant Zebrafish Develop Malignant Peripheral Nerve Sheath Tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2005**, *102* (2), 407–412.
- (23) Montazerolghaem, M.; Nyström, L.; Engqvist, H.; Karlsson Ott, M. Zebrafish: A Possible Tool to Evaluate Bioactive Ions. *Acta Biomater.* **2015**, *19*, 10–14.
- (24) Melet, F.; Motro, B.; Rossi, D. J.; Zhang, L.; Bernstein, A. Generation of a Novel Fli-1 Protein by Gene Targeting Leads to a Defect in Thymus

- Development and a Delay in Friend Virus-Induced Erythroleukemia. *Mol Cell Biol* **1996**, *16*, 2708–2718.
- (25) Thompson, M. A.; Ransom, D. G.; Pratt, S. J.; MacLennan, H.; Kieran, M. W.; Detrich, H. W.; Vail, B.; Huber, T. L.; Paw, B.; Brownlie, A. J.; Oates, A. C.; Fritz, A.; Gates, M. A.; Amores, A.; Bahary, N.; Talbot, W. S.; Her, H.; Beier, D. R.; Postlethwait, J. H.; Zon, L. I. The cloche and spadetail Genes Differentially Affect Hematopoiesis and Vasculogenesis. *Dev. Biol.* **1998**, *197* (2), 248–269.
- (26) Lawson, N. D.; Weinstein, B. M. In Vivo Imaging of Embryonic Vascular Development Using Transgenic Zebrafish. *Dev Biol* **2002**, *248* (2), 307–318.
- (27) Gong, Z.; Ju, B.; Wan, H. Green Fluorescent Protein (GFP) Transgenic Fish and Their Applications. *Genetica* **2001**, *111* (1-3), 213–225.
- (28) Schuermann, A.; Helker, C. S. M.; Herzog, W. Angiogenesis in Zebrafish. *Semin. Cell Dev. Biol.* **2014**, *31*, 106–114.
- (29) Fouquet, B.; Weinstein, B. M.; Serluca, F. C.; Fishman, M. C. Vessel Patterning in the Embryo of the Zebrafish: Guidance by Notochord. *Dev. Biol.* **1997**, *183* (1), 37–48.
- (30) Ellertsdóttir, E.; Lenard, A.; Blum, Y.; Krudewig, A.; Herwig, L.; Affolter, M.; Belting, H. G. Vascular Morphogenesis in the Zebrafish Embryo. *Dev. Biol.* **2010**, *341* (1), 56–65.
- (31) Childs, S.; Chen, J.; Garrity, D. M.; Fishman, M. C. Patterning of Angiogenesis in the Zebrafish Embryo. *Development* **2002**, *129* (4), 973–982.
- (32) Torres-Vázquez, J.; Gitler, A. D.; Fraser, S. D.; Berk, J. D.; Pham, V. N.; Fishman, M. C.; Childs, S.; Epstein, J. A.; Weinstein, B. M. Semaphorin-Plexin Signaling Guides Patterning of the Developing Vasculature. *Dev. Cell* **2004**, *7* (1), 117–123.
- (33) Hen, G.; Nicenboim, J.; Mayseless, O.; Asaf, L.; Shin, M.; Busolin, G.; Hofi, R.; Almog, G.; Tiso, N.; Lawson, N. D.; Yaniv, K. Venous-Derived

- Angioblasts Generate Organ-Specific Vessels during Embryonic Development. *Development* **2015**, *142*, 4266–4278.
- (34) Isogai, S.; Horiguchi, M.; Weinstein, B. M. The Vascular Anatomy of the Developing Zebrafish: An Atlas of Embryonic and Early Larval Development. *Dev. Biol.* **2001**, *230* (2), 278–301.
- (35) Lenard, A.; Daetwyler, S.; Betz, C.; Ellertsdottir, E.; Belting, H.; Huisken, J.; Affolter, M. Endothelial Cell Self-Fusion during Vascular Pruning. *PLoS Biol.* **2015**, *13* (4), 1–25.
- (36) Avraham-Davidi, I.; Ely, Y.; Pham, V. N.; Castranova, D.; Grunspan, M.; Malkinson, G.; Gibbs-Bar, L.; Mayseless, O.; Allmog, G.; Lo, B.; Warren, C. M.; Chen, T. T.; Ungos, J.; Kidd, K.; Shaw, K.; Rogachev, I.; Wan, W.; Murphy, P. M.; Farber, S. A.; Carmel, L.; Shelness, G. S.; Iruela-Arispe, M. L.; Weinstein, B. M.; Yaniv, K. ApoB-Containing Lipoproteins Regulate Angiogenesis by Modulating Expression of VEGF Receptor 1. *Nat. Med.* **2012**, *18* (6), 967–973.
- (37) Serbedzija, G. N.; Flynn, E.; Willett, C. E. Zebrafish Angiogenesis: A New Model for Drug Screening. *Angiogenesis* **1999**, *3* (4), 353–359.
- (38) Li, Q.; Uitto, J. Zebrafish as a Model System to Study Skin Biology and Pathology. *J. Invest. Dermatol.* **2014**, *134* (6), 1–6.
- (39) Wehmas, L. C.; Anders, C.; Chess, J.; Punnoose, A.; Pereira, C. B.; Greenwood, J. A.; Tanguay, R. L. Comparative Metal Oxide Nanoparticle Toxicity Using Embryonic Zebrafish. *Toxicol. reports* **2015**, *2*, 702–715.
- (40) Vicario-Parés, U.; Castañaga, L.; Lacave, J. M.; Oron, M.; Reip, P.; Berhanu, D.; Valsami-Jones, E.; Cajaraville, M. P.; Orbea, A. Comparative Toxicity of Metal Oxide Nanoparticles (CuO, ZnO and TiO₂) to Developing Zebrafish Embryos. *J. Nanoparticle Res.* **2014**, *16* (8), 2550.
- (41) Lin, S.; Zhao, Y.; Ji, Z.; Ear, J.; Chang, C. H.; Zhang, H.; Low-Kam, C.; Yamada, K.; Meng, H.; Wang, X.; Liu, R.; Pokhrel, S.; Mädler, L.; Damoiseaux, R.; Xia, T.; Godwin, H. A.; Lin, S.; Nel, A. E. Zebrafish High-Throughput Screening to Study the Impact of Dissolvable Metal Oxide Nanoparticles on the Hatching Enzyme, ZHE1. *Small* **2013**, *9-10*, 1776–1785.

- (42) Sano, K.; Inohaya, K.; Kawaguchi, M.; Yoshizaki, N.; Iuchi, I.; Yasumasu, S. Purification and Characterization of Zebrafish Hatching Enzyme - An Evolutionary Aspect of the Mechanism of Egg Envelope Digestion. *FEBS J.* **2008**, *275*, 5934–5946.
- (43) Okada, A.; Sano, K.; Nagata, K.; Yasumasu, S.; Ohtsuka, J.; Yamamura, A.; Kubota, K.; Iuchi, I.; Tanokura, M. Crystal Structure of Zebrafish Hatching Enzyme 1 from the Zebrafish *Danio Rerio*. *J. Mol. Biol.* **2010**, *402* (5), 865–878.
- (44) Zhang, Y.; Chen, Y.; Westerhoff, P.; Hristovski, K.; Crittenden, J. C. Stability of Commercial Metal Oxide Nanoparticles in Water. *Water Res.* **2008**, *42* (8-9), 2204–2212.
- (45) Lee, K. J.; Nallathamby, P. D.; Browning, L. M.; Osgood, J. C.; Xu, X. N. In Vivo Imaging of Transport and Biocompatibility of Single Silver Nanoparticles in Early Development of Zebrafish Embryos. *ASC Nano* **2007**, *1* (2), 133–143.
- (46) Cheng, J.; Flahaut, E.; Cheng, S. H. Effect of Carbon Nanotubes on Developing Zebrafish (*Danio Rerio*) Embryos. *Environ. Toxicol. Chem.* **2007**, *26* (4), 708–716.
- (47) Bai, W.; Zhang, Z.; Tian, W.; He, X.; Ma, Y.; Zhao, Y.; Chai, Z. Toxicity of Zinc Oxide Nanoparticles to Zebrafish Embryo: A Physicochemical Study of Toxicity Mechanism. *J. Nanoparticle Res.* **2010**, *12* (5), 1645–1654.
- (48) Griffitt, R. J.; Luo, J.; Gao, J.; Bonzongo, J.; Barber, D. S. Effects of Particle Composition and Species on Toxicity of Metallic Nanomaterials in Aquatic Organisms. *Environ. Toxicol. Chem.* **2008**, *27* (9), 1972–1987.
- (49) Chen, D.; Zhang, D.; Yu, J. C.; Chan, K. M. Effects of Cu₂O Nanoparticle and CuCl₂ on Zebrafish Larvae and a Liver Cell-Line. *Aquat. Toxicol.* **2011**, *105* (3-4), 344–354.
- (50) Dave, G.; Xiu, R. Toxicity of Mercury, Copper, Nickel, Lead, and Cobalt to Embryos and Larvae of Zebrafish, *Brachydanio Rerio*. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* **1991**, *21* (1), 126–134.

- (51) McAuslan, B. R.; Reilly, W. Endothelial Cell Phagocytosis in Response to Specific Metal Ions. *Exp. Cell Res.* **1980**, *130*, 147–157.
- (52) Chang, J.; Ichihara, G.; Shimada, Y.; Tada-Oikawa, S.; Kuroyanagi, J.; Zhang, B.; Suzuki, Y.; Sehshah, R.; Kato, M.; Tanaka, T.; Ichihara, S. Copper Oxide Nanoparticles Reduce Vasculogenesis in Transgenic Zebrafish Through Down-Regulation of Vascular Endothelial Growth Factor Expression and Induction of Apoptosis. *J. Nanosci. Nanotechnol.* **2015**, *15* (3), 2140–2147.
- (53) Griffitt, R. J.; Weil, R.; Hyndman, K. A.; Denslow, N. D.; Powers, K.; Taylor, D.; Barber, D. S. Exposure to Copper Nanoparticles Causes Gill Injury and Acute Lethality in Zebrafish (*Danio Rerio*). *Environ. Sci. Technol.* **2007**, *41* (23), 8178–8186.
- (54) Minghetti, M.; Leaver, M. J.; George, S. G. Multiple Cu-ATPase Genes Are Differentially Expressed and Transcriptionally Regulated by Cu Exposure in Sea Bream, *Sparus Aurata*. *Aquat. Toxicol.* **2010**, *97* (1), 23–33.
- (55) Alcaide, M.; Portolés, P.; López-Noriega, a.; Arcos, D.; Vallet-Regí, M.; Portolés, M. T. Interaction of an Ordered Mesoporous Bioactive Glass with Osteoblasts, Fibroblasts and Lymphocytes, Demonstrating Its Biocompatibility as a Potential Bone Graft Material. *Acta Biomater.* **2010**, *6* (3), 892–899.
- (56) Hoppe, A.; Güldal, N. S.; Boccaccini, A. R. A Review of the Biological Response to Ionic Dissolution Products from Bioactive Glasses and Glass-Ceramics. *Biomaterials* **2011**, *32* (11), 2757–2774.
- (57) Craig, P.; Wood, C.; McClelland, G. B. Oxidative Stress Response and Gene Expression with Acute Copper Exposure in Zebrafish (*Danio Rerio*). *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* **2007**, *293* (5), 1882–1892.
- (58) Saghiri, M. A.; Asatourian, A.; Orangi, J.; Sorenson, C. M.; Sheibani, N. Functional Role of Inorganic Trace Elements in Angiogenesis-Part II: Cr, Si, Zn, Cu, and S. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* **2015**, *96*, 143–155.
- (59) Day, R. M. Bioactive Glass Stimulates the Secretion of Angiogenic Growth Factors and Angiogenesis in Vitro. *Tissue Eng.* **2005**, *11* (5), 768–777.

- (60) Li, H.; Chang, J. Bioactive Silicate Materials Stimulate Angiogenesis in Fibroblast and Endothelial Cell Co-Culture System through Paracrine Effect. *Acta Biomater.* **2013**, *9* (6), 6981–6991.
- (61) Li, H.; Xue, K.; Kong, N.; Liu, K.; Chang, J. Silicate Bioceramics Enhanced Vascularization and Osteogenesis through Stimulating Interactions between Endothelial Cells and Bone Marrow Stromal Cells. *Biomaterials* **2014**, *35* (12), 3803–3818.
- (62) Li, H.; Chang, J. Stimulation of Proangiogenesis by Calcium Silicate Bioactive Ceramic. *Acta Biomater.* **2013**, *9* (2), 5379–5389.
- (63) Gorustovich, A. A.; Roether, J. A.; Boccaccini, A. R. Effect of Bioactive Glasses on Angiogenesis: A Review of In Vitro and In Vivo Evidences. *Tissue Eng. Part B* **2010**, *16* (2), 199–207.
- (64) White, C.; Kambe, T.; Fulcher, Y. G.; Sachdev, S. W.; Bush, A. I.; Fritsche, K.; Lee, J.; Quinn, T. P.; Petris, M. J. Copper Transport into the Secretory Pathway Is Regulated by Oxygen in Macrophages. *J Cell Sci* **2009**, *122* (9), 1315–1321.
- (65) Zimnicka, A. M.; Ivy, K.; Kaplan, J. H. Acquisition of Dietary Copper: A Role for Anion Transporters in Intestinal Apical Copper Uptake. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **2011**, *300* (3), C588–C599.
- (66) Van Heerden, D.; Vosloo, A.; Nikinmaa, M. Effects of Short-Term Copper Exposure on Gill Structure, Metallothionein and Hypoxia-Inducible Factor-1 α (HIF-1 α) Levels in Rainbow Trout (*Oncorhynchus Mykiss*). *Aquat. Toxicol.* **2004**, *69* (3), 271–280.
- (67) Solaini, G.; Baracca, A.; Lenaz, G.; Sgarbi, G. Hypoxia and Mitochondrial Oxidative Metabolism. *Biochim. Biophys. Acta* **2010**, *1797* (6-7), 1171–1177.

Conclusiones generales

Los resultados obtenidos en este trabajo de Tesis Doctoral se pueden resumir en las siguientes conclusiones generales:

- El estudio de la fabricación de matrices biomiméticas híbridas cerámico-biopolímero ha demostrado que el recubrimiento de estructuras matriz basadas en cerámicas con un biopolímero tipo colágeno fibrilar es efectivo para mejorar las propiedades mecánicas de estas estructuras tridimensionales preservando sus características de macroporo interconectado y nanoporosidad ordenada. Se ensayaron dos procedimientos de secado de colágeno fibrilar y en ambos casos la respuesta de bioactividad *in vitro* se ha visto favorecida. El recubrimiento de colágeno fibrilar activa la cinética de la mineralización de HA *in vitro* actuando como una plantilla para la cristalización de HA.

