

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE FARMACIA



TESIS DOCTORAL

**Vidrios mesoporosos bioactivos para el tratamiento de
patologías óseas**

**Mesoporous bioactive glasses for the treatment of bone
pathologies**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

M^a Natividad Gómez Cerezo

Director

Daniel Arcos Navarrete

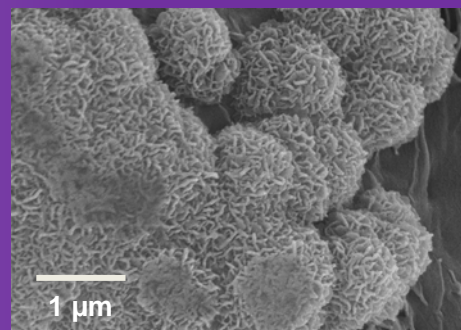
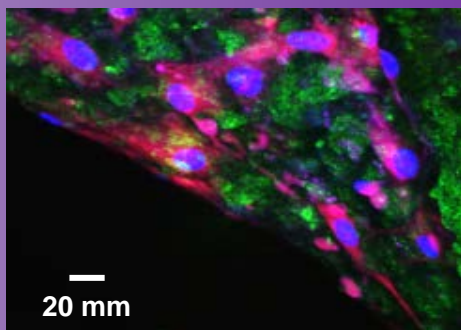
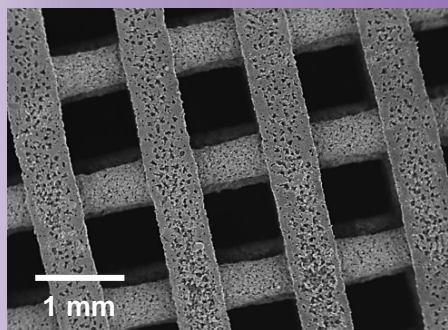
Madrid 2019



Universidad Complutense de Madrid
Dpto. de Química en Ciencias Farmacéuticas
Facultad de Farmacia

VIDRIOS MESOPOROSOS BIOACTIVOS PARA EL TRATAMIENTO DE PATOLOGÍAS ÓSEAS

*Mesoporous bioactive glasses for the treatment of
bone pathologies*



M^a Natividad Gómez Cerezo

Memoria para optar al grado de Doctor por la UCM
Madrid, 2018
Director: Daniel Arcos Navarrete

Departamento de Química en Ciencias Farmacéuticas

Facultad de Farmacia



**UNIVERSIDAD
COMPLUTENSE
MADRID**

**Vidrios mesoporosos bioactivos para el
tratamiento de patologías óseas**

Memoria presentada por

M^a Natividad Gómez Cerezo

Director

Dr. Daniel Arcos Navarrete

Para optar al Grado de Doctor con mención Internacional por la

Universidad Complutense de Madrid

Agradecimientos

“La ciencia moderna aún no ha producido un medicamento tranquilizador tan eficaz como lo son unas pocas palabras bondadosas. “

-Sigmund Freud.

Agradecimientos

No tengo palabras para agradecer el enriquecimiento no solo científico, sino también personal que ha supuesto en mi vida la realización de esta tesis doctoral.

Hace más de 4 años el profesor Daniel Arcos llamaba a mi casa para ofrecerme embarcarme en esta aventura, y no puedo estar más agradecida de que lo hiciera. Primeramente me gustaría dar las gracias a la profesora María Vallet Regí por permitirme trabajar en este grupo de investigación. De corazón, gracias Marita.

Por supuesto, gracias al profesor Daniel Arcos, por permitirme empezar esta aventura, su paciencia conmigo y enseñarme y ayudarme siempre que ha podido, especialmente estos meses de escritura. Sin su ayuda esta tesis sería muy diferente, muchas gracias Dani.

Gracias al Ministerio de Economía y Competitividad por la concesión de un contrato de formación de doctores que me ha dado la oportunidad de realizar esta tesis doctoral.

Durante estos años he conocido a un volumen de gente que de verdad me resulta difícil de manejar. Me gustaría dar las gracias a todas las personas que están en el laboratorio y que de una forma u otra me ha echado una mano en estos años. Gracias a Montse, Isabel, Antonio, Alejandro, Rafa, Miguel, África, María Teresa... Gracias a Jesús, Vicky y Juan por su cariño, ayuda en todo lo que les he pedido y sacarme tantas sonrisas durante estos años. Gracias a Fer por su ayuda no solo científica sino también por sus consejos y su permanente amabilidad. A Jose y Pili por su ayuda constante y su completa disponibilidad a echarme una mano siempre. Especialmente, gracias al director del departamento Juan Carlos, por todas las divertidas historias que me ha contado estos años y las múltiples mejoras que ha hecho en el departamento estos años.

Gracias a todas las personas que han pasado por el laboratorio aunque ahora no están por aquí, todas han dejado una huella en mi vida y me siento afortunada de haberos conocido Ángel, Okan, Anahí, Valentina, Matteo, Rebe (amigas de los vidrios)... También me gustaría dar las gracias a las personas con las que he compartido esta última etapa de la tesis y con las que he pasado buenísimos momentos: Víctor (nos cantamos una marsellesa) David, Anna, Adri, Clara, Javi, Elena (gracias por hacerme reír tantísimo), Naiara...

Quizás las tres personas que más horas han pasado conmigo estos últimos cuatro años han sido Dani, Ana y Sandra, gracias por hacer de psicólogos, por escucharme, por quererme, y por valorar mi tremenda adorabilidad. Gracias a Dani tener tanta paciencia y haberme explicado cada cosa que le he preguntado sobre las células, a Sandra por tantos momentos de risas y tantas charlas con o sin té de por medio. Finalmente gracias a Ana, por ser una de las mejores personas que he conocido en mi vida, por cuidarme, por escucharme, porque ha hecho de sicóloga y amiga cada día de la tesis y por compartir tantas cosas conmigo.

Una de las mejores cosas que me ha traído esta tesis doctoral es el hecho de haber conocido a gente, a los que ya solo puedo considerar amigos. Gracias también a Marina por cuidarme cuando lo he necesitado y por hacerme sentir una más de este laboratorio desde el minuto uno. A Marta por su forma de ser, por lo divertida que es y por haberse preocupado todo el tiempo por como lo llevaba. A Edu por tantos momentos de todos los colores, horas de charla, momentos de risas y por todo lo que he aprendido de ti. Sergio, gracias por tu sentido del humor, tu sensatez y tu apoyo durante este tiempo.

Gracias a Juan Luis por enseñarme tanto, por su pasión científica contagiosa y por ser una persona inolvidable. A Patito por su sonrisa contagiosa, su energía, su cariño y por haberme cuidado tantísimo (ah y por las meriendas). A Gonzalo por todo lo que me has enseñado, por tantas conversaciones sobre cualquier cosa, porque eres un científico maravilloso y por todo lo que me has cuidado.

Gracias a Iciar y Rocío, porque no me podía esperar que cuando os conocí empezaseis a formar parte de mi vida como mis amigas, ahora no me imagino ningún viaje o plan divertido sin vosotras, conoceros ha sido una de las cosas más importantes que me ha pasado estos últimos años y me alegra pensar en todo lo que nos queda por vivir juntas. Rocío gracias por haberme acompañado durante esta aventura, por tus palabras de ánimo y por haberme dado valentía y ver lo mejor en mí incluso cuando a mí me costaba.

Especialmente me gustaría dar las gracias a Miguel por tantas horas en el metro, por los paseos hasta casa, porque me has perseguido hasta mi barrio, por todo lo que me has hecho reír. Tu amistad es uno de los regalos más valiosos que me ha dado esta tesis, espero de corazón que consigas todo lo que te propongas, porque tu capacidad de trabajo y vocación científica son una gran inspiración para cualquiera.

No puedo olvidarme de las personas a las que he conocido gracias a las colaboraciones y estancias doctorales que he realizado que han ayudado a que esta tesis sea lo que es hoy en día.

Me gustaría empezar dando las gracias al profesor Ramón Martínez Mañez por acogerme en el grupo idm en la Universidad Politécnica de Valencia. El mes y poco que estuve allí cambio mi perspectiva respecto al tipo de científica que quiero ser. Estoy profundamente agradecida a todas las personas que me acogieron y que hicieron que mi tiempo allí fuera inolvidable. Especialmente me gustaría dar las gracias a Lorena por todos los momentos que hemos pasado juntas desde que nos conocemos, con la ilusión de pensar que quedan muchos más.

Merci beaucoup a le professeur Jean-Michel Bouler pour s'aide pendant mon stage a Nantes. On plus, je devrais remercier a Sophie, Bruno et Elise. Además quiero dar las gracias a Vero y Regis por cuidarme y acogerme en casa como si fuera una más (y a gina :P). Gracias a Dimitri y Dani por su ayuda y buen humor, sin vosotros esta experiencia no habría sido lo mismo. Et, gracias señorita Yefa, je t'adore, tu me manques trop, t'adie pendant J'etais dans le CEISAM c'est incroyable pour moi.

I would like to thank Professor Hutmacher for the opportunity to have spent six months in the group of Regenerative Medicine group at IHBI. My time in Australia changed my mind and improved my scientific life. I want to mention my supervisor Cedryck Vaquette, thank you for your help and support. I can not be more grateful with all the people (Julia, Pawel, Reuben, Elena, Chen, Josephine, Amelia, Greeshma, Jahayanti and specially to Margaux (koala bebé, I know I have a friend forever)...) I met in Brisbane, thank you guys I am missing you every day, my time in Australia has been much worse without your jokes, laughter, love, parties... Gracias a Joanna y a Álvaro por tantas risas, y tantos momentos que el calimocho hizo más divertidos. También me gustaría agradecer a mi familia colombiana en la otra punta del mundo por tratarme como a una más, por las risas, viajes, convivencia, fiestas gracias Juancho, Ale, David, Omairita y Jason.

Aunque durante este último año haya estado un poco más desconectada del Centro Juvenil, me gustaría dar las gracias a todas las personas con las que he coincidido estos últimos años por su apoyo y cariño, comprender mis ausencias y haberme ayudado a grabar a fuego en mi mente y mi corazón que tanto allí, como en todas partes *lo*

importante somos las personas. Me gustaría hacer una mención especial a los grupos a los que he dedicado más tiempo estos años, gracias por vuestro apoyo, por preguntarme tantas veces que cuando acababa y por hacerme prometer que ya no me iba a ir más veces de Madrid.

Gracias a todos y cada uno de mis amigos, a los que estáis cerca y los que por otros motivos estáis un poco más lejos. Gracias a Pablo por tantos momentos de compartir cosas y por tu risa contagiosa, empezamos en el ICP juntos y me alegro de que me hayas seguido apoyando durante este tiempo. Gracias a Lidia, Pelao, Jorge, Nerea, Rosa, Poncho... por escucharme cuando lo he necesitado. Gracias a mis químicos y bioquímica favoritos por vuestro apoyo y comprensión todo este tiempo. Especialmente me gustaría dar las gracias a David por su apoyo y cariño, haberse preocupado de mí durante toda la tesis y haber intentado entender de qué iba. A Vivi porque como en todas las etapas de mi vida, sin ella habría estado medio coja y un poco manca, sé que continuaré compartiendo etapas contigo y no sabes la tranquilidad vital que me da eso.

Si hay alguien que ha soportado la peor cara de esta tesis, ese es Javi. Cada día que me levanto por la mañana me siento afortunada de haberte conocido y de que estés en mi vida. Gracias por tu paciencia, por tu perseverancia y por tu buen humor, creo que este año nos ha enseñado mucho. También me gustaría agradecer a Dani, Lara, Martinita, Bea y Jaume su cariño y comprensión durante esta tesis doctoral, gracias por todas las sonrisas que me habéis sacado estos meses. Por supuesto también me gustaría dar las gracias a Adela y Gerardo por preocuparos por mí y cuidarme tanto sois una familia estupenda y me siento afortunada de formar parte de ella.

Me gustaría agradecer a mis hermanos, Diego e Isabel, todo su apoyo en este tiempo, toda su comprensión, porque son mis compañeros de vida y porque son las personas a las que más quiero en este mundo.

Por supuesto esta tesis va en parte dedicada a mis abuelos, porque sin entender nada de lo que hago me han dado su apoyo todo el rato, abuelo, sé que me has acompañado todo el tiempo aunque no estés físicamente, siempre te llevo conmigo. Si hay una persona a la que quiero y admiro en este mundo es a mi abuela, gracias por ser tan perseverante y tan fuerte, cada día me demuestras que no hay nada con lo que no pueda, como siempre me dices, esta tesis ha sido peor de pensar que de pasar, muchas gracias abuelita.

No sería la persona que soy hoy en día si no fuese gracias a mis padres Casildo y Nati. Ellos me han inculcado el amor por la ciencia, pero también me han enseñado que hay que cuidar tu vocación y que hay que poner el alma en lo que haces. A parte de ser seguramente los mejores profesores que existen en este mundo, su hambre de aprender y de no parar de conocer cosas nuevas ha sido una fuente de inspiración para mí cada día que ha durado el doctorado. Gracias por haberme apoyado siempre y por haberme ayudado a convertirme en la persona que soy hoy, os quiero y admiro mucho más de lo que pueda expresar por escrito.

Espero no haberme dejado a nadie, gracias, a cada una de las personas que ha pasado por mi vida durante este tiempo, por los buenos momentos vividos, por sus palabras de ánimo y por comprenderme en los momentos más complicados.

A mis padres

Índice

Resumen / Summary	1
1. Introducción general	9
1.1 Biocerámicas y sus aplicaciones en el tratamiento de defectos óseos.....	10
1.2 Vidrios mesoporosos bioactivos (MBGs) en terapias regenerativas del tejido óseo..	15
1.2.1 Desde la sílice mesoporosa a los MBGs.....	16
1.2.2 Síntesis de materiales de sílice mesoporosa	16
1.2.3 Preparación de vidrios mesoporosos bioactivos	19
1.2.4 Funcionalización de materiales de sílice mesoporosa	21
1.3 MBGs como sistemas de liberación de fármacos frente a patologías óseas.....	24
1.3.1 Infección ósea	24
1.3.2 Tumores óseos	25
1.3.3 Osteoporosis	25
1.4 MBGs y regeneración de defectos óseos con andamios tridimensionales	26
1.4.1 Propiedades de los andamios 3D y respuesta celular	28
1.4.2 Diseño y preparación de andamios tridimensionales por <i>robocasting</i>	30
1.4.3 Andamios tridimensionales como sistemas de liberación de fármacos.....	35
2. Objetivos / Objectives	49
3. Resultados y Discusión.....	54
3.1 Optimización de la respuesta celular a través del control de la estructura porosa y la composición química de MBGs	55
3.1.1 Introducción y antecedentes	56
3.1.2 Estudios de biocompatibilidad y respuesta celular <i>in vitro</i> de MBGs en el sistema SiO ₂ -CaO-P ₂ O ₅ a través del control de su estructura mesoporosa	68
Artículo 1: <i>Tailoring the Biological Response of Mesoporous Bioactive Materials</i>	73
3.1.3 Estudio de la influencia de la composición química de MBGs en el sistema SiO ₂ -CaO-P ₂ O ₅	83
3.1.4 Estudio de los efectos del MBG 75S-F127 sobre osteoblastos, osteoclastos y macrófagos.....	87

Artículo 2: <i>Effects of mesoporous bioactive glass MBG-75S on osteoblasts, osteoclasts and macrophages</i>	89
3.1.5 Incorporación de dopantes catiónicos en MBGs SiO ₂ -CaO-P ₂ O ₅ para el tratamiento de la osteoporosis	101
Artículo 3: <i>Novel ion-doped mesoporous glasses for bone tissue engineering: Study of their structural characteristics influenced by the presence of phosphorous oxide</i>	106
Artículo 4: <i>The response of osteoblasts and osteoclasts to gallium containing mesoporous bioactive glasses</i>	114
3.2 Preparación de MBGs como sistemas de liberación de fármacos frente a patologías óseas	168
3.2.1 Introducción y antecedentes	169
3.2.2 Síntesis de las compuertas moleculares	173
3.2.3 Sistema estímulo-respuesta sensible a fosfatasa alcalina	182
3.2.4 Sistema estímulo-respuesta sensible a proteasas	194
3.2.5 Discusión	201
3.2.6 Conclusiones.....	203
3.3 Diseño y preparación de andamios macroporosos tridimensionales.....	210
3.3.1 Introducción y antecedentes	211
3.3.2 Preparación de andamios tridimensionales de MBG-ε-Policaprolactona (ε-PCL)	213
Artículo 5: <i>In vitro colonization of stratified bioactive scaffolds by pre-osteoblast cells</i>	216
3.3.3 Estudios <i>in vivo</i>	235
4. Conclusiones / Conclusions.....	248
Anexo I. Técnicas de caracterización.....	255
Anexo II. Artículos producidos durante la tesis doctoral	264

Resumen

La presente tesis doctoral tiene como objetivo la obtención de vidrios mesoporosos bioactivos (MBGs) para ser utilizados en el tratamiento de defectos óseos asociados a patologías del tejido óseo. La motivación de este trabajo surge de la demanda de terapias regenerativas para el tratamiento de defectos óseos derivados de enfermedades como la osteoporosis, la infección o el cáncer. Generalmente la mayoría de los implantes óseos poseen una vida útil limitada y se implantan con fines sustitutivos. En la actualidad, relacionado en gran medida con el envejecimiento de la población, ha surgido la necesidad de diseñar materiales que favorezcan la regeneración ósea frente a los diseñados para su sustitución. En este sentido las biocerámicas *bioactivas de tercera generación*, en las que se engloban los MBGs presentan propiedades que favorecen la regeneración de defectos en el hueso promoviendo la restauración y reparación de los mismos. En la presente tesis hemos abordado este objetivo siguiendo tres estrategias:

1. Optimización de las propiedades químicas y de la estructura porosa para determinar las composiciones químicas y propiedades texturales más adecuadas para los fines propuestos.
2. Obtención de MBGs con capacidad regenerativa para tratamiento o prevención secundaria de tumores óseos e infecciones en el hueso.
3. Obtención de andamios macroporosos de MBGs para regeneración de hueso en pacientes osteoporóticos.

Los MBGs se han preparado en el sistema $\text{SiO}_2\text{-CaO-P}_2\text{O}_5$ por el método de autoensamblaje inducido por evaporación (EISA). Este método se basa en la incorporación de un agente director de estructura (SDA) durante la síntesis por el método sol-gel y permite la incorporación de componentes no silíceos en las estructuras mesoporosas. Se ha obtenido un conjunto de MBGs a partir del uso de diferentes SDA no iónicos dentro de la misma composición química, lo que ha dado lugar un conjunto de materiales con diferentes estructuras y propiedades texturales. Los MBGs con tamaños de mesoporo menores favorecen el intercambio iónico con el medio, siendo más bioactivos y presentando un mejor comportamiento *in vitro* con células preosteoblásticas.

Tras estudiar la influencia de las propiedades texturales en el comportamiento *in vitro*, se han obtenido materiales con diferentes composiciones químicas dentro del sistema $\text{SiO}_2\text{-CaO-P}_2\text{O}_5$ con el fin de conocer el efecto de la composición sobre su comportamiento frente a células óseas. Tras la caracterización físico-química y la evaluación de su bioactividad *in vitro* pudimos concluir que los MBGs de composición $75\text{SiO}_2\text{-}20\text{CaO}\text{-}5\text{P}_2\text{O}_5$ (% mol) (MBG-75S) obtenidos con F127 como SDA presentaban las mejores propiedades bioactivas. Como consecuencia de su elevada superficie específica, estructura y contenido en calcio se produce un rápido intercambio iónico (principalmente especies solubles de calcio y silice) entre MBGs y el medio circundante, lo que da lugar a la rápida formación de una fase tipo carbonato apatita nanocrystalina, muy similar al componente mineral del hueso. Por ello, este material ha sido elegido para evaluar su respuesta *in vitro* en contacto con células de tipo osteoblasto, osteoclasto y macrófagos. Los resultados obtenidos mostraron que MBG-75S presenta elevada biocompatibilidad *in vitro*. MBG-75S redujo la actividad de los osteoclastos, pero no inhibió la osteoclastogénesis, lo que evitaría situaciones de hueso adinámico al ser implantados. Finalmente se ha demostrado que MBG-75S no favorece la diferenciación de los macrófagos a fenotipo pro-inflamatorio M1, lo que sería indicativo de que los materiales no producirían una respuesta inflamatoria prolongada en el tiempo al ser implantados *in vivo*. Estos resultados hacen de MBG-75S un candidato interesante como injerto óseo en pacientes osteoporóticos.

Estudios previos han demostrado que la incorporación de determinados iones con actividad terapéutica a la estructura de los MBGs permite ampliar su campo de aplicación. Sin embargo la incorporación de estos iones puede afectar a la estructura y propiedades en los MBGs. Por ello, hemos estudiado la influencia de la incorporación de iones como Cu^{2+} , Sr^{2+} o Co^{2+} en las propiedades estructurales de los MBGs. Los estudios por RMN han permitido determinar que la presencia de P_2O_5 juega un papel importante en la estructura de los MBGs. El P_2O_5 interacciona con estos iones, que actúan como deformadores de red, formando ortofosfatos, favoreciendo de este modo la formación de estructuras mesoporosas mejor ordenadas.

Se han preparado MBGs en el sistema $\text{SiO}_2\text{-CaO-P}_2\text{O}_5$ sustituidos con Ga (III) para dotar a estos materiales con actividad antiosteoporótica. Para evitar que la estructura del material se vea afectada al introducir galio se ha seguido una estrategia de incorporación mediante impregnación post-síntesis. La incorporación se llevó a cabo mediante la

disolución de $\text{Ga}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4.5\text{H}_2\text{O}$ en medio alcalino, en contacto con MBGs de dos composiciones diferentes dentro del sistema $\text{SiO}_2\text{-CaO-P}_2\text{O}_5$. Los estudios de RMN han demostrado que el galio se incorpora a los materiales siguiendo dos mecanismos: (I) intercambio iónico con el calcio de los materiales y (II) incorporación como formador de red en forma de $[\text{GaO}_4]$. La presencia de galio no afecta a la capacidad de formación de la fase tipo apatita en la superficie de los mismos en contacto con fluido corporal simulado, indicando que los MBGs-Ga conservan el comportamiento bioactivo de estos materiales. El galio no afectó a la proliferación celular, sin embargo los estudios *in vitro* con macrófagos y factores de diferenciación demostraron el efecto sobre la osteoclastogénesis, lo que postula a los MBGs $\text{SiO}_2\text{-CaO-P}_2\text{O}_5\text{-Ga}_2\text{O}_3$ como materiales muy interesantes para la regeneración en pacientes osteoporóticos.

Con el objetivo de obtener sistemas para el tratamiento y prevención secundaria de osteosarcoma e infección ósea se ha modificado la superficie de los MBGs para desarrollar sistemas estímulo-respuesta sensibles a enzimas. Estos sistemas pueden retener fármacos en su interior que se liberan al elevarse la concentración de enzimas asociadas a osteosarcoma (caso de fosfatasa alcalina) y a la infección (caso de proteasas). El tamaño de poro y el contenido en calcio resultan factores determinantes para su uso como matrices liberadoras de fármacos de los MBGs. Nuestros estudios demuestran que el tamaño debe ser relativamente pequeño para que pueda ser tapado por el agente funcionalizante, el cual actúa a modo de compuerta, y que el contenido en calcio no debe ser demasiado alto puesto que los MBGs se disuelven rápidamente liberando la carga de forma prematura.

El sistema sensible a fosfatasa alcalina ha permitido la liberación controlada de doxorubicina, disminuyendo significativamente la viabilidad de células de osteosarcoma humano en condiciones *in vitro*. La presencia de los grupos fosfato en esta compuerta atrapa el calcio y ralentiza la bioactividad de estos sistemas, la cual se recupera en presencia del estímulo cuando se produce la rotura de la compuerta. Por su parte, el sistema sensible a enzimas proteasas producidas por bacterias ha permitido la liberación de levofloxacino de forma controlada, inhibiendo la formación de unidades formadoras de colonias de *E. Coli*. La compuerta molecular sensible a proteasas no afecta a la bioactividad de los MBGs.

Se han preparado andamios macroporosos por un método aditivo de prototipado rápido como es la técnica de *robocasting*. Estos andamios se prepararon con ϵ -policaprolactona (PCL) para formar composites MBG-PCL. Se evaluó la capacidad del MBG para estimular la migración de osteoblastos hacia el interior de los andamios. Para ello se diseñó un experimento que consistió en el estudio de la proliferación y colonización celular en andamios dispuestos en forma de estratos. Las células fueron sembradas en el estrato inferior, observándose que la migración celular desde el andamio de siembra hacia los estratos superiores era significativamente mayor en los andamios que contienen MBG. Este hecho se pudo explicar en términos del comportamiento bioactivo del MBG, de la liberación al medio de especies solubles de calcio y sílice y de la arquitectura del andamio, que favorece la migración celular a través de los puntos de contacto entre las paredes que lo forman.

Los estudios *in vivo* se han llevado a cabo en un modelo ovino que simula las condiciones de osteoporosis en humanos. Estos estudios han demostrado el excelente comportamiento de los andamios MBG-PCL. Su implantación en un defecto cavitario estimula la formación de nuevo tejido óseo en su interior por lo que este sistema se postula como un interesante candidato para la regeneración de defectos óseos en pacientes con osteoporosis. Con el objetivo de evaluar los efectos que la liberación local de un inhibidor osteoclastico tendría en la regeneración ósea, en condiciones de osteoporosis, se incorporó ácido zoledrónico en la matriz polimérica de estos andamios. El resultado fue la pérdida para estimular la formación de nuevo hueso, la formación de tejido fibroso y la estimulación de la respuesta inflamatoria alrededor del implante.

El conjunto de resultados recogidos en esta tesis doctoral ponen de manifiesto el interés de los MBGs como biocerámicas para regeneración ósea de defectos derivados de patologías como cáncer, infección y osteoporosis.

Summary

The objective of this thesis has been to obtain mesoporous bioactive glasses (MBG) to be used in the treatment of pathologies associated with bone tissue. The motivation for this work arises by the demand for regenerative therapies for the treatment of bone defects derived from diseases such as osteoporosis, infection or cancer. Most bone implants generally have a limited lifespan and are implanted for replacement purposes. Currently, due to the ageing of the population, the need has arisen to design materials that favour bone regeneration as opposed to bone replacement. In this sense, the third generation bioactive bioceramics including MBGs have properties that favor the regeneration of defects in the bone, promoting their restoration and repair. This objective has been addressed through three strategies:

1. Optimization of chemical properties and porous structure to determine the most suitable chemical compositions and textural properties for the proposed purposes.
2. Obtaining regenerative MBGs for secondary treatment or prevention of bone tumors and bone infections.
3. Obtaining macroporous scaffolding of MBG for bone regeneration in osteoporotic patients.

The MBGs have been prepared in the $\text{SiO}_2\text{-CaO-P}_2\text{O}_5$ system by the method of self-assembly induced by evaporation (EISA). This method is based on the incorporation of a structure director agent (SDA) during the synthesis by the sol-gel method and allows the incorporation of non-siliceous components in the mesoporous structures. A set of MBGs has been obtained from the use of different non-ionic SDA within the same chemical composition resulting in materials with varying structural and textural properties. The MBGs with smaller mesopore sizes favor ion exchange with the medium, being more bioactive and presenting better *in vitro* behavior interactions with preosteoblastic cells.

After studying the influence of textural properties on *in vitro* behaviour, materials with different chemical compositions have been obtained within the $\text{SiO}_2\text{-CaO-P}_2\text{O}_5$ system in order to know the effect of the composition on its behaviour against bone cells. After the physical-chemical characterization and evaluation of its bioactivity *in vitro*, we were able to conclude that the MBGs with a composition of $75\text{SiO}_2\text{-}20\text{CaO-}5\text{P}_2\text{O}_5$ (% mol)

(MBG-75S) obtained with F127 as SDA had the best bioactive properties. Due to its high specific surface area, structure and calcium content, there is a rapid ion exchange (mainly soluble calcium and silica species) between MBGs and the surrounding media resulting in rapid formation of a nanocrystalline carbonated-apatite very similar to the mineral component of bones. Therefore, this material has been chosen to evaluate the *in vitro* response of the material in contact with osteoblast, osteoclast and macrophage cells. The results obtained showed high *in vitro* biocompatibility. MBG-75S reduced the activity of osteoclasts, but without inhibiting osteoclastogenesis, which would prevent adynamic bone situations when implanted. Finally, it has been shown that MBG-75S does not favor the differentiation of macrophages to pro-inflammatory phenotype M1, which would indicate that the materials would not produce a prolonged inflammatory response in time when implanted *in vivo*. These results make MBG-75S an interesting candidate for bone grafting in osteoporotic patients.

Previous studies have shown that the incorporation of certain ions known with therapeutic activity into the structure of the MBGs allows expanding MBGs clinical properties. However, the incorporation of these ions can affect the structure and properties of MBG. Therefore, we have studied the influence of the incorporation of ions such as Cu^{2+} , Sr^{2+} or Co^{2+} on the structural properties of MBGs. NMR studies have determined that the presence of P_2O_5 plays an important role in the structure of doped MBGs. P_2O_5 interacts with these ions that act as network deformers in the form of orthophosphates, thus favoring the formation of mesoporous more order structures.

MBGs have been prepared in the $\text{SiO}_2\text{-CaO-P}_2\text{O}_5$ system with Ga (III) to provide these materials with antiosteoporotic activity. To prevent the structure of the material from being affected by the introduction of gallium into the composition of the MBG, a post-synthesis impregnation strategy has been followed. The incorporation was carried out by dissolving $\text{Ga}(\text{NO}_3)_3 \cdot 4.5\text{H}_2\text{O}$ in alkaline medium, in contact with MBG of two different compositions within the $\text{SiO}_2\text{-CaO-P}_2\text{O}_5$ system. NMR studies have shown that gallium is incorporated into materials by two mechanisms: (I) one side ion exchange with the calcium in the materials and (II) incorporation as a network former in the form of $[\text{GaO}_4]$. The presence of gallium does not affect the ability to form an apatite-type phase on the surface of the MBGs in contact with simulated body fluid, indicating that the MBGs-Ga preserve the bioactive behavior of these mesoporous materials. Gallium did not affect cell proliferation, however, *in vitro* studies with

macrophages and differentiation factors demonstrated the effect on osteoclastogenesis, which postulates $\text{SiO}_2\text{-CaO-P}_2\text{O}_5\text{-Ga}_2\text{O}_3$ MBG as very interesting materials for regeneration in osteoporotic patients.

In order to obtain systems for secondary treatment and prevention of osteosarcoma and bone infection, the surface of the MBGs has been modified to develop enzyme-sensitive stimuli-response systems. These systems can retain drugs inside them, which are released when the concentration of enzymes associated with osteosarcoma (alkaline phosphatase) and bone infection (protease) increases. The pore size and chemical calcium content are determining factors for their use as drug container matrices of MBGs. Our studies show that the size must be relatively small so that it can be blocked by the functionalizing agent, which acts as a molecular gate and that the calcium content should not be too high since the MBGs dissolve quickly, releasing the load prematurely.

The alkaline phosphatase sensitive system has allowed the controlled release of doxorubicin, significantly decreasing the viability of human osteosarcoma cells under *in vitro* conditions. The presence of the phosphate groups in this gate traps calcium and slows down the bioactivity of these systems, which is recovered in the presence of stimulus when the gate is broken. On the other hand, the system sensitive to protease enzymes produced by bacteria has allowed the release of levofloxacin in a controlled way inhibiting the formation of *E. Coli* colony forming units. The protease sensitive molecular gate does not affect the bioactivity of the MBGs.

Macroporous scaffolds have been designed using an additive method of rapid prototyping such as the robocasting technique. These scaffolds were prepared with ϵ -polycaprolactone (PCL) to form MBG-PCL composites. The ability of the MBG to stimulate osteoblasts migration to the inside of the scaffolds was evaluated. For this purpose, an experiment was designed that consisted of the study of cell proliferation and colonization in scaffolds arranged in the form of strata. The cells were seeded in the lower stratum, and it was observed that cell migration from the seeding scaffold to the upper strata was significantly higher in scaffolds containing MBG. This fact could be explained in terms of the bioactive behaviour of the MBG, the release of soluble species of calcium and silica into the environment and the architecture of the scaffold that favours cell migration through the points of contact between the walls that form it.

In vivo studies have been carried out using a sheep model simulating the conditions of osteoporosis in humans. These studies have demonstrated the excellent behavior of MBG-PCL scaffolds. Its implantation in a cavitory defect stimulates the formation of new bone tissue inside it, which is why this system is an interesting candidate for the regeneration of bone defects in patients with osteoporosis. In order to evaluate the effects that the local release of an osteoclastic inhibitor would have on bone regeneration under conditions of osteoporosis, zoledronic acid was incorporated into the polymer matrix of these scaffolds. The result was a decrease in the new bone formation, formation of fibrous tissue and stimulation of the inflammatory response around the implant.

The set of results collected in this doctoral thesis show the interest of MBGs as bioceramics for bone regeneration of defects derived from pathologies such as cancer, infection and osteoporosis.

1. Introducción

“Aprendí muy pronto la diferencia entre
conocer el nombre de algo y saber algo.”

-Richard P. Feynman

1. Introducción general

1.1 Biocerámicas y sus aplicaciones en el tratamiento de defectos óseos

Las biocerámicas son sólidos inorgánicos no metálicos diseñados específicamente para reparar y reconstruir partes del cuerpo enfermas o dañadas, fundamentalmente huesos y dientes [1,2]. Se espera que en el año 2050 haya más de mil millones de personas mayores de 60 años en el mundo [3]. A partir de esa edad muchas de estas personas requerirán de implantes óseos para recuperar la estructura y funcionalidad del esqueleto, el cual sufre una degradación progresiva a partir de los 30 años conduciendo a enfermedades como la artrosis o la osteoporosis. Desafortunadamente, la mayoría de los dispositivos ortopédicos como placas, clavos, prótesis articulares etc. necesitan revisiones después ser implantados lo que implica cirugías adicionales para reemplazarlos [4]. La comunidad científica está trabajando para resolver los problemas asociados a estos escenarios, comúnmente relacionados con patologías degenerativas, proponiendo materiales que favorezcan la regeneración tisular frente a los de sustitución utilizados hasta la fecha [5,6]. En este sentido el uso de las biocerámicas en medicina ha protagonizado importantes avances durante los últimos años. Si bien el uso de materiales cerámicos ha acompañado a la humanidad desde hace siglos, su aplicación en biomedicina como biomateriales se reduce a los últimos 40 años, principalmente para reparar y reconstruir defectos en el tejido óseo [7,8].

Muchos materiales cerámicos han demostrado potencial como injertos óseos para rellenar defectos en el tejido, favoreciendo la restauración y reparación del mismo. Algunos de ellos se utilizan en clínica hoy en día ya sea en forma de partículas, piezas, y otros componentes protésicos [9]. También pueden ser utilizados como recubrimientos de otros materiales, como los metales, o formando parte de composites que combinen las características de sus componentes consiguiendo mejores propiedades [10].

El éxito de un material como implante óseo se basa en la respuesta que produzca en el tejido. Esta respuesta requiere de la formación de una interfaz estable con el tejido receptor y una respuesta mecánica apropiada del implante con el tejido a reemplazar. Todos los materiales implantados en tejidos vivos dan lugar a una respuesta biológica de los mismos, por lo que no existen materiales totalmente inertes. Los materiales

implantados deben presentar baja toxicidad para evitar la muerte del tejido circundante y no liberar sustancias al organismo que puedan causar daño sistémico al paciente. La respuesta habitual de los tejidos ante la incorporación de un material a su entorno es la formación de una cápsula fibrosa. La función de la cápsula fibrosa es la de aislar y eliminar un cuerpo extraño del organismo receptor. Este mecanismo de protección puede dar lugar a la encapsulación total del implante y la consecuente rechazo del mismo. Los metales y la mayoría de los polímeros provocan la formación de capsula fibrosa en su superficie mientras que una de las ventajas de los cerámicos es que presentan una toxicidad muy baja y pueden dar lugar a las siguientes respuestas biológicas *in vivo* [11]:

- 1) **Respuesta prácticamente inerte:** el tejido forma una capsula fibrosa no adherente alrededor del implante.
- 2) **Bioactiva:** el tejido forma enlaces con el implante o se regenera de forma natural.
- 3) **Disolución del implante:** cuando la formación de los enlaces con el implante es suficientemente rápida el material se reabsorbe y el tejido reemplaza al implante.