- La incorporación de Cu en los materiales MBG se puede llevar a cabo mediante una única etapa en el proceso sol-gel (SG-MBG-Cu) ó utilizando una ruta que integre una segunda etapa de impregnación (I-MBG-Cu). Ambos métodos han permitido la incorporación de Cu en la composición del MBG sin afectar drásticamente sus propiedades físico-químicas. Sin embargo, la ruta en una etapa sol-gel se destaca por incorporar el Cu más homogéneamente en la matriz de la sílice del MBG sin afectar su carácter amorfo y sus propiedades texturales. El ensayo de biodegradabilidad *in vitro* nos indica que el perfil de degradación de los materiales MBG-Cu es análogo al MBG.
- La viabilidad y migración celular se comprobó mediante ensayos *in vitro* en células BAEC encontrando que los materiales MBG y SG-MBG-5Cu no inhiben ninguno de los dos procesos celulares a concentraciones de 100 y 300 mg de material por L de medio de cultivo. Se encontró mayor crecimiento y migración celular para los cultivos con medios conteniendo materiales a bajas concentraciones.
- Durante el estudio de la funcionalidad angiogénica *in vivo* de los materiales MBG y SG-MBG-5Cu en el modelo del pez cebra se encontró que los iones Si, Ca, P y Cu, productos de la redisolución de los materiales influían en el proceso de angiogénesis. El mayor efecto pro-angiogénico fue observado para el SG-MBG-5Cu a bajas concentraciones (300 mg·L⁻¹) mientras que a altas concentraciones los efectos se revierten.
- Por último, se puede concluir que los resultados presentados en este trabajo de Tesis han mostrado la posibilidad de obtener materiales con funcionalidad de matrices biomiméticas y/o matrices administradora de iones terapéuticos, para su posterior desarrollo y optimización en aplicaciones de regeneración ósea.

Anexo 1. Acrónimos y abreviaturas

A

α : Alfa

Ag: Plata

ADN: ácido desoxirribonucleico

ALP: Alkaline Phosphatase, fosfatasa alcalina

ANG: Angiopoyetina

ANOVA: Analysis of variance, análisis de varianza

As: Arsénico

ATOX 1: Antioxidant protein 1, proteína antioxidante 1

ATP: Adenosine triphosphate, trifosfato de adenosina

B

β : Beta

B: Boro

BAEC: Bovine aortic endothelial cells, células endoteliales de aorta bovina

BG: Bioactive glasses, vidrios bioactivos

BJH: Barrett-Joyner-Hallenda

BMP-2: Bone Morphogenetic Proteins, proteína morfogenética ósea 2

C

°C: Grado Celsius

Ca: Calcio

CAM: Chick chorioallantoic membrane, membrana corioalantoidea de embrión de pollo

CaP: Fosfato de calcio

CCS: Copper chaperone for superoxide dismutase, metaloproteína superóxido dismutasa del Cu

Cd: Cadmio

Ce: Cerio

C-H: Enlace carbono-hidrógeno

cm: Centímetro

C-N: Enlace carbono-nitrógeno

Co: Cobalto

col.: Colaboradores

COX 17: Cytochrome c oxidase, citocromo c oxidasa subunidad 17

CS: Calcium silicate, silicato cálcico

Cu: Cobre

D

d₅₀: percentil 50

DHT: Dehydrothermal treatment, tratamiento dehidrotermal

DIH₂O: Agua desionizada

DPSC: Dental pulp stem cells, células madre de pulpa dental

DSC: Differential scanning calorimetry, calorimetría diferencial de barrido

E

E3: Medio embrionario

ECM: Extracellular matrix, matriz extracelular

EDX: Energy-dispersive X-ray spectroscopy, espectroscopia de dispersión de energía por rayos X

EGF: Epidermal growth factor, factor de crecimiento epidérmico

EISA: Evaporation induced self assembly, autoensamblaje inducido por evaporación

etc.: Etcétera

Eu: Europio

F

Fe: Hierro

FGF: Fibroblast growth factor, factor de crecimiento de fibroblastos

FT-IR: Fourier transform infrared spectroscopy, espectroscopia infrarroja con transformada de Fourier

G

g: Gramo

Ga: Galio

GCSF: *Granulocyte colony-stimulating factor*, factor estimulante de colonias de granulocitos

Gly: Glicina

GFOGER: Secuencia de aminoácido glicina–fenilalanina–hidroxiprolina–glicina–glutamato–arginina

GPa: Gigapascales

H

h: hora

HA: Hydroxiapatite, hidroxiapatita

HCl: Ácido clorhídrico

HBMSC: Human bone marrow derived stem cells, células madre humanas mesenquimales

HGF: Hepatocyte growth factor, factor de crecimiento de hepatocitos

HIF: Hypoxia-inducible factors, factor inducible por hipoxia

His: Histidina

HMVEC: Human dermal microvascular endothelial cells, células endoteliales dérmicas micro vasculares humanas

hPa: Hectopascal

hpf: Hours post-fertilization, horas post-fertilización

HRTEM, High-resolution transmission electron microscopy, microscopia electrónica de alta resolución

HUVEC: Human umbilical vein endothelial cells, células endoteliales de vena umbilical humana

Hyp: Hidroxiprolina

I

I: Impregnación

ICP-MS: Inductively coupled plasm-mass spectrometry, espectrometría de masas de plasma de acomplamiento inducido

IGF-1: Insuline-like growth factor 1, factor de crecimiento similar a insulina

K

K: Potasio

L

λ : Longitud de onda

L: Litro

LC50: Lethal concentration, concentración letal media

LO: Óptica longitudinal

Lys: Licina

M

m: Metro

M: Molar

MBG: Mesoporous bioactive glasses, Vidrios bioactivos nanoporosos ordenados

DMEM: Dulbecco's Modified Eagle's Medium, medio de cultivo eagle modificado de dulbecco

mg: Miligramo

Mg: Magnesio

min: Minuto

μ L: Microlitro

mL: Mililitro

μ m: Micrometro

mm: Milimetro

mM: Milimolar

MMP: Matrix metalloproteinases, metaloproteinasas de la matriz

MPa: Mega pascales

m/v: Relación masa-volumen

N

N: Níquel

N₂: Nitrógeno

Na: Sodio

NBO: Non-bridging oxygen, átomos de oxígeno no vinculantes

ng: Nanogramo

NF-κB: Nuclear factor kappa B, *factor nuclear* de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas

N-H: Enlace nitrógeno-hidrógeno

nm: Nanómetro

NP: Nanoparticulado

NP-1: Neuropilin 1, Neuropilina 1 soluble

O

O₂⁻: Radical superóxido

P

ρ: Significación

P: Fósforo

P123: Pluronic®

PAI: Plasminogen activator inhibitor, inhibidores de los activadores de plasminógenos

PBS: Phosphate buffer saline, tampón fosfato salino

PDGF: Platelet derived growth factor, factor de crecimiento derivado de plaquetas

PECAM: Platelet-endothelial cell adhesion molecule, molécula de adhesión de células endoteliales/plaquetas

PEDF: *Pigment epithelium-derived factor*, factor derivado del epitelio pigmentado

PF-4: Platelet factor 4, factor de plaquetas 4

pH: Medida de acidez

PHB: Polyhydroxybutyrate, ácido polihidroxibutírico

PHD: Poly(α -hydroxylase domain, dominio polihidroxilasas

pI: Punto isoeléctrico

PI-10: Interferon-inducible protein 10, factor inducible por interferón 10

PLA: Polylactic acid, ácido poliláctico

PLC: Poly(ϵ -caprolactona), policaprolactona

Pro: Prolina

PVA: Polyvinyl alcohol, alcohol polivinílico

pVHL, por von Hippel-Lindau tumor supresor protein, proteína supresora de tumores von Hippel-Lindau

R

RMN: Nuclear magnetic resonance spectroscopy, espectroscopia de resonancia magnética nuclear

ROS: Reactive oxygen specie, especies reactivas del oxígeno

rpm: Revoluciones por minuto

S

SAXRD: Small angle x-ray diffracttion, difracción de rayos X de bajo ángulo

SBA-15: Santa bárbara amorphous material n°15

S_{BET}: Superficie específica BET

SBF: Simulated body fluid, fluido corporal simulado

SCO: Synthesis cytochrome oxidase, síntesis del citocromo oxidasa

SEM: Scanning electron microscope, microscopía electrónica de barrido

SG: Sol-gel

Si: Silicio

SOD1, Superoxide dismutase, superóxido dismutasa

Sr: Estroncio

STEM: Scanning transmission electron microscopy, microscopía electrónica de transmisión de barrido

T

TCP: Tricalcium phosphate, fosfato tricálcico

TEOS: Tetraetilortosilicato

TEP: Trietil fosfato

TGA: Thermogravimetric analysis, análisis termogravimétrico

TGFb: Transforming growth factor beta, factor de crecimiento transformante tipo b

Tg(Fli-1:EGFP): Transgenic, friend leukemia integration-1: enhanced green fluorescent protein

TIMP: Tissue inhibitor of metalloprotease, inhibidores tisulares de metaloproteinasas

TM: Tetrathiomolybdate, tetratiomolibdato

TNF α : Tumor necrosis factor alpha, factor de necrosis tumoral α

TO: Óptica transversal

U

uPA, *Urokinase-type plasminogen activator*, uroquinasa tipo activador plaminógeno

UV: Ultravioleta

UV-Vis: Ultravioleta visible

V

V: Vanadio

VE-Caderinas: Vascular endothelial cadherin, marcador vascular endotelial caderina

v/v: Relación volumen-volumen

VEGF: *Vascular endothelial growth factor*, factor de crecimiento endotelial vascular

X

XRD: X-ray diffraction, difracción de rayos X

XRF: X-ray fluorescence, fluorescencia de rayos X

Z

ZHE1: Zebrafish hatching enzyme, enzima de eclosión del pez cebra

Zn: Zinc

Zr: Circonio

Anexo 2. Métodos y técnicas de caracterización

2.1. Difracción de Rayos X

Mediante esta técnica es posible obtener información acerca de las características estructurales (cristalinidad y fases presentes) de los materiales. Durante la caracterización de los materiales se utilizó Difracción de Rayos X de Bajo Ángulo (SAXRD) y Difracción de Rayos X (XRD) en condiciones de rutina. Ambos análisis se realizaron en un difractómetro PANanalytical X'Pert PRO equipado con un detector X'Celerator y monocromador de grafito, que opera a un voltaje de 45 kV y una intensidad de 40mA, y que utiliza radiación de rayos X de longitud de onda 0.15404 nm, proveniente de un cátodo de Cu (línea $K\alpha$).

Para ambas medidas, los materiales en forma de partículas se colocaron sobre un soporte de silicio de Si monocristalino crecido en una familia de planos que no presenta difracción dentro del rango. Los XRD se registraron en un rango 2θ de 5 a 80° , con un paso de 0.02° y 300 segundos de adquisición por paso, mientras que

los difractogramas de SAXRD se registraran en el rango 2θ de 0.5 a 5°, con un paso de 0.01° y un tiempo de exposición de 1 segundo.

Durante la incidencia de rayos X se puede dar lugar a interferencias constructivas entre los rayos dispersados. El resultado es la difracción, que da lugar a un patrón de intensidades que puede interpretarse según la ubicación de los átomos en el cristal, por medio de la ley de Bragg:

$$n\lambda = 2d_{hkl} \text{sen } \theta$$

donde n es un número entero; λ la longitud de onda; d_{hkl} la distancia entre planos adyacentes y θ el ángulo de difracción¹. Las fases cristalinas presentes se identificaron usando patrones de difracción estándar de JCPDS (Joint committee for powder diffraction studies).

2.2. Fisisorción de N₂

Las medidas de fisisorción de N₂ se realizaron en un analizador automático de gases Micromeritics Tristar 3020, después de desgasificar 100 mg de muestra (partículas o estructuras procesadas) a 250 °C durante 2 h en corriente de nitrógeno. En el caso de las estructuras procesadas revestidas de colágeno, la desgasificación se llevó a cabo a 150 °C durante 48 h, para evitar su degradación y para que la desgasificación fuera completa.

A partir de las isotermas de adsorción y desorción obtenidas se evaluó la porosidad de los materiales. El área específica se determinó utilizando el método Brunauer–Emmett–Teller (BET)² que consiste en determinar la cantidad (moléculas) de gas adsorbido necesario para formar una monocapa. Para calcular el valor de S_{BET} se

utilizaron los valores de la isoterma de adsorción en el intervalo de presión relativa de 0.05 a 0.2, donde es válida dicho modelo.

Para el volumen total de poro, se estimó a partir de la cantidad de gas nitrógeno adsorbido a una presión relativa de ≈ 0.99 . Mientras que la distribución de tamaño de poro se calculó utilizando la rama de adsorción de la isoterma de adsorción-desorción de nitrógeno y aplicando la ecuación de Barrett-Joyner-Hallenda (BJH)^{3,4}.

2.3. Espectroscopia infrarroja con transformada de Fourier (FT-IR) y Raman

FT-IR es una técnica donde se analizan las vibraciones moleculares. Estas vibraciones corresponden a los cambios energéticos producidos por las transiciones entre distintos estados vibracionales y rotacionales que han sido inducidas por la irradiación de luz infrarroja. Las medidas se llevaron a cabo en un espectrofotómetro FT/IR-6200 (Jasco Inc., Easton, PA, USA) en el rango del infrarrojo medio de 380 a 4000 cm^{-1} en modo transmisión. Los espectros obtenidos se registraron con las siguientes condiciones: 64 barridos con una resolución de 4 cm^{-1} . La preparación de las muestras consiste en mezclar y moler 99.5 mg de bromuro potásico (KBr, 60090, Fluka) y 0.5 mg de la muestra a analizar. Posteriormente la mezcla se coloca en una matriz para su compresión mediante el uso de una prensa hidráulica (7 toneladas) para la obtención de pastillas transparentes. Como blanco se tomó una pastilla constituida únicamente por KBr.

Para ampliar la información estructural del material también se analizara en un espectrofotómetro Raman dispersivo, modelo LabRam HR800 de la casa de Horiba

Jobin Yvon, con microscopio confocal y, como fuente de excitación, un láser verde de argón con longitud de onda de 514 nm. La adquisición de espectros consistió en 10 acumulaciones de 30 segundos y ventanas de medida comprendidas entre 200 y 1800 cm^{-1} . La muestra no recibe ningún tipo de preparación.

2.4. Fluorescencia de Rayos X (XRF)

A través de esta técnica se determinó la composición real de las muestras. La medida se realizara en espectrómetro secuencial de fluorescencia de rayos X por dispersión de longitud de onda (WDXRF, por wavelength dispersive X-ray fluorescence), de la marca PANalytical, modelo AXIOS.

La preparación de la muestra consiste en la mezcla de 100 mg de muestra con 6 mg de cera que se molerán y homogenizaran en un mortero de ágata. Posteriormente la mezcla se coloca en el centro de un soporte de ácido bórico, preparado con anticipación, y se prensa a 160 MPa.

2.5. Microscopia electrónica de barrido (SEM), SEM en modo transmisión (STEM) y dispersión de energías de rayos X (EDX)

Esta técnica nos provee información morfológica y topográfica de la superficie de las muestras. Se utilizó un microscopio modelo HITACHI S-4800 de alta resolución dotado con un cañón de emisión de campo (FEG-SEM, por field emission gun scanning electron microscope). Además, el equipo cuenta con un detector para electrones transmitidos con un sistema de microanálisis químico por EDX, Bruker X Flash Detector 4010, con una resolución de 133 eV, que nos permite un acercamiento a la composición estructural. Las micrografías se realizaron a un potencial de 2 kV, mientras que el análisis químico mediante EDX, el haz electrónico incidió sobre las muestras a un potencial de 10 kV durante 5 min.

Para los análisis las muestras se colocaron directamente sobre una cinta adhesiva de doble cara de carbono para fijarlos en el portamuestra del equipo. Para el caso de los materiales que contenían material orgánico, además de la fijación física, se recubrieron con una capa de carbono, para disminuir la carga eléctrica que se genera. La capa se realizó con un evaporador de carbono EMITECH K950 usando 60 A de voltaje, repitiendo el proceso por triplicado.

Para las observaciones STEM las muestras se depositaron en una rejilla de cobre, que contiene un recubrimiento de colodión y de carbono, y se dejó secar a temperatura ambiente. Posteriormente la muestra se fija y se tiñe como se indicó en el Capítulo 2.

2.6. Espectroscopía de Emisión Atómica por Plasma de Acoplamiento Inducido (ICP-MS)

La ICP-MS se fundamenta en el análisis de la radiación UV-Vis característica de cada elemento químico, emitida durante su relajación tras haber sido excitado en un plasma, gas ionizado altamente energético. La temperatura de atomización característica del atomizador ICP es (4000-6000) °C. Esta técnica se emplea fundamentalmente en el análisis de elementos metálicos.

Para el trabajo de esta Tesis Doctoral los análisis se llevaron a cabo en el equipo Horiba Jobin Yvon, modelo última 2, equipado con un generador de estado sólido de 40.68 MHz, un monocromador Czerny-Turner y un detector con tubo fotomultiplicador. La entrada de la muestra (líquida) a través de una bomba peristáltica fue de $1 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, el potencial del plasma fue de 1000 w y el flujo de Argón fue de $12 \text{ L} \cdot \text{min}^{-1}$. El volumen de muestra requerido para realizar la medida fue de 5 mL.

2.7. Análisis termogravimétrico (TGA) y calorimetría diferencial de barrido (DSC)

Los análisis térmicos TGA y DSC se llevaron a cabo simultáneamente utilizando un sistema automático de análisis térmico TA Instruments SDT Q600 (TA Instruments, Crawley, UK), que está conectado a un sistema de flujo de aire de $100 \text{ cm}^3 \cdot \text{min}^{-1}$. Se trabajó en atmósfera de aire y la velocidad de calentamiento fue de $10 \text{ }^\circ\text{C} \cdot \text{min}^{-1}$ en un soporte de platino con 0.6 cm de diámetro. El intervalo de temperatura de medida estuvo comprendido entre 25 y $1000 \text{ }^\circ\text{C}$.

2.8. Distribución de tamaño de partícula

El tamaño medio de partícula (dv_{50}) y la distribución del tamaño de partícula de los polvos se obtuvieron empleando un analizador de pulso láser de Malvern, modelo Mastersizer S (Reino Unido). Este equipo utiliza una longitud de haz activa de 2,4 mm y una lente de 300-RF y evalúa tamaños medios de partícula comprendidos entre 0,20–880 μm .

2.9. Análisis de ultravioleta visible (UV-Vis)

Para cada estado electrónico, la molécula puede encontrarse en diferentes estados vibracionales y rotacionales próximos en energía. En muestras líquidas o en disolución (como las tratadas en este trabajo) se pierde la estructura fina asociada a vibraciones y rotaciones debido a la solvatación y a la interacción con moléculas vecinas. Por lo que, se obtienen bandas anchas centradas en torno a la longitud de onda correspondiente a la transición electrónica.

En este trabajo se utiliza la espectroscopia de absorción UV-Vis para realizar análisis cuantitativos de las muestras estudiadas, para estimar la concentración de Si en solución. Para ello se aplica la ley de Lambert-Beer⁵:

$$A = \epsilon \lambda c$$

donde A es la absorbancia, ϵ es el coeficiente de extinción molar, λ es la longitud del medio que es atravesada por la luz y c es la concentración de Si. Los espectros se registraron entre 190 y 800 nm en un espectrofotómetro SHIMADZU UV-2101 PC.

2.10. Ensayos de compresión

Los ensayos de compresión de las estructuras macroporosas tridimensionales procesadas en el Capítulo 2 se llevaron a cabo en un Scratch MicroTest modelo MTR3/50-50/NI con una célula de carga de 500 N a una velocidad de 0,5 mm min⁻¹. Las estructuras poseen una geometría cilíndrica, con dimensiones de 9.2 mm de diámetro x 5.4 mm en altura. Para determinar los valores de resistencia a la compresión se ensayaron 5 estructuras y se han expresado en MegaPascuales (MPa), teniendo en cuenta el área expuesta de cada uno de las estructuras ensayadas⁶.

2.11. Análisis de porosidad y densidad

Los valores de densidad y porosidad de las estructuras macroporosas tridimensionales se estimaron a partir del porcentaje molar teórico de cada uno de los óxidos que lo constituyen y sus respectivas densidades. Para ello, se consideró la densidad del SiO₂ (ρ_{SiO_2} : 2.2 g·cm⁻³)⁷, del CaO (ρ_{CaO} : 3.35 g·cm⁻³)⁸ y del P₂O₅ ($\rho_{\text{P}_2\text{O}_5}$: 2.3 g·cm⁻³)⁸.

Los valores de densidad se determinaron a partir de las dimensiones finales de cada estructura procesada, mediante el cociente de su masa y volumen. Mientras que la porosidad total, P , se calculó a partir de la siguiente ecuación:

$$P = 1 - \frac{\rho_{estructura}}{\rho_{sólido}} = 1 - \rho_{relativa}$$

2.12. Preparación de fluido fisiológico simulado (SBF)

El SBF es una solución que contiene concentraciones de iones análogas a las del plasma sanguíneo humano, su formulación ha sido reportada y optimizada por Kokubo y col^{9,10}. la cual se emplea como medio de cultivo para la conservación celular, por lo que permite predecir la bioactividad de un material.

La solución SBF se formuló a partir de los reactivos y las cantidades siguientes, y en el orden en que se indica a continuación:

1. Cloruro de sodio (NaCl, S7653 Sigma-Aldrich), 8.035 g
2. Bicarbonato sódico (NaHCO₃, 31437 Sigma-Aldrich), 0.355 g
3. Cloruro de sodio (KCl, 60129 Fluka), 0.225 g
4. Fosfato potásico dibásico trihidratado (K₂HPO₄·H₂O, P5504 Sigma-Aldrich), 0.231 g
5. Cloruro de magnesio hexahidratado (MgCl₂·6H₂O, M2670 Sigma-Aldrich), 0.311 g
6. HCl 1 M, 39 mL
7. Cloruro de calcio (CaCl₂, 12095 Riedel-de Haën), 0.292 g
8. Sulfato de sodio (Na₂SO₄, 23859-7 Sigma-Aldrich), 0.072 g

La solución SBF se preparó en un recipiente de plástico, disolviendo las cantidades de cada uno de los reactivos en agua Milli-Q, añadiéndolos uno por uno, en el orden indicado anteriormente, hasta que cada reactivo se disolvió completamente. Dado que la solución SBF es una solución supersaturada, cualquier método de preparación inapropiado puede generar una precipitación en la solución. Por tal

razón, en todo momento durante la preparación se debe distinguir una solución transparente, libre de cualquier indicio de precipitación.

Para preparar 1 L de solución, primeramente los reactivos se disolvieron en 700 mL de agua Milli-Q, la cual se ajusta previamente a 36.5 ± 1.5 °C en una placa calefactora, baño de aceite y con agitación constante a 500 rpm. Después de añadir todos los reactivos se añade 200 mL de agua Milli-Q se añade 6.118 g de tris-(hidroximetil)-aminometano (TRIS, $C_4H_{11}NO_3$, T87602 Sigma-Aldrich). La adición se hace poco a poco esperando a que se disolviera completamente y observando el aumento gradual de pH en la solución. Una vez que alcanza un valor de pH = 7.45, se le añade HCl 1M hasta bajar el pH a 7.42, repitiendo la operación hasta que se termine de añadir el TRIS. Posteriormente, se estabiliza la temperatura en 36.5 ± 0.02 °C y se ajusta el pH a 7.42 ± 0.01 . Finalmente, la solución se transfiere a un matraz de vidrio aforado de 1 L, se espera el tiempo necesario para que alcance la temperatura ambiente, se afora y se guarda a 5-10 °C en el frigorífico. La solución se puede conservar ≤ 30 días.

2.13. Preparación de tampón de fosfato salino (PBS)

El PBS constituye una solución amortiguadora de pH comúnmente empleada para procedimientos bioquímicos. Su osmolaridad y concentración de iones (Cl^- , Na^+ y K^+) es muy semejante a la del líquido extracelular de los mamíferos. Además, es una solución isotónica y no-tóxica¹¹.

Para preparar 1 L de PBS se deben añadir los siguientes reactivos y cantidad, en el orden que se indica:

1. NaCl, 8.06 g
2. KCl, 0.22 g
3. NH_2PO_4 , 1.15 g

4. KH₂PO₄, 0.20 g

La preparación se realizó en un recipiente de vidrio con 800 mL de dH₂O y se añaden los reactivos uno a uno hasta su completa disolución con agitación constante a 500 rpm. Después de la adición y disolución de los reactivos se ajusta el pH a 7.4 con 1 M HCl o 10 M hidróxido de sodio (NaOH, 30620 Riedel-de Haën) según sea el caso, añadiéndolas gota a gota mientras se monitorea el pH. Finalmente, la solución se transfiere a un matraz volumétrico de 1 L y se afora con dH₂O. La solución debe conservarse entre 5-10 °C en el frigorífico por un periodo menor a 30 días.

2.14. Referencias

- (1) Klug, H. P.; Alexander, L. E. X-Ray Diffraction Procedures for Polycrystalline and Amorphous Materials. *Acta Metall.* **1956**, *4* (1), 102.
- (2) Sing, K. S. W. Reporting Physisorption Data for Gas/solid Systems with Special Reference to the Determination of Surface Area and Porosity. *Pure Appl. Chem.* **1985**, *57* (4), 603–619.
- (3) Barrett, E. P.; Joyner, L. G.; Halenda, P. P. The Determination of Pore Volume and Area Distributions in Porous Substances. I. Computations from Nitrogen Isotherms. *J. Am. Chem. Soc.* **1951**, *73* (1), 373–380.
- (4) Kruk, M.; Jaroniec, M.; Sayari, a. Application of Large Pore MCM-41 Molecular Sieves To Improve Pore Size Analysis Using Nitrogen Adsorption Measurements. *Langmuir* **1997**, *13* (23), 6267–6273.
- (5) Ricci, R. W.; Ditzler, M.; Nestor, L. P. Discovering the Beer-Lambert Law. *J. Chem. Educ.* **1994**, *71* (11), 983.
- (6) Athanasiou, K. A.; Zhu, C.; Lanctot, D. R.; Agrawal, C. M.; Wang, X. Fundamentals of Biomechanics in Tissue Engineering of Bone. *Tissue Eng.* **2000**, *6* (4), 361–381.

- (7) Roshi, A.; Barjami, S.; Iannacchione, G. S.; Paterson, D.; McNulty, I. Structure and Dynamics of a Nanocolloidal Silica Gel Dispersion. *Phys. Rev. E - Stat. Nonlinear, Soft Matter Phys.* **2006**, *74* (3), 1–8.
- (8) Lide, D. R. Hardness of Minerals and Ceramics. *CRC Handb. Chem. Phys.* **2005**, 2313–2314.
- (9) Oyane, A.; Kim, H.; Furuya, T.; Kokubo, T.; Miyazaki, T.; Nakamura, T. Preparation and Assessment of Revised Simulated Body Fluids. *J Biomed Mater Res* **2003**, *65*, 188–195.
- (10) Kokubo, T.; Takadama, H. How Useful Is SBF in Predicting in Vivo Bone Bioactivity? *Biomaterials* **2006**, *27* (15), 2907–2915.
- (11) Dulbecco, R.; Vogt, M. Plaque Formation and Isolation of Pure Lines with Poliomyelitis Viruses. *J. Exp. Med.* **1954**, *99* (2), 167–182.

Anexo 3. Publicación

Revista: Biomedical Engineering Express 3 (2017) 035012

Título: “High surface area biopolymeric-ceramic scaffolds for hard tissue engineering”

Autores: Lilian B. Romero-Sánchez, Sara Borrego-Gómez, Aránzazu Díaz-Cuenca

DOI: <https://doi.org/10.1088/2057-1976/aa7001>



PAPER

High surface area biopolymeric-ceramic scaffolds for hard tissue engineering

RECEIVED
14 March 2017REVISED
13 April 2017ACCEPTED FOR PUBLICATION
28 April 2017PUBLISHED
11 May 2017Lilian B Romero-Sánchez¹, Sara Borrego-González¹ and Aránzazu Díaz-Cuena^{1,2}¹ Materials Science Institute of Seville (ICMS), Joint CSIC-University of Seville Center, C/Américo Vespucio 49, Isla de la Cartuja, E-41092 Seville, Spain² Networking Research Center on Bioengineering, Biomaterials and Nanomedicine (CIBER-BBN), SpainE-mail: aranzazu@icmse.csic.es**Keywords:** dual macro-nano porous scaffold, structured fibrillar collagen, compressive strength, bioactivity**Abstract**

The development of scaffolds mimicking native bone tissue composition and structure is a challenge in bone tissue engineering. 3D scaffolds with both an interconnected macropore structure and nanotextured surfaces are required. However, 3D scaffolds processed by microfabrication usually lack of nanotextured surface, while nanotextured materials generated by bottom-up nanofabrication are difficult to process conforming scaffolds having well interconnected microsized cavities. In this work, the processing of reticulated (macropore interconnected) structures using nanostructured precursors has been performed to improve the mechanical properties of the scaffolds. The application of a fibrillar collagen coating, using less than 1 wt% collagen per scaffold, has allow a significant increase of the compressive strength while preserving a high surface area and nanopore accessibility. Besides, the fibrillar nanostructured collagen coating promotes hydroxyapatite mineralization. Two different collagen-coating procedures are applied showing interesting differences in terms of mechanical performance.

1. Introduction

Synthetic engineered biomaterials acting as scaffold or template structures to mimic the natural bone extracellular matrix (ECM) environment and to assist newly tissue-engineering approaches, is a matter of major interest [1–3]. Intrinsic bioactivity, biocompatibility, pro-osteogenicity, pro-angiogenicity, high porosity and interconnected large pore structure are essential properties bone graft materials which have been demonstrated for bioactive glass (BG)-based scaffolds fabricated by the foam replication technique [4, 5]. As natural ECM exhibit nanotextured surface, efforts have been made to produce these 3D BG scaffolds with improved nanostructural features [6].