Teniendo en cuenta la respuesta que pueden generar las biocerámicas en el tejido óseo se puede hacer una clasificación de las biocerámicas en tres generaciones [12]. La *primera* de ellas buscaba sustituir tejido dañado con biocerámicas casi-inertes, la *segunda* en reparar defectos en el tejido óseo mediante materiales que produjeran la unión tejido-implante y la *tercera* se centraba en la regeneración del tejido hospedador [9].

Las primeras biocerámicas que se desarrollaron fueron las llamadas *biocerámicas de primera generación*. Estos materiales, entre los que destacan ZrO_2 y $\alpha-AlO_3$, presentan naturaleza prácticamente inerte por lo que únicamente se usan como sustitutos del tejido y no presentan capacidad regenerativa [13]. Su mecanismo de interacción con el tejido vivo se basa en la formación de una capsula fibrosa no adherente, lo que impide que se mueva y favorece su adaptación al defecto. Estas biocerámicas presentan gran resistencia al desgaste y alta estabilidad química por lo que hoy en día continúan utilizándose para la fabricación de cabezas de fémur de prótesis totales de cadera o en cirugía maxilofacial.

Tras el desarrollo de las cerámicas de *primera generación* se observó la necesidad de obtener materiales bioactivos y biodegradables. En esta línea se desarrollaron las *biocerámicas de segunda generación* que tienen la capacidad de integrarse en el tejido sin desarrollar la capsula fibrosa, inflamación o toxicidad y pueden ser clasificadas dos grupos según su comportamiento *in vivo*. Por un lado están las biocerámicas bioactivas y por otro las biocerámicas reabsorbibles. Los materiales bioactivos son aquellos que provocan una respuesta biológica específica en la interfaz del material con el tejido que da como resultado la formación de enlaces entre el material y los tejidos [14]. Dentro de los materiales bioactivos se pueden distinguir dos clases. Los que presentan comportamiento bioactivo de **clase A** se caracterizan por favorecer la **osteointegración** (proceso a través del cual se forman enlaces fuertes y estables entre un material y el hueso), la **osteoconducción** (capacidad de guiar el crecimiento del hueso sobre la superficie de los materiales) y su reabsorción, permitiendo la regeneración del tejido hasta sus condiciones iniciales [15]. Por su parte, los materiales bioactivos de **clase B** son únicamente osteoconductores, por lo que el hueso crecería en torno al implante sin producir la reabsorción del mismo [16,17]. Una característica común de los implantes bioactivos es la formación de una fase hidroxycarbonatoapatita (HCA) en la superficie cuando son implantados. Esta fase es similar, en composición y estructura a la fase mineral que forma el hueso [18,19].

Por su parte los materiales reabsorbibles son aquellos con la capacidad de ser reabsorbidos por el tejido. Las biocerámicas reabsorbibles están diseñadas para degradarse gradualmente al mismo tiempo que el tejido óseo crece en torno a ellas y lo reemplazan. En este sentido resulta esencial el control de su solubilidad, pues si los materiales son muy solubles puede no dar tiempo a que el hueso lo reemplace y si es poco soluble no podría ser reabsorbido. Dentro de este tipo de cerámicas reabsorbibles destacan los cementos de fosfato tricálcico.

Las *biocerámicas de tercera generación* poseen tanto la capacidad de integrarse al tejido óseo como la de ser reabsorbidos por el organismo. Son **osteoinductores**, es decir estimulan a las células mesénquimas a diferenciarse a fenotipos característicos de células preosteoblásticas y osteoblásticas. Estos materiales favorecen la proliferación, diferenciación celulares y la producción de matriz extracelular. La liberación de especies solubles de calcio, fósforo y sílice al medio desde los materiales regulan la

activación de ciertos genes dando lugar a una regeneración de hueso muy rápida [14,20]. Dentro de este tipo de materiales destacan los vidrios bioactivos.

Vidrios bioactivos

En 1971 el profesor L.L. Hench descubrió los vidrios bioactivos obtenidos por el método de fusión y enfriamiento rápido [21]. Los vidrios bioactivos poseen la capacidad de unirse al tejido óseo sin inducir la formación de la capsula fibrosa. Estos primeros vidrios bioactivos se obtuvieron por fusión y enfriamiento rápido de una mezcla de SiO_2 , P_2O_5 , CaO y Na_2O . Los componentes SiO_2 y P_2O_5 actúan como formadores de la red del vidrio mientras que la presencia de CaO y Na_2O es fundamental para reducir la temperatura de fusión de los componentes y para aumentar la reactividad química del vidrio mediante la incorporación de defectos en la red [13]. Este procedimiento permite obtener vidrios bioactivos con contenido en SiO_2 inferiores al 60% en mol. La figura 1 muestra un esquema del papel que juega cada uno de los componentes del sistema SiO_2 - CaO - Na_2O - P_2O_5 desde un punto estructural.

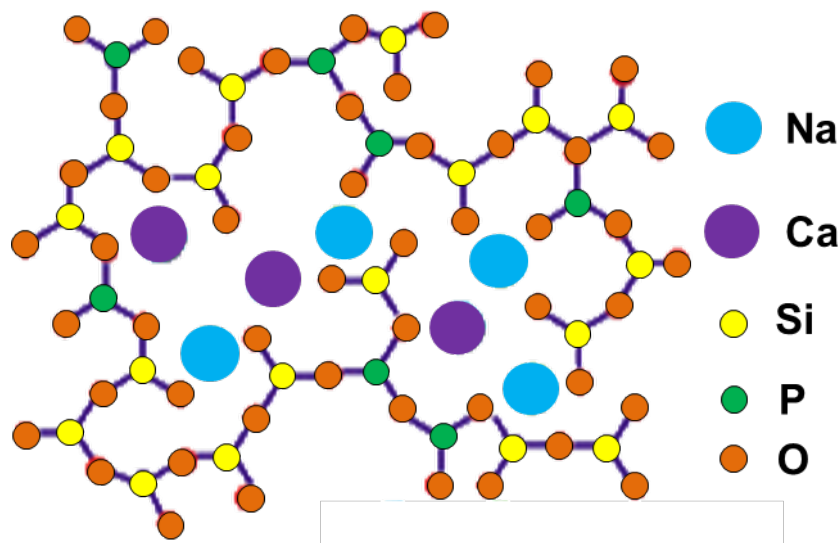


Figura 1. Estructura tipo de un vidrio bioactivo de fusión

El descubrimiento de los vidrios bioactivos puso de manifiesto la capacidad de ciertos materiales basados en SiO_2 para formar enlaces mecánicamente estables y químicamente fuertes al tejido óseo. Compuestos como el Bioglass45S5® se encuentra formando parte en varios productos sanitarios mayormente en reconstrucción maxilofacial (NovaBone®), otorrinolaringología y cirugía periodontal (Perioglass®). Además durante los últimos años se ha desarrollado la tecnología Novamin®, y se

encuentra formando parte de algunas pastas de dientes para favorecer la regeneración de la dentina (Sensodine®) [22]. En esta línea, se han descrito otras biocerámicas vítreas como la bredigita o la akermanita preparadas por sinterización que también han demostrado comportamiento bioactivo [23,24].

La bioactividad de estos materiales requiere de la formación de una fase tipo apatita en la interfaz hueso-implante en contacto con fluidos biológicos. La base de la unión al hueso de los vidrios bioactivos radica en su reactividad química en contacto con fluidos biológicos. Como resultado de estas reacciones se produce la nucleación y formación de una fase carbonato apatita HCA en la superficie del material la cual se uniría fuertemente al hueso. Este proceso consta de una serie de reacciones [25] que se pueden esquematizar en las siguientes etapas[18]:

- 1) Intercambio Ca^{2+} , Na^+ con los H^+ del medio circundante a los materiales
- 2) Cesión de especies solubles de sílice al medio a causa de la rotura de los enlaces Si-O-Si que mantienen la estructura del vidrio para formar Si-OH.
- 3) Condensación de los grupos Si-OH formándose una capa de gel de sílice hidratado en superficie.
- 4) Nucleación de una fase de fosfato amorfo debido al intercambio iónico
- 5) Cristalización de la capa carbonato hidroxiapatita por la incorporación de aniones al medio.

Tras estas etapas en las que se suceden procesos de disolución, precipitación y cristalización de la fase HCA se produce una respuesta biológica en el organismo receptor [26,27]:

- 6) Adsorción de proteínas en la interfaz SiO_2 -HCA
- 7) Respuesta inmune, acción de los macrófagos
- 8) Adhesión celular
- 9) Diferenciación celular
- 10) Formación de nuevo tejido óseo
- 11) Mineralización de la matriz ósea

Las primeras etapas del proceso bioactivo se pueden simular en condiciones *in vitro* a través del uso de soluciones biológicas simuladas. De este forma es posible llevar a cabo experimentos en el laboratorio para evaluar la evolución de la superficie del vidrio

en contacto con esta disolución. Una de las más utilizadas para esta finalidad es el fluido corporal simulado (SBF), publicado por primera vez por el profesor Kokubo [28]. Según este autor, la formación de una fase apatita en superficie cuando el material entra en contacto con el SBF es indicativo de un comportamiento bioactivo en condiciones *in vivo*. De esta forma la evaluación de la bioactividad de biocerámicas en condiciones *in vitro* se convirtió en norma estándar y su aplicación se ha convertido en una herramienta básica en este campo [29].

A principios de los años 90 el desarrollo de la química sol-gel permitió avanzar en el desarrollo de nuevos materiales bioactivos basados en sílice. Este proceso permitió obtener biocerámicas con mejores propiedades de superficie y porosidad que las de los vidrios de fusión. La superficie y porosidad de los vidrios sol-gel mejoraban las propiedades bioactivas, pues favorecían el intercambio iónico con el medio [30]. Los avances en este tipo de materiales han sido muy destacables y han sido recogidas en numerosas publicaciones científicas [31–38]. Sin embargo, mientras los vidrios bioactivos de fusión han pasado a tener aplicaciones médicas, el valor añadido de los vidrios sol-gel no ha sido suficiente para lograr este paso, quizás debido al alto coste que presenta la incorporación de un nuevo material al mercado.

1.2 Vidrios mesoporosos bioactivos (MBGs) en terapias regenerativas del tejido óseo

En el año 2004 el grupo de investigación liderado por el profesor Zhao decidió combinar los avances en la química sol-gel para obtener vidrios multicomponente (utilizados para los vidrios sol-gel) con la química supramolecular de surfactantes que venía utilizándose para la preparación de materiales mesoporosos de SiO_2 [39]. De este modo se obtuvieron vidrios $\text{SiO}_2\text{-CaO-P}_2\text{O}_5$ que presentaban características texturales y bioactivas no observadas anteriormente en ninguna otra biocerámica. Este comportamiento se debe a su estructura multicomponente y a sus elevadas superficies específicas, que permiten un mayor contacto con los fluidos acelerando el intercambio iónico con el medio y por tanto la bioactividad. Este descubrimiento dio lugar a una nueva generación de biocerámicas conocidas en la actualidad como MBGs. Sin embargo, para llegar a este hallazgo fueron necesarios años de investigación que probablemente habían comenzado unos años antes con el descubrimiento de los materiales de sílice mesoporosa.

1.2.1. Desde la sílice mesoporosa a los MBGs

A principios de la década de 1990, investigadores de Mobil Oil Corporation sintetizaron por primera vez materiales de sílice mesoporosa ordenados conocidos como familia MCM (*Mobil Composition of Matter*) [40]. Los materiales MCM son el resultado de incorporar un surfactante, bromuro de hexadeciltrimetilamonio (CTAB), que actúa como agente director de estructura (SDA) durante el proceso de síntesis de SiO₂ a partir de alcoxisilanos. Inicialmente, estos materiales fueron diseñados como sustratos para catálisis heterogénea pues presentan propiedades texturales muy destacables como superficies específicas de alrededor de 1000 m²/g, volúmenes de poro de cerca de 0.5 cm³/g y estructura mesoporosa ordenada con diámetros de poro homogéneos de entre 3 y 10 nm.

En 2001, el grupo de investigación liderado por la profesora Vallet-Regí propuso el uso de MCM-41 como sistema de administración de fármacos, demostrando su capacidad para liberar ibuprofeno de forma controlada [41]. Unos años después, el mismo equipo demostró que los materiales mesoporosos podían liberar alendronato (un potente antiosteoporótico) siguiendo una cinética de orden cero por medio de una funcionalización apropiada de la superficie [42]. Este fue el punto de partida para fabricar diferentes sistemas basados en sílice mesoporosa, entre los que destacan los sistemas estímulo-respuesta para liberación controlada de fármacos [43].

1.2.2. Síntesis de materiales de sílice mesoporosa

La síntesis de los materiales de sílice mesoporosa se basa en el uso de surfactantes que actúan como SDA durante el proceso de condensación de las especies precursoras de SiO₂. Con ellos es posible obtener diferentes estructuras complejas que se forman a partir de moléculas sencillas [44]. Actualmente el mecanismo aceptado para describir la formación de estos materiales es el de cristal líquido cooperativo, que se recoge en la figura 2. Este método consiste en la formación de un cristal líquido formado por la nucleación cooperativa del surfactante y las especies precursoras de la sílice dando lugar a una mesofase cristalina [45].

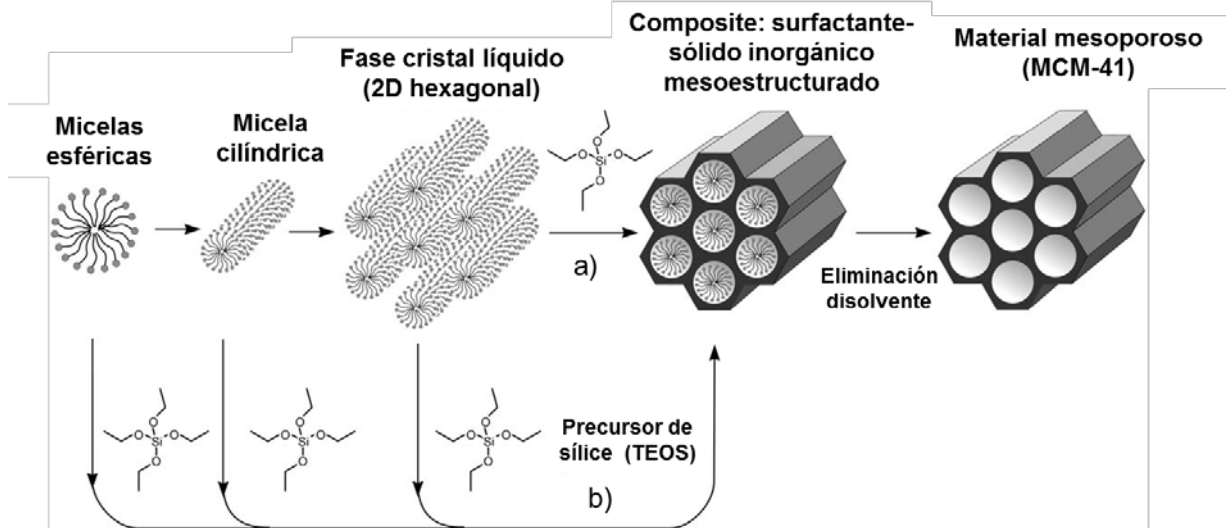


Figura 2. Etapas del mecanismo del cristal líquido cooperativo adaptada de la referencia [46]

Por tanto la síntesis requiere del uso de un precursor de sílice y un surfactante que determina la estructura mesoporosa final. Efectivamente la naturaleza química del surfactante junto a las condiciones de síntesis, como son el pH, la concentración y la temperatura permiten obtener diferentes estructuras porosas, como por ejemplo cúbicas, hexagonales o laminares [47,48].

Un surfactante es una molécula tensoactiva que se caracteriza por tener carácter anfifílico, presentando una zona hidrofílica y una hidrofóbica como muestra la figura 3.

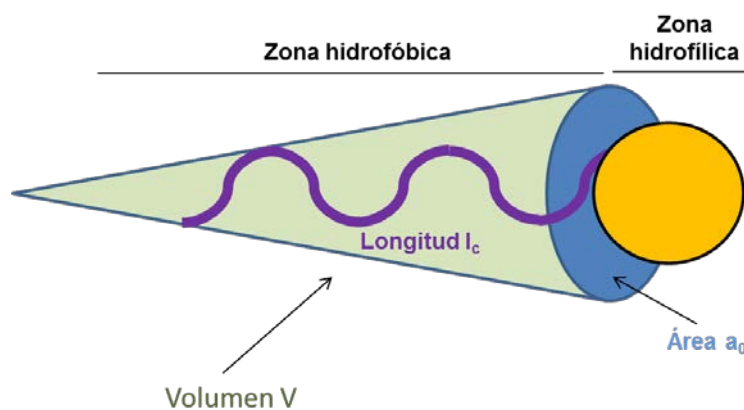


Figura 3. Representación de una molécula de surfactante

Los surfactantes poseen la capacidad de agruparse en disolución a través de interacciones entre sus cadenas apolares y su cabezas polares, dando lugar a diferentes

estructuras cuya curvatura varía con la naturaleza polar/apolar del surfactante y viene definido por su parámetro de empaquetamiento g [49–52].

$$g = \frac{V}{a_0 \cdot L_c}$$

Donde, V = volumen de la cadena hidrofóbica, L =longitud de la cadena a = área de la cabeza polar.

El valor del parámetro g determina la geometría básica del SDA, por lo tanto influye en la forma de las micelas. Valores elevados de g (en torno a 1) dan lugar a estructuras de baja curvatura como bicapas, mientras que valores pequeños de g (1/3) dan lugar a micelas de alta curvatura, generalmente esféricas. Para valores intermedios suelen obtenerse micelas con formas cilíndricas.

La figura 4 muestra los tipos de micela en los que se organiza la materia mediante el mecanismo de cristal líquido cooperativo. Tras el proceso de eliminación del SDA, la morfología de las micelas y su ordenamiento determina la morfología de los poros (esférica, laminar...) así como el tipo de estructura en la que se organiza (hexagonal, cubica, lamelar...). Por ello la elección del SDA es fundamental en el diseño de las propiedades finales del material mesoporoso, sea cual sea su aplicación final.

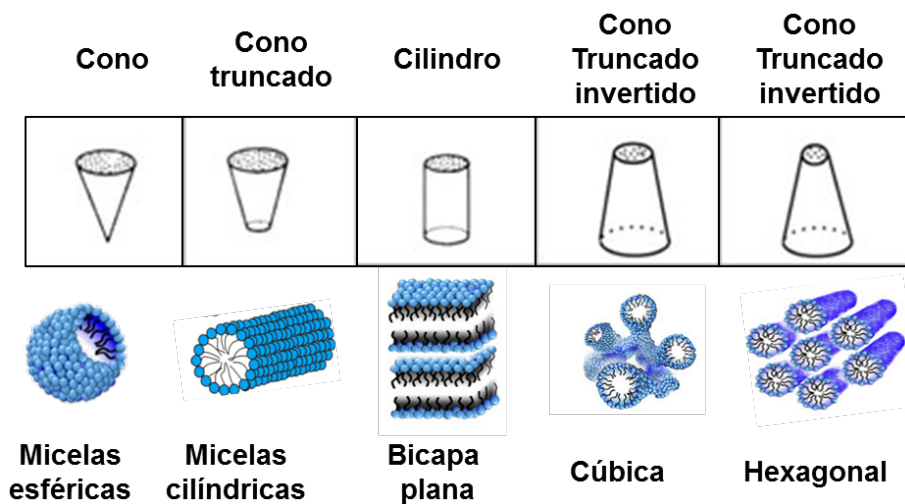


Figura 4. Estructuras de surfactantes y tipos de micelas obtenidas con cada uno de ellos adaptada de la referencia [53].

En la actualidad son muchos los materiales mesoporosos obtenidos por combinación de diferentes SDA y condiciones de síntesis, lo que ha dado lugar a diferentes tipos de estructuras algunas de las cuales se recogen en la tabla 1.

Tabla 1. Materiales mesoporosos de sílice obtenidos con diferentes surfactantes.

Material obtenido	Surfactante	Estructura mesoporosa	Referencia
MCM-41	CTAB	Hexagonal $p6mm$	[40]
MCM-48	CTAB	Cúbica $Im3m$	[54]
SBA-15	P123	Hexagonal $p6mm$	[55]
SBA-16	P123/P85	Cúbica $Im3m$	[47]
HOM-1	Brij58	Cúbica $Im3m$	[56]
HOM-2	Brij97	Hexagonal $p6mm$	[56]

1.2.3. Preparación de vidrios mesoporosos bioactivos

El carácter multicomponente de los vidrios bioactivos dificulta su obtención como materiales con estructuras mesoporosas ordenadas utilizando los métodos de síntesis más habituales (comúnmente el hidrotermal), pues habitualmente contienen en su composición CaO y P₂O₅ además de SiO₂. La obtención de MBGs requiere un método de síntesis más robusto en el sentido de producir estructuras mesoporosas con componentes que podrían afectar al ordenamiento mesoporoso. Durante la síntesis hidrotermal convencional, la presencia de modificadores de red como el Ca²⁺ interfiere en la interacción surfactante-sílice lo que conduce a mesoestructuras muy defectuosas, por lo que se puso atención en otras metodologías de reacción más lentas que permitieran que se establecieran relaciones entre la fase orgánica-inorgánica incluso cuando había cationes que dificultaban las interacciones.

Método de autoensamblaje inducido por evaporación (EISA)

En 1999 el Prof. J. C. Brinker describió por primera vez el método EISA que se basaba en la formación de estructuras mesoporosas a través de la evaporación de disolventes volátiles sin necesidad de condiciones hidrotermales [57]. Este método requiere de la

preparación de soluciones muy diluidas de los precursores y el surfactante y se desarrolla en dos etapas diferenciadas (figura 5):

- 1. Autoensamblaje inducido por evaporación:** en la medida que el disolvente se evapora lentamente (generalmente a temperaturas que van desde 25 a 40 °C) aumenta la concentración de los precursores y el surfactante, alcanzándose la cmc. A esa concentración se produce la organización espontánea entre las moléculas de surfactante por interacciones no covalentes (enlaces de hidrógeno, fuerzas de Van der Waals, fuerzas electrostáticas) así como entre los precursores y el surfactante a través de los restos hidrofílicos de este último, obteniéndose mesofases ordenadas [58].
- 2. Eliminación del surfactante:** la obtención final del material requiere de la eliminación del surfactante para obtener sólidos porosos. Se puede llevar a cabo por extracción o por calcinación, consiguiéndose redes inorgánicas porosas.

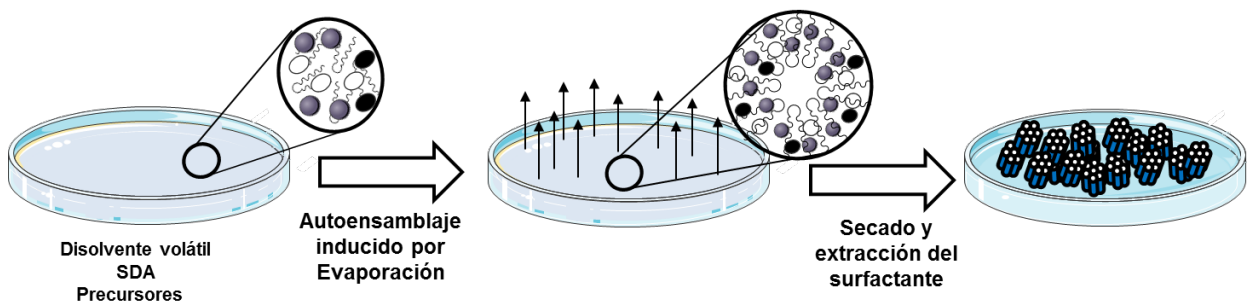


Figura 5. Esquema de las etapas del método EISA.

La obtención de los MBGs por este método se basa en la adición de los precursores de SiO_2 , CaO y el P_2O_5 , normalmente tetraetil ortosilicato (TEOS), $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ y trietil fosfato (TEP). La presencia de tres componentes durante el método EISA requiere de la hidrólisis de cada uno de ellos para ordenarse en torno al surfactante como muestra la figura 6. La adición de cada uno de los precursores se realiza en intervalos de varias horas que asegure la hidrólisis del TEOS y el TEP antes de añadir el precursor de CaO que actúa como deformador de la red.

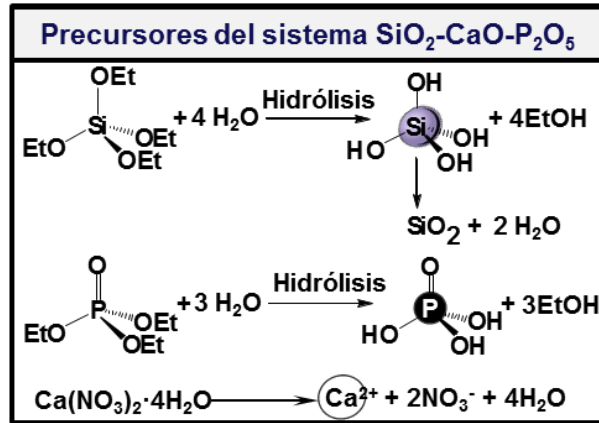


Figura 6. Representación esquemática de las reacciones químicas de los precursores que se producen durante el método EISA para obtener MBGs.

Los primeros MBGs obtenidos por el método EISA se obtuvieron en el sistema SiO₂-CaO-P₂O₅ característicos de los vidrios bioactivos sol-gel, pero con la estructuras mesoporosas altamente ordenadas de los materiales mesoporosos de sílice [59–62]. Como consecuencia de los altos valores de área superficial y porosidad, la bioactividad de estos materiales se mejoró significativamente [63]. Los estudios *in vitro* demostraron que en la superficie de los materiales se podía observar la formación de una fase tipo apatita con cinéticas más rápidas que las observadas hasta la fecha en otras biocerámicas. Además, la estructura mesoporosa altamente ordenada abrió nuevas posibilidades para aplicaciones duales, es decir, injerto óseo y sistema de administración de fármacos de forma similar a MCM-41 y SBA-15 [64].

1.2.4. Funcionalización de materiales de sílice mesoporosa

El impacto actual y potencial de la sílice mesoporosa se debe en gran medida a la posibilidad de funcionalizar la superficie de estos materiales. La superficie de los materiales mesoporosos de sílice presenta una elevada reactividad química gracias a la presencia de grupos silanol. Estos grupos funcionales son muy reactivos, lo que se traduce en la posibilidad de modificar la superficie inorgánica de los materiales con grupos orgánicos. La funcionalización de la superficie se puede llevar a cabo por tres vías como se recoge en la figura 7 [46]:

1. Método de anclaje

Se basa en la funcionalización de la superficie del material una vez ha sido completamente sintetizado, es decir, cuando el surfactante ha sido extraído o calcinado. Este proceso suele llevarse a cabo mediante la incorporación de grupos organosilanos de tipo $(R'O)_3\text{-Si-R}$ que condensan con los grupos silanol de la superficie. Si bien con esta vía la distribución del agente funcionalizante es menos homogénea, la estructura porosa interna no se ve afectada.

2. Método de co-condensación

Consiste en la incorporación del agente funcionalizante al mismo tiempo que los precursores de la sílice. Con este método se consigue una funcionalización más homogénea del material, tanto de forma externa como interna. Con la finalidad de conservar la funcionalización la extracción del surfactante se realiza con una mezcla hidroalcohólica ácida, nunca por calcinación.

3. Formación de órgano-sílice mesoporosa periódica (PMOS)

Consiste en la incorporación de precursores bi-sililados $(R'O)_3\text{-Si-R-(OR')}_3$ en presencia del surfactante. De esta forma se forman puentes orgánicos entre los componentes que forman la red de sílice, obteniéndose estructuras funcionalizadas a lo largo de toda la red de forma homogénea.

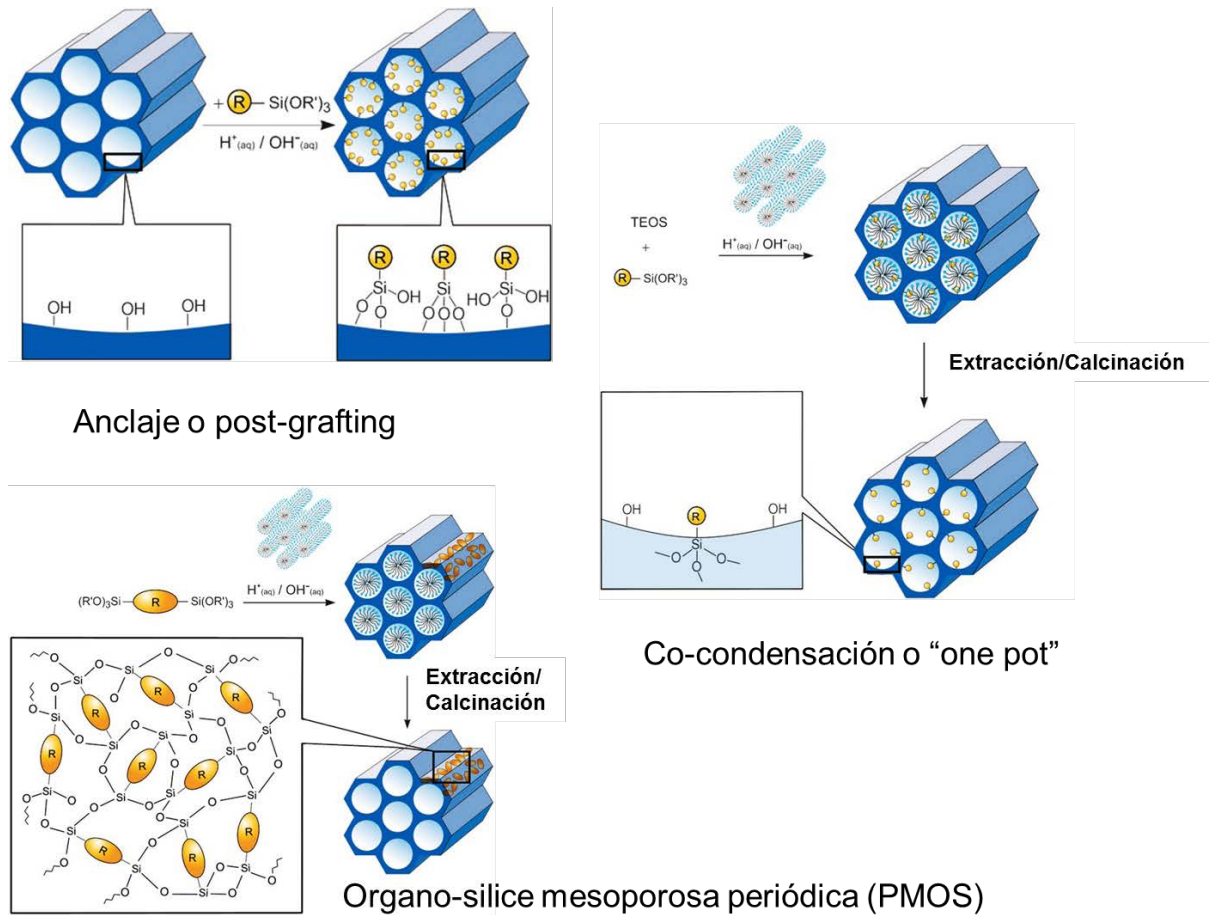


Figura 7. Representación de los diferentes métodos utilizados para funcionalizar sílice mesoporosa, adaptada de la referencia [46].

De los métodos descritos anteriormente la funcionalización post-síntesis tras su calcinación es la que se utiliza para los MBGs, evitando la exposición a soluciones alcohólicas ácidas que disolverían el CaO del MBG.

La funcionalización de los MBGs permite su adaptación a usos más concretos. Por ejemplo, han sido funcionalizados con factores de crecimiento o proteínas morfogenéticas óseas para favorecer la osteogénesis [65–67]. Por otra parte se han descrito MBGs funcionalizados con grupos amino y carboxílicos que podrían mejorar las propiedades de estos materiales como matrices para liberación de fármacos sin afectar a su comportamiento bioactivo [68–70]. Finalmente, cabe destacar que se han desarrollado sistemas que permiten el tratamiento de patologías asociadas al hueso, como por ejemplo la osteomielitis, a través de la formación de superficies zwitteriónicas que evitan la adhesión bacteriana en la superficie [71].

1.3 MBGs como sistemas de liberación de fármacos frente a patologías óseas

El uso de la sílice mesoporosa como matriz portadora de fármacos impulsó la posibilidad de aplicar esta propiedad a los MBGs. El interés de utilizar MBGs como matrices portadoras y liberadoras de fármacos radica en la posibilidad de tratar patologías propias del tejido óseo de forma localizada, favoreciendo la regeneración del tejido al mismo tiempo que se tratan o previenen patologías. Los primeros en proponer los MBGs como sistemas liberadores de fármacos fueron Xia y Chang a través de la carga en el interior de los poros de un antibiótico de amplio espectro como la gentamicina [72]. Para este propósito siguieron la técnica de impregnación del fármaco en contacto con un MBG de composición $58\text{SiO}_2\text{-}37\text{CaO-}5\text{P}_2\text{O}_5$ (% mol). Los estudios posteriores de la cinética de liberación de la gentamicina indicaron que esta puede incorporarse al material en la superficie y en el interior de los poros, por lo que se pudieron distinguir cinéticas de liberación diferentes. Este trabajo supuso el punto de partida para intentar tratar algunas de las patologías más habituales asociadas al tejido óseo como son la osteomielitis, tumores de tipo sarcoma o la osteoporosis usando MBGs [73–78].

1.3.1. Infección ósea

La infección consiste en la invasión de un organismo por otro organismo de carácter patógeno. En el campo de la regeneración ósea la más habitual es la producida por bacterias, especialmente relacionadas con el uso de implantes. Por ello el tratamiento de las infecciones bacterianas resulta un campo de especial interés enfocado a la cirugía ortopédica y maxilofacial, pues se estima que la infección ósea se produce en un 2-3% de las cirugías. La infección periimplantaria se manifiesta como un proceso inflamatorio que conduce a la destrucción ósea (osteólisis) causada por una infección microbiana subyacente, principalmente por la bacteria *S. aureus* [12,79]. Si la infección se prolonga en el tiempo, puede complicarse dando lugar a osteomielitis con graves efectos sobre el tejido circundante al implante [80]. La colonización bacteriana en la superficie del implante promueve la actuación de los macrófagos que activan el proceso inflamatorio afectando a su integración. Estos hechos producen graves complicaciones como la extirpación de la prótesis, la amputación del miembro o incluso la muerte.

Se ha descrito la liberación de antibióticos desde MBGs para el tratamiento y la prevención de la infección utilizando diferentes antibióticos como pueden ser gentamicina, gatifloxacina o levofloxacino [72,81]. Recientemente se han descrito sistemas de liberación de antibióticos desde MBGs de forma controlada, usando la porosidad de los MBGs para liberar antibióticos con diferentes cinéticas [82]. Por otra parte se han escrito sistemas estímulo respuesta para liberación controlada de levofloxacino en presencia de bacterias [83]. Estos sistemas minimizan la adhesión y proliferación bacteriana sin reducir la bioactividad de los materiales y sin presentar toxicidad en células osteoblásticas.

1.3.2. Tumores óseos

Los tipos comunes de cáncer óseo primario son el osteosarcoma, el condrosarcoma y el sarcoma de Edwing que se caracterizan por provocar una destrucción del tejido óseo sano [73,84]. Uno de los tratamientos más habituales para este tipo de cáncer es la cirugía, que implica retirar el tejido dañado, incluso en muchas ocasiones se llega a la amputación de un miembro. Este tratamiento pone en peligro la vida del paciente, además de ocasionar secuelas físicas y psicológicas muy graves [85]. Sin embargo, los tratamientos con quimioterapia han disminuido el número de amputaciones. Normalmente se utilizan terapias basadas en fármacos como la doxorubicina o el cisplatino que en muchas ocasiones van acompañados de dexametasona para minimizar complicaciones asociadas al cáncer [86].

Algunos investigadores han propuesto la liberación de antitumorales desde MBGs permitiría la reducción de la dosis de quimioterapia, pues el antitumoral se liberaría localmente como sistemas de prevención secundaria. La capacidad de carga de estos materiales se ha utilizado para liberar antitumorales como doxorubicina desde esferas de MBGs recubiertas de alginato obteniéndose cinéticas de orden cero [87] o desde nanopartículas de MBGs [88]. Recientemente se han descrito sistemas de liberación de antitumorales de forma controlada para el tratamiento de cáncer tipo sarcoma mediante el uso de compuertas moleculares sensibles a estímulo enzimático [83].

1.3.3. Osteoporosis

La osteoporosis es la enfermedad degenerativa con mayor incidencia en el mundo y se produce cuando existe un desequilibrio entre las actividades de los osteoblastos y los

osteoclastos, lo que da lugar a la pérdida de masa ósea generando huesos más frágiles con tendencia a las fracturas [89–92]. La homeostasis del tejido óseo se mantiene principalmente por medio de la comunicación osteoblasto-osteoclasto. Generalmente la comunicación entre ambos tipos de células se lleva a cabo cuando los osteoblastos sobreexpresan marcadores celulares que activan o inhiben la actividad de los osteoclastos. Estos marcadores son el OPG, que inhibe la osteoclastogénesis, y el ligando de receptor activador para el factor nuclear κ B (RANKL) que la activa. El estrógeno juega un papel determinante en el equilibrio OPG/RANKL por ello la osteoporosis afecta en mayor medida a mujeres post-menopáusicas [90,93].

Se espera que el número de casos de osteoporosis se duplique en el mundo durante los próximos 20 años, surgiendo la necesidad de desarrollar nuevas formas de tratamiento, tanto de la enfermedad como de las fracturas producidas por la misma [75].

El tratamiento farmacológico para la osteoporosis se basa principalmente en la administración de antiresorptivos como bifosfonatos (Ácido Zoledrónico, Risedronato, Alendronato, etc), inhibidores del RANKL (Denosumab), antagonistas (Raloxifeno) selectivos de los receptores estrogénicos [92,94–97], si bien en la última década se ha puesto el foco de interés en agentes con actividad anabólica como el Ranelato de estroncio o las proteínas morfogenéticas (BMPs) o anticuerpos neutralizantes de esclerostina [89,98].

La aplicación de los MBGs como sistemas de liberación de agentes antiosteoporóticos está poco explorada. Hasta la fecha únicamente se han descrito sistemas de liberación de ipriflavona (una isoflavona sintética que inhibe la resorción ósea) desde MBGs funcionalizados consiguiéndose cinéticas de liberación de orden cero [70] o sistemas para liberación de alendronato (un potente inhibidor de la actividad osteoclastica) desde partículas esféricas de MBGs [99].

1.4 MBGs y regeneración de defectos óseos con andamios tridimensionales

Uno de los métodos más utilizados para tratar defectos óseos es el uso de injertos en el lugar del defecto. Estos sistemas pretenden restablecer la morfología y la función del tejido cuando se ha producido un defecto en la masa ósea ya sea después de un traumatismo o por la extirpación de un tumor [100]. El material implantado, solo o en

combinación con otros materiales, debe promover la osteogénesis, la osteoconducción y la osteointegración. Si bien el uso de autoinjertos del propio tejido del paciente es la opción más recomendable, en la práctica presenta la desventaja de que hay muy poca cantidad de tejido disponible para ser utilizado. Otra posibilidad es el uso de injertos donados por parte de personas (aloinjerto) o animales (xenoinjerto), sin embargo, esta práctica también presenta desventajas dado que se incrementa la posibilidad de rechazo o de transmitir enfermedades [101]. El desarrollo de andamios tridimensionales macroporosos basados en biomateriales para injertos tisulares es una alternativa a los autoinjertos e injertos de donantes en el campo de las terapias regenerativas de tejido óseo [102].

La fabricación andamios macroporosos tridimensionales en ingeniería tisular permite mimetizar la estructura porosa y las funciones de la matriz extracelular características del hueso. De este modo, es posible crear el microambiente adecuado para favorecer el crecimiento y la vascularización del tejido [103,104]. Los andamios tridimensionales pueden actuar como plantillas estructurales sobre las cuales las células puedan proliferar, expandirse y diferenciarse [105]. Además, los soportes deben ser reabsorbidos por el organismo, permitiendo la formación de tejido vivo en el lugar que ocupaba el implante [106].

Los andamios se pueden diseñar con dos propósitos diferentes [107]:

- i) Regeneración de tejidos *in situ*: consiste en la implantación del andamio directamente sobre el defecto óseo combinándose o no con factores de crecimiento o moléculas que favorezcan la regeneración tisular.
- ii) Técnicas de ingeniería de tejidos *ex vivo*: el andamio se utiliza como sustrato tridimensional *in vitro* para prefabricar tejido, incorporando células precursoras en la estructura. En el andamio las células se diferencian y proliferan, para posteriormente, ser implantadas en el tejido huésped siendo las responsables últimas de la regeneración tisular.

La ingeniería de tejidos ha experimentado una rápida evolución en los últimos años gracias a la incorporación de técnicas que permiten incluir células directamente durante la fabricación de los andamios. De esta forma se puede mejorar la eficiencia de los sistemas, pues no es necesario el paso de siembra sobre la estructura de los andamios,

sino que las células se encuentran integradas en la estructura [101]. Este campo se encuentra todavía en expansión, con prometedores resultados *in vitro* e *in vivo* [108]. Los andamios tridimensionales macroporosos deben cumplir una serie de requisitos para poder ser implantados [109]:

- Ser redes tridimensionales con elevada porosidad conectada para permitir la colonización celular, el flujo de nutrientes y desechos y la vascularización.
- Ser biodegradables y bioreabsorbibles manteniendo un equilibrio entre el proceso de degradación controlable y la resorción, para favorecer el crecimiento tisular.
- Ser biocompatibles, es decir, que el soporte no libere ninguna sustancia tóxica para el organismo receptor.
- Poseer una superficie química con características de dureza y rugosidad adecuadas que favorezcan la adhesión, proliferación y diferenciación celular.
- Poseer propiedades mecánicas similares a las del tejido huésped.
- Fabricarse mediante un proceso de síntesis sencillo para obtener formas y tamaños adaptables al defecto requerido.
- Ser baratos y fácilmente esterilizables

1.4.1. Propiedades de los andamios 3D y respuesta celular

Para fabricar andamios macroporosos capaces de promover la regeneración ósea hay que considerar una serie de factores que permitan mimetizar la compleja estructura que presenta este tejido. Macroscópicamente el hueso se compone de tejido cortical y tejido esponjoso, el cual está relleno en gran medida por médula ósea y vasos sanguíneos (figura 8) que permiten la llegada de nutrientes y la eliminación de los desechos de las células que forman parte de él.

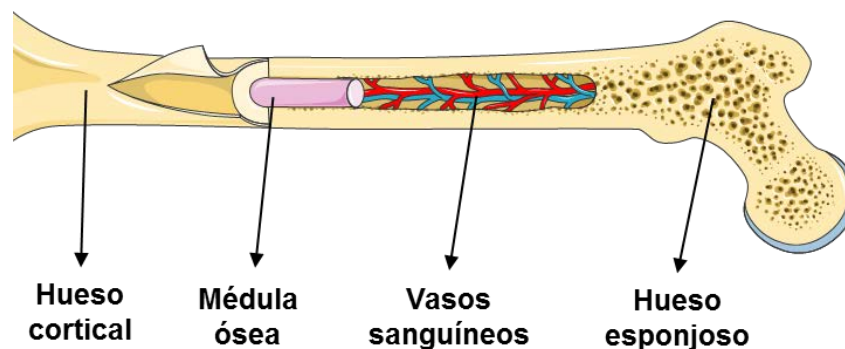


Figura 8. Estructura macroscópica del hueso.

La figura 9 muestra la organización del tejido óseo en las diferentes escalas jerarquizadas. Los vasos sanguíneos se ubican en el interior de los osteonas, que son estructuras calcificadas compactas formadas por osteocitos que interaccionan con el colágeno, el cual a su vez se encuentra interaccionando con HA nanocristalina. De esta forma el tejido óseo presenta una estructura muy característica que le dota de propiedades mecánicas excepcionales.

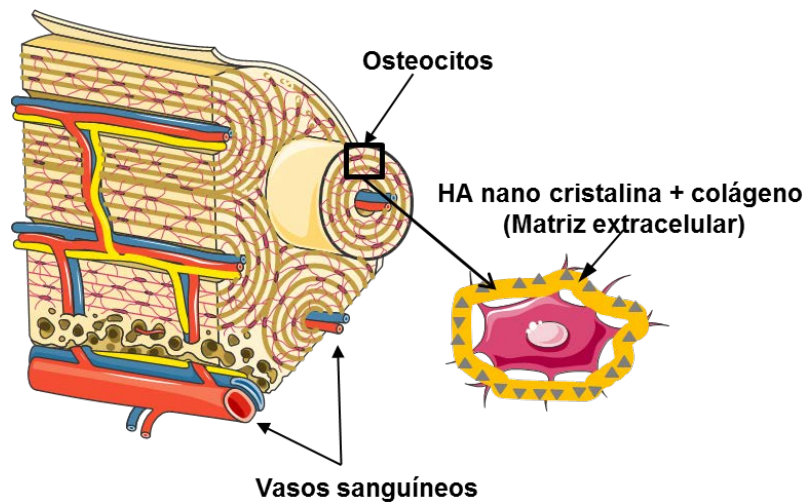


Figura 9. Representación de la estructura del tejido óseo.

La ingeniería tisular basa sus principios en el diseño de estructuras tridimensionales poniendo especial atención en la composición, la microestructura, la interconectividad, la topografía y las propiedades mecánicas de los andamios, propiedades que afectan al comportamiento celular y por lo tanto determinan el éxito o el fracaso del implante. En este sentido, los andamios deberían asemejarse al máximo a la matriz extracelular, mimetizando las condiciones fisiológicas para asegurar el éxito del implante [11]. En este tipo de estructuras la fijación y la migración celular desde la superficie juegan un papel primordial a la hora de determinar el éxito del injerto.

Una de las principales funciones del tejido óseo es la de sostén, función que lleva a cabo gracias a sus *propiedades mecánicas*. Esto implica que los andamios tridimensionales deben exhibir valores de resistencia mecánica en torno a 70 y 280 MPa para cargas de tensión y compresión respectivamente [110]. En este sentido destacan los materiales metálicos pues presentan mejores valores de resistencia. Por otra parte, es muy recomendable que la elasticidad del andamio sea similar a la del hueso, para evitar

problemas derivados de la protección frente a la carga. Lo ideal es que además de altos valores de resistencia a tensión y compresión presentara valores de módulo de Young en torno a 20 GPa siendo los polímeros los materiales que más se aproximan a estos valores. En la actualidad no se conoce ningún biomaterial artificial que reúna las exigencias de resistencia y flexibilidad que si satisface el hueso.

La estructura del implante debe adaptarse al defecto que pretende ser reparado por lo que es importante disponer de técnicas suficientemente versátiles que permitan fabricar réplicas lo más similares posibles al defecto. Generalmente, los andamios se diseñan como *estructuras macroporosas interconectadas*, con tamaños de poro entre 100 y 1000 μm . El tamaño de los poros juega un papel fundamental en los procesos de regeneración ósea y se ha demostrado que afecta a la morfología y expansión celulares. En los últimos años se ha determinado que tamaños de poro alrededor de 200-300 μm son necesarios para suministro de nutrientes y la retirada de los desechos metabólicos. Por otra parte, poros mayores de 400 μm favorecen la angiogénesis y tamaños de poro mayores de 500 μm permiten una distribución celular mayor y más homogénea que poros de menor tamaño [106].

Las *propiedades superficiales* como la rugosidad, la dureza, la microestructura o la hidrofobicidad juegan un papel fundamental en el comportamiento celular en superficie, pues afectan a la adhesión celular, la propagación, la proliferación, la función del citoesqueleto y la diferenciación pues pueden estimular la secreción de especies quimiotácticas que favorecen la migración celular hacia ubicaciones de los andamios menos accesibles.

Los andamios deben exhibir topografías que favorezcan la adhesión celular, la propagación, la proliferación y la función del citoesqueleto. Por su parte la composición química puede facilitar la diferenciación celular tras la proliferación. Además, es deseable que los subproductos de degradación de los injertos óseos actúen como estímulos de diferenciación celular hacia el fenotipo osteoblástico [20,111,112].

1.4.2 Diseño y preparación de andamios tridimensionales por *robocasting*

El tejido óseo se puede definir como un composite (material compuesto por varias fases que se utiliza para la fabricación de estructuras) dado que en su composición se puede distinguir una fase orgánica (principalmente colágeno de tipo I) y una fase inorgánica

(carbonato hidroxapatita). El colágeno es principalmente proteína que confiere resistencia a la tracción y propiedades elásticas, mientras que la cerámica proporciona rigidez y resistencia a la compresión [113].

La formación de composites polímero-cerámico tiene dos ventajas fundamentales:

- Mejorar las propiedades mecánicas donde las partículas actúan como fase discreta, aumentando la resistencia mecánica, mientras que el polímero actúa como fase continua dotando de mayor flexibilidad al andamio.
- Mejorar las propiedades viscoelásticas de la pasta para mejorar su fluidez y permitir la deposición capa a capa del fluido.

Estas técnicas para la fabricación de andamios tridimensionales van desde métodos convencionales, como fundición con solvente, lixiviación de partículas, liofilización, réplica de fundición en gel, GELX3D, etc. hasta tecnologías más sofisticadas, como el prototipado rápido y el electrospinning, que permiten un control más preciso de la arquitectura macroporosa [114–116]. Dentro de las técnicas de prototipado rápido podemos distinguir la impresión 3D/impresión directa, la bioimpresión asistida por láser, la sinterización selectiva con láser, la estereolitografía, el *robocasting* y el modelado de deposición fundida [108,117,118]. A través de cualquiera de estos métodos es posible reproducir de forma muy precisa un diseño tipo CAD (*computer assisted design*) que puede ser la reproducción del defecto óseo del paciente. La principal ventaja de estas técnicas radica de la posibilidad de utilizar datos obtenidos por TC o RMI avanzando hacia la medicina personalizada. Con las técnicas de prototipado rápido es posible fabricar, capa sobre capa, estructuras macroporosas interconectadas que favorezcan la vascularización del tejido (figura 10) [119].

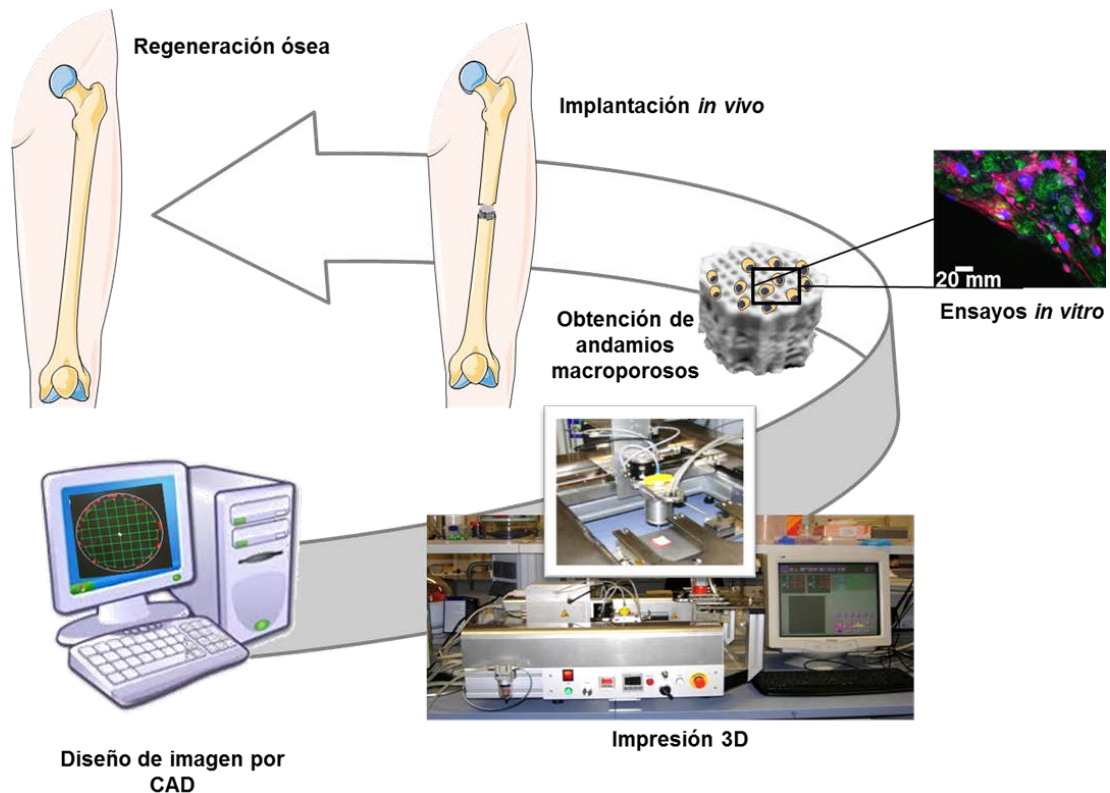


Figura 10. Pasos que se suceden desde el diseño a la implantación de andamios tridimensionales

En el caso de los andamios cerámicos o de composites cerámico-polímero, el *robocasting* es quizás el método más utilizado para la preparación de estructuras macroporosa. Esta técnica comprende la deposición capa sobre capa de una pasta inyectable que contiene la suspensión cerámica o la mezcla de cerámico-polímero (figura 11). El compuesto en suspensión se coloca en un cartucho a modo de jeringa y la pasta se extruye a través de una boquilla que se asemeja a una aguja. Durante el proceso, la pasta se extruye como un filamento continuo para obtener la primera capa, y luego se deposita la siguiente capa sobre la primera siguiendo un patrón previamente diseñado con un archivo CAD. La deposición capa a capa permite un elevado control de la arquitectura, ya que el movimiento de la boquilla presenta una alta precisión para reproducir la forma, el tamaño y la porosidad previamente diseñados.

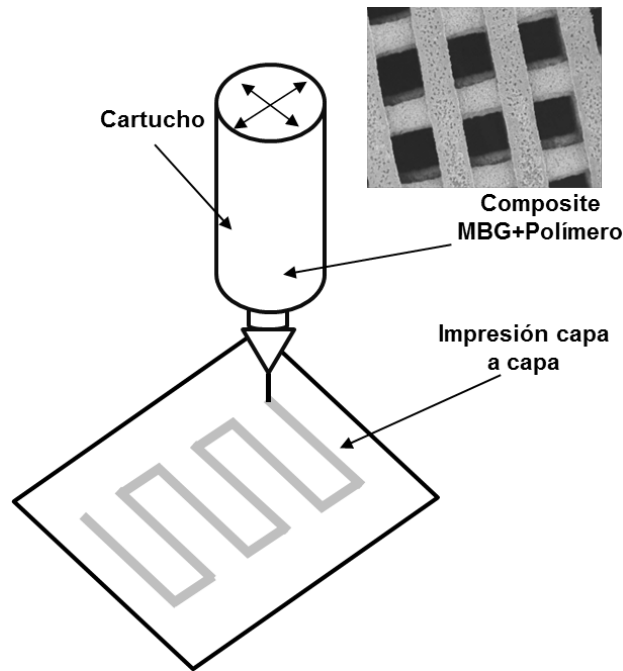


Figura 11. Representación de la fabricación de andamios tridimensionales por robocasting capa a capa.

Como se ha mencionado la técnica del *robocasting* requiere de una serie de condiciones de impresión. Es fundamental obtener pastas con propiedades reológicas adecuadas, es decir capaces de fluir a través de la boquilla y de adquirir la rigidez necesaria para soportar la sucesiva deposición de capas sin colapsar la estructura. La versatilidad de este método ha permitido incluso introducir células en los andamios durante su impresión [120].

En el caso de los composites cerámica-polímero, la polimerización de la fase orgánica debe tener lugar después de la siguiente deposición de la capa, de lo contrario la estructura interna de los andamios se colapsará total o parcialmente, perdiéndose la estructura porosa deseada. Cuando se supera este problema, el *robocasting* proporciona arquitecturas 3D macroporosas altamente repetitivas y reproducibles con porosidad regular y definida, como se muestra en la figura 12.

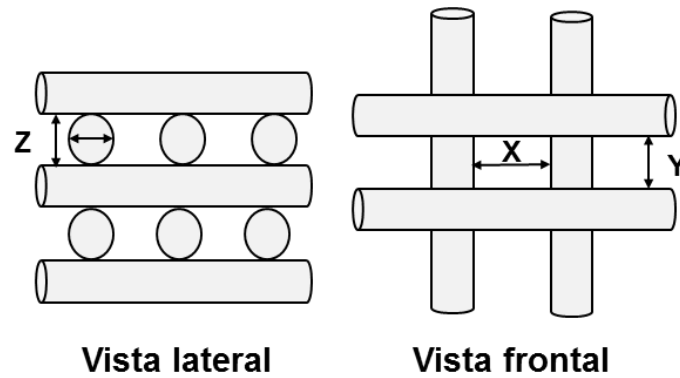


Figura 12. Esquema de un andamio macroporoso

Durante el proceso de fabricación de andamios cerámica-polímero por *robocasting* hay una serie de parámetros que deben ser cuidadosamente controlados, destacando entre ellos:

- Viscosidad
- Propiedades reológicas
- Velocidad de deposición
- Temperatura

Algunos de los polímeros y cerámicas más utilizados en la fabricación de andamios macroporosos fabricados por *robocasting* se muestran en la tabla 2.

Tabla 2. Polímeros y cerámicos utilizados para la fabricación de andamios macroporosos compuestos.

Polímero	Cerámico	Referencia
Polivinil alcohol	Vidrios bioactivos	[121]
Policaprolactona	Vidrios bioactivos	[122,123]
	Hidroxiapatita	
ácido poliláctico	Vidrios bioactivos	[124]
	Brusita	
Colágeno	HAP	[120]
	β -TCP	
Quitosano	Vidrios bioactivos	[125]
Gelatina	Hidroxiapatita	[126]

1.4.3. Andamios tridimensionales como sistemas de liberación de fármacos

El desarrollo de sistemas que permitan no solo la regeneración del tejido sino también la liberación de fármacos se muestra como un campo de especial interés en la actualidad [114,127,128]. Durante los últimos años se han desarrollado diferentes sistemas tridimensionales complejos que integran células y factores de crecimiento con las estructuras tridimensionales. Además, se han descrito numerosos sistemas para liberación de fármacos desde andamios porosos posibilitando el tratamiento de patologías de forma localizada [97,129,130].

La liberación de fármacos desde andamios tridimensionales tiene como finalidad el tratamiento y prevención secundaria de algunas de las lesiones principalmente infecciones y osteoporosis [75,131]. La ventaja de los andamios tridimensionales como liberador de fármacos radica en que minimiza el número de intervenciones quirúrgicas y puede incrementar el éxito del implante. Sobre este tipo de estructuras se han incorporado fármacos siguiendo estrategias como la incorporación directa o la encapsulación [97,132,133]. También son destacables los sistemas de liberación de varios fármacos de forma fraccionada que podrían combinar el efecto dos o más sustancias terapéuticas con diferente actividad farmacológica [97,134,135].

Los andamios macroporosos funcionalizados con factores de crecimiento también han sido un campo de interés en medicina regenerativa [136,137]. Favorecer la vascularización del implante garantiza la llegada de nutrientes hacia zonas menos disponibles del mismo, lo que en ultimo termino ayuda a la colonización ósea. En esta línea se han descrito sistemas que incluyen la liberación de factores angiogénicos [138]. Por otra parte se han descrito sistemas que liberan factores osteogénicos como las proteínas morfogenéticas para mejorar la integración y la osteogénesis de los andamios *in vivo* [137].

Referencias

- [1] L.L. Hench, Bioceramics: From Concept to Clinic, J. Am. Ceram. Soc. 74 (1991) 1487.

- [2] T. Yamamuro, Bioceramics, in: Biomech. Biomater. Orthop., Springer London, London, 2016: pp. 21–33.
- [3] L.L. Hench, Chronology of Bioactive Glass Development and Clinical Applications, *New J. Glas. Ceram.* 03 (2013) 67.
- [4] L.L. Hench, Genetic design of bioactive glass, *J. Eur. Ceram. Soc.* 29 (2009) 1257.
- [5] M.M. Stevens, Biomaterials for bone tissue engineering, *Mater. Today.* 11 (2008) 18.
- [6] F.S.L. Bobbert, A.A. Zadpoor, Effects of bone substitute architecture and surface properties on cell response, angiogenesis, and structure of new bone, *J. Mater. Chem. B.* 5 (2017) 6175.
- [7] M. Vallet-Regí, Evolution of bioceramics within the field of biomaterials, *Comptes Rendus Chim.* 13 (2010) 174.
- [8] J.R. Henstock, L.T. Canham, S.I. Anderson, Silicon: The evolution of its use in biomaterials, *Acta Biomater.* 11 (2015) 17.
- [9] M. Vallet-Regí, Bioceramics, M. Vallet-Regí (Ed) *Bio-ceramics with clinical applications* John Wiley & Sons, United Kingdom, 2014, pp. 292–313.
- [10] L.L. Hench, J. Wilson, *An Introduction to Bioceramics*, World Scientific Publishing Co. Pte. Ltd. 1993.
- [11] L.L. Hench, Biomaterials, *Science* (80-.). 208 (1980) 826.
- [12] D. Arcos, M. Vallet-Regí, Bioceramics for drug delivery, *Acta Mater.* 61 (2013) 890.
- [13] M. Vallet-Regí, Ceramics for medical applications, *J. Chem. Soc. Dalt. Trans.* 0 (2001) 97.
- [14] L.L. Hench, J.M. Polak, Third-generation biomedical materials., *Science.* 295 (2002) 1014.

- [15] T. Albrektsson, C.Johansson, Osteoinduction, osteoconduction and osseointegration, *Eur. Spine J.* 10 (2001) 96.
- [16] D.S. Kumar, S.K. Kumar, Study of Development and Applications of Bioactive Materials and Methods In Bone Tissue Engineering, *Biomed Res – India Biomed. Res.* 26 (2015) 55.
- [17] P. Chandra, J.J. Yoo, S.J. Lee, Biomaterials in Regenerative Medicine, in: A. Atala, J. G. Allickson (eds) *Translational Regenerative Medicine*, Elsevier, 2015, Winston Salem, USA pp151-167.
- [18] J.R. Jones, Review of bioactive glass: from Hench to hybrids., *Acta Biomater.* 9 (2013) 4457.
- [19] L.L. Hench, Genetic design of bioactive glass, *J. Eur. Ceram. Soc.* 29 (2009) 1257.
- [20] L.L. Hench, I.D. Xynos, J.M. Polak, Bioactive glasses for in situ tissue regeneration, *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* 15 (2004) 543.
- [21] L.L. Hench, R.J. Splinter, W.C. Allen, T.K. Greenlee, Bonding mechanisms at the interface of ceramic prosthetic materials, *J. Biomed. Mater. Res.* 5 (1971) 117.
- [22] J.R. Jones, Reprint of: Review of bioactive glass: From Hench to hybrids, *Acta Biomater.* 23 (2015) 53.
- [23] H. Sun, C. Wu, K. Dai, J. Chang, T. Tang, Proliferation and osteoblastic differentiation of human bone marrow-derived stromal cells on akermanite-bioactive ceramics, *Biomaterials.* 27 (2006) 5651.
- [24] C. Wu, J. Chang, Degradation, bioactivity, and cytocompatibility of diopside, akermanite, and bredigite ceramics, *J. Biomed. Mater. Res. Part B Appl. Biomater.* 83B (2007) 153.
- [25] M. Vallet-Regí, C. Victoria Ragel, A.J. Salinas, Glasses with Medical Applications, *Eur. J. Inorg. Chem.* (2003) 1029.
- [26] J.E. Davies, Bone bonding at natural and biomaterial surfaces, *Biomaterials.* 28 (2007) 5058.

- [27] W. Cao, L.L. Hench, Bioactive materials, *Ceram. Int.* 22 (1996) 493.
- [28] T. Kokubo, H. Kushitani, S. Sakka, T. Kitsugi, T. Yamamuro, Solutions able to reproduce in vivo surface-structure changes in bioactive glass-ceramic A-W3, *J. Biomed. Mater. Res.* 24 (1990) 721.
- [29] Mizuno M., Implants for surgery — In vitro evaluation for apatite-forming ability of implant materials, *J Mater Sci: Mater Med* 26 (2015) 115.
- [30] R. Li, A.E. Clark, L.L. Hench, An investigation of bioactive glass powders by sol-gel processing, *J. Appl. Biomater.* 2 (1991) 231.
- [31] M.M. Pereira, A.E. Clark, L.L. Hench, Calcium phosphate formation on sol-gel-derived bioactive glasses in vitro, *J. Biomed. Mater. Res.* 28 (1994) 693.
- [32] L.L. Hench, Sol-gel materials for bioceramic applications, *Curr. Opin. Solid State Mater. Sci.* 2 (1997) 604.
- [33] D. Arcos, M. Vallet-Regí, Sol-gel silica-based biomaterials and bone tissue regeneration, *Acta Biomater.* 6 (2010) 2874.
- [34] B. Yu, G. Poologasundarampillai, C. Turdean-Ionescu, M.E. Smith, J.R. Jones, A New Calcium Source for Bioactive Sol-Gel Hybrids, *Bioceram. Dev. Appl.* 1 (2011) 1.
- [35] H. Aguiar, J. Serra, P. González, B. León, Structural study of sol-gel silicate glasses by IR and Raman spectroscopies, *J. Non. Cryst. Solids.* 355 (2009) 475.
- [36] M. Vallet-Regí, D. Arcos, J. Pérez-Pariente, Evolution of porosity during in vitro hydroxycarbonate apatite growth in sol-gel glasses, *J. Biomed. Mater. Res.* 51 (2000) 23.
- [37] R. Li, A.E. Clark, L.L. Hench, An investigation of bioactive glass powders by sol-gel processing, *J. Appl. Biomater.* 2 (1991) 231.
- [38] M. Vallet-Regí, Evolution of bioceramics within the field of biomaterials, *Comptes Rendus Chim.* 13 (2010) 174.

- [39] X. Yan, C. Yu, X. Zhou, J. Tang, D. Zhao, Highly ordered mesoporous bioactive glasses with superior in vitro bone-forming bioactivities, *Angew. Chemie - Int. Ed.* 43 (2004) 5980.
- [40] J.S. Beck, J.C. Vartuli, W.J. Roth, M.E. Leonowicz, C.T. Kresge, K.D. Schmitt, C.T.W. Chu, D.H. Olson, E.W. Sheppard, S.B. McCullen, J.B. Higgins, J.L. Schlenker, A new family of mesoporous molecular sieves prepared with liquid crystal templates, *J. Am. Chem. Soc.* 114 (1992) 10834.
- [41] M. Vallet-Regí, A. Rámila, R.P. del Real, J. Pérez-Pariente, A New Property of MCM-41: Drug Delivery System, *Chem. Mater.* 13 (2001) 308.
- [42] F. Balas, M. Manzano, P. Horcajada, M. Vallet-Regí, Confinement and Controlled Release of Bisphosphonates on Ordered Mesoporous Silica-Based Materials, *J. Am. Chem. Soc.* 128 (2006) 8116.
- [43] A. Baeza, M. Colilla, M. Vallet-Regí, Advances in mesoporous silica nanoparticles for targeted stimuli-responsive drug delivery, *Expert Opin. Drug Deliv.* 12 (2015) 319.
- [44] S. Manne, H.E. Gaub, Molecular Organization of Surfactants at Solid-Liquid Interfaces, *Science* (80-.). 270 (1995) 1480.
- [45] A. Monnier, F. Schuth, Q. Huo, D. Kumar, D. Margolese, R.S. Maxwell, G.D. Stucky, M. Krishnamurty, P. Petroff, A. Firouzi, M. Janicke, B.F. Chmelka, Cooperative Formation of Inorganic-Organic Interfaces in the Synthesis of Silicate Mesostructures, *Science* (80-.). 261 (1993) 1299.
- [46] F. Hoffmann, M. Cornelius, J. Morell, M. Fröba, Silica-based mesoporous organic-inorganic hybrid materials, *Angew. Chemie - Int. Ed.* 45 (2006) 3216.
- [47] J.M. Kim, G.D. Stucky, Synthesis of highly ordered mesoporous silica materials using sodium silicate and amphiphilic block copolymers, *Chem. Commun.* 0 (2000) 1159.
- [48] D. Zhao, Q. Huo, J. Feng, B.F. Chmelka, G.D. Stucky, Nonionic Triblock and Star Diblock Copolymer and Oligomeric Surfactant Syntheses of Highly Ordered,

Hydrothermally Stable, Mesoporous Silica Structures, *J. Am. Chem. Soc.* 120 (1998) 6024.

[49] A. Dominguez, A. Fernandez, N. Gonzalez, E. Iglesias, L. Montenegro, Determination of Critical Micelle Concentration of Some Surfactants by Three Techniques, *J. Chem. Educ.* 74 (1997) 1227.

[50] I. Amar-Yuli, A. Aserin, N. Garti, Some Characteristics of Lyotropic Liquid-Crystalline Mesophases, in: *Self-Organized Surfactant Struct.*, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, Germany, 2010: pp. 89–120.

[51] S.P. Moulik, Micelles: Self-organized surfactant assemblies, *Curr. Sci.* 71 (1996) 368–376. doi:10.2307/24099613.

[52] J.N. Israelachvili, D.J. Mitchell, B.W. Ninham, Theory of self-assembly of hydrocarbon amphiphiles into micelles and bilayers, *J. Chem. Soc. Faraday Trans. 2.* 72 (1976) 1525.

[53] M.C.A. Stuart, E.J. Boekema, Two distinct mechanisms of vesicle-to-micelle and micelle-to-vesicle transition are mediated by the packing parameter of phospholipid-detergent systems., *Biochim. Biophys. Acta.* 1768 (2007) 2681.

[54] J. Xu, Z. Luan, H. He, W. Zhou, L. Kevan, A Reliable Synthesis of Cubic Mesoporous MCM-48 Molecular Sieve, *Chem. Mater.* 10 (1998) 3690.

[55] D. Zhao, J. Sun, Quanzhi Li, G.D. Stucky, Morphological Control of Highly Ordered Mesoporous Silica SBA-15, *Chem. Mater.* 12 (2000) 275.

[56] S.A. El-Safty, Y. Kiyozumi, T. Hanaoka, F. Mizukami, Controlled Design of Ordered and Disordered Pore Architectures, Geometries, and Dimensions of HOM-Type Mesostructured Monoliths and Their Hydrothermal Stabilities, *J. Phys. Chem. C.* 112 (2008) 5476.

[57] C.J. Brinker, Y. Lu, A. Sellinger, H. Fan, Evaporation-Induced Self-Assembly: Nanostructures Made Easy, *Adv. Mater.* 11 (1999) 579.

[58] D. Grosso, F. Cagnol, G.J. de A.A. Soler-Illia, E.L. Crepaldi, H. Amenitsch, a. Brunet-Bruneau, a. Bourgeois, C. Sanchez, Fundamentals of Mesostructuring Through Evaporation-Induced Self-Assembly, *Adv. Funct. Mater.* 14 (2004) 309.

- [59] Zhao, Feng, Huo, Melosh, Fredrickson, Chmelka, Stucky, Triblock copolymer syntheses of mesoporous silica with periodic 50 to 300 angstrom pores, *Science*. 279 (1998) 548.
- [60] A. López-Noriega, D. Arcos, I. Izquierdo-Barba, Y. Sakamoto, O. Terasaki, M. Vallet-Regí, Ordered Mesoporous Bioactive Glasses for Bone Tissue Regeneration, *Chem. Mater.* 18 (2006) 3137.
- [61] X. Yan, G. Wei, L. Zhao, J. Yi, H. Deng, L. Wang, G. (Max) Lu, C. Yu, Synthesis and in vitro bioactivity of ordered mesostructured bioactive glasses with adjustable pore sizes, *Microporous Mesoporous Mater.* 132 (2010) 282.
- [62] C. Wu, J. Chang, Y. Xiao, Mesoporous bioactive glasses as drug delivery and bone tissue regeneration platforms., *Ther. Deliv.* 2 (2011) 1189.
- [63] I. Izquierdo-Barba, M. Vallet-Regí, Mesoporous bioactive glasses: Relevance of their porous structure compared to that of classical bioglasses, *Biomed. Glas.* 1 (2015) 140.
- [64] M. Vallet-Regí, F. Balas, D. Arcos, Mesoporous Materials for Drug Delivery, *Angew. Chemie Int. Ed.* 46 (2007) 7548.
- [65] C. Wu, J. Chang, Multifunctional mesoporous bioactive glasses for effective delivery of therapeutic ions and drug/growth factors., *J. Control. Release.* (2014) 1.
- [66] P. Yilgor, R.A. Sousa, R.L. Reis, N. Hasirci, V. Hasirci, Effect of scaffold architecture and BMP-2/BMP-7 delivery on in vitro bone regeneration, *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 21 (2010) 2999.
- [67] S.N. Rath, A. Brandl, D. Hiller, A. Hoppe, U. Gbureck, R.E. Horch, A.R. Boccaccini, U. Kneser, Bioactive copper-doped glass scaffolds can stimulate endothelial cells in co-culture in combination with mesenchymal stem cells, *PLoS One.* 9 (2014) 1.
- [68] X. Zhang, D. Zeng, N. Li, J. Wen, X. Jiang, C. Liu, Y. Li, Functionalized mesoporous bioactive glass scaffolds for enhanced bone tissue regeneration, *Sci. Rep.* 6 (2016) 19361.