Besides all these interesting properties, the high porosity of the 3D BG structures and the brittle nature of the ceramic component limit the mechanical performance of these scaffolds [7]. Hence, a major challenge for the development of scaffolds in the clinical success is to overcome its brittle character and intrinsic low resistance to fracture. To reach this, a promising strategy is to coat or infiltrate the brittle scaffold

with suitable polymer materials [8]. Among the available synthetic polymers, such as poly(D,L-lactic acid) [9], poly(ϵ -caprolactone) [10] and biopolymers, alginate [11], cellulose [12] or gelatine [11, 13], collagen materials offer unique characteristics. Collagen type I is the main component of the organic ECM in bone [14] and constitute a predominant biomaterial in biomedical applications including bone repair and regeneration [15]. Collagen biomaterials have high affinity to water and present hemostatic properties, low inflammatory (immunogenic) host response and non-toxicity [16]. Unlike other mentioned biopolymers, fibrillar collagens show additional molecular features that are essential for appropriate matrix biomineralization [17] and facilitation of cell-biomaterial surface interactions and communication [15]. The collagen fibrils comprise an assemble of periodic arranged tropocollagen molecules staggered along the axial direction by $D \approx 67$ nm. This generates a characteristic pattern of gap zones with 35 nm length and overlap zones with 32 nm length within the fibril [17, 18]. Calcium hydroxyapatite (HAP) mineral crystals stagger along the collagen fibrils. This staggering

has been attributed to the nucleation of mineral particles inside the gap zone of the collagen fibrils [19]. Moreover, high-affinity-binding site for cell matrix-binding protein integrins has been identified in the type I collagen molecule. This site consists of a hexapeptide sequence GFOGER. According to the D-staggered (≈ 67 nm) alignment of single collagen I molecules in the native collagen fibril, the GFOGER epitope can also be predicted to be arranged at a repetitive distance of 68–67 nm on the fibril surface [20].

In this work, new scaffold materials comprising a bioactive dual porous (open macropore and ordered nanopore) structure coated with a biomimetic fibrillar collagen film are processed. Bone tissue engineering requires 3D scaffolds with both an interconnected macropore structure and nanotextured surfaces. In this respect, 3D scaffolds processed by microfabrication usually lack of nanotextured surface, while nanotextured materials generated by bottom-up nanofabrication are difficult to process to conform open macropore scaffolds. In this work the hierarchical structures obtained resemble the one found in the natural bone tissue. The two distinctive features of these structures, the textural properties and the fibrillar collagen coating, have been characterized and compared to other previously reported 3D BG structures in terms of nanostructure, compressive strength performance and *in vitro* bioactivity response.

2. Materials and methods

2.1. Scaffold pieces processing

Scaffold processing was performed using the replication method of polyurethane foam (BULPREN[®] S28133). The ceramic precursor slurry consisted of a mixture of a mesoporous BG sol with a Si/Ca/P molar ratio of 80:15:5 and a SBA-15 type silica particulate material in a proportion of 92 and 8 vol% respectively, as previously reported by our group [6]. In this work, a 2 wt% polyvinyl alcohol (PVA) (Mw 89 000–98 000; 99+% hydrolyzed, Sigma-Aldrich) aqueous solution was additionally incorporated in the protocol as it follows. Foam pieces of 7 mm in height and 12 mm diameter were firstly soaked in DI water and dried before use. The pieces were immersed for 5 min into the PVA solution and squeezed out to remove the liquid redundancy. Then the pieces were immersed in the prepared ceramic mixture slurry for other 5 min. The slurry excess was squeezed out of the pieces, which were introduced in a laboratory oven at 50 °C for 24 h. The same procedure was repeated three times. After drying, the pieces were heat-treated twice using a heating rate of 1 °C min⁻¹ with two isothermal steps: 400 °C and 800 °C. The holding time at 400 °C was always 1 h, and at 800 °C it was 2 h for the first treatment and 6 h for the second. Final ceramic pieces were named SP8PVA.

A collagen type I solution (BD Biosciences) of 3.1 mg ml⁻¹ was used to prepare the fibrillar collagen suspension. Fibril formation was achieved by means of self-assembly of the collagen molecules using a KH₂PO₄ (Sigma-Aldrich)/Na₂HPO₄ (Sigma-Aldrich) buffer solution of 200 mM ionic strength using 34 °C. The collagen coating of the prepared ceramic pieces was carried out adding 100 μ l of the fibrillar collagen suspension on each side of the piece (total 200 μ l per piece) followed by two different drying protocols, freeze-drying (FD) (SP8PVA-CFD) and room temperature under atmosphere (SP8PVA-CRT). Finally, both type of coated materials were cross-linked using a dehydrothermal treatment (DHT) at 150 °C under vacuum for 24 h.

2.2. Materials characterization

X-ray diffraction (XRD) analysis was performed with a PANalytical X'Pert PRO diffractometer using Cu-K α radiation (0.154 187 nm). Small-angle XRD (SAXRD) measurements were carried out using a step size of 0.01° and 1.5 s exposure time. Wide angle XRD (WAXRD) patterns were recorded using a step size of 0.03° and a 500 s exposure time.

Thermogravimetric (TG) and differential scanning calorimetry analyzes were performed simultaneously using a thermal analyzer system TA Instruments SDT Q600 under an airflow system of 100 cm³ min⁻¹ and heating rate of 10 °C min⁻¹.

Fourier transform infrared spectroscopy (FT-IR) absorption spectra were recorded using a JASCO 6200 spectrometer in the 4000–400 cm⁻¹ range.

Fracture cross-section of the scaffold pieces were examined using a HITACHI S-4800 field emission gun scanning electron microscope (FEG-SEM) working at an accelerating voltage of 2 kV. Energy dispersive x-ray (EDX) analysis was performed with an EDX Bruker X Flash 4010 detector. EDX spectra were collected at 10 kV. Collagen fibrils observations after the self-assembly process were performed using scanning transmission electron microscopy (STEM) of the collagen suspension. The samples were fixed using 1% (v/v) glutaraldehyde/DI H₂O solution and negatively stained using 1% (v/v) phosphotungstic acid (HT152-Sigma-Aldrich)/DI H₂O solution adjusted to pH 7.4 by adding NaOH (30620, Riedel-de-Häen).

N₂ adsorption-desorption isotherms were collected on a Micromeritics Tristar 3020 gas adsorption analyzer at 77 K, after degassing in a nitrogen stream at 423 K during 72 h. The surface areas were calculated from the Barrett-Emmett-Teller (BET) method. Total pore volume was obtained from the N₂ amount adsorbed at 0.99 relative pressure. The pore size distributions were calculated from the adsorption branch of the isotherm using the Barrett-Joyner-Halanda (BJH) method.

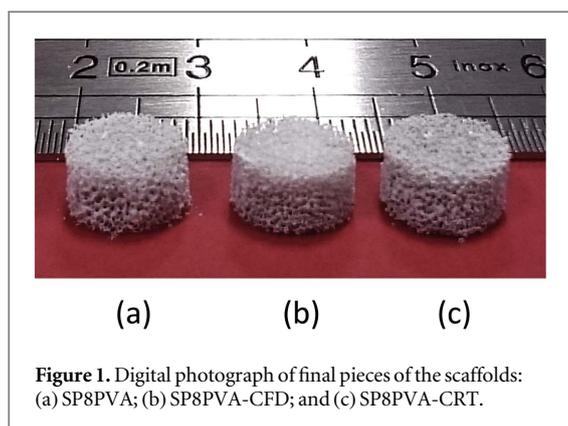


Figure 1. Digital photograph of final pieces of the scaffolds: (a) SP8PVA; (b) SP8PVA-CFD; and (c) SP8PVA-CRT.

The compressive strength of scaffolds was measured using the MicroTest EM1/50/FR with a 500 N load cell at a cross-head speed of 0.5 mm min^{-1} .

2.3. *In vitro* bioactivity assays

The bioactivity assay was carried out by soaking the pieces in Simulated Body Fluid (SBF) [21]. Previous to the assay, the scaffolds were sterilized by UV in a laminar flow cabinet and the solutions were filtered using $0.2 \mu\text{m}$ bacteriostatic filter (Biofil). After sterilization, the material pieces were soaked in 12 ml SBF solution and incubated for 24, 72 and 168 h at 36.5°C and 60 r.p.m. of shaking. Once removed from incubation, the samples were dried in an oven at 50°C and stored in a desiccator. Then the scaffolds were then characterized using FEG-SEM, FT-IR and XRD for mineralization.

3. Results

3.1. Morphological and textural characterization of processed scaffold pieces

Based on a previous reported work of blending SBA-15 microparticles with a $\text{SiO}_2\text{-CaO-P}_2\text{O}_5$ sol [6], a new variation in the processing protocol of PVA incorporation is implemented. Reticulated cylindrical

structures, named SP8PVA, of reproducible shape and dimensions of 9.2 mm diameter base and 5.4 mm height are obtained from the replica morphology of a polyurethane foam sacrificial template. After heating treatment a complete removal of both the polyurethane foam and the PVA was confirmed using thermal analysis and infrared spectroscopy (figure 5). Final ceramic pieces of 0.27 g cm^{-3} density and 88% total porosity are obtained. A fibrillar collagen coating is then applied to the ceramic pieces followed by two different drying protocols, FD and a room temperature under atmosphere. The final biopolymeric-ceramic scaffolds obtained after both processes are respectively evaluated. The three studied scaffolds, the uncoated, SP8PVA, and the two-type collagen coated, SP8PVA-CFD and SP8PVA-CRT, are shown in figure 1.

A precursor collagen suspension was used for scaffold coating. The achievement of structured collagen nanofibrils after *in vitro* fibrillogenesis was assessed using STEM. Figure 2(a) shows homogeneous nanofibrils of $\sim 100 \text{ nm}$ diameter in size obtained after this process. At higher magnification (figure 2(b)) these nanofibrils display the characteristic D-periodic banding of alternating dark (stain penetrable) and light (stain excluding) zones, the so called ‘gap’ and ‘overlap’ zones [18].

Following the same protocol used for the scaffold fabrication, the prepared collagen fibril suspension was freeze-dried and analyzed using FT-IR. The freeze-dried monomeric collagen reactive product was used as a control. Figure 3 shows both infrared spectra that identify the collagen fingerprint vibrations [22, 23]. The principal amide group related absorption bands at $3400\text{--}3300 \text{ cm}^{-1}$ (amide A), $1660\text{--}1630 \text{ cm}^{-1}$ (amide I), $1560\text{--}1530 \text{ cm}^{-1}$ (amide II) and 1239 cm^{-1} (amide III) are the prominent features of the spectra. Although the main characteristic collagen bands are present in both spectra, important differences between them are detected. After fibril

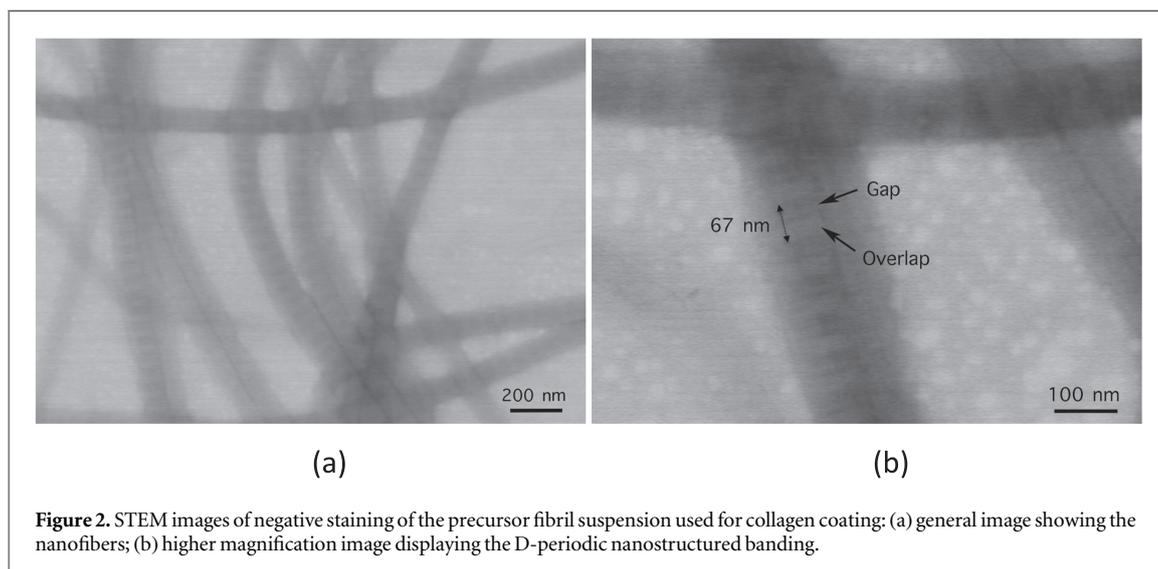


Figure 2. STEM images of negative staining of the precursor fibril suspension used for collagen coating: (a) general image showing the nanofibrils; (b) higher magnification image displaying the D-periodic nanostructured banding.

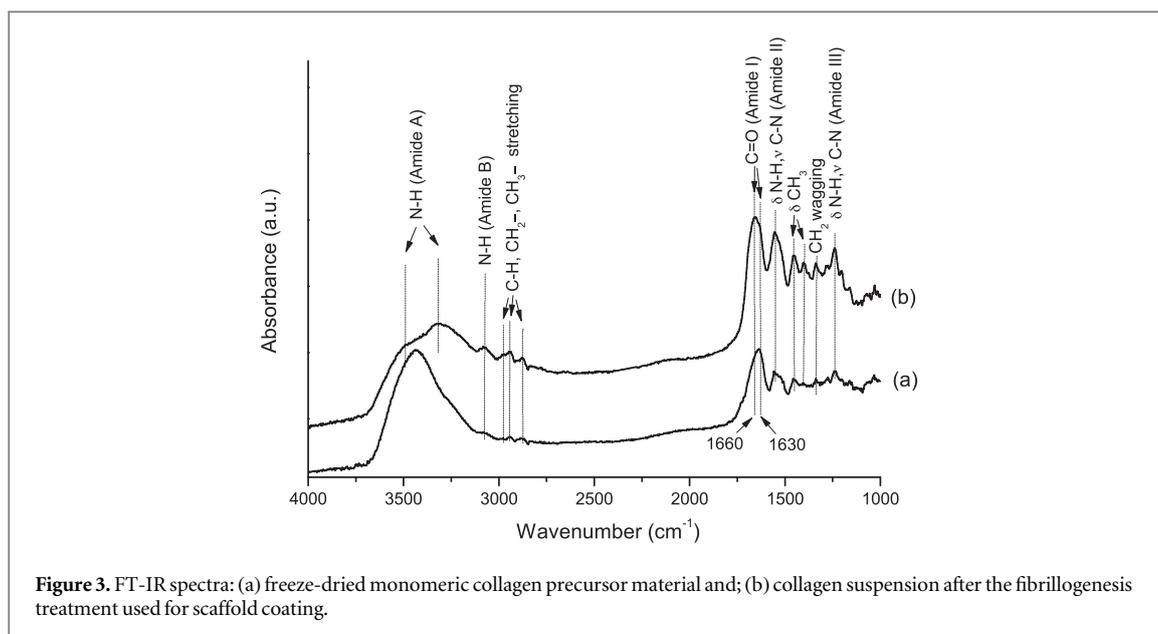


Figure 3. FT-IR spectra: (a) freeze-dried monomeric collagen precursor material and; (b) collagen suspension after the fibrillogenesis treatment used for scaffold coating.