- [69] J. Sun, Y. Li, L. Li, W. Zhao, L. Li, J. Gao, M. Ruan, J. Shi, Functionalization and bioactivity in vitro of mesoporous bioactive glasses, *J. Non. Cryst. Solids*. 354 (2008) 3799.
- [70] A. López-Noriega, D. Arcos, M. Vallet-Regí, Functionalizing mesoporous bioglasses for long-term anti-osteoporotic drug delivery, *Chem. - A Eur. J.* 16 (2010) 10879.
- [71] S. Sánchez-Salcedo, A. García, M. Vallet-Regí, Prevention of bacterial adhesion to zwitterionic biocompatible mesoporous glasses, *Acta Biomater.* 57 (2017) 472.
- [72] W. Xia, J. Chang, Well-ordered mesoporous bioactive glasses (MBG): A promising bioactive drug delivery system, *J. Control. Release*. 110 (2006) 522.
- [73] S.H. Tabatabaei, G. Jahanshahi, F. Dehghan Marvasti, Diagnostic challenges of low-grade central osteosarcoma of jaw: a literature review., *J. Dent. (Shiraz, Iran)*. 16 (2015) 62.
- [74] V. Mouriño, J.P. Cattalini, W. Li, A.R. Boccaccini, S. Lucangioli, Multifunctional scaffolds for bone tissue engineering and in situ drug delivery, in: *Tissue Eng. Using Ceram. Polym.*, Elsevier, 2014: pp. 648–675.
- [75] F. Jakob, R. Ebert, A. Ignatius, T. Matsushita, Y. Watanabe, J. Groll, H. Walles, Bone tissue engineering in osteoporosis, *Maturitas*. 75 (2013) 118.
- [76] V. Pierrefite-Carle, S. Santucci-Darmanin, V. Breuil, O. Camuzard, G.F. Carle, Autophagy in bone: Self-eating to stay in balance, *Ageing Res. Rev.* 24 (2015) 206.
- [77] E. Gentleman, J.M. Polak, Historic and current strategies in bone tissue engineering: Do we have a hope in Hench?, *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 17 (2006) 1029.
- [78] Office of the Surgeon General (US), *What is Bone Health in America?*, (2004).
- [79] D. Arcos, A. López-Noriega, E. Ruiz-Hernández, O. Terasaki, M. Vallet-Regí, Ordered Mesoporous Microspheres for Bone Grafting and Drug Delivery, *Chem. Mater.* 21 (2009) 1000.

- [80] O. Murillo, I. Grau, J. Lora-Tamayo, J. Gomez-Junyent, A. Ribera, F. Tubau, J. Ariza, R. Pallares, The changing epidemiology of bacteraemic osteoarticular infections in the early 21st century., *Clin. Microbiol. Infect.* 21 (2015) 254.
- [81] L. Zhao, X. Yan, X. Zhou, L. Zhou, H. Wang, J. Tang, C. Yu, Mesoporous bioactive glasses for controlled drug release, *Microporous Mesoporous Mater.* 109 (2008) 210.
- [82] R. García-Alvarez, I. Izquierdo-Barba, M. Vallet-Regí, 3D scaffold with effective multidrug sequential release against bacteria biofilm, *Acta Biomater.* 49 (2017) 113.
- [83] L. Polo, N. Gómez-Cerezo, E. Aznar, J. Vivancos, F. Sancenón, D. Arcos, M. Vallet-Regí, R. Martínez-Máñez, Molecular gates in mesoporous bioactive glasses for the treatment of bone tumors and infection, *Acta Biomater.* 50 (2017) 114.
- [84] T. Ozaki, Diagnosis and treatment of Ewing sarcoma of the bone: a review article, *J. Orthop. Sci.* 20 (2015) 250.
- [85] G. Bacci, A. Longhi, M. Versari, M. Mercuri, A. Briccoli, P. Picci, Prognostic factors for osteosarcoma of the extremity treated with neoadjuvant chemotherapy: 15-Year experience in 789 patients treated at a single institution, *Cancer.* 106 (2006) 1154.
- [86] A. Luetke, P.A. Meyers, I. Lewis, H. Juergens, Osteosarcoma treatment – Where do we stand? A state of the art review, *Cancer Treat. Rev.* 40 (2014) 523.
- [87] C. Wu, W. Fan, J. Chang, Functional mesoporous bioactive glass nanospheres: synthesis, high loading efficiency, controllable delivery of doxorubicin and inhibitory effect on bone cancer cells, *J. Mater. Chem. B.* 1 (2013) 2710.
- [88] Y. Zhang, X. Wang, Y. Su, D. Chen, W. Zhong, A doxorubicin delivery system: Samarium/mesoporous bioactive glass/alginate composite microspheres, *Mater. Sci. Eng. C.* 67 (2016) 205.
- [89] L. Kyllönen, M. D'Este, M. Alini, D. Eglin, Local drug delivery for enhancing fracture healing in osteoporotic bone, *Acta Biomater.* 11 (2015) 412.
- [90] U.H. Lerner, Bone Remodeling in Post-menopausal Osteoporosis, *J. Dent. Res.* 85 (2006) 584.

- [91] D. Arcos, A.R. Boccaccini, M. Bohner, A. Díez-Pérez, M. Epple, E. Gómez-Barrena, A. Herrera, J.A. Planell, L. Rodríguez-Mañas, M. Vallet-Regí, The relevance of biomaterials to the prevention and treatment of osteoporosis, *Acta Biomater.* 10 (2014) 1793.
- [92] N.M. Appelman-Dijkstra, S.E. Papapoulos, Novel approaches to the treatment of osteoporosis, *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* 28 (2014) 843.
- [93] X. Feng, J.M. McDonald, Disorders of Bone Remodeling, *Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.* 6 (2011) 121.
- [94] P. Makras, S. Delaroudis, A.D. Anastasilakis, Novel therapies for osteoporosis, *Metabolism.* 64 (2015) 1199.
- [95] A.J. Salinas, P. Esbrit, M. Vallet-Regí, A tissue engineering approach based on the use of bioceramics for bone repair, *Biomater. Sci.* 1 (2013) 40.
- [96] E. V Giger, B. Castagner, J. Leroux, Biomedical applications of bisphosphonates, *J. Control. Release.* 167 (2013) 175.
- [97] J.L. Paris, J. Román, M. Manzano, M. V. Cabñas, M. Vallet-Regí, Tuning dual-drug release from composite scaffolds for bone regeneration, *Int. J. Pharm.* 486 (2015) 30.
- [98] D.B. Raina, D. Larsson, F. Mrkonjic, H. Isaksson, A. Kumar, L. Lidgren, M. Tägil, Gelatin- hydroxyapatite- calcium sulphate based biomaterial for long term sustained delivery of bone morphogenic protein-2 and zoledronic acid for increased bone formation: In-vitro and in-vivo carrier properties, *J. Control. Release.* 272 (2018) 83.
- [99] M. Zhu, J. Shi, Q. He, L. Zhang, F. Chen, Y. Chen, An emulsification-solvent evaporation route to mesoporous bioactive glass microspheres for bisphosphonate drug delivery, *J. Mater. Sci.* 47 (2012) 2256.
- [100] F. Griffiths, V. Mason, F. Boardman, K. Dennick, K. Haywood, J. Achten, N. Parsons, X. Griffin, M. Costa, Evaluating recovery following hip fracture: a qualitative interview study of what is important to patients., *BMJ Open.* 5 (2015) e005406.

- [101] D. Tang, R.S. Tare, L.-Y. Yang, D.F. Williams, K.-L. Ou, R.O.C. Oreffo, Biofabrication of bone tissue: approaches, challenges and translation for bone regeneration, *Biomaterials*. 83 (2016) 363.
- [102] M. Vallet-Regí, A.J. Salinas, Chapter 17. Mesoporous Bioactive Glasses in Tissue Engineering and Drug Delivery, in: 2016: pp. 393–419.
- [103] Z. Min, Z. Shichang, X. Chen, Z. Yufang, Z. Changqing, 3D-printed dimethyloxallyl glycine delivery scaffolds to improve angiogenesis and osteogenesis, *Biomater. Sci.* 8 (2015) 1236.
- [104] C. Wu, Y. Zhou, M. Xu, P. Han, L. Chen, J. Chang, Y. Xiao, Copper-containing mesoporous bioactive glass scaffolds with multifunctional properties of angiogenesis capacity, osteostimulation and antibacterial activity, *Biomaterials*. 34 (2013) 422.
- [105] V. Karageorgiu, D. Kaplan, Porosity of 3D biomaterial scaffolds and osteogenesis, *Biomaterials*. 26 (2005) 5474.
- [106] F. Baino, G. Novajra, C. Vitale-Brovarone, *Bioceramics and Scaffolds: A winning Combination for Tissue engineering*, *Front. Bioeng. Biotechnol.* 3 (2015) 202.
- [107] A.R. Amini, C.T. Laurencin, S.P. Nukavarapu, Bone tissue engineering: recent advances and challenges., *Crit. Rev. Biomed. Eng.* 40 (2012) 363.
- [108] S.M. Peltola, F.P.W. Melchels, D.W. Grijpma, M. Kellomäki, A review of rapid prototyping techniques for tissue engineering purposes, *Ann. Med.* 40 (2008) 268.
- [109] D.W. Hutmacher, Scaffolds in tissue engineering bone and cartilage, *Biomaterials*. 21 (2000) 2529.
- [110] A.A. White, S.M. Best, Properties and characterisation of bone repair materials, in: D.L. and A.M. JA Panne,l A.A White (Ed.), *Bone Repair Biomater.*, Elsevier, Cambridge, UK, 2009: pp. 121–153.
- [111] S. Samavedi, A.R. Whittington, A.S. Goldstein, Calcium phosphate ceramics in bone tissue engineering: A review of properties and their influence on cell behavior, *Acta Biomater.* 9 (2013) 8037.

- [112] M.C. Matesanz, J. Linares, I. Lilue, S. Sánchez-Salcedo, M.J. Feito, D. Arcos, M. Vallet-Regí, M.T. Portolés, Nanocrystalline silicon substituted hydroxyapatite effects on osteoclast differentiation and resorptive activity, *J. Mater. Chem. B.* 2 (2014) 2910.
- [113] S. Viguet-Carrin, P. Garnero, P.D. Delmas, The role of collagen in bone strength, *Osteoporos. Int.* 17 (2006) 319.
- [114] V. Mouriño, A.R. Boccaccini, Bone tissue engineering therapeutics: controlled drug delivery in three-dimensional scaffolds., *J. R. Soc. Interface.* 7 (2010) 209.
- [115] S.M. Giannitelli, D. Accoto, M. Trombetta, A. Rainer, Current trends in the design of scaffolds for computer-aided tissue engineering., *Acta Biomater.* 10 (2014) 580.
- [116] V. FitzGerald, R.A. Martin, J.R. Jones, D. Qiu, K.M. Wetherall, R.M. Moss, R.J. Newport, Bioactive glass sol-gel foam scaffolds: Evolution of nanoporosity during processing and in situ monitoring of apatite layer formation using small- and wide-angle X-ray scattering, *J. Biomed. Mater. Res. Part A.* 91A (2009) 76.
- [117] S.M. Giannitelli, P. Mozetic, M. Trombetta, A. Rainer, Combined additive manufacturing approaches in tissue engineering, *Acta Biomater.* 24 (2015) 1.
- [118] I. Izquierdo-barba, Scaffold designing, M. Vallet-Regí (Eds). *Bio-ceramics with clinical applications* John Wiley & Sons, United Kingdom, 2014, pp. 292–313.
- [119] F. Baino, S. Fiorilli, C. Vitale-Brovarone, Bioactive glass-based materials with hierarchical porosity for medical applications: Review of recent advances, *Acta Biomater.* 42 (2016) 18.
- [120] J.A. Inzana, D. Olvera, S.M. Fuller, J.P. Kelly, O.A. Graeve, E.M. Schwarz, S.L. Kates, H.A. Awad, 3D printing of composite calcium phosphate and collagen scaffolds for bone regeneration, *Biomaterials.* 35 (2014) 4026
- [121] C. Wu, Y. Luo, G. Cuniberti, Y. Xiao, M. Gelinsky, Three-dimensional printing of hierarchical and tough mesoporous bioactive glass scaffolds with a controllable pore architecture, excellent mechanical strength and mineralization ability., *Acta Biomater.* 7 (2011) 2644.

- [122] P.S.P. Poh, D.W. Hutmacher, B.M. Holzapfel, A.K. Solanki, M.M. Stevens, M.A. Woodruff, In vitro and in vivo bone formation potential of surface calcium phosphate-coated polycaprolactone and polycaprolactone/bioactive glass composite scaffolds, *Acta Biomater.* 30 (2016) 319.
- [123] N. Gómez-Cerezo, S. Sánchez-Salcedo, I. Izquierdo-Barba, D. Arcos, M. Vallet-Regí, In vitro colonization of stratified bioactive scaffolds by pre-osteoblast cells, *Acta Biomater.* 44 (2016) 73.
- [124] M. Zhu, L. Zhang, Q. He, J. Zhao, G. Limin, J. Shi, Mesoporous bioactive glass-coated poly(l-lactic acid) scaffolds: A sustained antibiotic drug release system for bone repairing, *J. Mater. Chem.* 21 (2011) 1064.
- [125] C. Soundrapandian, A. Mahato, B. Kundu, S. Datta, B. Sa, D. Basu, Development and effect of different bioactive silicate glass scaffolds: In vitro evaluation for use as a bone drug delivery system., *J. Mech. Behav. Biomed. Mater.* 40C (2014) 1.
- [126] F.J. Martínez-Vázquez, M. V. Cabañas, J.L. Paris, D. Lozano, M. Vallet-Regí, Fabrication of novel Si-doped hydroxyapatite/gelatine scaffolds by rapid prototyping for drug delivery and bone regeneration, *Acta Biomater.* 15 (2015) 200.
- [127] J.D. Kretlow, L. Klouda, Injectable matrices and scaffolds for drug delivery in tissue engineering, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 59 (2007) 263.
- [128] R. Dorati, A. DeTrizio, T. Modena, B. Conti, F. Benazzo, G. Gastaldi, I. Genta, Biodegradable scaffolds for bone regeneration combined with drug-delivery systems in osteomyelitis therapy, *Pharmaceuticals.* 10 (2017) 1.
- [129] M. Cicuéndez, J.C. Doadrio, A. Hernández, M.T. Portolés, I. Izquierdo-Barba, M. Vallet-Regí, Multifunctional pH sensitive 3D scaffolds for treatment and prevention of bone infection, *Acta Biomater.* 65 (2018) 450.
- [130].N. Mas, D. Arcos, L. Polo, E. Aznar, S. Sánchez-Salcedo, F. Sancenón, A. García, M.D. Marcos, A. Baeza, M. Vallet-Regí, R. Martínez-Máñez, Towards the Development of Smart 3D “Gated Scaffolds” for On-Command Delivery, *Small.* 10 (2014) 4859.

- [131] M. Vallet-Regí, E. Ruiz-Hernández, Bioceramics: From bone regeneration to cancer nanomedicine, *Adv. Mater.* 23 (2011) 5177.
- [132] C. Fauchoux, E. Verron, A. Soueidan, S. Josse, M.D. Arshad, P. Janvier, P. Pilet, J.M. Bouler, B. Bujoli, J. Guicheux, Controlled release of bisphosphonate from a calcium phosphate biomaterial inhibits osteoclastic resorption in vitro., *J Biomed Mater Res A.* 89 (2009) 46.
- [133] C. Wu, Y. Zhou, W. Fan, P. Han, J. Chang, J. Yuen, M. Zhang, Y. Xiao, Hypoxia-mimicking mesoporous bioactive glass scaffolds with controllable cobalt ion release for bone tissue engineering., *Biomaterials.* 33 (2012) 2076.
- [134] Y. Su, Q. Su, W. Liu, M. Lim, J.R. Venugopal, X. Mo, S. Ramakrishna, S.S. Al-Deyab, M. El-Newehy, Controlled release of bone morphogenetic protein 2 and dexamethasone loaded in core-shell PLLACL-collagen fibers for use in bone tissue engineering, *Acta Biomater.* 8 (2012) 763.
- [135] Z. Min, L. Kun, Z. Yufang, Z. Jianhua, Y. Xiaojian, 3D-printed hierarchical scaffold for localized isoniazid/rifampin drug delivery and osteoarticular tuberculosis therapy, *Acta Biomater.* 16 (2015) 145.
- [136] M. Manzano, D. Lozano, D. Arcos, S. Portal-Núñez, C.L. La Orden, P. Esbrit, M. Vallet-Regí, Comparison of the osteoblastic activity conferred on Si-doped hydroxyapatite scaffolds by different osteostatin coatings, *Acta Biomater.* 7 (2011) 3555.
- [137] W. Tang, D. Lin, Y. Yu, H. Niu, H. Guo, Y. Yuan, C. Liu, Bioinspired trimodal macro/micro/nano-porous scaffolds loading rhBMP-2 for complete regeneration of critical size bone defect, *Acta Biomater.* 32 (2016) 309.
- [138] S. Bose, S. Tarafder, A. Bandyopadhyay, Effect of Chemistry on Osteogenesis and Angiogenesis Towards Bone Tissue Engineering Using 3D Printed Scaffolds, *Ann. Biomed. Eng.* 45 (2017) 261.

2. Objetivos/ Objectives

“En algún lugar, algo increíble está esperando ser conocido.”

-Carl Sagan.

Objetivos

El objetivo general de esta tesis ha sido el diseño, síntesis y caracterización de vidrios mesoporosos bioactivos como implantes para el tratamiento de defectos óseos producidos por patologías asociadas este tejido. Ese objetivo general se subdivide a su vez en los siguientes objetivos concretos:

1. Optimización de las propiedades de MBGs para regeneración ósea a través del control de su estructura porosa y su composición química.
 - Estudio de la influencia del agente director de estructura en las propiedades texturales y estructurales de vidrios mesoporosos de composición $85\text{SiO}_2\text{-}10\text{CaO-}5\text{P}_2\text{O}_5$ (% mol).
 - Estudio de la influencia de la composición química en las propiedades texturales y estructurales de vidrios mesoporosos bioactivos.
 - Evaluación de la respuesta *in vitro* de tipo osteoblastos, osteoclastos y macrófagos en contacto con vidrios mesoporosos bioactivos.
 - Estudio de la influencia de la incorporación de iones terapéuticos Sr(II), Co(II) y Cu(II) en la estructura mesoporosa por el método EISA.
 - Evaluación de la incorporación de iones Ga(III) por medio de impregnación post-síntesis a vidrios mesoporosos para el tratamiento de defectos óseos en hueso osteoporótico.
2. Desarrollo de MBGs como matrices para la liberación controlada de fármacos en el tratamiento de osteosarcoma e infección.
 - Diseño, síntesis, caracterización y evaluación *in vitro* de una compuerta sensible a fosfatasa alcalina para la liberación controlada de un antitumoral (doxorrubicina).
 - Diseño, síntesis, caracterización y evaluación *in vitro* de una compuerta sensible a proteasas para liberación controlada de un antibiótico (levofloxacino).
3. Diseño y preparación de andamios tridimensionales de vidrio mesoporoso bioactivo con alto contenido en calcio y ϵ -poli-caprolactona para la regeneración de defectos óseos en condiciones osteoporóticas.

- Preparación andamios tridimensionales ordenados a partir de composites de vidrios mesoporosos bioactivos con alto contenido en calcio (37 % en mol) y ϵ -policaprolactona.
- Evaluación *in vitro* de la migración celular hacia zonas menos disponibles de la superficie de los andamios en ausencia de flujo dinámico.
- Evaluación del comportamiento *in vivo* en un modelo ovino osteoporótico y del efecto de la liberación de ácido zoledrónico a nivel local.

Objectives

The general objective of this thesis has been the design, synthesis and characterization of mesoporous bioactive glasses as implants for the treatment of bone defects produced by pathologies associated with this tissue. This overall objective is further subdivided into the following specific objectives:

1. Optimization of the properties of MBGs for bone regeneration through the control of their porous structure and chemical composition.

- Study of the influence of the structural agent on the textural and structural properties of mesoporous glasses with $85\text{SiO}_2\text{-}10\text{CaO-}5\text{P}_2\text{O}_5$ composition (% mol).
- Study of the influence of chemical composition on the textural and structural properties of bioactive mesoporous glasses.
- Evaluation of the *in vitro* response of osteoblasts, osteoclasts and macrophages in contact with bioactive mesoporous glasses.
- Study of the influence of the incorporation of therapeutic ions Sr(II), Co(II) and Cu(II) in the mesoporous structure by the EISA method.
- Evaluation of the incorporation of Ga(III) ions by means of post-synthesis impregnation to mesoporous glasses for the treatment of bone defects in osteoporotic bone.

2. Development of GBMs as matrices for the controlled release of drugs in the treatment of osteosarcoma and infection.

- Design, synthesis, characterization and *in vitro* evaluation of a gate sensitive to alkaline phosphatase for the controlled release of an antitumor (doxorubicin).
- Design, synthesis, characterization and *in vitro* evaluation of a protease sensitive gateway for controlled release of an antibiotic (levofloxacin).

3. Design and preparation of three-dimensional scaffolds made of bioactive mesoporous glass with high calcium content and ϵ -polycaprolactone for the regeneration of bone defects in osteoporotic conditions.

- Preparation of three-dimensional scaffolds ordered from bioactive mesoporous glass composites with high calcium content (37% mol.) and ϵ -polycaprolactone.
- *In vitro* evaluation of cell migration to less available areas on the scaffold surface in the absence of dynamic flow.
- Evaluation of *in vivo* behaviour in an osteoporotic sheep model and the effect of zoledronic acid release locally.

3. Resultados y discusión

Soy de las que piensan que la ciencia tiene una gran belleza. Un científico en su laboratorio no es sólo un técnico: es también un niño colocado ante fenómenos naturales que le impresionan como un cuento de hadas.

-Marie Curie.

3.1 Optimización de la respuesta celular a través del control de la estructura porosa y la composición química de MBGs

3. Resultados y discusión

3.1 Optimización de la respuesta celular a través del control de la estructura porosa y la composición química de MBGs.

3.1.1 Introducción y antecedentes

El desarrollo de materiales bioactivos para regeneración ósea ha experimentado grandes avances en los últimos años, especialmente en el campo de la traumatología y la cirugía maxilofacial. Las biocerámicas bioactivas presentan superficies reactivas capaces de unirse fuertemente al tejido vivo mediante la nucleación y el crecimiento de una fase apatita en la interfaz tejido-material. Dicha fase induce la fijación del material con el hueso y dependiendo del grado de resorción puede promover la regeneración del tejido [1,2].

Los MBGs se engloban en este grupo de biomateriales. Sus excelentes propiedades texturales, tales como elevada superficie específica, y composición química favorecen procesos bioactivos más rápidos e intensos en comparación con otras biocerámicas [3,4] en condiciones *in vitro*. Este comportamiento debe traducirse en mejor comportamiento *in vivo* en términos de osteointegración, osteoinducción y osteoconducción.

Metabolismo óseo

Los procesos de remodelado óseo son imprescindibles para el mantenimiento del esqueleto. Se estima que el 10 % del esqueleto de un adulto se renueva cada año, por lo que las células implicadas en el proceso de regeneración (osteoblastos y osteoclastos) están activas constantemente. La respuesta celular en contacto con los materiales es especialmente relevante pues determina el éxito del material como implante *in vivo*. La **figura 1** muestra una representación de las células implicadas en los procesos de formación y remodelación ósea.

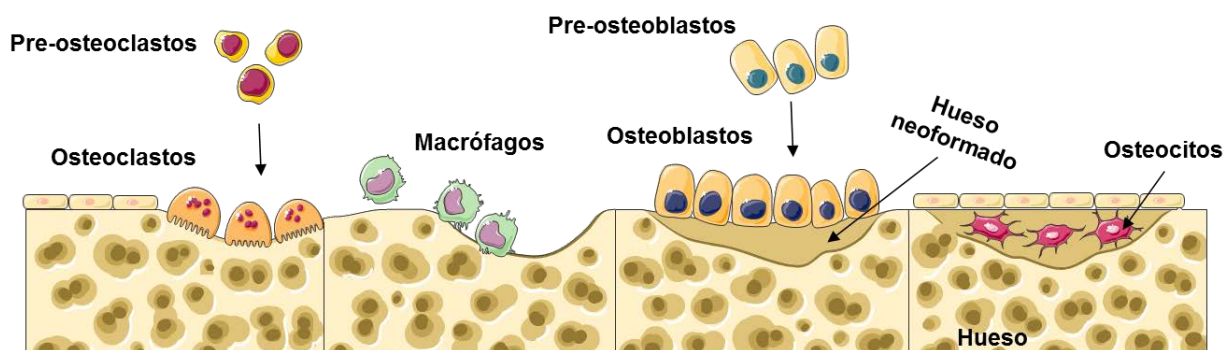


Figura 1. Representación de los diferentes tipos celulares implicados en la remodelación ósea.

Los **osteoblastos** son las células implicadas en la formación de matriz ósea orgánica, produciendo colágeno de tipo I entre otros factores. Su función incluye favorecer el desarrollo del hueso, su reparación y su mantenimiento. El complejo citoesqueleto de los osteoblastos, permite su adhesión y movilidad en la superficie del hueso, lo que favorece las interacciones y la coordinación entre ellos [5].

Los **osteocitos** son osteoblastos maduros que han quedado rodeados por la matriz ósea. Su función es la de mantener las actividades celulares del tejido óseo facilitando el intercambio de nutrientes y productos de deshecho[6].

Los **osteoclastos** son células multinucleadas que se diferencian de las células madre hematopoyéticas del linaje monocito/macrofágico, cuya función es la de reabsorción ósea [7]. Su mecanismo de actuación se inicia con la señal de activación que reciben en su membrana celular a través del ligando factor nuclear kappa-B RANKL [8]. Este agente induce la fusión de los pre-osteoclastos, que se convierten en células multinucleadas, y a la formación de su membrana celular rica en F-actina, en forma ondulada, responsable de la unión de los osteoclastos con la superficie ósea esencial para que la resorción ósea tenga lugar [9]. Tras la fijación de los osteoclastos en la superficie del hueso se produce la liberación de enzimas como la Cathepsina K y de protones que acidifican el medio hasta llegar a pH ácido y degradando la matriz ósea (colágeno) y el componente mineral del tejido (HCA) (Figura 2) [10,11].

El equilibrio entre la formación y la reabsorción ósea es esencial en el remodelado del tejido, lo que es determinante para un correcto metabolismo óseo. Desequilibrios entre ambos procesos pueden dar lugar al deterioro óseo, provocando patologías como la

osteoporosis [10]. El proceso osteogénico viene determinado por la liberación al medio de diversos marcadores celulares por parte de todas las células implicadas en él. Conocer de los mecanismos de actuación de osteoclastos y osteoblastos ha ayudado a predecir el comportamiento de los materiales *in vivo* [12].

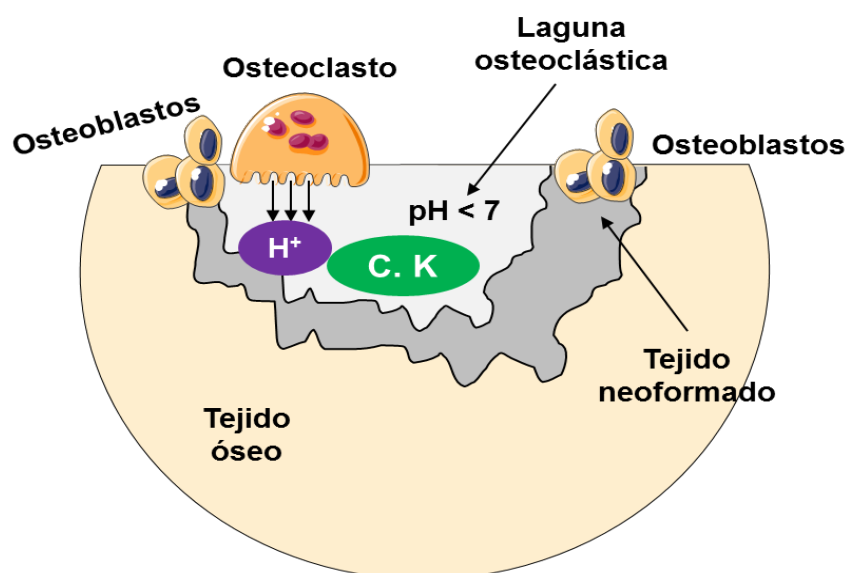


Figura 2. Representación del proceso de remodelación en el tejido óseo.

Por otra parte, el estudio de la osteoinmunología ha revelado la importancia de la respuesta inmune en el proceso regenerativo óseo [13]. Conocer el mecanismo de actuación de células como los macrófagos es determinante para poder predecir el comportamiento *in vivo* de los materiales tras implantarlos.

Recientemente, se ha descubierto que la respuesta inmune de los **macrófagos** juega un papel fundamental en la regeneración y por lo tanto en el comportamiento *in vivo* de los materiales [14,15]. Tras la implantación de un biomaterial *in vivo* es necesario que se produzca la respuesta inflamatoria para desencadenar el proceso de curación del tejido, pero debe controlarse para evitar inflamaciones crónicas que impedirían la regeneración ósea. Este proceso viene mediado porque macrófagos pueden polarizarse hacia dos fenotipos diferentes, M1 o M2 [16,17].

El fenotipo M1 se asocia con procesos pro-inflamatorios que pueden dar lugar a una respuesta inmune, a partir de la cual diferentes citoquinas, óxidos de nitrógeno y especies reactivas de hidrógeno son liberadas al medio pudiendo dar lugar al a la

formación de una capsula fibrosa que produzca un rechazo del implante por parte del organismo receptor. El fenotipo M2, también llamado reparativo, está asociado a procesos de regeneración de tejido. La polarización de los macrófagos hacia el fenotipo M2 en contacto con los materiales favorecería la secreción de citoquinas, factores de crecimiento y proteínas que regulan la formación de hueso activando las células mesenquimales vía osteoprotegerina (OPG) y pudiendo reducir y regular la formación de la cápsula fibrosa. Aunque tras implantar *in vivo* un material siempre se produce una respuesta inflamatoria, esta etapa debe ser lo más reducida posible. De esta forma, los materiales deberían inducir la polarización de los macrófagos hacia fenotipos no inflamatorios, mejorando así las posibilidades de éxito.

Características físico-químicas de los MBGs

En 2004 el grupo de investigación del profesor Zhao publicó la síntesis del primer MBG en el sistema $\text{SiO}_2\text{-CaO-P}_2\text{O}_5$ [18]. Para ello se combinaron los procesos de síntesis de SiO_2 mesoporosa con las propiedades de los vidrios bioactivos desarrollados hasta la fecha [19]. La incorporación de un agente director de estructura (SDA) a la síntesis de los MBGs da como resultado la obtención de una mesofase ordenada por la auto-organización del SDA en micelas. Por ello se llevó a cabo la síntesis mediante el método EISA, descrito en el capítulo anterior.

Como se ha mencionado en la introducción, los SDA son moléculas tenso-activas que se caracterizan por presentar una parte polar o hidrofílica y otra apolar o hidrofóbica en su estructura. Estas moléculas tienen la capacidad de autoasociarse en disolución para formar diversas estructuras como bicapas, esferas, cilindros... [20–22]. La estructura de los SDA influye en los parámetros de empaquetamiento de los surfactantes y por lo tanto en la forma que estas moléculas tienen de agruparse en disolución. Este comportamiento varía para cada disolvente y es específico para cada surfactante, por lo que con similares SDA se pueden obtener materiales con estructuras porosas muy variadas [23–25]. Los SDA utilizados para la obtención de MBGs se pueden clasificar en iónicos y no iónicos:

- **Iónicos:**

- **Catiónicos:** poseen un grupo de cabeza hidrofílica con carga positiva, generalmente un grupo alquilamonio y una cadena hidrocarbonada de cadena larga para formar la zona hidrófoba. Como ejemplo destaca el CTAB.

○ **Aniónicos:** poseen un grupo de cabeza hidrofílica con carga negativa, generalmente grupos fosfato, sulfato o carboxilato y una cadena hidrocarbonada de cadena larga para formar la zona hidrófoba. Como ejemplo destaca el dodecil sulfato de sodio (SDS).

○ **Neutros/ anfóteros:** poseen una cabeza polar que es una amina protonable y una cola hidrófoba formada por una cadena hidrocarbonada larga.

● **No iónicos:** no contienen grupos iónicos o ionizables en condiciones normales. Poseen una cadena alifática y una cadena polar, normalmente compuesta por grupos etoxilados o polietilenglicol. Este tipo de surfactantes pueden ser denominados poliméricos, destacan los surfactantes tipo Pluronic®.

El uso del SDA es determinante en las propiedades texturales finales de los MBGs y por lo tanto en sus posibles aplicaciones. De este modo, resulta esencial estudiar el comportamiento del SDA en disolución y su interacción con los precursores de los MBGs [20]. Las especies solubles precursoras de SiO₂, CaO y P₂O₅ se condensan en torno a las micelas, que actúan como plantilla orgánica, conduciendo a estructuras mesoporosas ordenadas tras su calcinación (etapa en la que se elimina la materia orgánica). Los MBGs obtenidos de este modo presentan hasta cinco veces más porosidad y poseen superficies específicas superiores a las de los vidrios sol-gel tradicionales [26].

De forma esquemática se puede describir el comportamiento del SDA en el método EISA en los siguientes pasos:

1. Añadir el SDA en la mezcla hidroalcohólica en concentración más baja de la cmc.
2. Adición de los precursores del MBG en forma de sus especies solubles Tetraetilortosilicato (TEOS), Trietilfosfato (TEP) y Ca(NO₃)₂.
3. Evaporación del disolvente a temperatura ambiente, para concentrar paulatinamente la disolución y permite alcanzar la concentración micelar crítica.
4. Autoensamblaje del SDA: las propiedades químicas de los surfactantes en disolución favorecen que las moléculas se organicen de forma espontánea mediante interacciones no covalentes (enlaces de hidrogeno, fuerzas de Van Der Waals...) sin intervención de agentes externos.
5. Obtención de una mesofase ordenada compuesta por híbridos orgánico-inorgánico del MBG en forma de gel.

6. Calcinación para eliminar los restos orgánicos y el SDA para obtener sistemas altamente porosos con composición $\text{SiO}_2\text{-CaO-P}_2\text{O}_5$.

Composición química de los MBGs

Desde el año 2004 la gran mayoría de los MBGs se han preparado en el sistema $\text{SiO}_2\text{-CaO-P}_2\text{O}_5$, donde los contenidos en SiO_2 , CaO y P_2O_5 varían dentro de unos intervalos que se recogen en la **tabla 1**. Estas composiciones químicas favorecen la formación de hueso, pues las especies solubles de calcio y sílice dan lugar a la formación de una nueva fase mineral en superficie así como la estimulación de mecanismos de osteoinducción. A pH fisiológico la fase que precipita es semejante a la que forma el tejido óseo, es decir HCA nanocristalina, lo que facilita la formación de enlaces químicamente fuertes con el tejido óseo [27–29].

Tabla 1. MBGs descritos en la bibliografía durante los últimos años

Composición (% mol)	SDA	Temp (°C)	Simetría	S _{BET} (m ² /g)	V _p (cm ³ /g)	D _p (nm)	Ref
58SiO ₂ -37CaO-5P ₂ O ₅	P123	40	Hexagonal 2D (p6mm)	195	0.46	9.45	[30]
58SiO ₂ -37CaO-5P ₂ O ₅	F127	30	Desordenada	178	0.29	5.6	[31]
70SiO ₂ -25CaO-5P ₂ O ₅	F127	T ^a amb	Desordenada	300	0.36	5.0	[18]
75SiO ₂ -20CaO-5P ₂ O ₅	P123	40	Hexagonal 2D P6mm/ortorrómbica (p2mm)	393	0.61	5.37	[30]
75SiO ₂ -20CaO-5P ₂ O ₅	F127	40	Cúbica (Im-3m)	400-500	0.25-0.53	3.2-5.4	[32]
80SiO ₂ -10CaO-5P ₂ O ₅	P123	T ^a amb	Hexagonal 2D (p6mm)	229	0.31	5.2	[33]
80SiO ₂ -15CaO-5P ₂ O ₅	P123	T ^a amb	Hexagonal 2D (p6mm)	351	0.49	1.6	[34]
80SiO ₂ -15CaO-5P ₂ O ₅	PN430 +Brij70	T ^a amb	Hexagonal 2D (p6mm)	485	0.27	<2	[34]
80SiO ₂ -15CaO-5P ₂ O ₅	P85	T ^a amb	Hexagonal 2D (p6mm)	328	0.36	5.0	[34]
85SiO ₂ -10CaO-5P ₂ O ₅	P123	40	Cúbica (Ia-3d)	427	0.61	5.73	[30]
85SiO ₂ -10CaO-5P ₂ O ₅	F68	T ^a amb	Hexagonal 2D (p6mm)	261	0.38	3.36	[35]
90SiO ₂ -5CaO-5P ₂ O ₅	P123	40	Hexagonal 2D (p6mm)	338	0.46	5.37	[33]

En los sistemas SiO₂-CaO-P₂O₅ cada componente tiene una función en la regeneración ósea [26]. El silicio es esencial en procesos metabólicos de formación y calcificación de hueso, en disolución acuosa induce la precipitación de HCA en el tejido óseo y estimula la formación de colágeno tipo I [36–38]. El calcio favorece la proliferación osteoblástica, la diferenciación y la mineralización de la matriz extracelular [39]. Se ha

demostrado en experimentos *in vivo* que la presencia de calcio incrementa la formación de hueso, la densidad ósea y la osteointegración [40]. El fósforo actúa estimulando la expresión de la proteína gla de matriz (MGP) que actúa como inhibidora de la calcificación. Además forma parte de los fosfatos de calcio, cuya solubilidad afecta a la diferenciación celular hacia fenotipos osteoblásticos [41].

La figura 3 indica de forma esquemática la función que cada componente presenta en la estructura de los MBGs y se especifica la función de cada uno de ellos en el proceso de regeneración ósea.

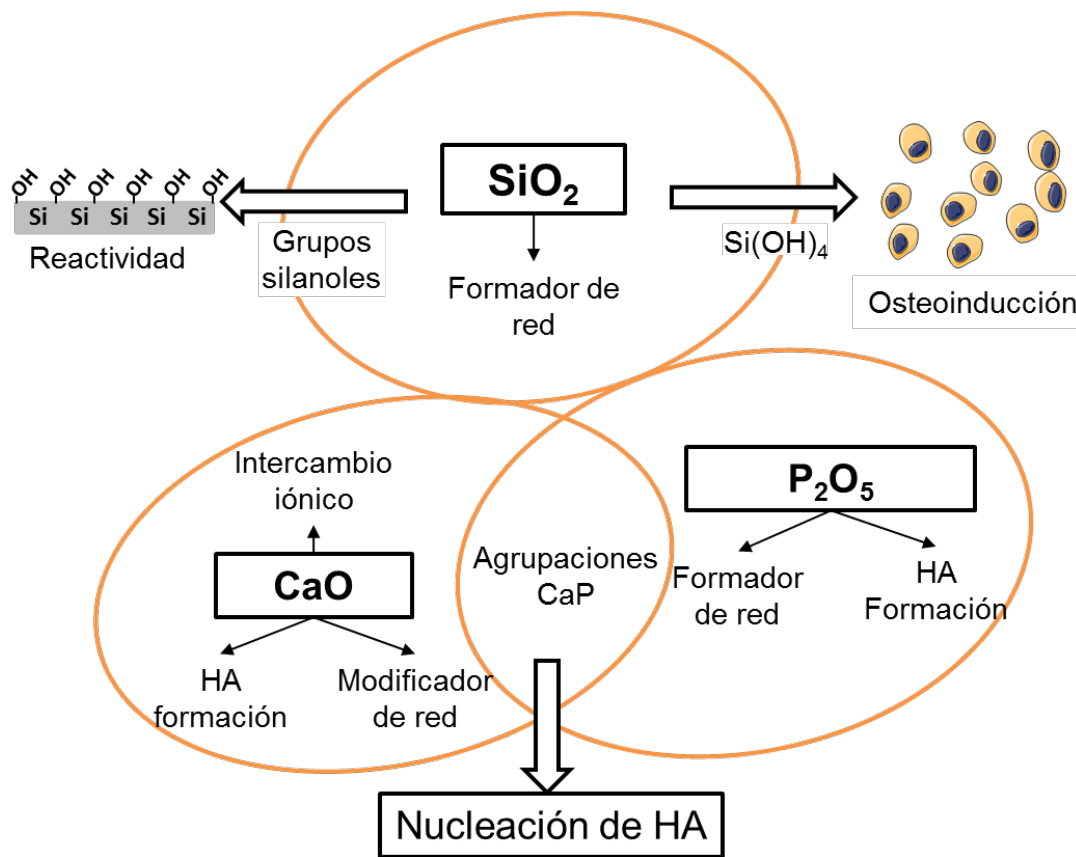


Figura 3. Resumen de los componentes de los MBGs en el sistema SiO₂-CaO-P₂O₅.

Propiedades de la estructura mesoporosa y entornos locales de los MBGs

La obtención de MBGs en el sistema $\text{SiO}_2\text{-CaO-P}_2\text{O}_5$ por el método EISA da lugar a estructuras porosas con diferentes ordenamientos que pueden controlarse a través de los siguientes factores:

- Composición química [42,43].
- Temperatura de evaporación durante el proceso EISA [43].
- Tipo de surfactante y su concentración [44,45].

Controlando los factores anteriores es posible obtener MBGs con elevadas superficies específicas y altamente porosos, lo que permite que se aceleren las reacciones químicas en la superficie de los implantes y, en consecuencia exhiban el comportamiento bioactivo más rápido observado hasta ahora en el campo de las biocerámicas [46]. Por otra parte, la estructura mesoporosa ordenada convierte a estos materiales en candidatos como sistemas de agentes activos como antibióticos [44], antiosteoporóticos [47] o antitumorales [48].

Respecto al control de la estructura porosa con la composición química se demostró que manteniendo constante la relación $\text{SiO}_2+\text{P}_2\text{O}_5/\text{surfactante}$ las variaciones en el contenido de CaO daban lugar estructuras diferentes. Con elevadas cantidades de CaO se favorecían fases hexagonales del tipo $p6mm$, mientras que bajas cantidades de CaO favorecen la formación de estructuras mesoporosas cúbica del tipo $Ia-3d$ (figura 4), características de entornos hidrófobos especialmente cuando la evaporación se produce a temperaturas mayores de la ambiente [42,43].

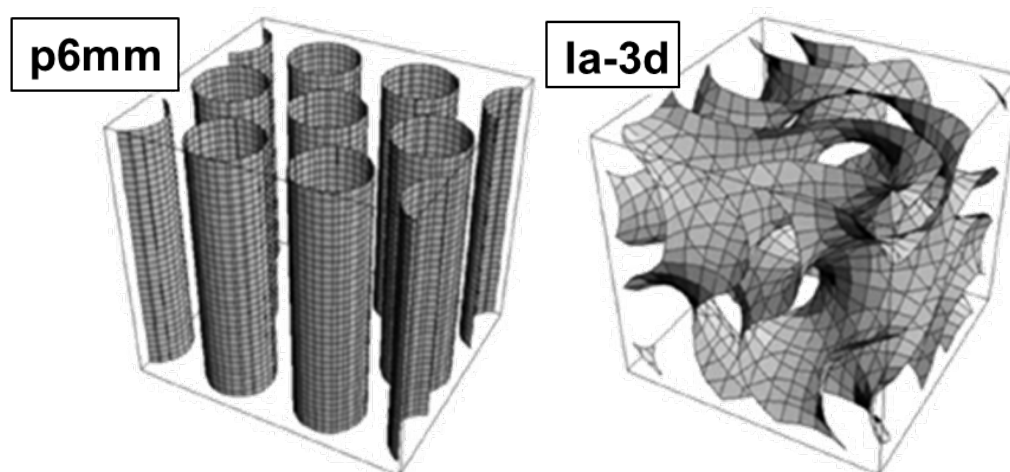


Figura 4. Representación de las estructuras mesoporosas descritas al obtener MBGs, adaptada de la referencia [49].

El interés derivado de la obtención de diferentes estructuras en sistemas multicomponentes está íntimamente ligado con las aplicaciones biomédicas de los materiales. La bioactividad es un proceso que tiene lugar en la interfaz tejido-implante y la superficie disponible determina la cinética y el tipo de reacción que tiene lugar en dicha interfaz. La difusión de materia se ve favorecida por estructuras tridimensionales comparado con los empaquetamientos planos [50]. El diferente comportamiento bioactivo es una de las principales diferencias entre los vidrios sol-gel y los MBGs. En los vidrios sol-gel el comportamiento bioactivo está asociado principalmente a la composición química mientras que en los MBGs las propiedades estructurales y texturales juegan un papel destacable que está directamente relacionado con la bioactividad [51].

La estructura mesoporosa de los MBGs puede ser descrita como una organización de mesoporos con tamaños entre 3 y 9 nm en el sistema $\text{SiO}_2\text{-CaO-P}_2\text{O}_5$. La anchura de la pared de los poros depende directamente del SDA utilizado aunque suele estar en torno a los 3 nm y determina la presencia de ciertas heterogeneidades en los entornos locales del MBG [43].

Los estudios de RMN de sólido realizados por Leonova *et al.* han arrojado luz sobre el entorno químico de los componentes de los MBGs. Los espectros de RMN- ^{31}P para MBGs del sistema $\text{SiO}_2\text{-CaO-P}_2\text{O}_5$ muestra una única resonancia a 2 ppm (q^0) asignable

a ortofosfatos lo que indica que la mayoría del fósforo se encuentra dispuesto en agrupaciones de ortofosfato de calcio distribuidas por la matriz [52].

Por su parte los estudios de RMN- ^{29}Si han aportado información sobre la conectividad de la red de sílice [43]. Estos experimentos ponen de manifiesto que MBGs con contenidos en CaO del 10 % en moles presentan conectividades de red en torno a 3.7, mientras que composiciones con contenidos en CaO del 37 % en mol muestran conectividades de red en torno a 3.2. Esto es indicativo de que el CaO actúa como modificador de la red de sílice, lo que disminuye su conectividad. Asimismo estudios de RMN- ^{29}Si de polarización cruzada con H^1 han desmotrado que el calcio se dispone principalmente en la superficie de los poros, mientras que las unidades más condensadas de sílice se encuentran en la parte interna de la pared [29,52]. La **figura 5** muestra una representación esquemática que resume los estudios descritos sobre la estructura mesoporosa, la composición y el entorno químico de los MBGs.

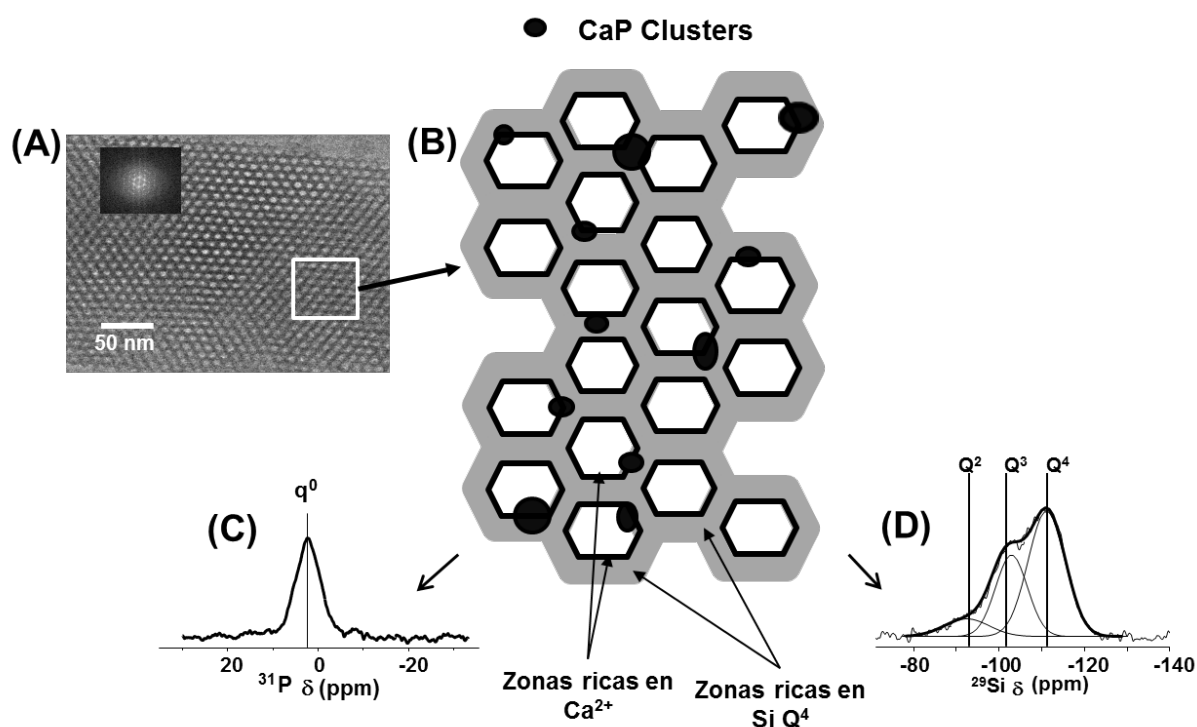


Figura 5. Imagen de TEM (A), representación esquemática del entorno químico (B), espectro de pulso simple de RMN- ^{31}P (C), espectro de pulso simple de RMN- ^{29}Si (D) de un MBG en el sistema $\text{SiO}_2\text{-CaO-P}_2\text{O}_5$.

Bioactividad in vitro de los MBGs

Como se ha explicado en el capítulo uno las propiedades regenerativas de los vidrios bioactivos dependen en gran medida de su capacidad para intercambiar iones con el medio circundante, principalmente Ca^{2+} - H^+ . Estas reacciones dan como resultado la nucleación y el crecimiento de una fase HCA, muy similar al componente mineral del hueso y la dentina que recubre los dientes sobre la superficie de los materiales. Por otra parte, la liberación de especies solubles de sílice al medio, como ácido ortosilícico y oligómeros del mismo, tiene un fuerte efecto osteoinductor [53]. Tras las investigaciones del grupo del profesor Kokubo en 1990 se estableció que cualquier material capaz de formar una fase tipo apatita cuando se sumerge en SBF, es susceptible de presentar bioactividad en condiciones *in vivo* [54], es decir, los materiales se unirán al hueso [55].

En el caso de los vidrios de fusión y los vidrios sol-gel, el contenido de calcio es posiblemente el parámetro más importante en la formación de la capa de HCA. Sin embargo, en el caso de los MBGs esta secuencia de reacciones se acelera como consecuencia de las elevadas áreas superficiales y porosidades de estos materiales, que facilitan el intercambio iónico con los del medio circundante y pasan a tener un papel mucho más importante que el que presentan en los vidrios bioactivos convencionales [42]. Además de la formación más rápida de HCA en condiciones *in vitro*, los MBGs con alto contenido en calcio exhiben un proceso de maduración del fosfato de calcio neoformado casi equivalente al que se produce en los sistemas biológicos [56], es decir formación fosfato cálcico amorfo (ACP), evolución a fosfato octacalcio (OCP) y cristalización como hidroxicarbonatoapatita deficiente en calcio (HCA), como se muestra en la **Figura 6** [57,58]. El alto contenido en calcio y la porosidad de estos MBGs permiten que una elevada cantidad de Ca^{2+} esté dispuesto de forma muy accesible en la superficie de los materiales. En contacto con SBF el intercambio iónico Ca^{2+} - H^+ libera Ca^{2+} al medio circundante, mientras favorece la incorporación de H^+ a la superficie y acidifica el medio generando un rango de pH que estabiliza la nucleación del OCP. Tras la nucleación de OCP en superficie, la precipitación de HA nanocristalina se ve favorecida mimetizando el mecanismo de formación ósea de los mamíferos.

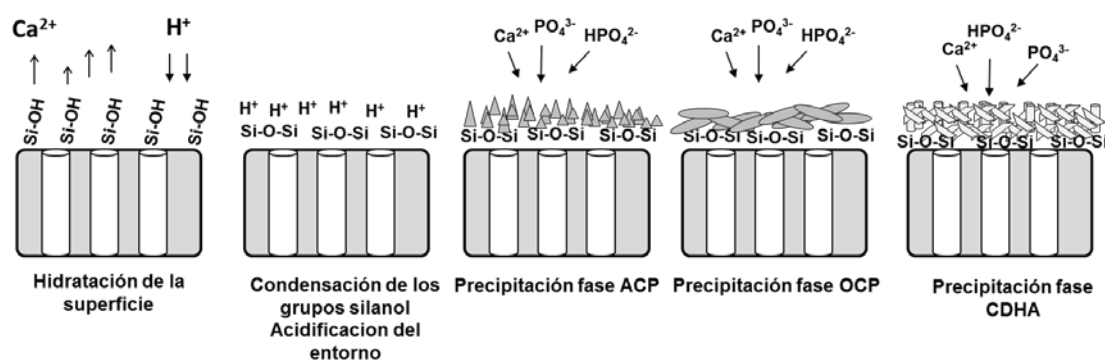


Figura 6. Etapas del proceso bioactivo in vitro de los MBGs tras su inmersión en SBF.

Biocompatibilidad de los MBGs

La biocompatibilidad de los MBGs ha sido estudiada en condiciones *in vitro* [59] e *in vivo* [39,60,61]. La capacidad de intercambiar iones con el medio favorece una respuesta celular positiva en las células de tipo osteoblasto, desencadenando una serie de reacciones bioquímicas que favorecen la regeneración de hueso [62]. Además, los productos de disolución de los vidrios bioactivos (Ca^{2+} y especies de sílice en solución) provocan la regulación hacia valores más elevados de los genes pro-osteoblásticos mejorando así su potencial osteogénico [37,38,53]. El comportamiento celular está íntimamente ligado a la composición química y la estructura de los MBG, pues ambos factores están relacionados con su solubilidad y la liberación de iones al medio.

A la vista de estos antecedentes podemos plantear la hipótesis de que las propiedades de los MBGs pueden optimizarse mediante el control de su composición y su estructura mesoporosa [63]. Composiciones químicas bajas en SiO_2 y alto contenido en CaO conducen a estructuras porosas menos ordenadas [30], pero que favorecen la bioactividad de los materiales. Por otra parte estructuras mesoporosas ordenadas favorecen el uso de MBGs como sistemas de liberación controlada de fármacos. Por ello es muy importante entender los equilibrios que se pueden alcanzar entre composiciones bioactivas y estructuras ordenadas, siendo este el objetivo fundamental de esta primera parte de la tesis doctoral.

3.1.2 Optimización de la bioactividad y respuesta celular *in vitro* de MBGs en el sistema $\text{SiO}_2\text{-CaO-P}_2\text{O}_5$ a través del control de su estructura mesoporosa.

A la vista de lo explicado anteriormente, se ha preparado una serie de MBGs de composición $85\text{SiO}_2\text{-}10\text{CaO}\text{-}5\text{P}_2\text{O}_5$ (% mol) cuyo bajo contenido en CaO facilita la

formación de estructuras mesoporosas ordenadas [64]. Para ello hemos variado el surfactante utilizado, con el fin de estudiar la influencia del mismo sobre las propiedades estructurales, texturales y por extensión en la bioactividad y la respuesta celular.

La **figura 7** muestra la estructura y la composición de los cuatro SDA utilizados para sintetizar los MBG. Por un lado se escogieron tres copolímeros tribloque de tipo Pluronic® (F68, F127 y P123) que se caracterizan por tener un bloque hidrofóbico de unidades de poli óxido de propileno (PPO) y dos cadenas hidrofílicas de poli óxido de etileno (PEO). El tamaño de cada tipo de cadenas, va a determinar el carácter hidrofílico-hidrofóbico final de cada uno de los SDA y el tipo de micelas a las que van a dar lugar.

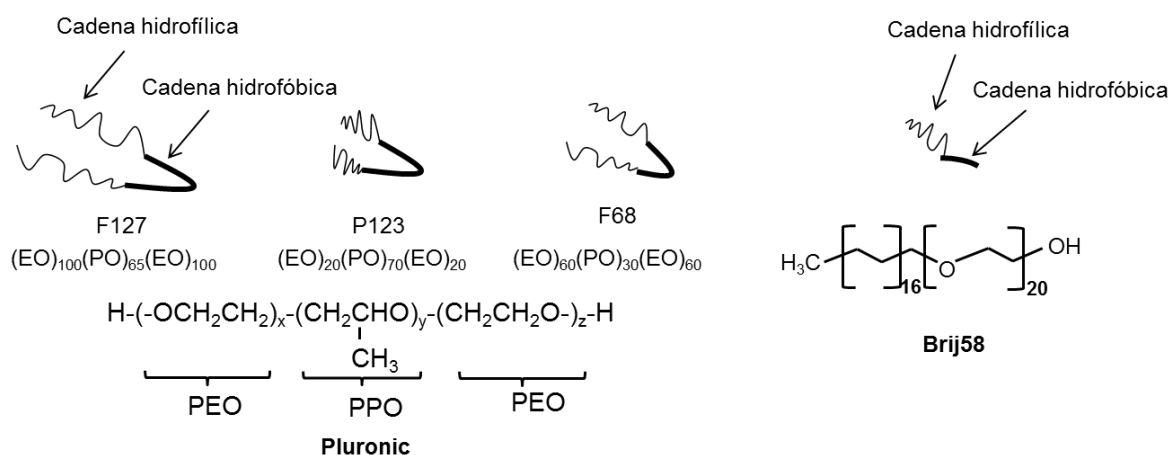


Figura 7. Estructura y composición de los SDA utilizados para la síntesis de los MBGs con composición $85\text{SiO}_2\text{-}10\text{CaO-}5\text{P}_2\text{O}_5$.

La síntesis de los materiales se llevó a cabo por el método EISA manteniendo constante las cantidades de precursores y modificando únicamente el SDA. Para las mismas condiciones de síntesis se observaron variaciones en las propiedades estructurales y texturales en función del SDA. Los MBGs sintetizados con SDA tipo Pluronic® mostraron estructuras mesoporosas ordenadas de tipo $p6mm$ mientras que con 85S-Brij no presentaron orden mesoporoso. Los estudios de adsorción de N_2 mostraron que los surfactantes tipo Pluronic® daban lugar a sólidos mesoporosos mientras que con el SDA lineal Brij58 se obtenía un material microporoso con mayor superficie específica que sus análogos.

Estas propiedades vienen determinadas por el proceso de formación de las micelas y la disposición de los precursores inorgánicos en torno al SDA. Durante la síntesis las micelas se disponen dejando las cadenas hidrofílicas en contacto con el medio. Siendo esta región donde policondensan los precursores que forman las paredes del MBG. Por otra parte, las cadenas hidrofóbicas se disponen en el interior de la micela, por lo que su longitud determina el tamaño de poro tras el proceso de calcinación [20]. Un mayor carácter hidrofílico permite obtener materiales más ordenados, al incrementar la interacción entre el surfactante y la fase inorgánica [32]. La tabla 2 muestra las propiedades texturales medidas por adsorción de nitrógeno y los valores de conectividad de red calculados a partir de los experimentos de RMN de sólido.

Estos datos muestran la correlación entre el índice de conectividad de la red de sílice y el tamaño de poro. Puesto que la conectividad de la sílice depende de la cantidad de Ca^{2+} secuestrado como heterogeneidades de CaP, la correlación parece indicar que la formación de estas heterogeneidades esta favorecida en los materiales con mayor tamaño de poro, quizás porque la nucleación de heterogeneidades de CaP está influenciada por factores estéricos.

Tabla 2. Propiedades texturales y conectividad de red de los MBGs.

Muestra	Superficie específica ($\text{m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$)	Volumen de poro ($\text{cm}^3 \cdot \text{g}^{-1}$)	Diámetro de poro (nm)	Conectividad de red
85S-Brij58	572.1	0.44	1.87	3.72
85S-F68	261.3	0.38	3.36	3.79
85S-P123	310.7	0.37	5.92	3.80
85S-F127	269.6	0.29	7.18	3.96

La **figura 8** muestra una representación esquemática de la formación de las micelas para cada uno de los surfactantes. Esta aproximación nos permite explicar la influencia del SDA en las propiedades texturales. De este modo la longitud de las cadenas hidrofóbicas e hidrofílicas contribuyen al diámetro de poro y grosor de la pared, respectivamente.

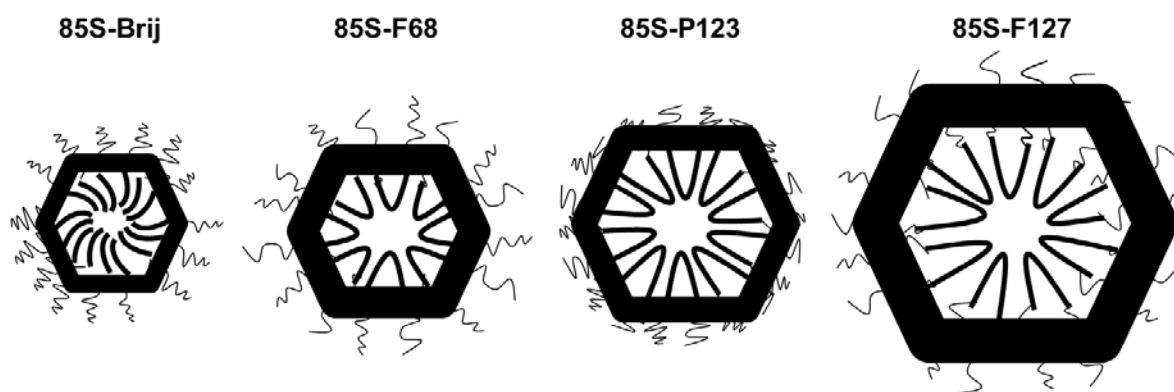
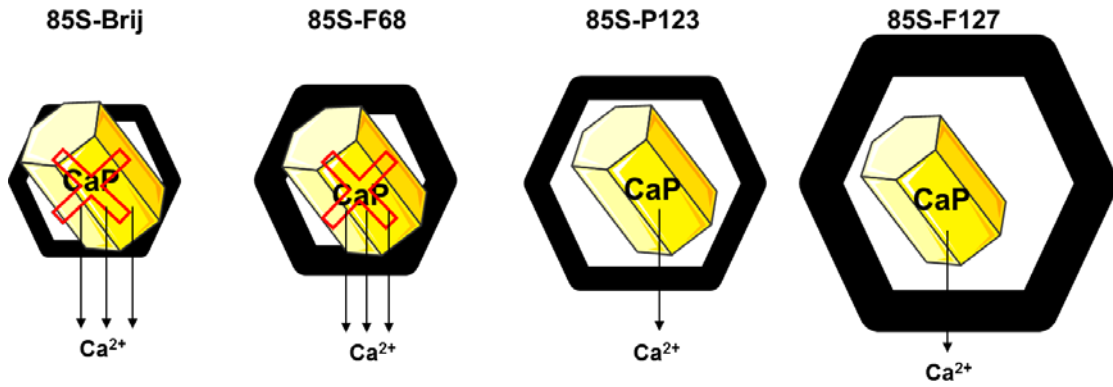


Figura 8. Representación de la formación de las micelas de cada uno de los surfactantes, que determina el tamaño de poro de los MBGs.

Bioactividad y respuesta celular de los MBGs $85\text{SiO}_2-10\text{CaO}-5\text{P}_2\text{O}_5$

Se llevaron a cabo estudios de bioactividad *in vitro* poniendo en contacto los diferentes MBGs sintetizados con SBF. Los resultados mostraron que todos los MBGs-85S sintetizados son bioactivos, aunque se observan diferencias en función del SDA utilizado y de la porosidad que se deriva de los mismos. En este sentido 85S-F68 mostró un comportamiento bioactivo más interesante puesto que forma la fase apatita más rápidamente que el resto.

Las diferencias en el comportamiento bioactivo entre este MBG pueden explicarse en términos de tamaño de poro crítico. Los núcleos de apatita formados durante las primeras etapas del proceso bioactivo pueden obstruir la estructura mesoporosa si tienen suficiente espacio para nuclearse dentro de los mesoporos (**figura 9**). Este hecho da como resultado el retraso de la formación de la nueva fase apatita, ya que ralentiza el intercambio iónico desde las regiones internas de la matriz del MBG. Según Deng y colaboradores el diámetro de nucleación crítico $2r^*$ para HA es inferior a 4.9 nm [65]. Estos estudios concuerdan con nuestros resultados, como se representa de forma esquemática en la **figura 9**, donde 85S-P123 y 85S-F127 con tamaños de poro de 5.9 nm y 7.2 nm, respectivamente, permiten formar estos tapones que evitarían parcialmente el intercambio iónico con SBF. Por su parte, 85S-F68 con un tamaño de poro de 3.4 nm no permite la nucleación de HA en el interior de los poros del material, por lo que el intercambio iónico está más favorecido, exhibiendo cinéticas de bioactividad más rápidas.



La figura 9. Representación de la cristalización de núcleos de fosfato de calcio en los poros del de los MBGs.

Los estudios con cultivos de preosteoblastos demostraron que los cuatro MBGs obtenidos son biocompatibles y permiten la proliferación celular. Por otra parte, el material 85S-F68 estimuló la diferenciación celular hacia fenotipo osteoblástico a tiempos cortos respecto a los otros MBGs, pudiendo establecer una relación directa entre el comportamiento bioactivo y la capacidad osteoinductora de estos MBGs [66].

El conjunto de resultados derivados de esta investigación se recogen en su totalidad en el artículo titulado “*Tailoring the biological response of mesoporous bioactive materials*”



CrossMark
click for updates

Cite this: *J. Mater. Chem. B*, 2015, **3**, 3810

Tailoring the biological response of mesoporous bioactive materials

N. Gómez-Cerezo,^{ab} I. Izquierdo-Barba,^{ab} D. Arcos^{*ab} and M. Vallet-Regí^{*ab}

Mesoporous bioactive glasses (MBGs) in the SiO₂–CaO–P₂O₅ system have been prepared using different non-ionic structure directing agents (SDA): Brij58, F68, P123 and F127. For the first time, the bioactive response of MBGs can be tailored with the kind of SDA incorporated. This is because, in addition to the textural properties, we can use the SDA to tailor the local atomic environment within the MBG struts. These features lead to differences in the *in vitro* bioactive behaviour of MBGs. Among the different SDAs used in this work, the triblock copolymer F68 leads to MBGs that exhibit the fastest bioactivity and the fastest differentiation induction from a pre-osteoblast to an osteoblast phenotype. These results are explained in terms of a highly ordered mesoporous structure, more free calcium cations acting as silica network modifiers and small mesopores that avoid the formation of CaP nuclei within pores, which could obstruct the ionic exchange with the surrounding fluids.

Received 6th February 2015,
Accepted 31st March 2015

DOI: 10.1039/c5tb00268k

www.rsc.org/MaterialsB

Introduction

Mesoporous bioactive glasses (MBGs) are a new generation of bioceramics intended for regenerative therapies of bone.^{1,2} They comprise the bone bonding capabilities of both, melt-derived and sol–gel bioactive glasses,^{3,4} and the porous structure of SiO₂ based mesoporous materials.^{5,6} The addition of both characteristics results in a synergy from the point of view of their biomedical applications. First, the high surface areas and porosities enhance their bioactive behavior, as their reactivity with physiological fluids is greater and faster.^{7,8} Secondly, mesoporous ordering makes these materials excellent matrices for drug delivery systems.^{9–12}

MBGs were firstly proposed by Yan *et al.* in the SiO₂–P₂O₅–CaO system.¹³ These ternary compositions have been most widely studied for MBGs and conventional sol–gel bioactive glasses.^{14–17} In this system, SiO₂ and P₂O₅ are added as network formers and CaO is incorporated into the system as a network modifier.^{18,19} When bioglasses are soaked in simulated body fluid (SBF),²⁰ Ca²⁺ cations are leached and initiate the sequence of reactions described by Hench.²¹ These events begin with the Ca²⁺–H⁺ exchange with the surrounding fluid and result in the nucleation and growth of an apatite-like layer on the material surface. Kokubo *et al.*²² stated that those materials that develop an apatite phase when soaked in SBF under *in vitro* conditions will

exhibit bone bonding and/or regeneration capabilities *in vivo*. This statement is widely accepted by a large part of scientific community, although some criticism about the scientific evidence for this assumption has been reported.²³ Anyway, since bioactivity is a surface process, the higher surface area and porosity are considered the main factors for the enhanced bioactivity of MBGs with respect to conventional bioglasses.^{24–26}

The interest for MBGs has impelled different research teams to explore alternatives for upgrading their characteristics. For instance, Li *et al.* have studied the incorporation of dopants into MBGs such as Mg, Zn or Cu.²⁷ Wu *et al.* have evaluated the biological meaning of Sr,^{28,29} B³⁰ as well as Co³¹ and Cu³² to mimic hypoxia conditions and Salinas *et al.* have also studied the incorporation of cerium, gallium and zinc.^{33,34} In addition to the incorporation of new elements into the glassy network, other strategies such as incorporation of magnetic phases,³⁵ the surface functionalization³⁶ and stimuli-responsive molecular gates³⁷ have been also explored for controlled drug delivery purposes. Finally, the processing methods also provide different ways to upgrade the MBG characteristics. For instance, the MBG preparation as coatings³⁸ or 3D macroporous scaffolds for bone tissue engineering is also an important ongoing research field. In this sense, macroporous pieces prepared by rapid prototyping techniques,^{39,40} polymeric templates^{41–43} or foaming methods⁴⁴ have been used by several authors.

Whatever the additives incorporated and/or the processing methods used, the synthesis of MBGs requires the addition of a structure directing agent (SDA). In most of the cases, the SDA is an amphiphilic molecule with self-organizing properties at the supramolecular level.⁴⁵ The type and amount of SDA determine the textural properties of MBGs, such as the porous structure,

^a Departamento de Química Inorgánica y Bioinorgánica, Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid, Instituto de Investigación Sanitaria Hospital, 12 de Octubre i+12, Plaza Ramón y Cajal s/n, 28040 Madrid, Spain.
E-mail: arcossd@ucm.es, vallet@ucm.es

^b CIBER de Bioingeniería, Biomateriales y Nanomedicina (CIBER-BBN), Spain

the pore volume, the pore size and also the surface area.^{46–49} However, very little is known about the influence of SDA on the pore wall characteristics such as thickness and local atomic distribution. For instance, the presence of CaP nuclei within silica walls determines the bioactive behavior of MBG, as they act as nucleation sites of newly grown apatite.⁵⁰ However, these nuclei also entrap the Ca cations avoiding their release to the surrounding media. Finally, the molecular structure of the surfactant determines the pore size and the volume available for the transport of matter between the MBG and the surrounding fluids.^{51,52} Despite this set of evidence, the relationships between the type of SDA, mesoporosity, pore wall local structure and bioactivity have been poorly considered.

In this work we have studied the effect of four non-ionic SDAs on the porosity and pore wall characteristics of SiO₂-P₂O₅-CaO MBGs. For the first time, this kind of SDA is used to tailor the properties of multicomponent mesoporous materials, not only at the textural level but also in the atomic local environment within the struts of the MBG. These results open the possibility of setting the kinetics of the bioactive process and choosing the most appropriate bone graft for each specific patient.

Materials and methods

Four different MBGs were synthesized by an evaporation induced self-assembly (EISA) method. For this aim three different triblock copolymers, Pluronic P123 (EO)₂₀-(PO)₇₀-(EO)₂₀ (Aldrich), F68 (EO)₇₈-(PO)₃₀-(EO)₇₈ and F127 (EO)₁₀₀-(PO)₆₅-(EO)₁₀₀ (from BAFS) and a non-ionic alkyl poly(oxyethylene) Brij58 HO(CH₂CH₂O)₂₀C₁₆H₃₃ (BASF) were used as structure directing agents. Tetraethyl orthosilicate (TEOS) (98%) Aldrich, triethyl phosphate (TEP) (99%) Aldrich and calcium nitrate Ca(NO₃)₂·4H₂O (99%) (Aldrich) were used as SiO₂, P₂O₅ and CaO sources, respectively. In a typical synthesis 2 g of the surfactant were dissolved in ethanol with HCl 0.5 M solution at room temperature. Afterward TEOS, TEP and Ca(NO₃)₂·4H₂O were added under stirring in 3 hours intervals. The different reagents and amounts are shown in Table 1. The resulting solution was kept under stirring during 12 hours and cast in Petri dishes (9 cm in diameter). The colorless solution was evaporated at 30 °C for several days (see Table 1). Eventually, the dried gels were removed as homogeneous and transparent membranes, and heated at 700 °C for 3 hours under an air atmosphere. Finally the MBGs were gently milled and sieved collecting the particle size fraction below 40 μm.