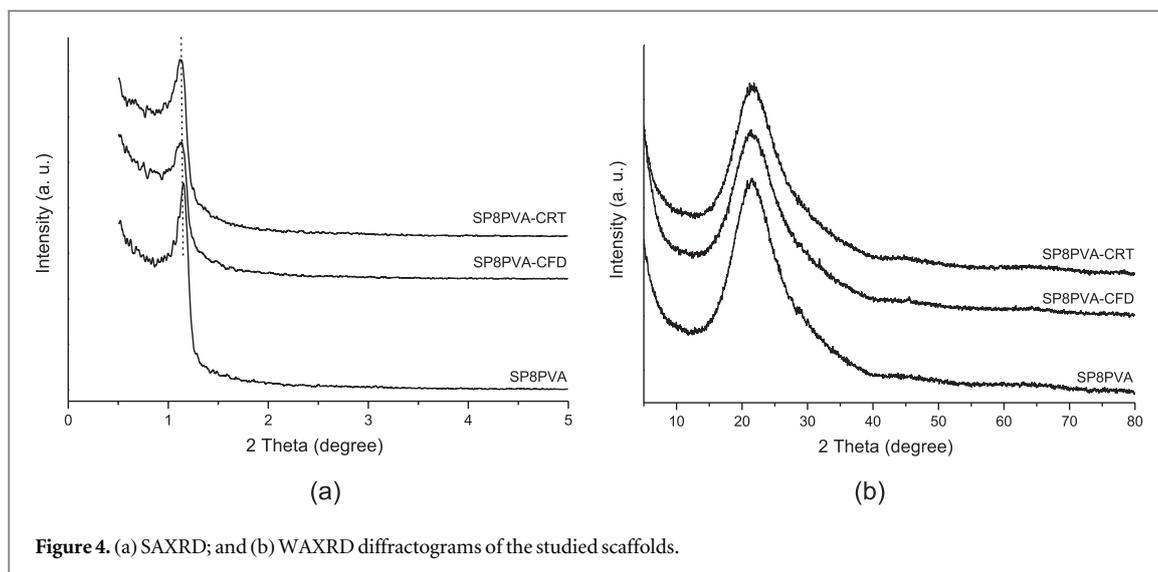


Figure 4. (a) SAXRD; and (b) WAXRD diffractograms of the studied scaffolds.

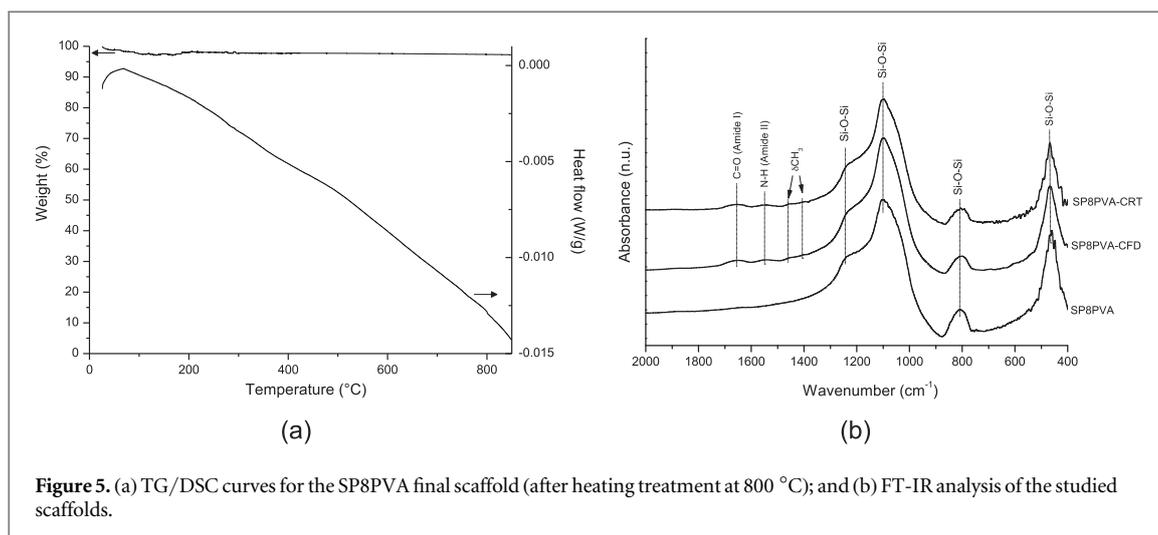
formation, the NH-stretching (Amide A) vibration at 3430 cm^{-1} is widened and the maximum intensity peak is shifted to a lower frequency of 3315 cm^{-1} . Other spectra changes observed after fibrillogenesis are a general sharpening and definition of all the peaks. In particular, N-H (Amide B) at 3083 cm^{-1} , and C-H, CH₂⁻ and CH₃⁻ stretching vibrations in the $2980\text{--}2850\text{ cm}^{-1}$ range are clearly more intense in the fibrillar collagen sample. Particularly related to the collagen self-assembly process is the sharpening of the 1660 cm^{-1} contribution band and the $1660\text{ cm}^{-1}/1630\text{ cm}^{-1}$ absorbance ratio increase. This has been demonstrated for monomeric type I collagen thermal self-assembly experiments carried out *in vitro* [24]. Likewise, the amide II is shifted from 1550 cm^{-1} in the monomeric collagen spectrum to 1555 cm^{-1} in the fibrillar material.

The total collagen amount incorporated per scaffold, 0.73 wt%, is small enough not to affect the

macroscopic appearance of the pieces, while preserving the open porosity and interconnectivity of the ceramic structure.

XRD analysis of the scaffolds is shown in figure 4. The sharp peaks corresponding to the (100) typical SBA-15 reflection measured by SAXRD are detected for the three samples. This confirms the presence of ordered nanopores. When compared to the uncoated scaffold, less intensity and a peak position shift and broadening very small is observed for the collagen coated materials. In agreement with the thermal analysis, which did not show any crystallization events up to $800\text{ }^{\circ}\text{C}$ (figure 5(a)), WAXRD patterns display a very broad signal indicating the vitreous character of the scaffolds.

FT-IR analysis of the scaffolds exhibits the typical features of a BG. The main vibrational modes of the Si-O-Si groups as the Si-O-Si stretching vibration in the $1000\text{--}1300\text{ cm}^{-1}$ range are composed of the two



transversal optical modes, a more intense centered at 1100 cm^{-1} and a shoulder located at 1240 cm^{-1} [25, 26]. The Si–O–Si bending vibrations near 800 cm^{-1} , characteristic of ring structures in the glass matrix stretching vibrations, and the Si–O–Si rocking vibrations at 460 cm^{-1} are also clearly identified [25]. No other signals corresponding to organic residues from the polyurethane foam or the PVA binding agent are detected in the final scaffolds, indicating its complete removal after the heating treatment.

With the addition of collagen, new bands corresponding to the Amide I peak at 1659 cm^{-1} , the Amide II at 1550 cm^{-1} [27, 28] and the absorption bands at 1452 and 1403 cm^{-1} , attributed to the $\delta(\text{CH}_3)$, are observed in the spectra [27].

Morphologies of the uncoated and coated scaffolds were observed by FEG-SEM (figure 6). All scaffolds exhibit an interconnected macroporous network indicating that the applied collagen coating does not significantly affect the macropore size and interconnectivity. Image analysis of the micrographs obtained from SP8PVA, SP8PVA-CFD and SP8PVA-CRT indicate an average macropore size of 297, 312 and $310\text{ }\mu\text{m}$ and a pore wall thickness of 49, 50 and $50\text{ }\mu\text{m}$ respectively. Higher magnification of cross sections of the scaffolds indicates that the coating is homogeneously distributed and the collagen firmly adheres to the strut. In this respect, no residues or indications of the coating peel off was observed during scaffolds cutting. Higher magnification of the surface shows the existence of a tissue-like film over the coated scaffolds that are accompanied by some charging effects on imaging contrast.

High magnification FEG-SEM images showing a comparison of the bare ceramic surface substrate of SP8PVA scaffold and the two type coated samples are displayed in figure 7. Thin sheets of biopolymer cover the rough ceramic surface but a significant difference in texture is observed between the two different type coated materials. A higher porosity and texture is

apparent for the freeze-dried collagen sample where collagen nanofibers forming a net became visible.

N_2 adsorption-desorption isotherms of the scaffolds (figure 8(a)) show hysteresis loops characteristic of the capillary condensation occurring in mesoporous materials. The BJH pore size distributions displayed in figure 8(b) indicate ordered nanopore size distributions with an average pore diameter between 4 and 5 nanometers. Application of the collagen coating on the scaffolds decrease the nanopore volume accessibility as measured by N_2 adsorption-desorption, particularly for the SP8PVA-CRT scaffold. Table 1 present the specific surface area S_{BET} and the total nanopore volume for the three studied scaffolds.

3.2. Compressive strength characterization

The mechanical performance of uncoated and collagen coated scaffolds was assayed by the uniaxial compressive strength test. As displayed by the typical compressive stress-strain curves of these scaffolds (figure 9), the compressive strength of the collagen-coated scaffolds was significantly higher than that of uncoated scaffolds. Besides, the coating effect on the strengthening is more important in the SP8PVA-CRT scaffold. It is worth pointing out that the compressive strength value measured for the SP8PVA uncoated scaffold material (0.09 MPa) is superior to the same inorganic precursor formulation prepared without PVA (0.04 MPa) as previously reported by our group [6, 29]. Also, it is interesting to note that the uncoated scaffold was completely broken and disaggregated into little pieces (particles) during compressive strength test, while the collagen coated scaffolds were able to maintain somehow piece integrity (compaction) despite being compressed (figure 10).

3.3. Assessment of *in vitro* bioactivity

The FEG-SEM observations of the three type studied scaffolds after 24 h of treatment did show features characteristic of calcium phosphate nucleation over the material surfaces for the three studied scaffolds.

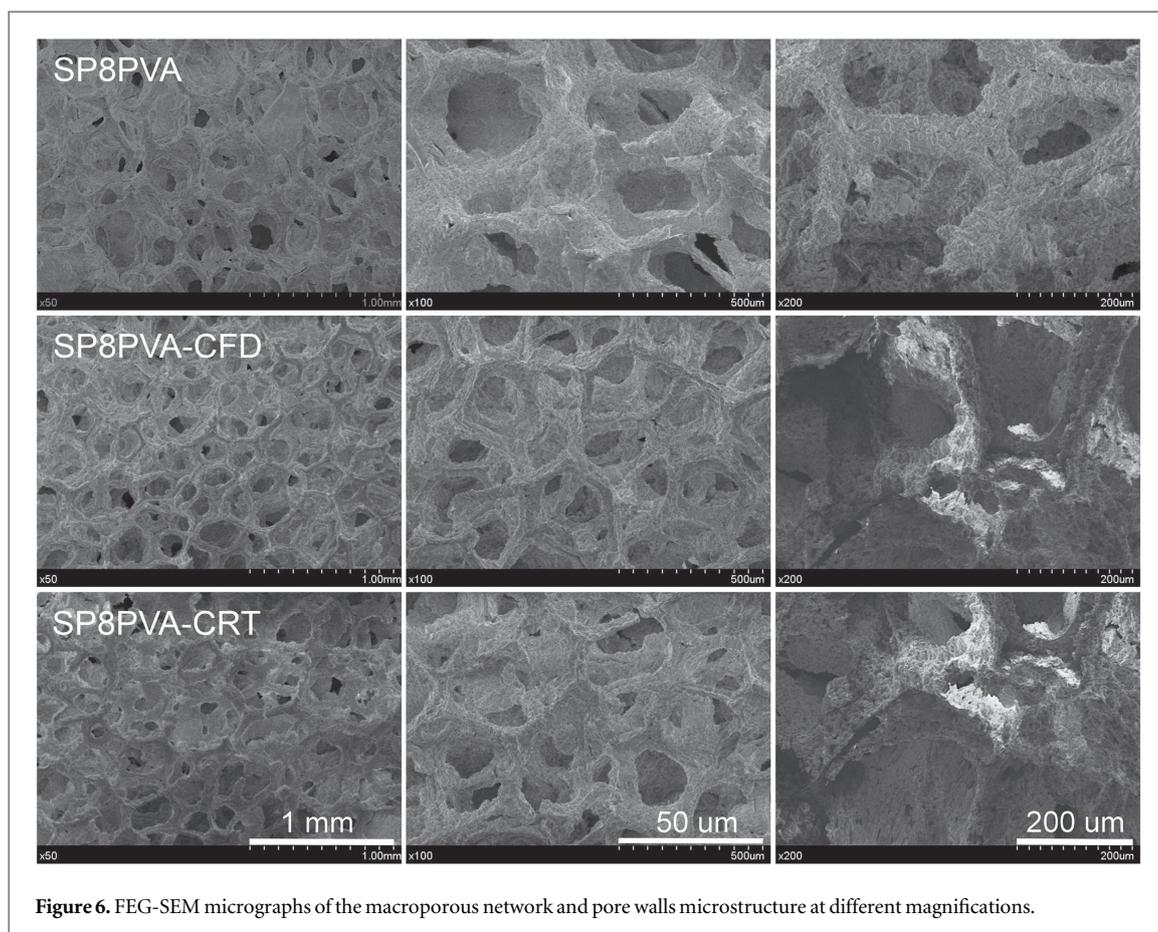


Figure 6. FEG-SEM micrographs of the macroporous network and pore walls microstructure at different magnifications.

Distinctively, more homogeneous morphologies over the surface showing very fine grain particle sizes morphologies were observed on the freeze-dried collagen coated scaffold. Abundant particulate aggregate morphologies were also observed over the collagen-coated scaffold dried at room temperature. Figure 11 shows how the increase in time treatment from 24 to 72 h produces a visible macropore size reduction as result of calcium phosphate growth on the scaffold walls, being particularly evident for the SP8PVA-CFD scaffold.

Figure 12 shows FEG-SEM high magnification images and EDX analysis of the surfaces after 168 h SBF treatment. Images of the bare ceramic SP8PVA scaffold exhibit typical cauliflower shape morphologies of calcium phosphate crystallization. In the case of the collagen coated materials fine crystal particle morphologies are not forming round aggregates but decorating the collagen nanofibers instead. EDX analysis of the surfaces indicates higher P/Si and Ca/Si signal intensity ratios for the collagen coated scaffolds in comparison with the full ceramic SP8PVA which might suggest a thicker and homogeneous calcium phosphate layer formation on the collagen coated materials.