Low angle powder X-ray diffraction experiments were performed using a Philips X'Pert diffractometer equipped with Cu KR radiation (wavelength 1.5406 Å). XRD patterns were collected

in the 2θ° range between 0, 5θ° and 6, 5θ°, with a step size of 0.02θ° and a counting time of 4 s per step. The textural properties of the calcined materials were determined by nitrogen adsorption porosimetry by using a Micromeritics ASAP 2020 porosimeter. To perform the N₂ adsorption measurements, the samples were previously degassed under vacuum for 15 h, at 150 °C. The surface area was determined using the Brunauer–Emmett–Teller (BET) method. The pore size distribution between 0.5 and 40 nm was determined from the adsorption branch of the isotherm by means of the Barrett–Joyner–Halenda (BJH) method. Transmission electron microscopy (TEM) was carried out using a JEOL-3010 microscope, operating at 300 kV (Cs 0.6 mm, resolution 1.7 Å). Images were recorded using a CCD camera (model Keen view, SIS analyses size 1024 × 1024, pixel size 23.5 mm × 23.5 mm) at 30 000× and 60 000× magnification using a low-dose condition. Fourier transform (FT) patterns have been conducted using a digital micrograph (Gatan). ¹H → ²⁹Si and ¹H → ³¹P CP (cross-polarization)/MAS (magic-angle-spinning) and single-pulse (SP) solid-state nuclear magnetic resonance (NMR) measurements were performed to evaluate the different silicon and phosphorus environments in the synthesized samples. The NMR spectra were recorded on a Bruker Model Avance 400 spectrometer. Samples were spun at 10 kHz for ²⁹Si and 6 kHz in the case of ³¹P. Spectrometer frequencies were set to 79.49 and 161.97 MHz for ²⁹Si and ³¹P, respectively. Chemical shift values were referenced to tetramethylsilane (TMS) and H₃PO₄ for ²⁹Si and ³¹P, respectively. All spectra were obtained using a proton enhanced CP method, at a contact time of 1 ms. The time period between successive accumulations was 5 and 4 s for ²⁹Si and ³¹P, respectively, and the number of scans was 10 000 for all spectra. Differential thermal analysis was done using a TG/DTA Seiko SSC/5200 thermobalance between 50 °C and 1000 °C at a heating rate of 10 °C min⁻¹. High resolution scanning electron microscopy was carried out using a field emission JEOL JSM 7600F microscope.

Particle size analysis was carried out by the average grain interception (AGI) method onto the SEM micrographs (ASTM E112). About 100 measurements were made over a set of randomly positioned line segments on the micrographs.

Zeta potential determination by electrophoretic mobility was carried out in a Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments) by suspending MBG particles in phosphate buffered solution at pH 7.4 (PBS).

In vitro bioactivity tests

Assessments of *in vitro* bioactivity were carried out on powder samples. For this purpose, 50 mg of powder were soaked into 7 mL of filtered simulated body fluid (SBF),²⁰ in polyethylene containers at 37 °C under sterile conditions. The evolution of

Table 1 Nominal composition, surfactant and synthesis conditions for the different mesoporous bioactive glasses

Sample	Nominal composition (% mol)	TEOS (g)	TEP (g)	Ca(NO ₃) ₂ (g)	Ethanol (g)	HCl (mL)	Gelling (days)
85S-Brij58	85SiO ₂ -10CaO-5P ₂ O ₅	3.70	0.34	0.49	30	0.8	7
85S-F68	85SiO ₂ -10CaO-5P ₂ O ₅	3.70	0.34	0.49	30	0.5	11
85S-P123	85SiO ₂ -10CaO-5P ₂ O ₅	3.70	0.34	0.49	30	0.5	6
85S-F127	85SiO ₂ -10CaO-5P ₂ O ₅	3.70	0.34	0.49	40	1	8

the glass surface was analyzed by Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy using a Nicolet Magma IR 550 spectrometer and by scanning electron microscopy (SEM) using a JEOL F-6335 microscope. Finally, MBG dissolution tests were conducted by measuring the Ca^{2+} concentration as a function of soaking time in SBF with an Ilyte system.

Cell culture

Murine MC3T3-E1 preosteoblasts (as undifferentiated osteoblast-like cells) were seeded on well culture plates (CULTEK), at a density of 105 cell per mL in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, USA) with 10% fetal bovine serum (FBS, Gibco, BRL), 1 mM L-glutamine (BioWhittaker Europe, Belgium), penicillin (200 mg mL^{-1} , BioWhittaker Europe, Belgium), and streptomycin (200 mg mL^{-1} , BioWhittaker Europe, Belgium), under a CO_2 (5%) atmosphere at 37°C for 24 hours to reach the confluence in each cell plate. After that the MBG powder, previously sterilized by dry heating at 150°C for 24 hours, was added on the seed cells at confluence at 1 mg mL^{-1} of concentration.

Mitochondrial activity. In order to evaluate the cell mitochondrial activity of living cells in contact with the MBGs for 1 and 7 days of incubation, the MTT method was employed based on the reduction of yellow 3[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide to blue formazan. For this aim, the culture media were replaced with 1 mL of DMEM and $125 \mu\text{L}$ of 0.012 g L^{-1} MTT solution in PBS. Samples were incubated for 4 h at 37°C and 5% CO_2 under dark conditions. Then, the medium was removed and $500 \mu\text{L}$ of 0.4 N isopropanol-HCl were added. Finally, the absorbance was measured at 570 nm using a Helios Zeta UV-VIS spectrophotometer.

Alkaline phosphatase activity. The alkaline phosphatase (ALP) activity of cells growing in the presence of MBG powder was used as the key differentiation marker in assessing the expression of the osteoblast phenotype. ALP activity was measured on the basis of the hydrolysis of *p*-nitrophenylphosphate to *p*-nitrophenol. For this purpose, MC3T3 cells were seeded under the same conditions but using supplemented medium with β -glycerolphosphate (50 mg mL^{-1} , Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, USA) and L-ascorbic acid (10 mM, Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, USA). Moreover, the total protein value after 10 days was determined using a colorimetric method at 540 nm (Bio-Analitica, S.L.), using a Helios Zeta UV-VIS spectrophotometer.

Statistics

Data are expressed as means \pm standard deviations of three experiments. Statistical analysis was performed using the Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) version 11.5 software. Statistical comparisons were made by analysis of variance (ANOVA). Subsequently, *post hoc* analyses were carried out to correct for multiple comparisons.

Results and discussion

Table 2 shows the zeta potential measurements and the particle size for the four MBGs prepared. The results indicate that the

Table 2 Zeta potential and particle size measured for the four MBGs prepared. Values in brackets indicate the standard deviation

Sample	Zeta potential (mV)	Particle size (μm)
85S-Brij58	-15.9	18 (± 10)
85S-F68	-12.1	32 (± 16)
85S-P123	-15.6	26 (± 14)
85S-F127	-16.1	23 (± 15)

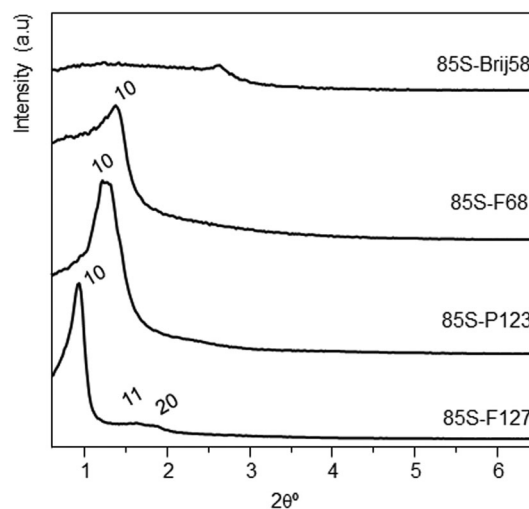


Fig. 1 Low angle XRD patterns of the mesoporous $85\text{SiO}_2-10\text{CaO}-5\text{P}_2\text{O}_5$ glasses synthesized with different structure directing agents.

use of different SDAs does not affect the surface charge or the particle size. The surface charge is determined by the chemical composition of the materials, mainly SiO_2 , which shows negative potential values at pH 7.4. Besides, the similar particle sizes for the four MBGs indicate that the milling and sieving processes determine this parameter independent of the SDA used.

Fig. 1 shows the low-angle XRD patterns of the four MBGs synthesized. The XRD pattern of 85S-Brij58 does not show any diffraction maxima pointing out the disordered structure of this material. 85S-F68 and 85S-P123 show a single peak at 1.38° and 1.26° 2θ , respectively. This maximum could correspond to the (10) reflexion of a 2D hexagonal $p6m$ structure based on TEM results (see below). 85S-F127 presents an intense maximum at 0.94° 2θ and two less intense peaks at 1.64° and 1.88° 2θ , which could be assigned to the (10), (11) and (20) reflections, respectively, of 2D hexagonal $p6m$ structure. The structural data calculated by XRD experiments are shown in Table 3.

Fig. 2 shows the TEM images and FT patterns for the 85S-MBGs prepared with the four different SDAs. TEM images

Table 3 XRD results obtained for the four MBGs prepared

Sample	2θ	d_{hkl} (nm)	hkl	a_0 (nm)
85S-Brij58	NA	NA	NA	NA
85S-F68	1.38	6.41	10 ($p6m$)	7.40
85S-P123	1.26	7.05	10 ($p6m$)	8.14
85S-F127	0.94	9.46	10 ($p6m$)	10.90
	1.64	5.45	11 ($p6m$)	
	1.88	4.78	20 ($p6m$)	

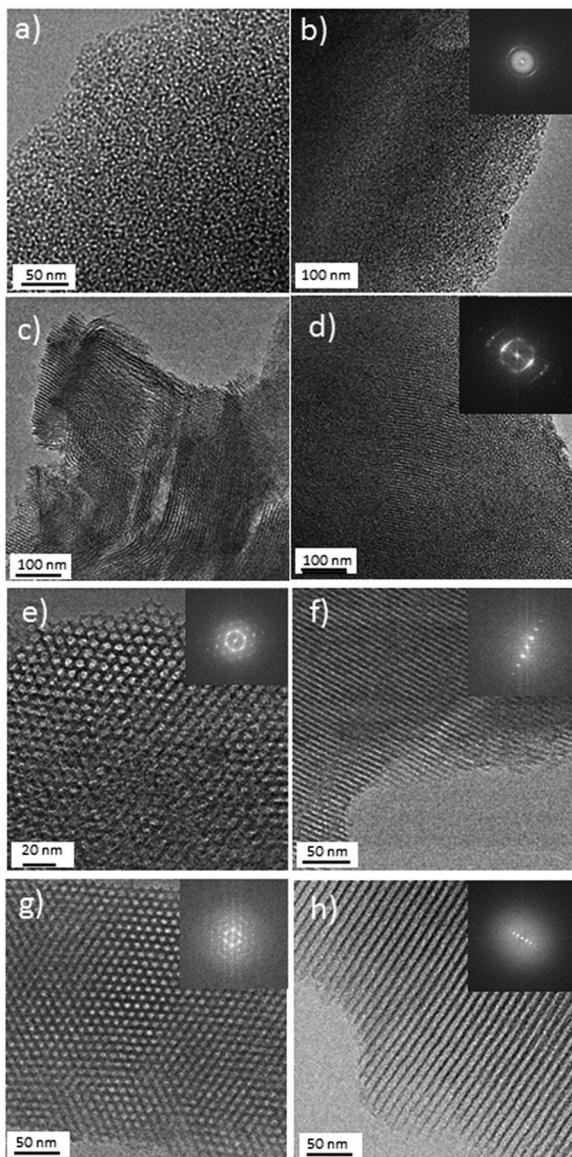


Fig. 2 HRTEM images and FT diagrams obtained from 85S-Brij58 (a and b), 85S-P123 (c and d), 85S-F68 (e and f) and 85S-F127 (g and h).

evidence differences in the mesoporous ordering as a function of the SDA used. The HRTEM images for 85S-Brij58 (Fig. 2a and b) evidence a disordered porous material as confirmed by the absence of maxima in the FT pattern and in agreement with the absence of diffraction maxima in the XRD pattern. HRTEM images of 85S-P123 (Fig. 2c and d) indicate a 2D-hexagonal mesoporous structure coexisting with a disordered worm-like porous phase. Finally, TEM images for 85S-F68 (Fig. 2e and f) and 85S-F127 (Fig. 2g and h) clearly correspond to a 2D hexagonal symmetry with a $p6m$ planar group, thus confirming the results obtained by XRD.

Fig. 3 shows the N_2 adsorption isotherms and pore size distribution of the four materials synthesized. 85S-Brij58 shows a type I isotherm characteristic of microporous materials. The pore size distribution indicates a monomodal distribution centered at the micropore range (1.87 nm) with an asymmetric

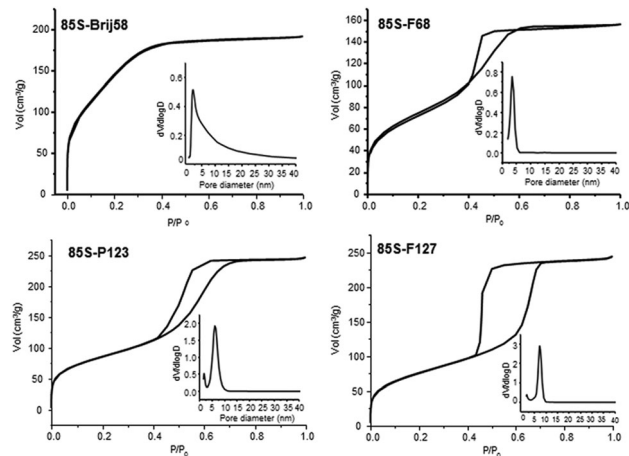


Fig. 3 N_2 adsorption isotherms of 85SiO₂-10CaO-5P₂O₅ glasses synthesized with different structure directing agents. The insets show the pore size distributions.

Table 4 Textural parameters obtained by N_2 adsorption porosimetry for ordered MBGs

Sample	S_{BET} (m ² g ⁻¹)	Pore size (nm)	Pore volume (cm ³ g ⁻¹)	a_0 (nm)	Wall thick (nm)
85S-Brij58	572.1	1.87	0.44	NA	NA
85S-F68	261.3	3.36	0.38	7.40	3.05
85S-P123	310.7	5.92	0.37	8.14	2.22
85S-F127	269.6	7.18	0.29	10.90	3.72

tail towards the mesopore region. 85S-F68, 85S-P123 and 85S-F127 materials exhibit type IV isotherms characteristic of mesoporous materials. Whereas 85S-P123 and 85S-F127 isotherms show H1-type hysteresis loops associated with cylindrical pores opened at the ends, 85S-F68 exhibits a H2-type loop characteristic of the ink-bottle pore or cylindrical pores with narrowings along the channels. Pore size distributions show porosities in the mesopore ranges (over 2 nm) with different pore sizes depending on the triblock copolymer used.

The textural parameters are summarized in Table 4. Samples prepared with triblock copolymers (*i.e.* F68, P123 and F127) show S_{BET} and pore volume values in the range of MBGs.^{1,2,13} 85S-Brij58 exhibits the highest S_{BET} and pore volume compared with the other materials. This fact indicates that, despite the disordered structure evidenced by XDR and TEM, Brij58 interacts with the inorganic phase thus raising a microporous material with high textural values. The pore sizes keep relation with the lengths of the hydrophobic chains of the surfactants, *i.e.* the poly-propylene oxide (PO)_{*n*} block. Thus P123 and F127 (with 70 and 65 units of (PO), respectively) lead to pore sizes significantly larger than F68 (with 30 units of PO) and Brij 58 (with a hydrophobic block composed of a -C₁₆H₃₃ hydrocarbide chain).

Wall thicknesses were calculated from the lattice parameter a (obtained by XRD) and the pore sizes (obtained by the BJH method). The wall thickness can be related to the size of the hydrophilic chains of the triblock copolymer. F68 and F127 with longer EO chains (78 and 100 EO units, respectively) lead to thicker walls than P123 (with hydrophilic chains of 20 EO

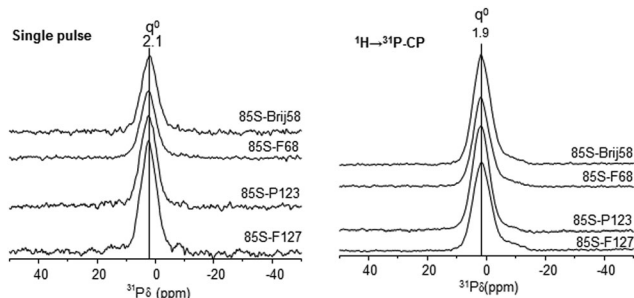


Fig. 4 Solid-state ^{31}P single-pulse (top) and cross-polarization (bottom) MAS NMR spectra of the $85\text{SiO}_2\text{-}10\text{CaO-}5\text{P}_2\text{O}_5$ bioglasses synthesized with different structure directing agents.

units). In the case of 85S-Brij58 this parameter could not be calculated due to the disordered structure of this material.

^{31}P -NMR results were used to evaluate the local environment of P atoms, thus elucidating the phosphate species contained in the different samples (Fig. 4). The spectra recorded by single pulse show one signal at ~ 2 ppm assignable to q_0 units present in the PO_4^{3-} species. The signals show a full width at a half-maximum height (fwhm) of around 7 ppm, which is typical of an amorphous orthophosphate.²⁵ These results evidence that most of the P atoms are included as independent PO_4^{3-} tetrahedrons within the silica network. The orthophosphates would be balanced with the Ca^{2+} cations introduced in the system, thus resulting in amorphous calcium orthophosphate. This fact would avoid the polyphosphate formation, independently of the SDA used. $^1\text{H} \rightarrow ^{31}\text{P}$ -CP spectra were collected to study the local environment of the P atoms in those regions close to the Si-OH groups, *i.e.* the material surface. $^1\text{H} \rightarrow ^{31}\text{P}$ -CP spectra evidence the same situation, pointing out that the phosphate groups are orthophosphates in both the surfaces and the inner locations of the MBG walls.

Table 5 shows the chemical shifts, deconvoluted peak areas, and the silica network connectivity of MBG85 for each SDA incorporated into the synthesis. Single pulse ^{29}Si MAS NMR spectra (Fig. 5) evidence significant differences in the network connectivity (NC), which are dependent on the SDA used. Interestingly, the NC increases with the SDA as follows: Brij-58 < F68 < P123 < F127, which is the same trend observed for the pore size. The NC in $\text{SiO}_2\text{-P}_2\text{O}_5\text{-CaO}$ bioactive glasses has been commonly related to the amount of Ca^{2+} cations within the SiO_2 network, not with the pore size.⁵⁰ In fact, Ca^{2+} acts as network modifiers reducing the amount of Q^4 units and increasing the glass bioactivity. Since the four MBGs synthesized in this work contains the same amount of Ca^{2+} , the different network connectivity must be

explained in terms of a different distribution of Ca^{2+} cations within the silica network.

$\text{SiO}_2\text{-P}_2\text{O}_5\text{-CaO}$ MBGs contain Ca^{2+} cations in two different local environments; (i) taking part of calcium orthophosphate heterogeneities segregated out of the silica network and (ii) dispersed within the silica network (and mainly placed at the wall surface) thus acting as network modifiers.⁵³ This Ca^{2+} distribution has been previously observed^{8,25,50} and it is in clear agreement with the NMR studies presented in this work. In our case, the composition $85\text{SiO}_2\text{-}5\text{P}_2\text{O}_5\text{-}10\text{CaO}$ has a theoretical NC = 3.69, considering SiO_2 and P_2O_5 as network formers and CaO as network modifier. The NC calculated for our four MBGs (Table 5) are higher, indicating that Ca^{2+} ions are partially sequestered into CaP heterogeneities and the SiO_2 network is thus depleted of network modifiers. There are also clear differences in NC between the MBGs. 85S-Brij58 has a NC very similar to the theoretical one (3.72 *vs.* 3.69), pointing out that most of Ca^{2+} ions are acting as network modifiers in this MBG and only a little amount of Ca^{2+} is sequestered as CaP clusters. However the NC for 85S-F127, *i.e.* 3.96, clearly indicates that most of Ca^{2+} is taken out of the SiO_2 network. Even more interesting, there is a clear correlation between the network connectivity and the pore size (see Tables 4 and 5). This fact seems to indicate that the formation of CaP heterogeneities is easier when the pore diameter is larger, perhaps because the nucleation of CaP clusters is also affected by steric factors.

The higher or lower presence of CaP heterogeneities is assessed by analyzing the vitreous transition temperature (T_g). DTA experiments (Table 6) show that T_g correlates with the presence of CaP heterogeneities, *i.e.* the more the CaP nuclei the lower the T_g , following the trend F127 < P123 < F68 < Brij-58. This behavior can be explained in terms of CaP heterogeneities acting as microstructural defects, which would decrease the T_g .

In vitro bioactivity tests

In vitro bioactivity tests were carried out by soaking powdered MBGs in SBF and studying the changes occurring on the MBG surfaces. FTIR spectroscopy was carried out to evaluate the changes in the bioglass surface as a function of soaking time.

Fig. 6 shows the FTIR spectra obtained after 0, 1, 6 and 24 hours in contact with SBF. Before soaking, the four MBGs show almost identical spectra, with the characteristic absorption bands of Si-O bonds at approximately 1040 cm^{-1} (Si-O-Si stretching), 800 cm^{-1} (Si-O-Si rocking) and 470 cm^{-1} (Si-O-Si bending). After one hour in contact with SBF, a singlet absorption band at 600 cm^{-1} can be observed in the four MBGs.

Table 5 Chemical shift, relative peaks areas and silica connectivity obtained by solid-state single pulse ^{29}Si MAS NMR

Sample	Q^2		Q^3		Q^4		Network connectivity
	Chemical shift	Relative peak area	Chemical shift	Relative peak area	Chemical shift	Relative peak area	
85S-Brij58	-93.11	3.9	-101.3	20	-110.87	76.1	3.72
85S-F68	-92.73	0.93	-101.24	18.8	-111.3	80.2	3.79
85S-P123	-94.93	3	-101.4	13.8	-111.1	83.2	3.80
85S-F127	-93.8	2	-101.9	13	-110.9	85	3.96

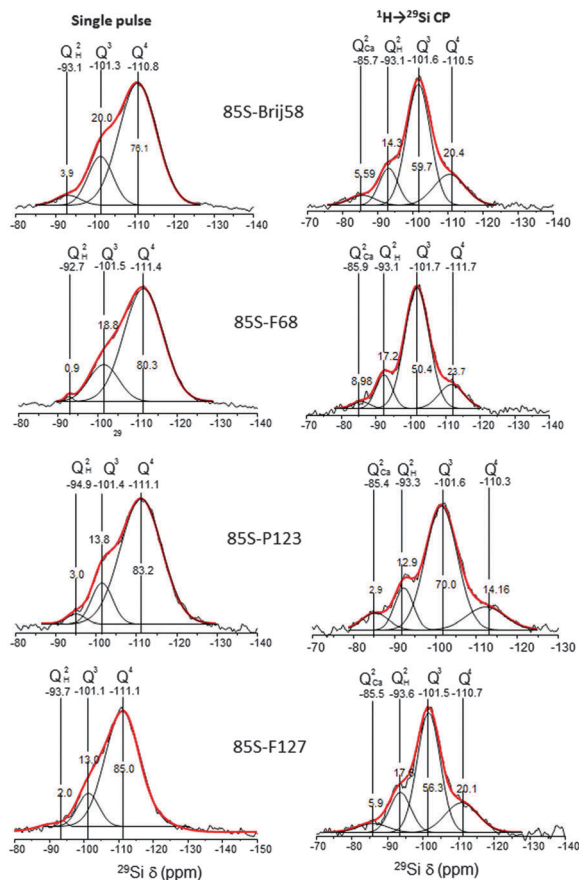


Fig. 5 Solid-state ^{29}Si single-pulse (left) and cross-polarization (right) MAS NMR spectra of the four mesoporous $85\text{SiO}_2\text{-}10\text{CaO-}5\text{P}_2\text{O}_5$ glass samples. The areas for the Q^n units were calculated by Gaussian line-shape deconvolutions and are displayed by grey dotted lines (their relative populations are expressed as percentages).

Table 6 Glass transition temperature and mass loss results obtained by TG/ATD

Sample	Glass transition temperature ($^{\circ}\text{C}$)
85S-Brij58	846.13
85S-F68	829.90
85S-P123	811.16
85S-F127	784.40

This band correspond to the bending mode O–P–O characteristic of phosphate in an amorphous environment, which is a normal stage during the bioactive processes occurring on bioactive glasses when they are soaked into biomimetic solutions.⁷ After 6 hours of contact with SBF, 85S-Brij58, 85S-P123 and 85S-F127 (Fig. 6a, c and d) still show the same singlet band at 600 cm^{-1} corresponding to amorphous phosphate. In contrast, in the case of 85S-F68 this signal appears as a doublet at $580\text{--}610\text{ cm}^{-1}$ corresponding to the bending mode of O–P–O in a crystalline environment. In 85S-F68 MBG, the amorphous CaP turns faster into crystalline apatite compared to any other MBGs studied in this work. After 24 hours, all the samples have developed an apatite like phase on the surfaces, as can be deduced from the doublet at $580\text{--}610\text{ cm}^{-1}$. However, from a

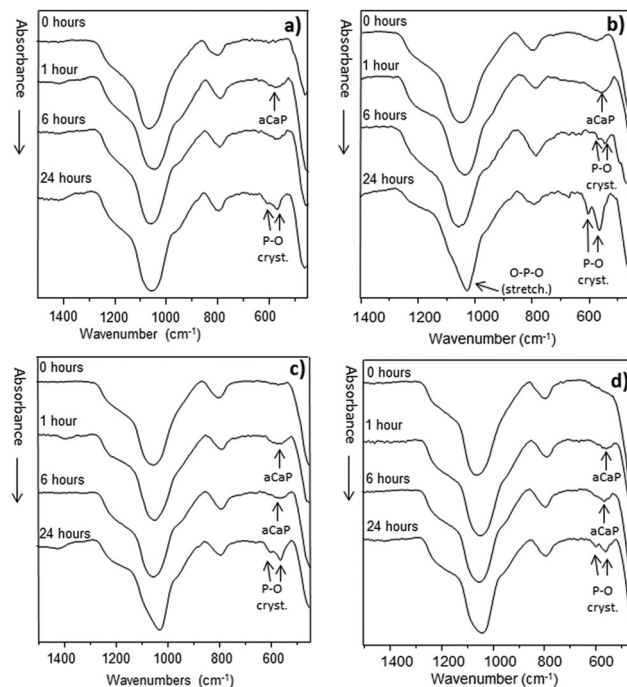


Fig. 6 FTIR spectra as a function of soaking time in SBF for 85S-Brij58 (a), 85S-F68 (b), 85S-P123 (c) and 85S-F127 (d).

semiquantitative point of view, the intensity of this signal is higher in 85S-F68 when compared to any other, especially with 85S-F127.

In order to confirm these results, the sample surfaces were observed by SEM after 0, 6 and 24 hours in contact with SBF and the micrographs are shown in Fig. 7. The insets indicate the Ca/Si ratio measured by EDX and provide an estimation of the bioactive process stage, considering Ca dissolution from the MBG to SBF, or Ca precipitation as hydroxyapatite from SBF onto MBG.

Before soaking in SBF the MBG grains show smooth surfaces, with some particles smaller than 1 micrometer attached to them. The EDX analyses indicate a Ca/Si ratio close to the theoretical one (0.12). After 6 hours in SBF, the surface of 85S-Brij58 appears covered with aggregates of rounded particles, indicating that a new phase has grown on it. The Ca/Si ratio is similar to the glass before soaking. However, considering that Ca is initially released during the first stages of the bioactive process,^{7,14,21} the similar Ca/Si ratio would indicate that the precipitation of Ca as calcium phosphate has also occurred, thus explaining the new phase that appeared in the micrograph. In the case of 85S-F68, the precipitation of a new phase after 6 hours is even more intense. The micrograph shows a thick and dense newly formed phase that has precipitated on the surface. This phase cracks under the electron beam as can be appreciated in the micrograph, which is very common in newly formed apatite phases when observed by SEM at high magnification. The EDX analysis confirm that, after the initial calcium release, the surface contains more calcium than before soaking and confirms the precipitation of a large amount new calcium phosphate onto the surface of 85S-F68 glass. The surfaces of

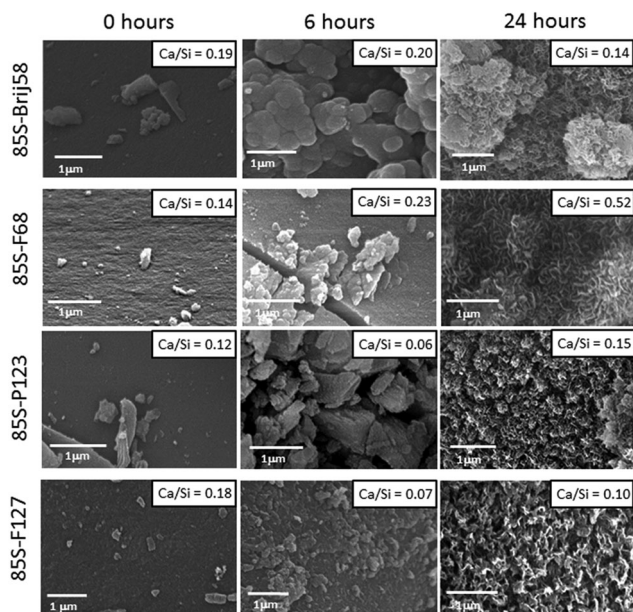


Fig. 7 SEM micrographs of the $85\text{SiO}_2-10\text{CaO}-5\text{P}_2\text{O}_5$ glasses synthesized with different structure directing agents, after being soaked in SBF for 0, 6 and 24 hours. The Ca amounts at the surface measured by EDX spectroscopy is pointed into an inset for each micrograph.

MBGs 85S-P123 and 85S-F127 appear with an increase of porosity. The pinholes would indicate that a dissolution process prevail over the precipitation one. This observation agrees with the decrease of the Ca/Si ratio observed by EDX, which point out that the amount of amorphous calcium phosphate precipitated does not compensate the Ca dissolution occurred during the first hours of the bioactive process. Finally, after 24 hours the formation of an apatite-like phase is evidenced over the surface of the four MBGs studied in this work. However, from a quantitative point of view, the amount of apatite grown onto 85S-F68 is significantly larger as can be observed from the Ca/Si ratio, agreeing with the FTIR results.

Fig. 8 shows the HR-TEM images of 85S-F68 and 85S-F127 after 6 hours in contact with SBF. The image obtained for MBG 85S-F68 (Fig. 8a) shows the formation of a crystalline phase (signed as HA). The EDX analysis made during the observation (data not shown) confirmed that these crystals are in a calcium phosphate phase. In order to study the structure of this newly formed CaP, higher magnification and electron diffraction experiments were carried out (Fig. 8b). The ED pattern (inset in Fig. 8b) demonstrates that the newly formed calcium phosphate phase is an apatite like phase, in agreement with the FTIR results. In contrast, 85S-F127 after 6 hours (Fig. 8c and d) in contact with SBF does not show the formation of this apatite phase, also confirming the FTIR data.

The kinetics of HA formation onto the MBG surface indicates that 85S-F68 is the fastest material in developing a new apatite phase under *in vitro* conditions, among the MBGs studied in this work. 85S-F68 exhibits the smallest pore size among the MBGs with a 2D-hexagonal $p6m$ structure (85S-Brij58 shows a pore size even smaller but this glass does not exhibit

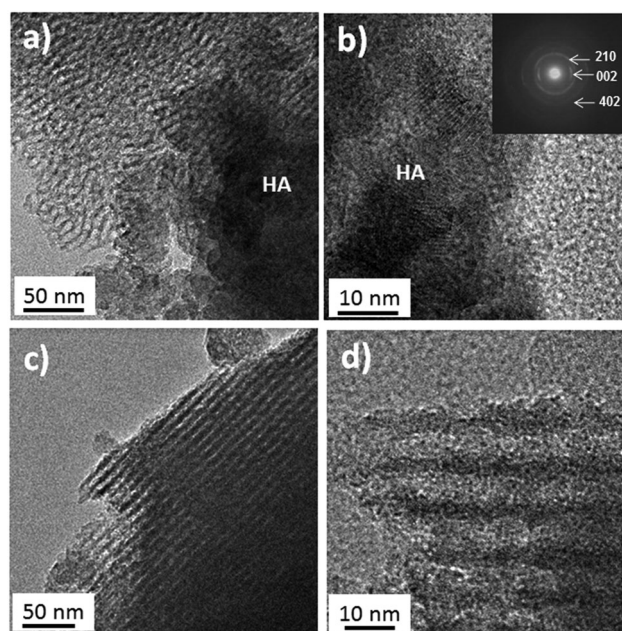


Fig. 8 (a) HR-TEM image of 85S-F68 MBG after 6 hours of soaking in SBF; HA indicates calcium phosphate crystals observed in this sample; (b) Higher magnification of image (a). The inset show the ED pattern obtained from the area pointed as HA. (c and d) HR-TEM images of 85S-F127 MBG after 6 hours of soaking in SBF.

mesoporous ordering). The structural studies of the MBGs indicated that the presence of CaP heterogeneities in 85S-F68 is lesser compared to 85S-P123 and 85S-F127. Consequently, 85S-F68 contains more free Ca^{2+} cations as network modifiers to exchange with protons of SBF and, in this way, initiate the bioactive process faster. In the opposite way, 85S-F127 with larger pore sizes, the formation of CaP clusters is facilitated. In fact, the high connectivity of the silica network (3.96) indicates that the amount of network modifiers, Ca^{2+} cations, is very low. Consequently, the Ca^{2+} dissolution and subsequent hydroxy-apatite growth seems to be slowed down. This point is confirmed by the measurement of Ca^{2+} dissolution in SBF as a function of soaking time (Fig. 9). The calcium release profiles show that the four MBGs prepared release calcium into the surrounding fluid during the first hour, due to the initial dissolution of the MBS in a hydric medium. Thereafter the calcium concentrations decrease, which is in agreement with the new calcium phosphate growth as evidenced by FTIR and SEM. The different dissolution degrees also keep a close relationship with the local environment of the MBGs determined by NMR. 85S-F68 and 85S-Brij58 exhibit the largest dissolution processes whereas 85S-F127 is significantly less soluble than the rest of the MBGs. This behavior would confirm the NMR results, which indicate the higher amount of Ca^{2+} ions acting as network modifiers in 85S-F68 and 85S-Brij58 compared with 85S-F127.

In order to study the influence of the different MBGs over bone cells, preliminary cell culture tests with pre-osteoblasts were carried out in the presence of the four prepared materials. Fig. 10A shows the mitochondrial activity of pre-osteoblast after 1 day of exposure to the different MBGs. Pre-osteoblasts showed

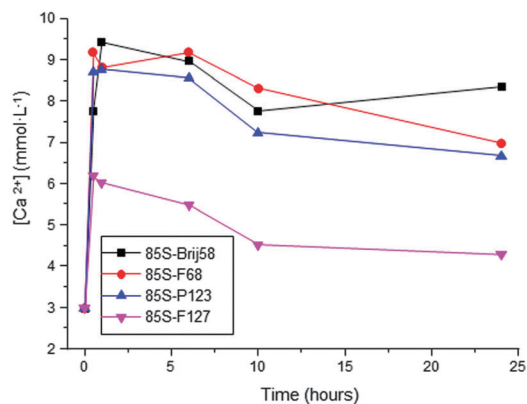


Fig. 9 Ca²⁺ release as a function of soaking time for the four MBGs synthesized.

a good proliferative behavior without significant differences among them. In order to study the osteoinductive capability of the different MBGs, ALP contents were measured as an osteoblast differentiation (Fig. 10B). After 10 days in contact, significant differences could be observed between 85S-F68 and 85S-F127, pointing out that the differentiation from a pre-osteoblast to an osteoblast phenotype is higher in the case of 85S-F68. This result could be related to the larger Ca²⁺ release

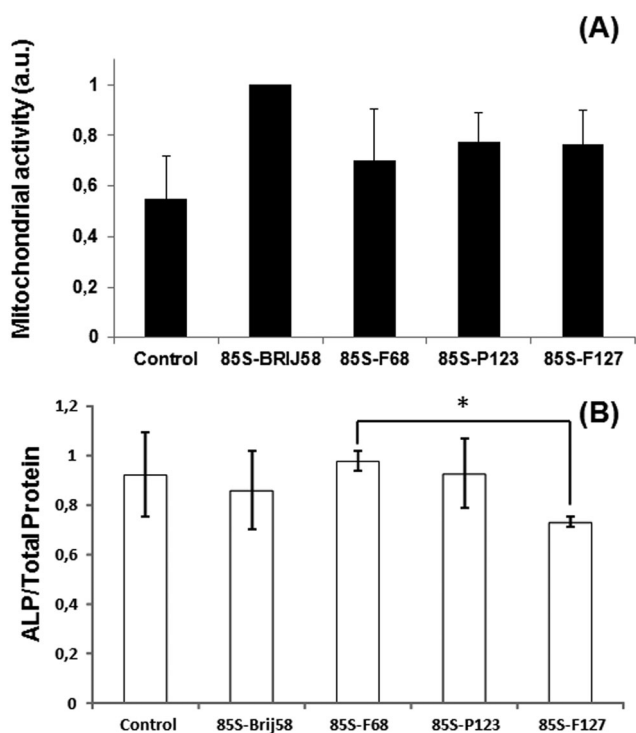


Fig. 10 (A) Mitochondrial activity of preosteoblast MC3T3 cells in the presence of 1 mg mL⁻¹ of MBG in powder after 1 day of incubation. (B) ALP per total protein of preosteoblast MC3T3 cells in the presence of different MBG powders after 10 days of incubation. The controls correspond to MC3T3 cells incubated in the absence of MBG powder. (*) Significant differences between 85S-F68 and 85S-F127 ($P < 0.05$) are shown.

and better bioactive behavior shown by this MBG, although further studies are required to confirm this point.

In addition to the Ca²⁺ local environment, the mesoporous ordering facilitates the bioactive process. In this sense, 85S-F68 is more bioactive than 85S-Brij58, although the latter contains more Ca²⁺ cations as network modifiers. However, the very small pore size of 85S-Brij58 (1.87 nm, *i.e.* below the mesopore range) and the tortuosity of its worm-like structure seems not to favor the HA nucleation and growth when compared to 85S-F68.

The accessibility of the pores to the surface is also a very important factor. We wondered if the lower bioactivity of 85S-F127 could be due to the non-accessibility of the open pores to the surface. In order to assess the pore accessibility of this MBG, we carried out high resolution scanning electron microscopy (HR-SEM). The micrograph obtained using this powerful tool is shown in Fig. 11, and it evidences an opened porosity accessible to the external surface.

Finally, we want to highlight the interesting point of view of Deng *et al.* on the possible block of the porous system during the bioactive process.⁵⁴ These authors demonstrated that the CaP nuclei formed during the first stages of the bioactive process can obstruct the mesoporous structure if they have enough space to nucleate within the mesopores. This fact results in the delaying of the newly apatite layer formation, as the ionic exchange from the inner regions of the MBG is impeded. These authors reported that the critical nucleation diameter $2r^*$ for HA is above 2.7 nm and below 4.9 nm. These studies agree with our results, indicating that 85S-F127 and 85S-P123 with pore sizes of 5.92 nm and 7.18 nm, respectively, would form these stoppers that partially avoid the matter exchange with SBF. In contrast, 85S-F68 with a pore size of 3.36 does not undergo this impediment. These results open new perspectives to tailor mesoporous materials based on multicomponent systems for different applications. In the specific case of bone regeneration purposes, the capability of designing the porous structure and the atomic environment can determine the success or failure in restoring the life quality of the patients.

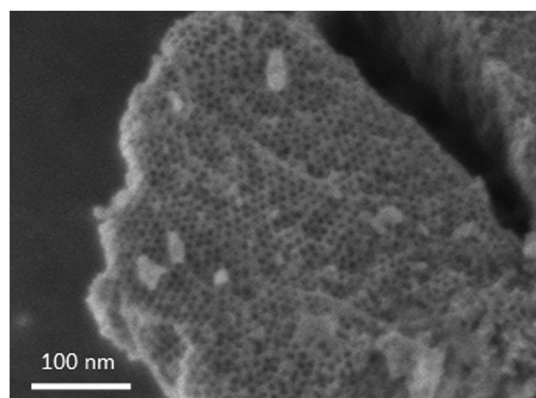


Fig. 11 HR-SEM micrographs of 85S-F127 evidencing the 2D-hexagonal mesoporous structure opened to the external surface.

Conclusions

Microporous and mesoporous bioactive glasses, in the 85SiO₂-10CaO-5P₂O₅ system, have been prepared with different structure directing agents. The glasses thus prepared range from microporous disordered structures to ordered mesoporous arrangements.

By choosing the appropriate structure directing agent we can tailor the pore size and the wall thickness for a specific MBG composition.

The local distribution of Ca cations and CaP heterogeneity formation is dependent on the SDA used. Those SDAs leading to larger pore sizes facilitate the formation CaP heterogeneities, increases the silica network connectivity and results in MBGs with slower bioactive behaviors.

MBGs with ordered mesoporous structure and a smaller pore size exhibit faster *in vitro* bioactive behavior. Specifically, MBG prepared with a F68 triblock copolymer contains less CaP heterogeneities and more Ca²⁺ cations available for ionic exchange. In addition, its small diameter would impede the newly formed CaP nuclei within the pores during the bioactive process, which could obstruct the matter transfer between the glass and the surrounding media.

Preliminary pre-osteoblast culture tests indicate that the four MBGs are biocompatible without significant differences with respect to the proliferative behavior of the cells. However, the MBGs prepared with F68 as SDA induces the differentiation into an osteoblast phenotype in a faster way than the MBG prepared with F127.

These findings demonstrate the significance of the local atomic environment and the pore size beyond the chemical composition and surface area, which are classically considered as the most significant parameters involved in the *in vitro* bioactivity and cell response.

Acknowledgements

This study was supported by research grants from the Ministerio de Ciencia e Innovacion (project MAT2012-35556), Ministerio de Economía y Competitividad (project MAT2013-43299-R) and Agening Network of Excellence (CSO2010-11384-E). The authors thank the staff of the ICTS National Center for Electron Microscopy, UCM, Madrid (Spain) for assistance with scanning and transmission electron microscopy.

Notes and references

- C. Wu and J. Chang, *Interface Focus*, 2012, **2**, 292.
- D. Arcos and M. Vallet-Regí, *Acta Biomater.*, 2010, **6**, 2874.
- L. L. Hench and J. M. Polack, *Science*, 2002, **295**, 1014.
- M. Vallet-Regí, *Dalton Trans.*, 2006, 5211.
- T. Kresge, M. E. Leonowicz, W. J. Roth, J. C. Vartuli and J. S. Beck, *Nature*, 1992, **359**, 710.
- D. Zhao, J. Feng, Q. Huo, N. Melosh, G. H. Fredrickson, B. G. Chmelka and G. D. Stucky, *Science*, 1998, **279**, 548.
- I. Izquierdo-Barba, D. Arcos, Y. Sakamoto, O. Terasaki, A. López-Noriega and M. Vallet-Regí, *Chem. Mater.*, 2008, **20**, 3191.
- P. N. Gunawidjaja, A. Y. H. Lo, I. Izquierdo-Barba, A. García, D. Arcos, B. Stevansson, M. Vallet-Regí and M. Eden, *J. Phys. Chem. C*, 2010, **114**, 19345.
- M. Vallet-Regí, F. Balas and D. Arcos, *Angew. Chem., Int. Ed.*, 2007, **46**, 7548.
- D. Arcos, A. López-Noriega, E. Ruiz-Hernández, O. Terasaki and M. Vallet-Regí, *Chem. Mater.*, 2009, **21**, 1000.
- C. Wu and J. Chang, *J. Controlled Release*, 2014, **193**, 282.
- D. Arcos and M. Vallet-Regí, *Acta Mater.*, 2013, **61**, 890.
- X. Yan, C. Yu, X. Zhou, J. Tang and D. Zhao, *Angew. Chem., Int. Ed.*, 2004, **43**, 5980.
- R. Li, A. E. Clark and L. L. Hench, *J. Appl. Biomater.*, 1991, **2**, 231.
- J. Zhong and D. C. Greenspan, *J. Biomed. Mater. Res.*, 2000, **53**, 694.
- M. Hamadouche, A. Meunier, D. C. Greenspan, C. Blanchat, J. P. Zhong, G. P. La Torre and L. Sedel, *J. Biomed. Mater. Res.*, 2001, **54**, 560.
- M. Vallet-Regí, C. V. Ragel and A. J. Salinas, *Eur. J. Inorg. Chem.*, 2003, 1029.
- D. Arcos, D. C. Greenspan and M. Vallet-Regí, *Chem. Mater.*, 2002, **14**, 1515.
- M. Vallet-Regí, A. J. Salinas and D. Arcos, *J. Mater. Sci.: Mater. Med.*, 2006, **17**, 1011.
- T. Kokubo, H. Kushitani, S. Saka, T. Kitsugi and T. Yamamuro, *J. Biomed. Mater. Res.*, 1990, **24**, 721.
- L. L. Hench, *J. Am. Ceram. Soc.*, 1991, **74**, 1487.
- T. Kokubo and H. Takadama, *Biomaterials*, 2006, **27**, 2907.
- M. Bohner and J. Lemaitre, *Biomaterials*, 2009, **30**, 2175.
- X. Yan, X. Huang, C. Yu, H. Deng, Y. Wang and Z. Zhang, *Biomaterials*, 2006, **27**, 3396.
- E. Leonova, I. Izquierdo-Barba, D. Arcos, A. Lopez-Noriega, N. Hedin, M. Vallet-Regí and M. Eden, *J. Phys. Chem. C*, 2012, **112**, 5552.
- M. Alcaide, P. Portoles, A. López-Noriega, D. Arcos, M. Vallet-Regí and M. T. Portoles, *Acta Biomater.*, 2010, **6**, 892.
- X. Li, X. P. Wang, D. N. He and J. L. Shi, *J. Mater. Chem.*, 2008, **18**, 4103.
- C. Wu, W. Fan, M. Gelinsky, Y. Xiao, P. Simon, R. Schulze, T. Doert, Y. Luo and G. Cuniberti, *Acta Biomater.*, 2011, **7**, 1797.
- C. Wu, Y. Zhou, C. Lin, J. Chang and Y. Xiao, *Acta Biomater.*, 2012, **8**, 3805.
- C. Wu, R. Miron, A. Sculean, S. Kaskel, T. Doert, R. Schulze and Y. Zhang, *Acta Biomater.*, 2011, **32**, 7068.
- C. Wu, Y. Zhou, W. Fan, P. Han, J. Chang, J. Yuen, M. Zhang and Y. Xiao, *Biomaterials*, 2012, **33**, 2076.
- C. Wu, Y. Zhou, M. Xu, P. Han, L. Chen, J. Chang and Y. Xiao, *Biomaterials*, 2013, **34**, 422.
- A. J. Salinas, S. Shruti, G. Malavasi, L. Menabue and M. Vallet-Regí, *Acta Biomater.*, 2011, **7**, 3452.
- S. Shruti, A. J. Salinas, G. Lusvardi, G. Malavasi, L. Menabue and M. Vallet-Regí, *Acta Biomater.*, 2013, **9**, 4836.

- 35 X. Li, X. Wang, Z. Hua and J. Shi, *Acta Mater.*, 2008, **56**, 3260.
- 36 A. López-Noriega, D. Arcos and M. Vallet-Regí, *Chem. – Eur. J.*, 2010, **16**, 10879.
- 37 H. M. Lin, W. K. Wang, P. A. Hsiung and S. G. Shyu, *Acta Biomater.*, 2010, **6**, 3256.
- 38 X. Wang, X. Li, K. Onuma, A. Ito, Y. Sogo, K. Kosuge and A. Oyane, *J. Mater. Chem.*, 2010, **20**, 6437.
- 39 H. S. Yun, S. E. Kim and Y. T. Hyeon, *Chem. Commun.*, 2007, 2139.
- 40 H. S. Yun, S. E. Kim, Y. T. Hyeon, S. J. Heo and J. W. Shin, *Chem. Mater.*, 2007, **19**, 6363.
- 41 G. F. Wei, X. X. Yan, J. Yi, L. Z. Zhao, L. Zhou, Y. H. Wang and C. Z. Yu, *Microporous Mesoporous Mater.*, 2011, **143**, 157.
- 42 Y. F. Zhu and S. Kaskel, *Microporous Mesoporous Mater.*, 2009, **118**, 176.
- 43 X. Wang, X. Li, A. Ito and Y. Sogo, *Acta Biomater.*, 2011, **7**, 3638.
- 44 J. Lacroix, J. Lao and E. Jallot, *J. Phys. Chem. C*, 2013, **117**, 23066.
- 45 G. J. A. A. Soler-Illia, C. Sanchez, B. Lebeau and J. Patarin, *J. Chem. Rev.*, 2002, **102**, 4093.
- 46 G. J. A. A. Soler-Illia, E. L. Crepaldi, D. Grosso and C. Sanchez, *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.*, 2003, **8**, 109.
- 47 H. Yamada, C. Urata, S. Higashimori, Y. Aoyama, Y. Yamauchi and K. Kuroda, *ACS Appl. Mater. Interfaces*, 2014, **6**, 3491.
- 48 T. Suzuki, H. Miyata, M. Watanabe and K. Kuroda, *Chem. Mater.*, 2006, **18**, 4888.
- 49 A. Shimojima and K. Kuroda, *J. Sol-Gel Sci. Technol.*, 2008, **46**, 307.
- 50 A. García, M. Cicuéndez, I. Izquierdo-Barba, D. Arcos and M. Vallet-Regí, *Chem. Mater.*, 2009, **21**, 5474.
- 51 N. Letaïef, A. Lucas-Girot, H. Oudadesse, R. Dorbez-Sridi and P. Boullay, *Microporous Mesoporous Mater.*, 2014, **195**, 102.
- 52 X. Yan, G. Wei, L. Zhao, J. Yi, H. Deng and L. Wang, *Microporous Mesoporous Mater.*, 2010, **132**, 282.
- 53 D. Arcos, D. C. Greenspan and M. Vallet-Regí, *J. Biomed. Mater. Res.*, 2003, **65A**, 344.
- 54 Y. Deng, X. Li and Q. Li, *Ind. Eng. Chem. Res.*, 2009, **48**, 8829.

3.1.3 Estudio de la influencia de la composición química de MBGs en el sistema SiO₂-CaO-P₂O₅

De lo expuesto anteriormente se deduce que los surfactantes F68 y F127 son los SDA que mejores resultados proporcionan para la composición 85SiO₂-10CaO-5P₂O₅ en términos de estructura mesoporosa ordenada. Concretamente para 85S-F68 se observó por añadidura un mejor efecto osteoinductor en lo relativo a una mejor diferenciación a fenotipo osteoblástico. Sin embargo y de igual modo que los vidrios en sol-gel, en los MBGs del sistema SiO₂-CaO-P₂O₅ las proporciones entre SiO₂ y CaO son determinantes en las propiedades biológicas del material [67]. Una mayor cantidad de CaO en la composición de los vidrios sol-gel se traduce en una mayor solubilidad, un incremento de la bioactividad y una mejora en el comportamiento ostogénico [68].

Desde un punto de vista estructural, la relación molar entre SiO₂ y CaO puede dar lugar a diferentes estructuras incluso para un mismo surfactante, como quedó demostrado por la profesora Vallet-Regí y colaboradores [49]. Por todo ello, decidimos profundizar en el estudio de las propiedades estructurales y bioactivas de los MBGs obtenidas con F127 y F68, pero variando la composición química dentro del sistema SiO₂-CaO-P₂O₅ y explorar el comportamiento de composiciones más ricas en CaO. El conjunto de MBGs obtenidos se recogen en la **tabla 3**.

La tabla 3. Composiciones químicas, cantidades de precursores y surfactantes utilizados para los diferentes MBG sintetizados.

Nomenclatura	Composición (% mol)	SDA (2 g)	TEOS (mL)	TEP (mL)	Ca(NO ₃) ₂ ·4H ₂ O (g)
58S-F127	58SiO ₂ -37CaO-	F127	3.49	0.51	2.47
58S-F68	5P ₂ O ₅	F68			
75S-F127	75SiO ₂ -20CaO-	F127	3.58	0.42	1.10
75S-F68	5P ₂ O ₅	F68			
85S-F127	85SiO ₂ -10CaO-	F127	3.70	0.34	0.49
85S-F68	5P ₂ O ₅	F68			

Caracterización de los materiales

La **figura 10** muestra los difractogramas de rayos X de los MBGs sintetizados. 85S-F68s muestra un máximo de difracción a $1,6^\circ$ asignable a la reflexión (1 0) de una fase $p6mm$, mientras que 85S-F127 presenta tres máximos de difracción a $1,1^\circ$ y dos hombros a $1,9^\circ$ y $2,1^\circ$, asignables a las reflexiones (1 0), (1 1) y (2 0) respectivamente. La presencia de estos máximos indica que los MBGs con composición 85S presentan estructuras mesoporosas ordenadas hexagonales planas $p6mm$ [69]. El material 75S-F127 presenta un máximo de difracción a $1,2^\circ$ y un hombro a $1,9^\circ$ asignables a las reflexiones (1 0), (1 1) también correspondientes a una estructura mesoporosa ordenada $p6mm$. Los difractogramas para los materiales 75S-F68, 58S-F68 y 58S-F127 no mostraban máximos definidos, por lo que no presentan orden mesoporoso. Los estudios indican que además de composiciones bajas en CaO, el uso del surfactante F127 favorece la formación de estructuras ordenadas respecto a F68.

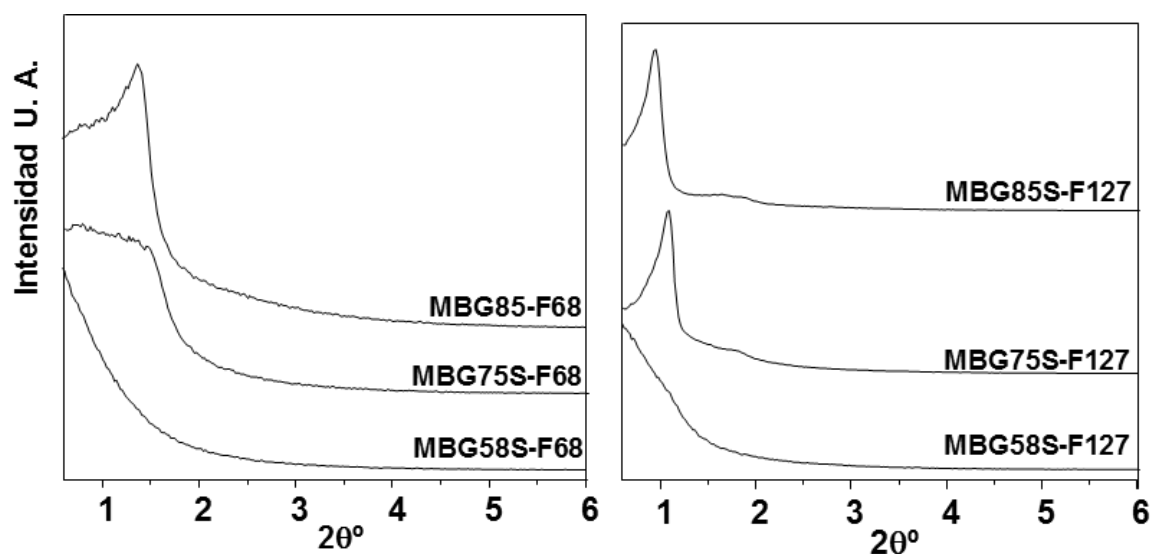


Figura 10. Difractogramas para los MBG a) sintetizados con F68 b) sintetizados con F127.

A la vista de los resultados podemos afirmar que la incorporación de F127 favorece la obtención de materiales mesoporosos más ordenados, respecto a lo sintetizados con F68. Estos hechos se pueden explicar porque F127 posee en su estructura cadenas hidrofílicas de mayor tamaño que permiten a los precursores de los MBGs organizarse en torno a ellas con menor impedimento estérico, en comparación con la región hidrofílica más pequeña del F68.

Las propiedades texturales de los MBGs sintetizados se midieron por absorción de N₂. Tanto el tipo de SDA como la composición química afectan a las propiedades texturales (tabla 4). Por otra parte, al comparar las propiedades texturales de las composiciones 75S, se puede observar que el orden mesoporoso de 75S-F127 se traduce en mayor S_{BET} (314.5 m²/g), que en 75S-F68 (271.3 m²/g). Además 75S-F127 posee también un tamaño superior de poro, lo que permitiría su uso como matriz portadora de fármacos de mayor tamaño.

Tabla 4. Propiedades texturales de los MBG, sintetizados con los surfactantes F127 y F68.

Composición	F68			F127		
	S _{BET} (m ² ·g ⁻¹)	D _{poro} (nm)	V poro (cm ³ ·g ⁻¹)	S _{BET} (m ² ·g ⁻¹)	D _{poro} (nm)	V poro (cm ³ ·g ⁻¹)
58S	115.8	6.1	0.23	179.1	5.6	0.14
75S	271.3	4.8	0.27	314.5	6.1	0.46
85S	261.3	3.4	0.38	272.2	7.5	0.29

Comportamiento bioactivo de los MBGs en función de su composición

A la vista de estos resultados decidimos realizar los estudios de bioactividad *in vitro* para la serie F127. El experimento se llevó a cabo añadiendo 150 mg de cada uno de los materiales en 20 mL de SBF y se mantuvo en agitación orbitalica a 37°C durante 1, 6 y 24 horas. Pasado ese tiempo los materiales fueron lavados con acetona y posteriormente se estudió la superficie del material por espectroscopia FTIR.

La **figura 11** muestra la evolución de la superficie de los MBGs por espectroscopia de FTIR tras la inmersión en SBF. Tras 24 horas de inmersión en SBF los MBG 85S y 75S muestran una banda doblete a 580-600 cm⁻¹ que es característica de fosfatos en entorno cristalino. A ese tiempo, también es posible observar un estrechamiento y desplazamiento de la banda Si-O-Si a 1100 cm⁻¹ hacia valores más bajos más cercanos a 1000 cm⁻¹ que se puede asociar a vibraciones P-O indicando la presencia de una nueva fase de fosfato cristalino en la superficie de los materiales. Por otra parte la composición 58S, si bien parece incrementar la presencia de una nueva fase de fosfato de calcio

(banda de absorción a 590 cm^{-1}), la cristalización a fase apatita parece estar retardada respecto a las composiciones con mejores propiedades texturales (75S y 85S).

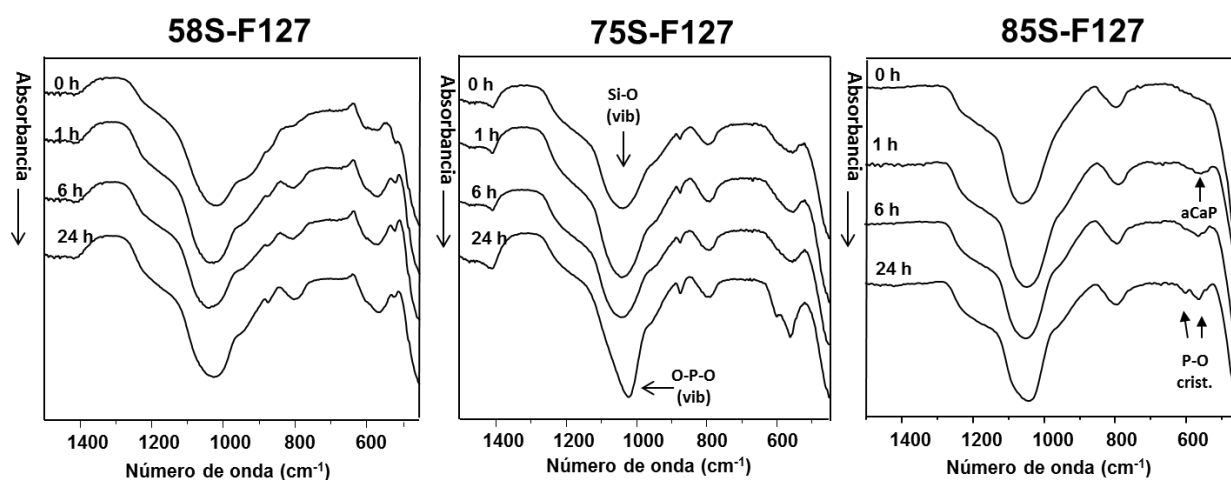


Figura 11. Espectros de FTIR de los materiales antes de sumergirlos en SBF y sumergidos a 1 h, 6 h y 24 h.

Los FTIR muestran que el MBG 75S-F127 parece tener un mejor comportamiento bioactivo pues la banda doblete a $580\text{-}600\text{ cm}^{-1}$ aparece a tiempos inferiores y presenta mayor intensidad, indicando que este material facilita la nucleación y el crecimiento de una nueva fase apatita más eficazmente que los demás. Este hecho se explica por el mayor contenido en CaO respecto a 85S, pero conservando los altos valores de superficie y porosidad, así como una estructura mesoporosa ordenado

Por todo ello podemos concluir que la composición 75S-F127 presenta las propiedades más interesantes desde el punto de vista de la composición química, la estructura porosa y las propiedades texturales, para ser objeto de evaluación con los diferentes tipos celulares que intervinieren en el proceso de remodelado óseo.

3.1.4 Estudio de los efectos del MBG 75S-F127 sobre osteoblastos, osteoclastos y macrófagos

A la vista de los resultados a se han llevado a cabo ensayos de biocompatibilidad del material 75S-F127 en contacto con osteoblastos, macrófagos y osteoclastos en colaboración con el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular I de la Facultad de Química de la Universidad Complutense de Madrid.

Resumen de “*Effects of a mesoporous bioactive glass on osteoblasts, osteoclasts and macrophages*”

1) *Evaluación de la respuesta de osteoblastos al material 75S-F127*

En este estudio se ha llevado a cabo la evaluación de células Saos-2 en contacto con 75S-F127 evaluando la proliferación, la morfología y el ciclo celular. De los resultados se determinó que hasta concentraciones de 1 mg/mL no se observaba disminución en la proliferación, ni cambios significativos en el ciclo celular o en la morfología de las células, poniendo de manifiesto la biocompatibilidad de este material frente a osteoblastos.

2) *Evaluación de la respuesta de macrófagos al material 75S-F127*

Se estudió el efecto del 75S-F127 sobre los macrófagos, observándose una disminución en la proliferación. Para evaluar la respuesta inflamatoria de los macrófagos RAW-264.7 en contacto con el MBG 75S-F127 se simularon condiciones de inflamación añadiendo al medio lipopolisacárido de *E coli* e interferón- γ [70]. De este modo fue posible cuantificar la expresión del CD80 como marcador de la polarización hacia fenotipo M1 a través de estudios de microscopia confocal y citometría de flujo. Se pudo observar que los macrófagos RAW-264.7 en presencia de 75S-F127 no se polarizaban hacia fenotipo M1 pro-inflamatorio en condiciones estimuladas, lo que permitiría descartar una respuesta inflamatoria prolongada en el tiempo en condiciones *in vivo*.

3) *Evaluación de la respuesta de osteoclastos al material 75S-F127*

El comportamiento osteoclástico en contacto con los MBG puede arrojar luz sobre los resultados de los MBGs aplicados *in vivo* como injertos óseos. En este sentido hemos evaluado los efectos de MBG 75S-F127 sobre la osteoclastogénesis o capacidad de

formación de osteoclastos a partir de macrófagos y en la actividad resorptiva una vez diferenciados.

Para evaluar la osteoclastogénesis se pusieron en contacto los materiales con el material en presencia de RANKL. Por microscopia confocal se pudo observar la presencia de células multinucleadas con anillos de actina, característicos de los osteoclastos, demostrándose que las especies solubles que libera el material al medio no afectaban a la diferenciación hacia fenotipo osteoclástico.

Los estudios de actividad resorptiva se realizaron diferenciando células RAW-264.7 en la superficie de pastillas de apatita nanocrystalina, sobre las que los osteoclastos actúan disolviendo la matriz cuando estén activos. De esta forma, sobre la superficie de las pastillas se detectaron huellas características de las lagunas osteoclásticas. Las células que habían estado en contacto con MBG-75S produjeron menos huellas y de menor tamaño que las células que no habían estado en contacto con el material. Ese comportamiento está relacionado con la liberación de iones del material al medio, fundamentalmente Ca^{2+} y especies solubles de sílice que actúan como inhibidores de la actividad osteoclastica [71,72].

El MBG no inhibe la osteoclastogénesis, lo que evitaría situaciones de hueso adinámico que impedirían la regeneración, como esta descrito para algunos fármacos como los bifosfonatos. Por otra parte, la actividad resorptiva queda disminuida, lo que favorecería la tasa formación/reabsorción siendo esto de gran interés en el tratamiento de pacientes osteoporóticos.



Regular Article

Effects of a mesoporous bioactive glass on osteoblasts, osteoclasts and macrophages



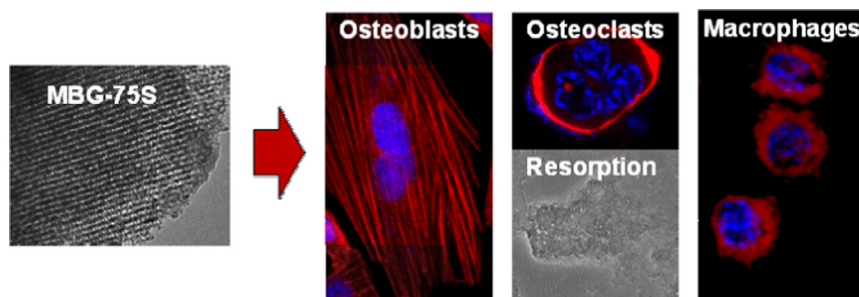
N. Gómez-Cerezo^{a,b}, L. Casarrubios^c, I. Morales^c, M.J. Feito^c, M. Vallet-Regí^{a,b,*}, D. Arcos^{a,b,*}, M.T. Portolés^{c,*}

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

^b CIBER de Bioingeniería, Biomateriales y Nanomedicina, CIBER-BBN, Madrid, Spain

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

GRAPHICAL ABSTRACT



ARTICLE INFO

Article history:

Received 18 April 2018

Revised 23 May 2018

Accepted 27 May 2018

Available online 29 May 2018

Keywords:

Mesoporous bioactive glasses

Osteoblasts

Osteoclasts

Macrophages

ABSTRACT

A mesoporous bioactive glass (MBG) of molar composition $75\text{SiO}_2\text{-}20\text{CaO-}5\text{P}_2\text{O}_5$ (MBG-75S) has been synthesized as a potential bioceramic for bone regeneration purposes. X-ray diffraction (XRD), Fourier transform infrared spectroscopy (FT-IR), nitrogen adsorption studies and transmission electron microscopy (TEM) demonstrated that MBG-75S possess a highly ordered mesoporous structure with high surface area and porosity, which would explain the high ionic exchange rate (mainly calcium and silicon soluble species) with the surrounded media. MBG-75S showed high biocompatibility in contact with Saos-2 osteoblast-like cells. Concentrations up to 1 mg/ml did not lead to significant alterations on either morphology or cell cycle. Regarding the effects on osteoclasts, MBG-75S allowed the differentiation of RAW-264.7 macrophages into osteoclast-like cells but exhibiting a decreased resorptive activity. These results point out that MBG-75S does not inhibit osteoclastogenesis but reduces the osteoclast bone-resorbing capability. Finally, *in vitro* studies focused on the innate immune response, evidenced that MBG-75S allows the proliferation of macrophages without inducing their polarization towards the M1 pro-inflammatory phenotype. This *in vitro* behavior is indicative that MBG-75S would just induce the required innate immune response without further inflammatory complications under *in vivo* conditions. The overall behavior respect to osteoblasts, osteoclasts and macrophages, makes this MBG a very interesting candidate for bone grafting applications in osteoporotic patients.

© 2018 Published by Elsevier Inc.

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

1. Introduction

Mesoporous bioactive glasses (MBGs) are bioceramics intended for bone tissue regeneration purposes. Discovered in 2004 by Zhao et al. [1], MBGs mean a significant upgrade respect to the conventional sol-gel bioactive glasses prepared by Li et al. in 1991 [2]. Similarly, to sol-gel bioactive glasses, MBGs are commonly prepared in the ternary system $\text{SiO}_2\text{-CaO-P}_2\text{O}_5$ [3–5] and, in the last decade, different research groups have incorporated different ions with potential therapeutic properties [6–11]. In the case of MBGs, the incorporation of a structure directing agent (SDA) to the synthesis results in the formation of an ordered mesophase by the self-organization of the SDA into micelles. Soluble silica, phosphate and calcium species condensates around this organic template, which leads to a mesoporous structure after calcination, thus providing higher textural properties compared to conventional sol-gel bioactive glasses [12,13].

The primary consequence on the biological behavior is a faster and more intense ionic exchange (mainly Ca^{2+} and silica species) between the MBG and the surrounding fluids [14]. In fact, some MBGs have shown the fastest *in vitro* bioactive behavior when soaked in simulated body fluid, in terms of the nucleation and growth of a carbonate nanocrystalline apatite on their surface, very similar to the biological one found in bones [15]. However, the MBG surface reactivity is not their only action mechanism. The ions released from MBG also stimulate the expression of several genes of osteoblastic cells and induce angiogenesis both *in vitro* and *in vivo* [16,17]. Recent studies suggest that these ions could also regulate immune responses by altering the ionic microenvironment between the implants and hosts [18]. The importance of the immune response during biomaterial-mediated osteogenesis makes necessary the evaluation of the osteoimmunomodulatory properties of biomaterials for bone tissue [19].

Recently, the *in vivo* response to these materials has been studied in different animal models, evidencing certain advantages respect to other bioceramics. Due to their potential bone regeneration capabilities, MBGs are being considered as bone grafts in the case of osteoporotic patients. Osteoporosis is produced by the bone remodeling disruption that is due to either increased bone resorption by osteoclasts or decreased new bone formation by osteoblasts or both [20]. The biomaterials most commonly employed for treatment of osteoporotic bone and bone regeneration have been designed to stimulate the osteogenesis process and bone formation by osteoblasts. For this reason, osteoblasts are commonly used for the *in vitro* evaluation of bone materials [21] but few studies are focused on the effects of these biomaterials on bone resorbing osteoclasts [22]. Osteoclasts are multinucleated giant cells which differentiate from hematopoietic stem cells of the monocyte/macrophage lineage through sequential steps [23] regulated by several growth factors and cytokines expressed by different bone cell types [24,25]. Osteoclasts can also differentiate *in vitro* from macrophages by stimulation with the macrophage/monocyte-colony-stimulating factor (M-CSF) and the receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand (RANKL) [22]. These agents induce the fusion of pre-osteoclasts, which become multinucleated cells, and the formation of “ruffled membrane”, critical for bone resorption, that involves the tight attachment of osteoclasts to the bone surface to create the “sealing zone” rich in F-actin [26]. During bone resorption, osteoclasts isolate the resorptive space from the surrounding bone and release matrix-degrading enzymes, hydrogen ions and chloride ions inside the sealing zone, producing the bone matrix degradation and the dissolution of the bone mineral component, respectively [27].

The effects of MBGs on osteoblasts have been widely evaluated by different research groups [7,12,13,38,41], whereas the effects on

other cell types involved in bone remodeling are practically unknown. The present study is focused on the effects of a potential mesoporous bioactive glass for bone regeneration, with molar composition $75\text{SiO}_2\text{-}20\text{CaO-}5\text{P}_2\text{O}_5$ (MBG-75S), on osteoclast differentiation, bone resorption activity and macrophage activation towards pro-inflammatory M1 phenotype. CaO plays a fundamental role in the biological properties of $\text{SiO}_2\text{-CaO-P}_2\text{O}_5$ MBGs. However, previous works demonstrated that compositions with higher CaO content led to disordered mesoporous structures [4]. The composition MBG-75S was chosen with the aim of ensuring enough CaO content while keeping the highly ordered mesoporous structure. Previously, the dose-dependent action of this powdered material on osteoblasts has been evaluated through the analysis of cell cycle, morphology, size, complexity and apoptosis after the treatment with different doses of MBG-75S.