The combined FT-IR and XRD analysis of the scaffolds carried out after 24, 72 and 168 h is displayed in figure 13. Only the new specific bands detected when compared to the SBF non-treated scaffolds spectra are

highlighted in the FT-IR spectra (figure 13(a)). The vibrational peak at 1630 cm^{-1} assigned to O–H bonds indicates water trapped inside the samples after soaking treatment. Peak at 1070 cm^{-1} corresponds to the asymmetric stretching mode of P–O bond [30, 31]. Bands at 563 and 602 cm^{-1} are characteristic of phosphate in a crystalline environment [32]. The formation of phosphate species on the scaffolds surface of the three types of scaffolds is detected by FT-IR after 24 h soaking. When increasing the time of treatment to 168 h, a crystalline growing nature of the phosphate phases is assessed after the 563 and 602 cm^{-1} distinctive peaks definition. The XRD diffractograms confirm the crystallization of calcium HAP particles. This starts earlier in the collagen coated scaffolds that shows characteristic HAP peaks (JCPDS card 9-432) after 72 h. With the increase in soaking treatment, the HAP crystals grow in all samples including the non-collagen coated SP8PVA material.

4. Discussion

Previous papers reporting on 3D open cell macropore biopolymeric-ceramic scaffolds lack of nanostructural features useful for induction of biological responses [8]. Table 2 compiles preceding work on bone tissue engineering scaffolds using conventional (low surface area) BGs and collagen.

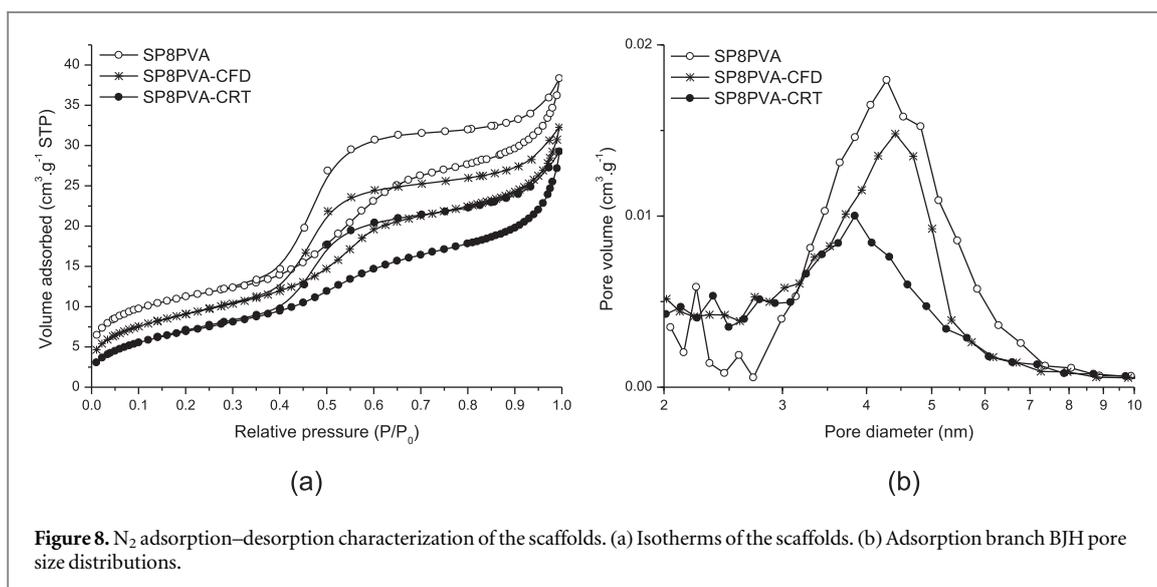
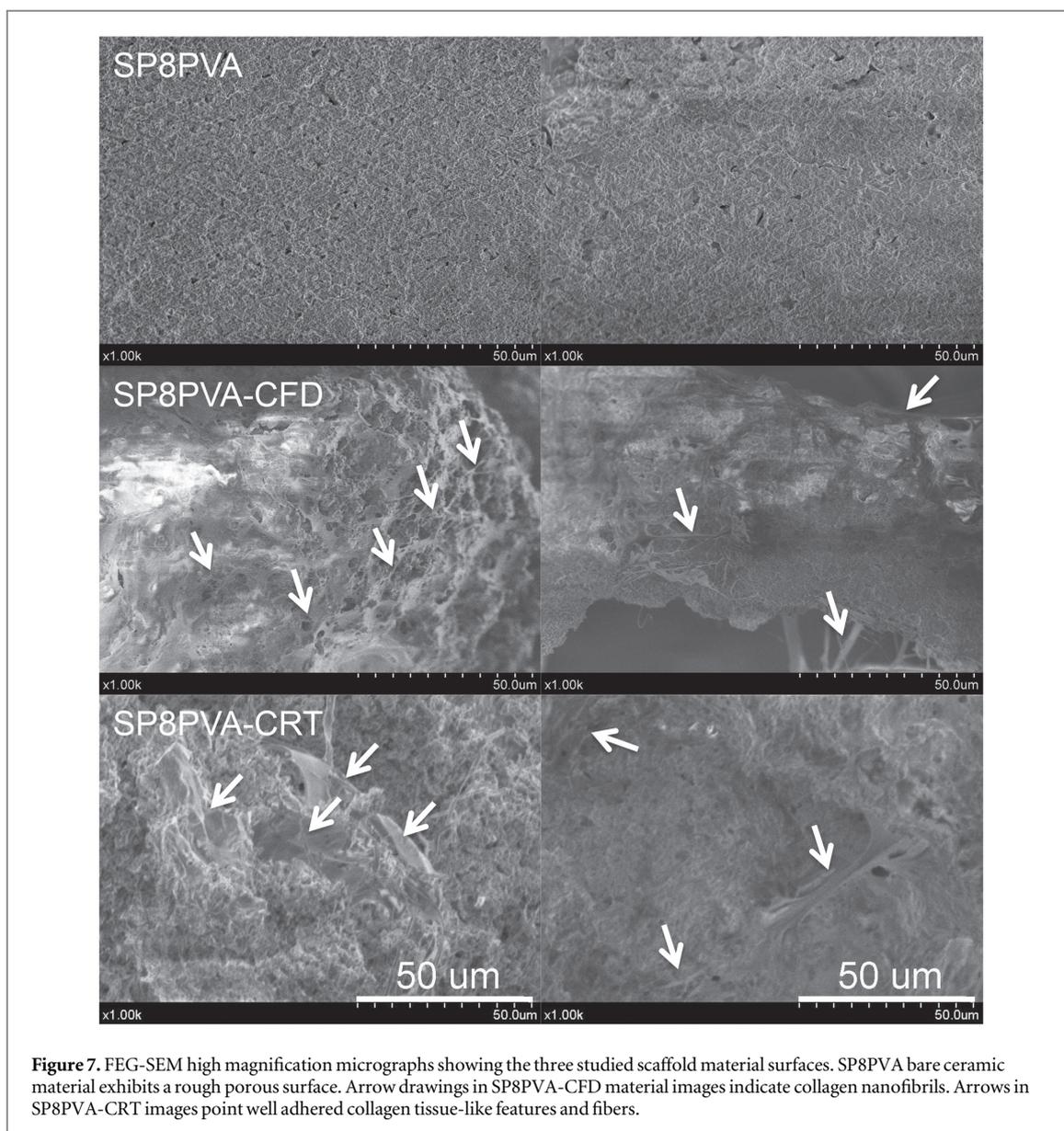


Table 1. Textural parameters of the scaffolds measured using physisorption analysis.

Scaffold	$S_{\text{BET}}^{\text{a}}$ ($\text{m}^2 \text{g}^{-1}$)	V_{t}^{b} ($\text{cm}^3 \text{g}^{-1}$)
SP8PVA	42	0.06
SP8PVA-CFD	32	0.04
SP8PVA-CRT	25	0.03

^a Specific surface area calculated by the BET method.

^b Total pore volume estimated from the nitrogen amount adsorbed at 0.99 relative pressure.

In this report, a hybrid scaffold with defined nanoporosity and nanostructured collagen fibers over the surface as well as improved mechanical properties when compared to a bare ceramic is presented. The PVA surfactant and binding agent [13, 36] has been added to the processing protocol of the scaffold-reticulated structures. The characterization data assessed for the uncoated (full-ceramic) scaffold, SP8PVA, indicate that density and total porosity values are not modified with respect to the PVA free materials [6]. Nevertheless, other textural and nanoscopic parameters, such as the surface area and nanopore volume, are significantly affected showing a drastic decrease of more than 50%. Although, the important decay observed in the textural parameters for PVA processed materials, the surface area of $42 \text{ m}^2 \text{g}^{-1}$ of the final scaffold material is still outstanding respect to conventional melt BG-based scaffolds [5, 7]. Even though no specific surface area data of the final processed melt BG-based scaffolds have been found in the literature, an estimation below $2.7 \text{ m}^2 \text{g}^{-1}$ can be inferred from the surface area values measured for the 45S5 bioglass precursor powders. Hence, depending on the particle size fraction used ranging between 4 and $248 \mu\text{m}$, a

maximum surface area of $2.7 \text{ m}^2 \text{g}^{-1}$ has been measured for this precursor material type [37].

On the other side, the decrease in the textural properties observed for the PVA processed scaffolds are compensated by an important increase of 40% in the compressive strength values when compared with the same structures processed without PVA. In addition to this, the comparison of the strength values (0.09 MPa) of the new PVA prepared nanostructures with data from conventional BG reticulated scaffolds (0.04 MPa) in the literature supports these new materials properties. To our best knowledge, previous reported work on mechanical properties of this type of BG-based reticulated scaffolds using melt-derived glass precursor powder, mainly 45S5 Bioglass in the particulate form and mean particle size of $5 \mu\text{m}$ [7, 38], possess very inferior textural properties.

Based on this progress, another strategy to improve the scaffolds properties is the coating of the structures using biodegradable polymers. Polymer coating can fill microcracks and voids of the scaffold turning weak and brittle ceramic strut into a stronger and tougher composite. This significantly improves the final scaffold mechanical stability [8]. Synthetic polymers, as polyesters, polylactides or polyglycolides, and their co-polymers and polyhydroxyalkanoates [9–11] are used. However, their application to bone regeneration has shown several drawbacks such as low bioactivity [39], release of acidic degradation products [40] and the lack of important surface biological cues, very important for cell recognition. As a promising alternative, polymers of natural origin such as alginate [11], chitosan [41], silk [42], cellulose [12, 41], gelatin [13, 43] or collagen [44] have been used. With regards to the mechanical performance, 45S5 BG-based scaffold, coated with cellulose nanowiskers, improved the

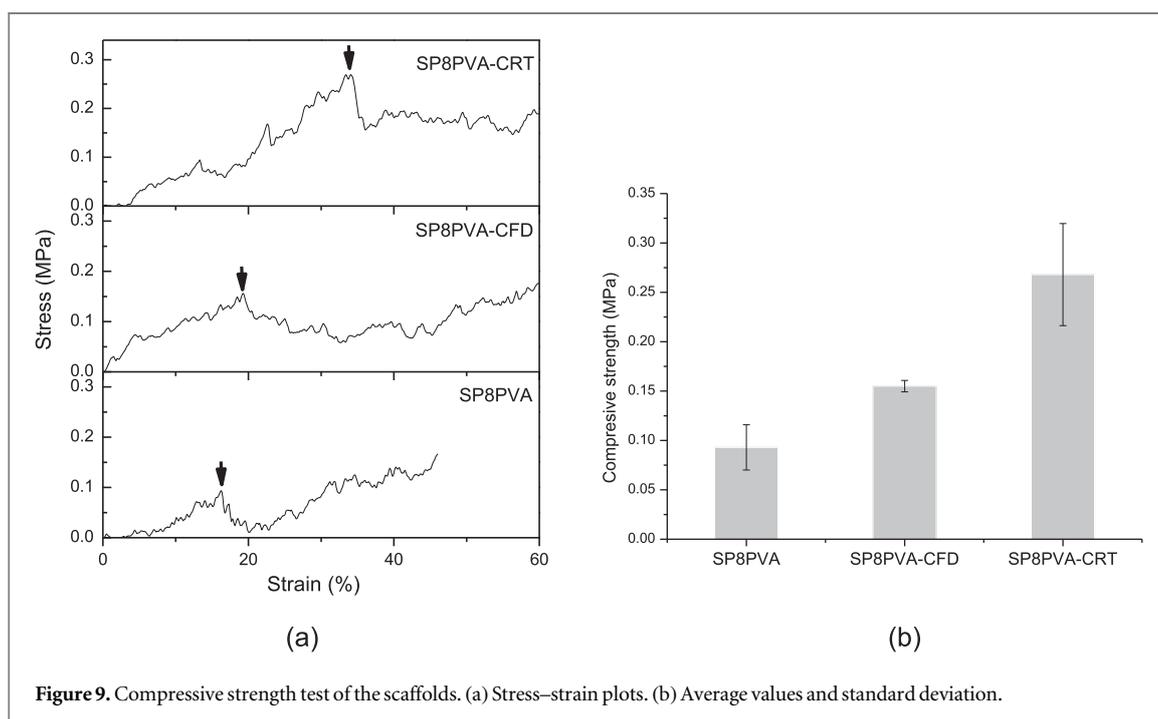
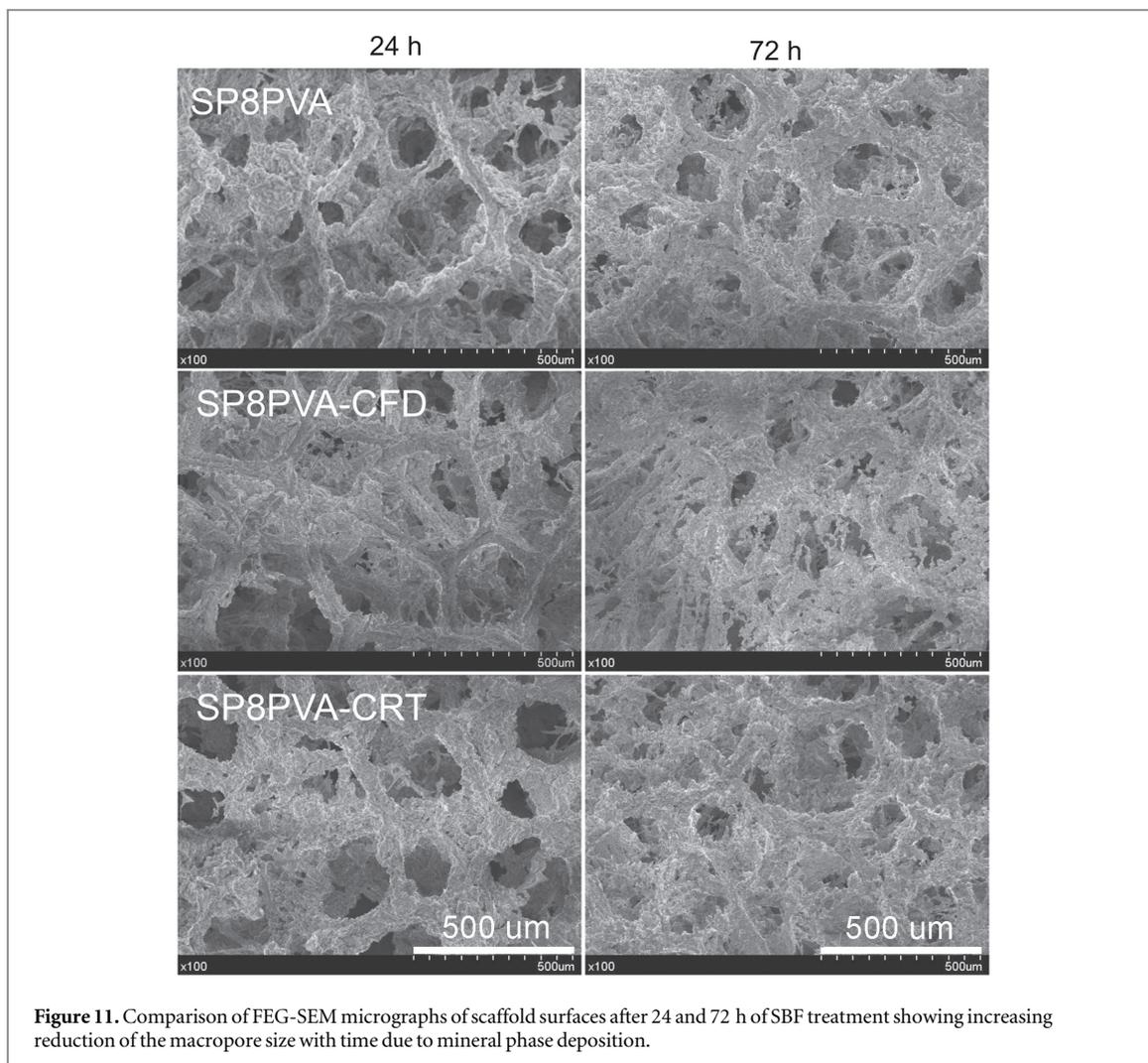
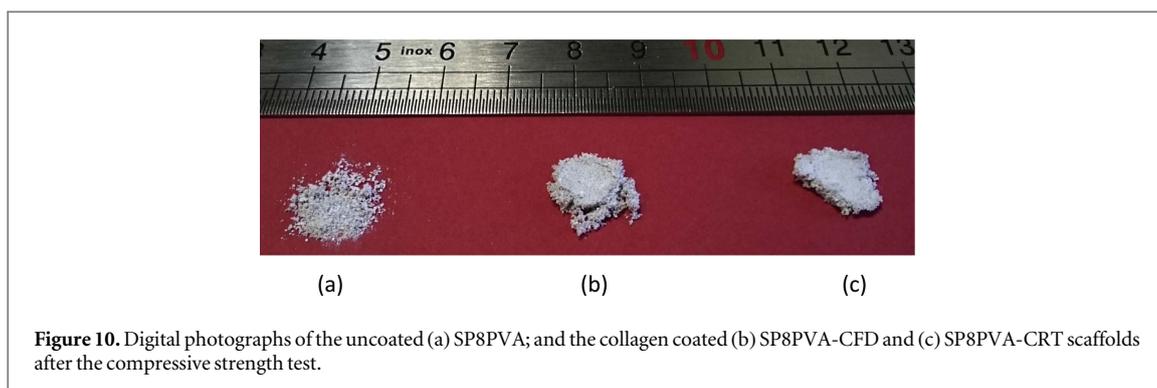
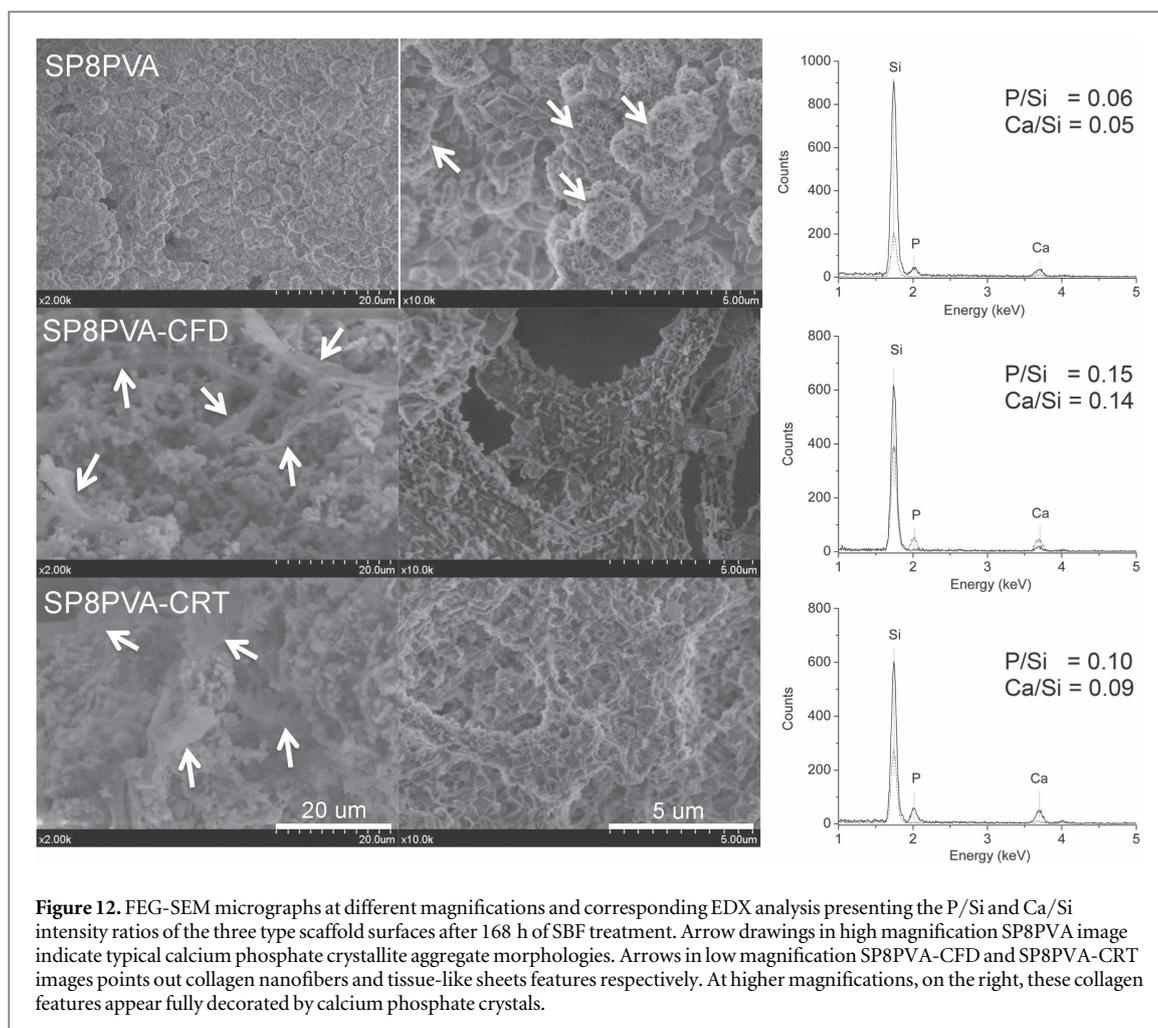


Figure 9. Compressive strength test of the scaffolds. (a) Stress–strain plots. (b) Average values and standard deviation.



compressive strength of the scaffolds from 0.02 to 0.06 MPa [12]. Similar BG-derived scaffolds, infiltrated with a 5% w/v gelatin solution, results in a higher compressive strength of 0.3–0.8 MPa [13] or 1.04 MPa for 5% w/v gelatin-genipin solution [38]. In this work, the collagen coating of the high surface area reticulated scaffold provides values up to 7-fold higher compressive strength. It is worth pointing out the significant strengthening effect produced using a very small amount (0.73 wt%) of fibrillar collagen per scaffold. The rationale behind the development of a collagen coated scaffold is that under the influence of

mechanical loading the fibrillar biopolymer bridges the cracks developing in the ceramic structure, thus increasing the overall resistance to crack propagation [8]. Hence, the bare ceramic (non-coated) scaffold fails by successive brittle fracture of struts in layers near testing load pieces producing a completely break-out of the scaffold in very small pieces and particles, figure 10(a). In contrast, the collagen coated scaffolds presents higher ductile deformation behavior and somehow densification of the structure, as can be appreciated in figures 10(b) and (c). In this respect, collagen coated scaffolds intended to mimic the



composite structure of bone consisting of a hierarchical combination of HAP and collagen [17].

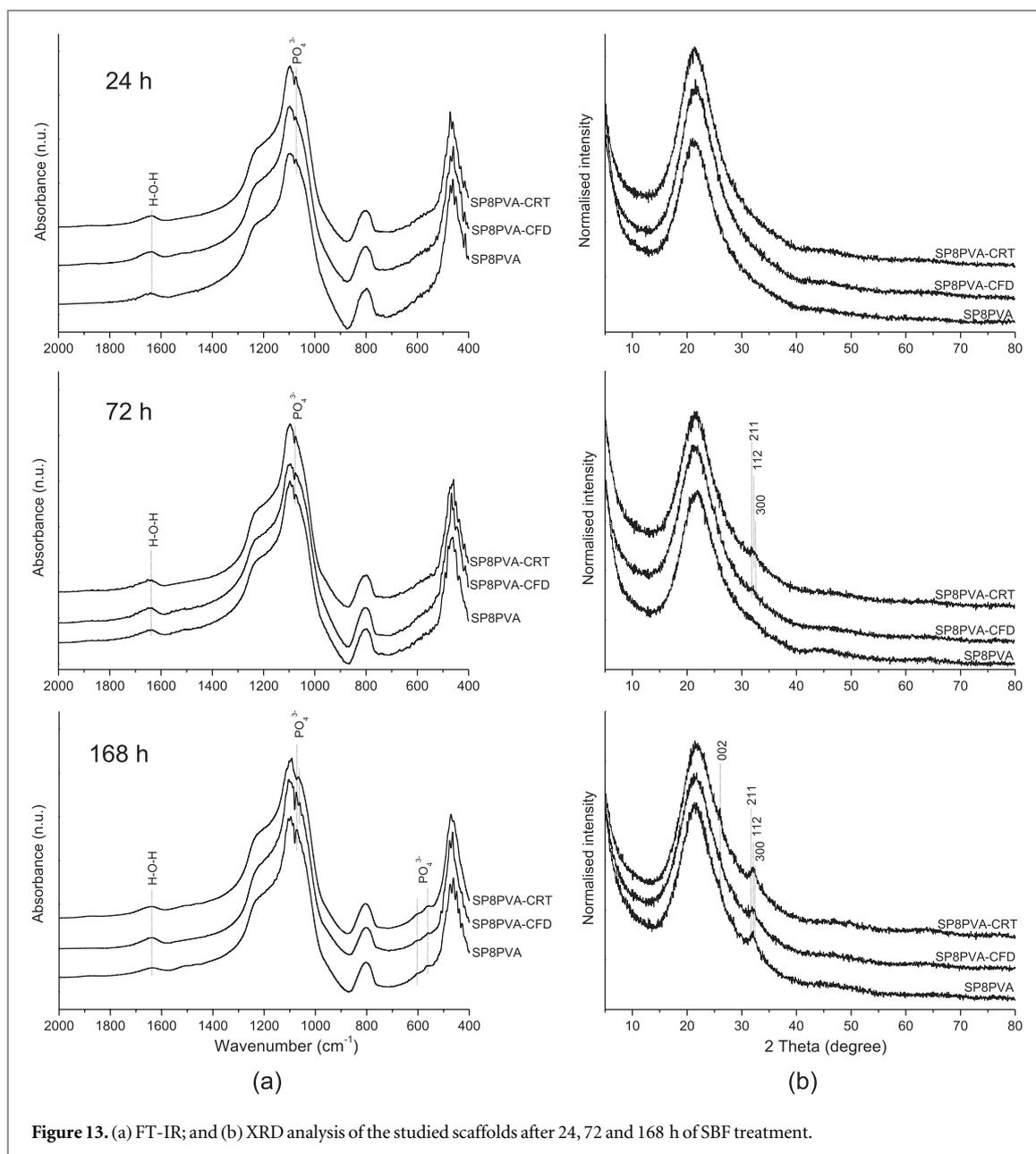
The FEG-SEM micrographs in figure 7 indicate a robust biopolymer adhesion to the ceramic substrate. The incorporation of the collagen fibrils suspension ($\text{pH} \approx 7$) will ensure overall collagen molecules ($\text{pI} \approx 7.5$) [45] positive charge, which is opposite to the scaffold ceramic substrate surface charge ($\text{pI} \approx 3$) [6], facilitating a complementary electrostatic interaction then strong collagen molecule-ceramic substrate adsorption process.

Fibrillogenesis of the monomeric collagen precursors has been assessed by STEM and FT-IR characterization. The comparison of the infrared spectrum of the collagen thermally driven fibrillogenesis and that of the precursor monomeric product showed a shift to lower wave number of the amide A peak, a band broadening and sharpened of the highest frequency at 1660 cm^{-1} of amide I, band shifted from 1559 to 1555 cm^{-1} of amide II and intensity increase of amide III at 1239 cm^{-1} . All these are events associated with increased intermolecular interactions of collagen [24, 46].

It is also worth to mention other interesting biocompatibility property of the presented scaffolds. An important property of the purified soluble collagen

monomers used to prepare the coating suspension precursor, is that they are able to reform *in vitro* into the ordered fibrillar structures found in native fibrils. This fibril forming process occurs even though the telopeptides have been removed. Another advantage of this process is the use of the soluble purified material pepsin treated that eliminates the telopeptide lineal chains, which present potential immunogenicity problems [47].

Besides, the fibrillar collagen coating not only does not inhibit the scaffolds bioactive response but also promotes the HAP mineralization on the material surface. XRD data in figure 13 indicates that, after the first 72 h of SBF treatment, incipient HAP peaks are only detected on the coated samples. As the time immersion increase to 168 h, the XRD pattern of the uncoated scaffold becomes similar to that of collagen-coated structures. This mineralization boosting effect of the collagen coating is also supported by FEG-SEM observations of the structures after 72 h of SBF soaking that show more clear open cell wall thickening on coated scaffolds. This is not an unexpected behavior as structured type I collagen may serve as a template to control both nucleation and growing of HAP crystals [48, 49]. In fact, sequestration of large quantities of calcium, phosphate and carbonate ions by collagen, which



precipitate spontaneously in apatite crystals, has been proposed [48]. FEG-SEM observations in figure 12 show the formation of fine HAP particles copiously and homogeneously distributed along the collagen both in the case of the more textured freeze-dried material or the sheet tissue-like of SP8PVA-CRT. This observed calcium phosphate crystals disposition, instead of bigger crystal aggregates formation as shown for the full ceramic scaffold, will support a collagen template nucleation mechanism. Precedent *in vitro* bioactivity essays using collagen coated ceramics have pointed out similar conclusions [33]. On the other side, previously reported SBF bioactivity essays on ceramic reticulated structures coated using alternative biopolymers, such as cellulose [12] or gelatin [38], have suggested that these polymer materials may slightly retard the formation of HAP.

The properties of the presented new collagen coated scaffolds are interesting for bone tissue engineering applications. In addition to inorganic suitable osteogenic and angiogenic compositional formulation [1, 4], the textural properties provide controlled drug delivery potential [6, 29] and the implemented collagen coating significantly improves the compressive strength and the HAP surface mineralization. The collagen coated SP8PVA-CRT scaffold shows the higher compressive strength performance. Although it presents a specific surface area and nanoporosity reduction compared with SP8PVA-CFD, a similar bioactivity response was found for both materials.

It is worth to highlight the important effect on the compressive strength values produced by such very small amount of collagen, 0.73 wt%. These results encourage future research to study how increasing

Table 2. Preceding work on bone tissue engineering scaffolds using conventional melt (low surface area) BG^a and collagen.

Material composition	Processing technique	Collagen type	Collagen content (wt%)	Surface area (m ² g ⁻¹)	Compressive strength (MPa)	References
45S5 BG (Full ceramic)	PFRT ^b	—	—	—	0.3	Chen <i>et al</i> 2006 [7]
45S5 BG & collagen	PFRT	Rat tail type I	0.35	0.8	—	Chen <i>et al</i> 2008 [33]
45S5 BG & collagen	Plastic compression	Rat tail type I	3.5–5.7	—	0.6–0.8	Marelli <i>et al</i> 2010 [34]
45S5 BG & collagen	Freeze drying	Bovine tendon	28	—	1.5–2.0	Xu <i>et al</i> 2011 [35]

^a BG: Bioactive glass.^b PFRT: Polyurethane foam replica technique.

collagen content could improve the compressive strength and other mechanical parameters further.

In relation with further clinical translation, other interesting aspect of the presented scaffolds and the purified and enzymatically treated soluble atelocollagen precursor used for the preparation of the coating collagen fibril suspension is that could show an immunogenicity reduction [47] when compared with non-purified biological extract derived collagen materials. Also, the vacuum thermal crosslinking (DHT) used in our protocol prevents the use of chemical cross-linking reagents such as aldehydes, isocyanates and carbodiimides substances, which can produce toxicity and inflammatory responses [50].

5. Conclusions

A nanostructured fibrillar collagen coating has been applied to a 3D open cell macropore ceramic structure exhibiting well-defined nanoporosity. The application of a small amount of 0.73 wt% total collagen content produces a 7-fold compressive strength increase respect to the uncoated material while preserving scaffold high surface area and nanopore accessibility.

The collagen-coated scaffold dried following the protocol using room temperature under atmosphere showed the higher compressive strength performance. Although it presents some specific surface area and nanoporosity reduction with respect to the freeze-dried material, a similar bioactivity response is found for both scaffolds. The *in vitro* bioactivity assay indicates that the fibrillar collagen coating promotes early HAP mineralization.

Acknowledgments

The authors gratefully acknowledge the financial support provided by the Andalusian Ministry of Economy, Science and Innovation (Proyecto Excelencia CTS-6681). LBRS acknowledges the CONACYT-Mexico Fellowship PhD Program.

Conflicts of interest

The authors declare no conflict of interest.

References

- [1] Hench L L and Polak J M 2002 Third-generation biomedical materials *Science* **295** 1014–7
- [2] Ng R, Zang R, Yang K K, Liu N and Yang S-T 2012 Three-dimensional fibrous scaffolds with microstructures and nanotextures for tissue engineering *RSC Adv.* **2** 10110–24
- [3] Williams D F 2014 The biomaterials conundrum in tissue engineering *Tissue Eng.* **20** 1129–31
- [4] El-Gendy R, Kirkham J, Newby P J, Mohanram Y, Boccaccini A R and Yang X B 2015 Investigating the vascularization of tissue-engineered bone constructs using dental pulp cells and 45S5 Bioglass® Scaffolds. *Tissue Eng.* **21** 2034–43
- [5] Detsch R, Alles S, Hum J, Westenberger P, Sieker F, Heusinger D, Kasper C and Boccaccini A R 2015 Osteogenic differentiation of umbilical cord and adipose derived stem cells onto highly porous 45S5 Bioglass®-based scaffolds *J. Biomed. Mater. Res. A* **103A** 1029–37
- [6] Ramiro-Gutiérrez M L, Will J, Boccaccini A R and Díaz-Cuenca A 2014 Reticulated bioactive scaffolds with improved textural properties for bone tissue engineering: nanostructured surfaces and porosity *J. Biomed. Mater. Res. A* **102A** 2982–92
- [7] Chen O Z, Thompson I D and Boccaccini A R 2006 45S5 Bioglass-derived glass–ceramic scaffolds for bone tissue engineering *Biomaterials* **27** 2414–25
- [8] Philippart A, Boccaccini A R, Fleck C, Schubert D W and Roether J A 2014 Toughening and functionalization of bioactive ceramic and glass bone scaffolds by biopolymer coatings and infiltration: a review of the last 5 years *Expert Rev. Med. Devices* **12** 93–111
- [9] Mantsos T, Chatzistavrou X, Roether J A, Hupa L, Arstila H and Boccaccini A R 2009 Non-crystalline composite tissue engineering scaffolds using boron-containing bioactive glass and poly(D,L-lactic acid) coatings *Biomed. Mater.* **4** 055002
- [10] Fereshteh Z, Noeaid P, Fathi M, Bagri A and Boccaccini A R 2015 The effect of coating type on mechanical properties and controlled drug release of PCL/zein coated 45S5 bioactive glass scaffolds for bone tissue engineering *Mat. Sci. Eng. C* **54** 50–60
- [11] Li W, Pastrama M-I, Ding Y, Zheng K, Hellmich C and Boccaccini A R 2014 Ultrasonic elasticity determination of 45S5 Bioglass-based scaffolds: influence of polymer coating and crosslinking treatment *J. Mech. Behav. Biomed. Mater.* **40** 85–94
- [12] Li W, Garmendia N, Pérez de Larraya U, Ding Y, Detsch R, Grünwald A, Roether J A, Schubert D W and Boccaccini A R 2014 45S5 bioactive glass-based scaffolds coated with cellulose nanowhiskers for bone tissue engineering *RSC Adv.* **4** 56156–64
- [13] Bellucci D, Sola A, Gentile P, Ciardelli G and Cannillo V 2012 Biomimetic coating on bioactive glass-derived scaffolds mimicking bone tissue *J. Biomed. Mater. Res. A* **100A** 3259–66
- [14] Wingender B, Bradley P, Saxena N, Ruberti J W and Gower L 2016 Biomimetic organization of collagen matrices to template bone-like microstructures *Matrix Biol.* **52–54** 384–96
- [15] Ferreira A M, Gentile P, Chiono V and Ciardelli G 2012 Collagen for bone tissue regeneration *Acta Biomater.* **8** 3191–200
- [16] Ramshaw J A M 2016 Biomedical applications of collagens *J. Biomed. Mater. Res. B* **104B** 665–75
- [17] Fratzl P and Weinkamer R 2007 Nature's hierarchical materials *Prog. Mater. Sci.* **52** 1263–334
- [18] Chapman J A, Tzaphlidou M, Meek K M and Kadler K E 1990 The collagen fibril—a model system for studying the staining and fixation of a protein *Electron Microsc. Rev.* **3** 143–82
- [19] Nudelman F, Pieterse K, George A, Bomans P H H, Friedrich H, Brylka L J, Hilbers P A J, de With G and Sommerdijk N A J M 2010 The role of collagen in bone apatite formation in the presence of hydroxyapatite nucleation inhibitors *Nat. Mater.* **9** 1004–9
- [20] von der Mark K, Park J, Bauer S and Schmuki P 2010 Nanoscale engineering of biomimetic surfaces: cues from the extracellular matrix *Cell Tissue Res.* **339** 131–53
- [21] Kokubo T and Takadama H 2006 How useful is SBF in predicting *in vivo* bone bioactivity? *Biomaterials* **27** 2907–15
- [22] Doyle B B, Bendit E G and Blout E R 1975 Infrared spectroscopy of collagen and collagen-like polypeptides *Biopolymers* **14** 937–57
- [23] Silva Z S Jr, Botta S B, Ana P A, França C M, Fernandes K P S, Mesquita-Ferrari R A, Deana A and Bussadori S K 2015 Effect of papain-based gel on type I collagen—spectroscopy applied for microstructural analysis *Sci. Rep.* **5** 11448
- [24] George A and Veis A 1991 FTIRS in H₂O demonstrates that collagen monomers undergo a conformational transition prior to termal self-assembly *in vitro Biochemistry* **30** 2372–7

- [25] Aguiar H, Serra J, González P and León B 2009 Structural study of sol-gel silicate glasses by IR and Raman spectroscopies *J. Non-Cryst. Solids* **355** 475–80
- [26] Magyar K, One R, Tódor I-S, Baia M, Simon V, Simon S and Baia L 2016 Titania effect on the bioactivity of silicate bioactive glasses *J. Raman Spectrosc.* **47** 1102–8
- [27] Belbachir K, Noreen R, Gousspillou G and Petibois C 2009 Collagen types analysis and differentiation by FTIR spectroscopy *Anal. Bioanal. Chem.* **395** 829–37
- [28] Radev L, Mostafa N Y, Michailova I, Salvado I M M and Fernandes M H V 2012 *In vitro* bioactivity of collagen/calcium phosphate silicate composites, cross-linked with chondroitin sulfate *Int. J. Mater. Chem.* **2** 1–9
- [29] Ramiro-Gutiérrez M L, Santos-Ruiz L, Borrego-González S, Becerra J and Díaz-Cuenca A 2016 *In vitro* stimulation of MC3T3-E1 cells and sustained drug delivery by a hierarchical nanostructured SiO₂-CaO-P₂O₅ scaffold *Micropor. Mesopor. Mat.* **229** 31–43
- [30] Charoensuk T, Sirisathitkul C, Boonyang U, Macha I J, Santos J, Grossin D and Ben-Nissan B 2016 *In vitro* bioactivity and stem cells attachment of three-dimensionally ordered macroporous bioactive glass incorporating iron oxides *J. Non-Cryst. Solids* **452** 62–73
- [31] Koutsopoulos S 2002 Synthesis and characterization of hydroxyapatite crystals: a review study on the analytical methods *J. Biomed. Mater. Res.* **62** 600–12
- [32] Salinas A J and Vallet-Regí M 2013 Bioactive ceramics: from bone grafts to tissue engineering *RSC Adv.* **3** 11116–31
- [33] Chen Q Z, Ahmed I, Knowles J C, Nazhat S N, Boccaccini A R and Rezwan K 2008 Collagen release kinetics of surface functionalized 45S5 Bioglass®-based porous scaffolds *J. Biomed. Mater. Res.* **86A** 987–95
- [34] Marelli B, Ghezzi C E, Barralet J E, Boccaccini A R and Nazhat S N 2010 Three-dimensional mineralization of dense nanofibrillar collagen-bioglass hybrid scaffolds *Biomacromolecules* **11** 1470–9
- [35] Xu C, Su P, Chen X, Meng Y, Yu W, Xiang A P and Wang Y 2011 Biocompatibility and osteogenesis of biomimetic bioglass-collagen-phosphatidylserine composite scaffolds for bone tissue engineering *Biomaterials* **32** 1051–8
- [36] Ustundag C B 2016 Fabrication of porous hydroxyapatite-carbon nanotubes composite *Mater. Lett.* **167** 89–92
- [37] Sepulveda P, Jones J R and Hench L L 2001 Characterization of melt-derived 45S5 and solgel-derived 58S bioactive glasses *J. Biomed. Mater. Res. (Appl. Biomater.)* **58** 734–40
- [38] Li W, Wang H, Ding Y, Scheithauer E C, Goudouri O-M, Grünwald A, Detsch R, Agarwal S and Boccaccini A R 2015 Antibacterial 45S5 Bioglass-based scaffolds reinforced with genipin cross-linked gelatin for bone tissue engineering *J. Mater. Chem. B* **3** 3367–78
- [39] Jones J R 2009 New trends in bioactive scaffolds: the importance of nanostructure *J. Eur. Ceram. Soc.* **29** 1275–81
- [40] Gunatillake P A and Adhikari R 2003 Biodegradable synthetic polymers for tissue engineering *Eur. Cells Mater.* **5** 1–16
- [41] Chen C, Li H, Pan J, Yan Z, Yao Z, Fan W and Guo C 2015 Biodegradable composite scaffolds of bioactive glass/chitosan/carboxymethyl cellulose for hemostatic and bone regeneration *Biotechnol. Lett.* **37** 457–65
- [42] Zhu H, Liu N, Feng X and Chen J 2012 Fabrication and characterization of silk fibroin/bioactive glass composite films *Mat. Sci. Eng. C* **32** 822–9
- [43] Goudouri O M, Theodosoglou E, Kontonasaki E, Will J, Chrissafis K, Koidis P, Paraskevopoulos K M and Boccaccini A R 2014 Development of highly porous scaffolds based on bioactive silicates for dental tissue engineering *Mat. Res. Bull.* **49** 399–404
- [44] Sarker B, Hum J, Nazhat S N and Boccaccini A R 2015 Combining collagen and bioactive glasses for bone tissue engineering: a review *Adv. Healthcare Mater.* **4** 176–94
- [45] Freudenberg U, Behrens S H, Welzel P B, Müller M, Grimmer M, Salchert K, Taeger T, Schmidt K, Pompe W and Werner C 2007 Electrostatic interactions modulate the conformation of collagen I *Biophys. J.* **92** 2108–19
- [46] Muyonga J H, Cole C G B and Duodu K G 2004 Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopic study of acid soluble collagen and gelatin from skins and bones of young and adult Nile perch (*Lates niloticus*) *Food Chem.* **86** 325–32
- [47] Ramshaw J A M, Werkmeister J A and Glattauer V 1995 Collagen-based biomaterials *Biotechnol. Genet. Eng. Rev.* **13** 335–82
- [48] Wang Y, Azaïs T, Robin M, Vallée A, Catania C, Legriel P, Pehau-Arnaudet G, Babonneau F, Giraud-Guille M-M and Nassif N 2012 The predominant role of collagen in the nucleation, growth, structure and orientation of bone apatite *Nat. Mat.* **11** 724–33
- [49] Ye B, Luo X, Li Z, Zhuang C, Li L, Lu L, Ding S, Tian J and Zhou C 2016 Rapid biomimetic mineralization of collagen fibrils and combining with human umbilical cord mesenchymal stem cells for bone defects healing *Mat. Sci. Eng. C* **68** 43–51
- [50] Delgado L M, Bayon Y, Pandit A and Zeugolis D I 2015 To cross-link or not to cross-link? Cross-linking associated foreign body response of collagen-based devices *Tissue Eng. B* **21** 298–313