2. Materials and methods

2.1. Synthesis and characterization of MBG-75S

Mesoporous bioactive glass MBG-75S with molar composition $75\text{SiO}_2\text{-}20\text{CaO-}5\text{P}_2\text{O}_5$ was prepared by EISA method and using Pluronic F127 as structure directing agent. For this purpose, 32 g of Pluronic F127 was dissolved in an ethanol-HCl (0.5 M) solution. Thereafter, 61.3 ml of tetraethylorthosilane (TEOS), 6.28 ml of triethylphosphate (TEP) and 17.6 mg of $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2\cdot 4\text{H}_2\text{O}$ were gradually added in 3 h intervals. The mixture was stirred for 24 h, poured into Petri dishes (9 cm in diameter) and introduced in an incubator at 30 °C for 7 days, until solvent evaporation and gelling. The transparent membranes so obtained were calcined at 700 °C for 3 h under air atmosphere. The resultant powder was gently milled in dry conditions and sieved, collecting the grain fraction below 40 μm . Chemicals of highest purity available have been used in the present study.

X-ray diffraction experiment was carried out in a Philips X'Pert diffractometer equipped with a Cu $\text{K}\alpha$ radiation (wavelength 1.5406 Å). The patterns were collected between 0.5 and 6.5 $2\theta^\circ$ angle using a Bragg-Brentano geometry. Fourier-transform infrared spectroscopy was done using a Nicolet Magma IR 550 spectrometer and using the attenuated total reflectance (ATR) sampling technique with a Golden Gate accessory.

Nitrogen adsorption/desorption isotherm was obtained with an ASAP 2020 equipment. The MBG-75S was previously degassed under vacuum for 15 h, at 150 °C. The surface area was determined using the Brunauer-Emmett-Teller (BET) method. The pore size distribution between 0.5 and 40 nm was determined from the adsorption branch of the isotherm by means of the Barrett-Joyner-Halenda (BJH) method. The surface area was calculated by the BET method and the pore size distribution was determined by the BJH method using the adsorption branch of the isotherm.

Scanning electron microscopy (SEM) was carried out using a JEOL-6335F microscope, operating at 15 kV. Transmission electron microscopy (TEM) was carried out using a JEOL-1400 microscope, operating at 300 kV (Cs 0.6 mm, resolution 1.7 Å). Images were recorded using a CCD camera (model Keen view, SIS analyses size 1024 X 1024, pixel size 23.5 mm X 23.5 mm) at 60,000 \times magnification using a low-dose condition.

2.2. Soluble species release from MBG-75S to the culture medium

The levels of soluble calcium, phosphates and silica species in the culture medium were measured by inductively coupled plasma (ICP) spectroscopy, after soaking MBG-75S in Dulbeccó's Modified Eagle's Medium (DMEM, Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, USA) (1 mg/ml) for 3 and 7 days.

2.3. Culture of human Saos-2 osteoblasts

Human Saos-2 osteoblasts (10^5 cells/ml) were cultured in the presence of 0.5, 1 and 2 mg/ml of powdered MBG-75S in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, USA) supplemented with 10% (vol/vol) fetal bovine serum (FBS, Gibco, BRL), 1 mM L-glutamine (BioWhittaker Europe, Belgium), penicillin (200 µg/ml, BioWhittaker Europe, Belgium), and streptomycin (200 µg/ml, BioWhittaker Europe, Belgium), under a 5% CO₂ atmosphere and at 37 °C. Controls in the absence of material were carried out in parallel. After 24 h, the culture medium was aspirated, the cells were washed with phosphate-buffered saline (PBS) and harvested using 0.25% trypsin-ethylene diamine tetraacetic acid (EDTA). Cell suspensions were centrifuged at 310g for 10 min and resuspended in fresh medium for the analysis of cell cycle, apoptosis, cell size and complexity by flow cytometry as described below.

2.4. Cell-cycle and apoptosis analysis by flow cytometry

Cells were resuspended in PBS (0.5 ml) and incubated with 4.5 ml of ethanol 70% during 4 h at 4 °C. Then, cells were centrifuged at 310g for 10 min, washed with PBS and resuspended in 0.5 ml of PBS with Tritón X-100 0.1%, propidium iodide (PI) 20 µg/ml and ribonuclease (RNase) 0.2 mg/ml (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). After incubation at 37 °C for 30 min, the fluorescence of PI was excited by a 15 mW laser tuning to 488 nm and the emitted fluorescence was measured with a 585/42 band pass filter in a FACScan Becton Dickinson flow cytometer. The cell percentage in each cycle phase: G₀/G₁, S and G₂/M was calculated with the CellQuest Program of Becton Dickinson and the SubG₁ fraction (cells with fragmented DNA) was used as indicative of apoptosis. For statistical significance, at least 10,000 cells were analyzed in each sample.

2.5. Cell size and complexity detection by flow cytometry

Forward angle (FSC) and side angle (SSC) scatters were evaluated as indicative of cell size and complexity, respectively, using a FACScan Becton Dickinson flow cytometer.

2.6. Osteoclast differentiation from murine RAW 264.7 macrophages

Murine RAW-264.7 macrophages (2×10^4 cells/ml) were seeded on glass coverslips and cultured in the presence of 1 mg/ml of powdered MBG-75S in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) without phenol red, supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS, Gibco, BRL), 1 mM L-glutamine (BioWhittaker Europe, Belgium), penicillin (200 µg/ml, BioWhittaker Europe, Belgium), and streptomycin (200 µg/ml, BioWhittaker Europe, Belgium). To stimulate osteoclast differentiation, 40 ng/ml of mouse receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand (RANKL) recombinant protein (TRANCE/RANKL, carrier-free, BioLegend, San Diego) and 25 ng/ml recombinant human macrophage-colony stimulating factor (M-CSF, Milipore, Temecula) were added to the culture medium. Cells were cultured under a 5% CO₂ atmosphere and at 37 °C for 7 days. Controls in the absence of material were carried out in parallel.

2.7. Lactate dehydrogenase (LDH) measurement

To evaluate the plasma membrane integrity during osteoclast differentiation, lactate dehydrogenase (LDH) activity was measured in the culture medium by an enzymatic method at 340 nm (Bio-Analítica) using a Beckman DU 640 UV-Visible spectrophotometer.

2.8. Morphological studies by confocal microscopy

Cells were seeded on glass coverslips and cultured in the presence of different doses of MBG-75S for 24 h. Controls in the absence of material were carried out in parallel. After washing with PBS, cells were fixed with 3.7% paraformaldehyde in PBS for 10 min, permeabilized with 0.1% Triton X-100 for 3 min and preincubated with PBS containing 1% bovine serum albumin (BSA) for 30 min. Then, cells were incubated with rhodamine phalloidin (1:40, v/v Molecular Probes) for 20 min to stain F-actin filaments. Samples were then washed with PBS and cell nuclei were stained with 3 µM 4'-6-diamidino-2'-phenylindole (DAPI, Molecular Probes) for 5 min. After staining and washing with PBS, cells were examined using a Leica SP2 Confocal Laser Scanning Microscope. Rhodamine fluorescence was excited at 540 nm and measured at 565 nm. DAPI fluorescence was excited at 405 nm and measured at 420–480 nm.

2.9. Osteoclast resorption activity

To evaluate the resorption activity of osteoclasts, RAW-264.7 macrophages were seeded on the surface of nanocrystalline hydroxyapatite disks and differentiate into osteoclasts in the presence of 1 mg/ml of powdered MBG-75S as it is described above. Nanocrystalline hydroxyapatite disks were prepared by controlled precipitation of calcium and phosphate salts and subsequently heated at temperatures below the sintering point, as previously described by our research group [22]. Controls in the absence of material were carried out in parallel. After 7 days of differentiation, cells were detached using cell scrapers and disks were dehydrated, coated with gold-palladium and examined with a JEOL JSM-6400 scanning electron microscope in order to observe the geometry of resorption cavities produced by osteoclasts on the surface of nano-HA disks.

2.10. Detection of pro-inflammatory M1 macrophage phenotype

To study the effect of MBG-75S on macrophage polarization towards pro-inflammatory M1 phenotype, RAW-264.7 macrophages were cultured with 1 mg/ml of this material for 24 h in the presence or the absence of *E. coli* lipopolysaccharide/interferon-γ (250 ng/ml LPS and 100 ng/ml IFN, Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, MO, USA) as inflammatory stimuli [28] in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS, Gibco, BRL), 1 mM L-glutamine (BioWhittaker Europe, Belgium), penicillin (200 µg/ml, BioWhittaker Europe, Belgium), and streptomycin (200 µg/ml, BioWhittaker Europe, Belgium) at 37 °C under a CO₂ (5%) atmosphere. Controls in the absence of material were carried out in parallel. For the analysis of macrophage proliferation, the attached RAW-264.7 cells were washed with phosphate buffered saline (PBS), harvested using cell scrapers and counted with a Neubauer hemocytometer.

The expression of CD80 as M1 marker [29] was used to detect pro-inflammatory M1 macrophages by flow cytometry and confocal microscopy. For flow cytometry studies, cells were detached, centrifuged and incubated in 45 µl of staining buffer (PBS, 2.5% FBS Gibco, BRL) with 5 µl of normal mouse serum inactivated for 15 min at 4 °C in order to block the Fc receptors on the macrophage plasma membrane and to prevent non-specific binding. Then, cells were incubated with phycoerythrin (PE) conjugated anti-mouse CD80 antibody (2.5 µg/ml, BioLegend, San Diego, California) for 30 min at 4 °C in the dark. Labelled cells were analyzed using a FACSCalibur flow cytometer. PE fluorescence was excited at 488 nm and measured at 585/42 nm.

For confocal microscopy studies, macrophages cultured on glass coverslips were fixed with 3.7% paraformaldehyde (Sigma-Aldrich

Corporation, St. Louis, MO, USA) in PBS for 10 min, washed with PBS and permeabilized with 0.1% Triton X-100 (Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, MO, USA) for 3 min. The samples were then washed with PBS and preincubated with PBS containing 1% BSA (Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, MO, USA) for 30 min to prevent non-specific binding. Samples were incubated in 1 ml of staining buffer with phycoerythrin (PE) conjugated anti-mouse CD80 antibody (2.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$, BioLegend, San Diego, California) for 30 min at 4 °C in the dark. Samples were then washed with PBS and the cell nuclei were stained with 3 μM DAPI (4'-6-diamidino-2'-phenylindole, Molecular Probes) for 5 min. Samples were examined using a Leica SP2 Confocal Laser Scanning Microscope. PE fluorescence was excited at 488 nm and measured at 575–675 nm. DAPI fluorescence was excited at 405 nm and measured at 420–480 nm.

2.11. Statistics

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

3. Results and discussion

3.1. Synthesis and characterization of MBG-75S

The structural, chemical and textural properties of MBG-75S were determined prior to any cell culture test. Low angle XRD pattern (Fig. 1a) shows two diffraction maxima at 1.05 and 1.75 $2\theta^\circ$ that could be assigned to the (1 0) and (1 1) reflections of $p6m$

hexagonal planar group, as previously observed for similar MBGs prepared with F127 as SDA [12]. FTIR spectrum (Fig. 1b) shows the characteristic bands at 500 and 1080 cm^{-1} corresponding to Si-O-Si bending and stretching mode, respectively. The weak adsorption band observed at 590 cm^{-1} corresponds to the bending vibrational modes of PO_4^{3-} groups in an amorphous environment.

The isotherm obtained by nitrogen adsorption analysis (Fig. 1c) can be described as a type IV curve, characteristic of mesoporous materials. The isotherm has a type H1 hysteresis loop in the mesopore range, which is characteristic of cylindrical pores open at both ends, having necks along the pores. The $dV/d \log D$ plot (data not shown) showed a monomodal distribution centered around 5.7 nm (see Table 1). The structural parameters obtained by XRD together with nitrogen adsorption data provide valuable information about the MBG structure. Table 1 shows the structural and textural parameters and a scheme of the MBG structure is shown in Fig. 1d. For instance, from the diffraction angle $2\theta^\circ$ of the (1 0) maxima and using the Bragg's Law

$$n\lambda = 2d\sin\theta \quad (1)$$

where n is a positive integer (in our case 1) and λ is the wavelength of the incident beam (1.5406 Å), the interplanar distance for the (0 1) was calculated as 8.41 nm. Considering the hexagonal structure of the $p6m$ planar group, the lattice parameter a of the mesoporous structure can be easily obtained (see Table 1). In a hexagonal planar structure, the lattice parameter corresponds to the distance from center of pore to center of pore, as it is shown in Fig. 1d. Using the pore size provided by the nitrogen adsorption analysis, we can also calculate the thickness of the pore walls. SEM observations (Fig. 2a) show that MBG-75S consist in particles of irregular shape, ranging in size between 10 and 40 μm . TEM study confirmed the highly ordered mesoporous structure of the MBG-75S (Fig. 2b), as well as the channel-like morphology of the pores characteristic of a $p6m$ planar group.

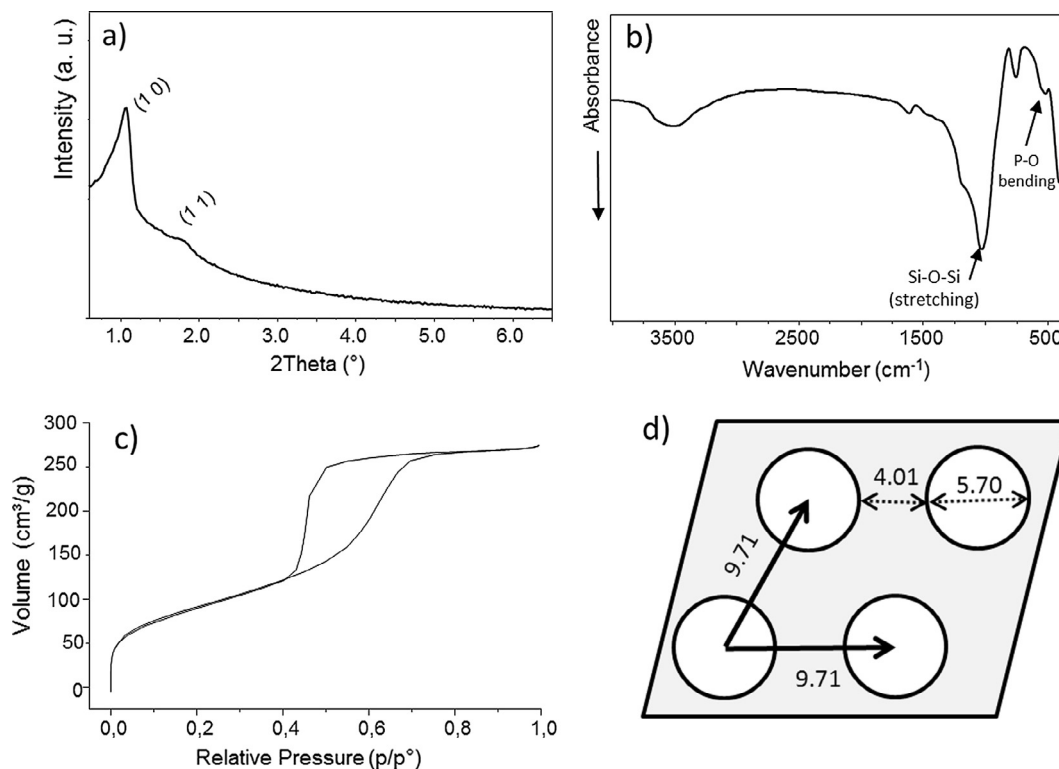
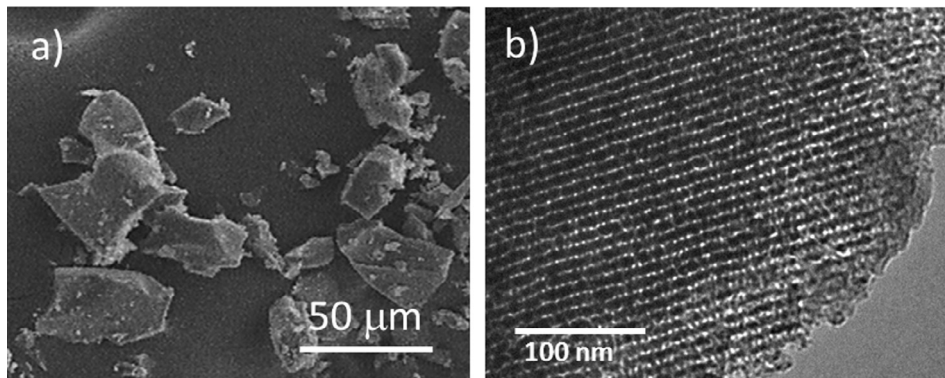


Fig. 1. Structural, chemical and textural characterization of MBG-75S; (a) XRD pattern. The Miller indexes for a planar hexagonal unit cell $p6m$ are indicated; (b) FTIR spectra; (c) Nitrogen adsorption/desorption isotherm and (d) a scheme of the MBG-75S porous structure calculated from the mentioned characterization techniques.

Table 1

Textural and structural parameters for MBG-S75.

Surface area (m ² g ⁻¹)	Pore volume (cm ³ g ⁻¹)	Pore size (nm)	d ₍₁₀₎ (nm)	Lattice parameter <i>a</i> ^a (nm)	Wall thickness ^b (nm)
305.5	0.46	5.7	8.41	9.71	4.01

^a Calculated as $a = d_{(10)} \cdot 2/\sqrt{3}$.^b Calculated as $a - \text{pore size}$.**Fig. 2.** SEM micrograph (a) and TEM image (b) obtained for MBG75-S.

Taken as a whole, we can describe the structure of MBG-75S as a highly porous material, with a regular arrangement of single modal pore size distribution. Considering the distance between pores and the pore size, we can conclude that the walls of MBG-75S are thinner than the pore diameters. This fact, together with the high surface area, pore volume and channel-like open morphology of the pores (deduced from the H1 hysteresis loop and TEM images) would facilitate the fast ionic dissolution and exchange, in contact with the surrounding fluids under both *in vitro* and *in vivo* conditions.

3.2. Dose-dependent effects of MBG-75S on human Saos-2 osteoblasts

The dose-dependent action of powdered MBG-75S on osteoblasts has been studied with human Saos-2 cells as *in vitro* experimental model. This osteosarcoma cell line is commonly used in this kind of *in vitro* studies due to its osteoblastic properties as production of mineralized matrix, high alkaline phosphatase levels, PTH receptors and osteonectin presence [30]. All these studies have been performed in direct contact between cells and powdered MBG. By culturing the cells in direct contact with the MBG particles, we can study not only the effects of the ions released from MBG but also the effect of the very fast release associated to the high textural properties of MBG. Different cell parameters (cell cycle, morphology, size, complexity and apoptosis) were evaluated after 24 h of culture of Saos-2 osteoblasts with increasing doses of MBG-75S.

The analysis of the cell cycle by flow cytometry allowed us to know the effects of this MBG on the proliferation of human Saos-2 osteoblasts through progressive stages: G₀/G₁ phase (Quiescence/Gap1), S phase (Synthesis) and finally G₂/M phase (Gap2 and Mitosis). This analysis also indicates the percentage of apoptotic cells with fragmented DNA corresponding to the SubG₁ fraction. Figs. 3 and 4 show the cell cycle profiles of osteoblasts and the percentages of cells within each cycle phase, respectively, after 24 h of culture in the absence or the presence of different doses of MBG-75S. As it can be observed in these figures, no alterations were detected in the G₀/G₁, S and the G₂/M phases after treatment with 0.5 and 1 mg/ml of this MBG. However, 2 mg/ml induced significant decreases in the G₀/G₁ phase ($p < 0.05$) and the G₂/M phase ($p < 0.005$). This effect can be explained by the significant increase

($p < 0.005$) produced by 2 mg/ml in the SubG₁ fraction (apoptotic cells). Very low levels of apoptosis were detected either in the absence of material or in the presence of 0.5 mg/ml and 1 mg/ml of MBG-75S (lower than $5\% \pm 0.5\%$), Fig. 4). The high apoptosis levels ($20\% \pm 1\%$) observed with 2 mg/ml are probably due to the presence of this material in powdered form which can produce the loss of cell anchorage, inducing a kind of apoptosis defined as anoikis [31,32].

The cell size and complexity of osteoblasts in the absence or the presence of different doses of MBG-75S were also evaluated by flow cytometry through FSC and 90° SSC light scatters, respectively. These properties depend on cell size, plasma membrane and intracellular organelles [33]. Significant effects of MBG-75S on these two parameters ($p < 0.005$) were observed (Fig. 5), evidencing dose-dependent decreases of osteoblast size and complexity induced in by this powdered material. These effects could be due to the loss of cell anchorage produced by the powdered material and to changes of the ambient ionic concentration as consequence of ion release from the material.

The morphology of human Saos-2 osteoblasts in the presence of different doses of MBG-75S was observed by confocal microscopy after staining with rhodamine-phalloidin (for F-actin filaments in red) and DAPI (for nuclei in blue). The typical characteristics of this cell type were observed in the presence of 0.5 and 1 mg/ml. However, 2 mg/ml induced cell morphology alterations in agreement with the pronounced apoptosis increase obtained by flow cytometry after treatment with this high MBG-75S dose (Fig. 6).

Considering the MBG-75S dose-dependent effects observed with Saos-2 osteoblasts, the dose chosen for studying the response of osteoclasts and macrophages to this material was 1 mg/ml.

3.3. Effects of MBG-75S on osteoclast differentiation and resorption activity

Osteoclasts can differentiate *in vitro* from macrophages by stimulation with the macrophage/monocyte colony-stimulating factor (M-CSF) and the receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand (RANKL). RAW-264.7 is a mouse macrophage cell line retaining many of the characteristics of macrophages *in vivo* [34]. In the present study, osteoclast-like cells were obtained from RAW-264.7 macrophages after 7 days of differentiation with RANKL

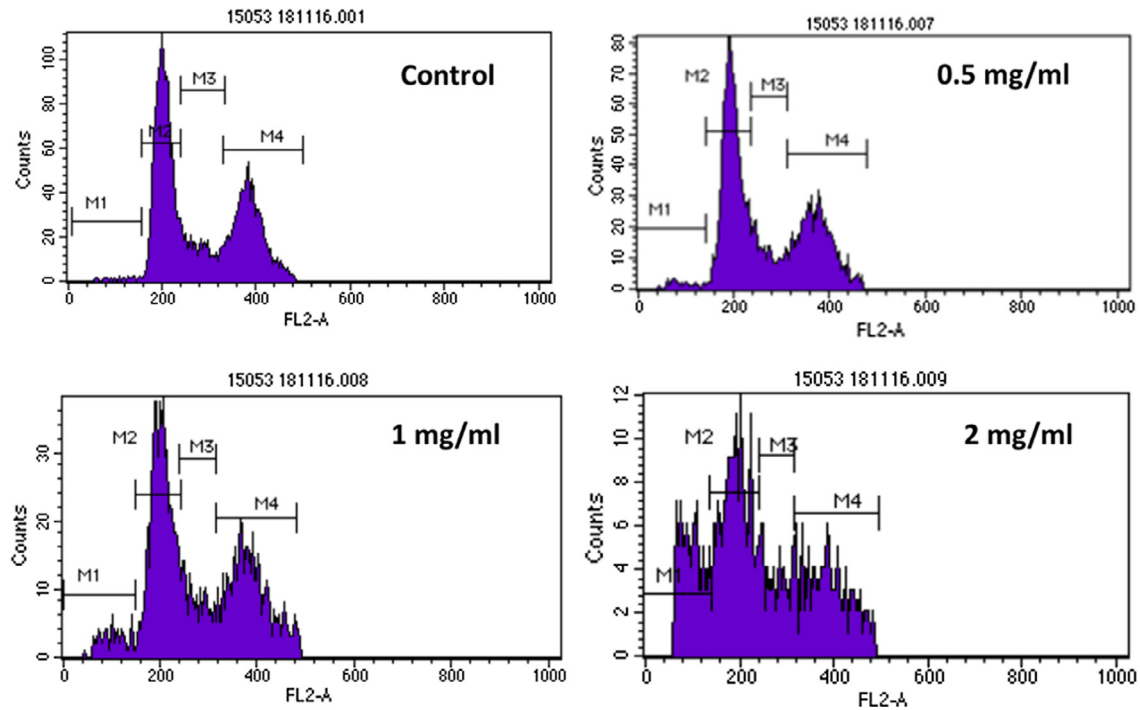


Fig. 3. Effects of different doses of MBG-75S on cell cycle profile of human Saos-2 osteoblasts after 24 h of treatment.

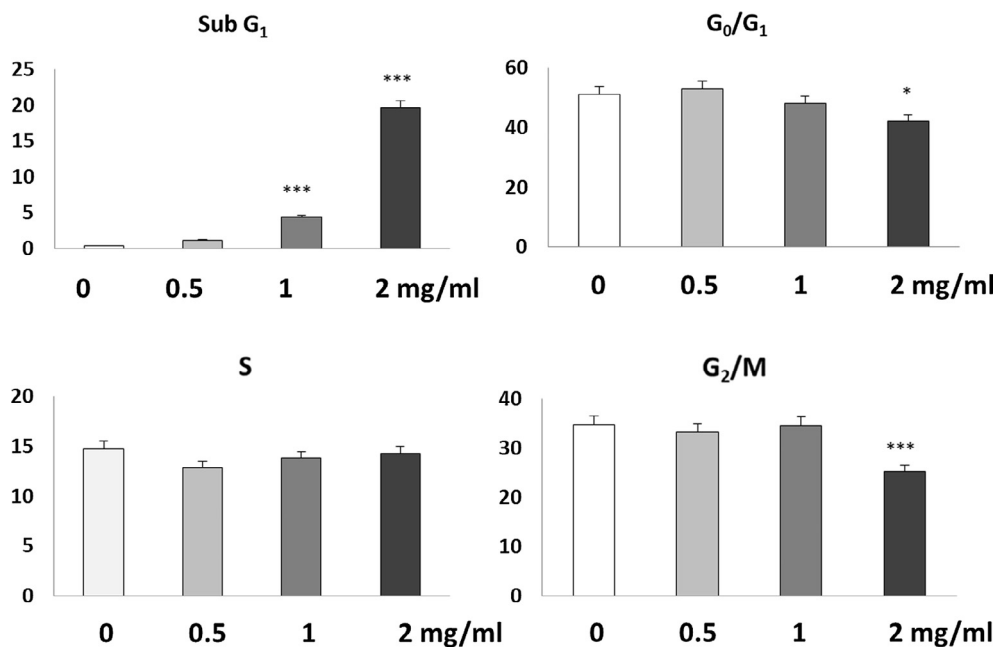


Fig. 4. Effects of different doses of powdered MBG-75S on cell cycle phases of human Saos-2 osteoblasts after 24 h of treatment. Statistical significance: * $p < 0.05$; *** $p < 0.005$.

and M-CSF, in the absence or in the presence of 1 mg/ml MBG-75S. The morphology of these osteoclast-like cells was evaluated by confocal microscopy (Fig. 7) which allowed us to observe multinucleated cells in the presence and in the absence of MBG-75S, revealing osteoclast-like cell differentiation from RAW macrophages after 7 days in both conditions. The presence of numerous actin rings, critical to define the sealing zone required for osteoclast resorption activity, was also observed (Fig. 7). Two images for each group are shown in order to highlight the presence of multinucleated cells and the actin rings, that are the main charac-

teristics of osteoclasts. A statistical analysis of the multinucleated cells has been carried out in the absence and in the presence of MBG-75S obtaining values of $10\% \pm 1\%$ of multinucleated cells in both cases in agreement with previous studies [22]. Our experiments evidence that the presence of MBG-75S does not inhibit the osteoclastogenesis, at least at the particles concentration used in this work.

The resorption cavities left by osteoclast-like cells on nanocrystalline hydroxyapatite disks after 7 days of differentiation, were evaluated by SEM. As it can be observed in Fig. 8, the morphology

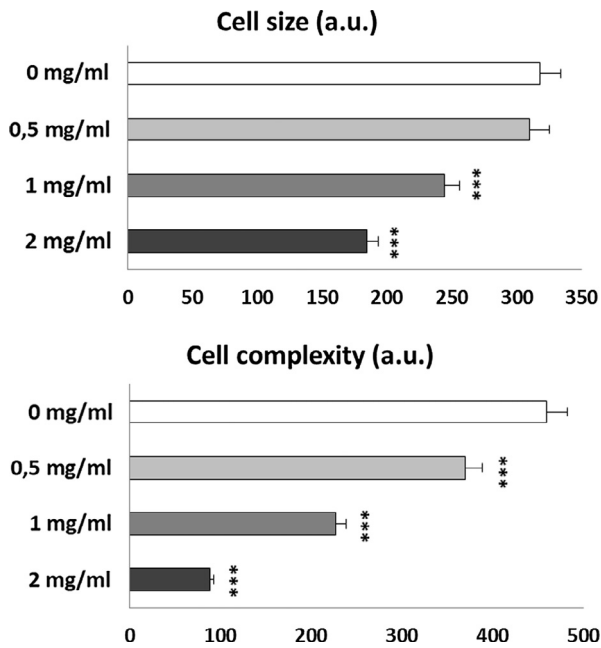


Fig. 5. Effects of different doses of powdered MBG-75S on cell size and complexity of human Saos-2 osteoblasts after 24 h of treatment. Statistical significance: *** $p < 0.005$.

and the number of these cavities evidenced that the resorptive activity is significantly modified by the presence of MBG-75S. Certainly, the cavities observed in both cases are of 20 to 40 μm in size ($30 \pm 10 \mu\text{m}$), in agreement with the sizes of the actin rings previously observed (see Fig. 7). However, in the absence of MBG-75S particles, osteoclasts leave marks significantly deeper with well-defined rims (Fig. 8, control images) in comparison with the marks left in the presence of the MBG, where only weak dark contrasts can be observed on the surface of the nano-HA substrate (Fig. 8, right images). The magnification of each image was chosen during the observation of the different samples in order to highlight the characteristics of the cavities left by osteoclasts in the presence and in the absence of MBG-75S. Higher magnifications (Fig. 8, bottom images) evidence the lower resorptive activity of osteoclasts differentiated in the presence of MBG-75S. Whereas the mark left without the MBG is a well-outlined cavity, exhibiting several micrometers in depth and a rim indicating the actin sealing area, the mark left in the presence of the MBG is just a superficial erosion poorly outlined rims.

To know the effects of MBG-75S on plasma membrane integrity during the differentiation process, the lactate dehydrogenase (LDH) released into the culture medium of osteoclast-like cells was measured after 3 and 7 days of treatment (Fig. 9). Although the presence of MBG-75S produced a significant increase of LDH levels after 3 days, no significant differences between control and treated cells were observed after 7 days of differentiation, thus

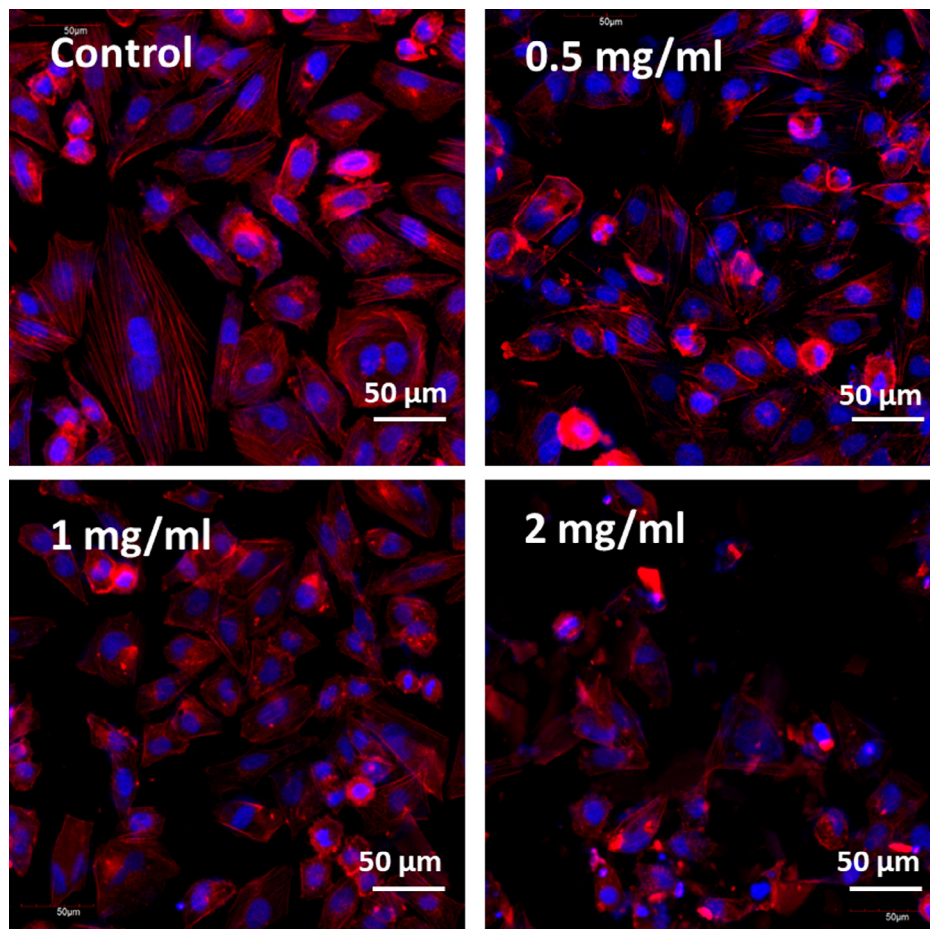


Fig. 6. Effects of different doses of powdered MBG-75S on the morphology of human Saos-2 osteoblasts observed by confocal microscopy after 24 h of treatment. Actin was stained with rhodamine-phalloidin (red) and cell nuclei with DAPI (blue). (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

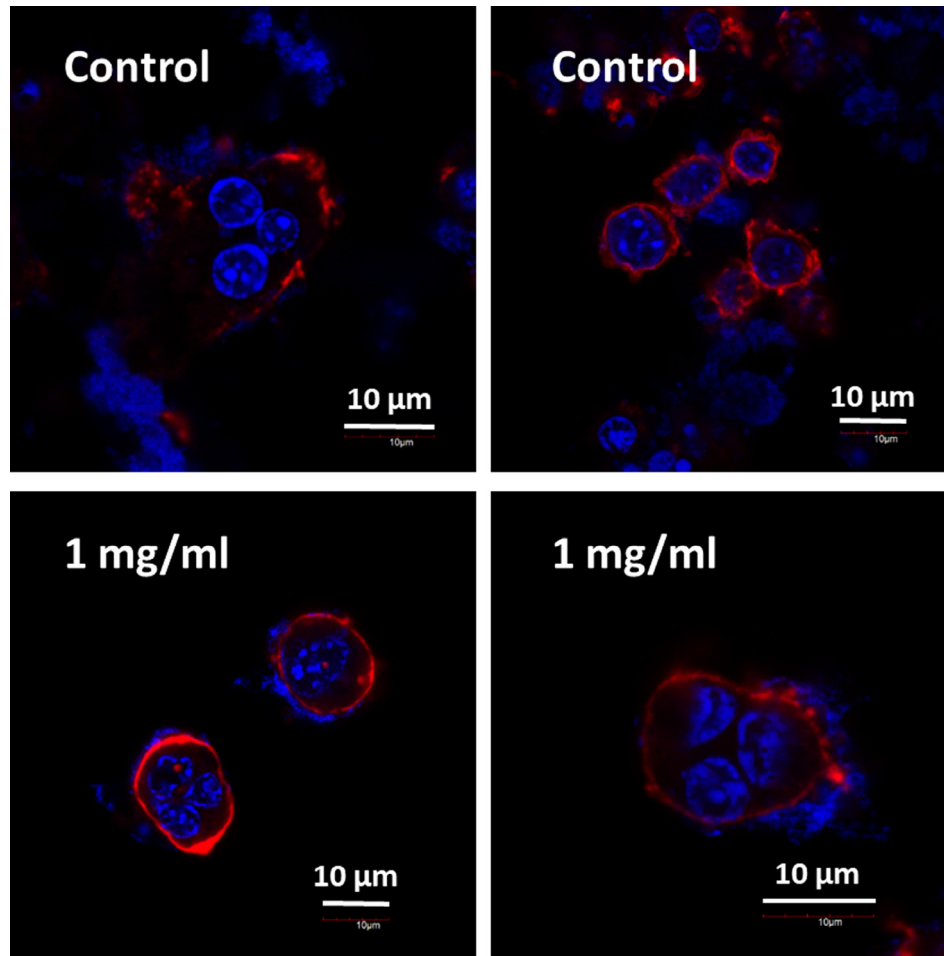


Fig. 7. Effects of 1 mg/ml of powdered MBG-75S on the morphology of osteoclast-like cells observed by confocal microscopy after 7 days of treatment. Actin was stained with rhodamine-phalloidin (red) and cell nuclei with DAPI (blue).

indicating the integrity of plasma membrane of these cells after 7 days of culture with this material.

To investigate specifically the possible effect of ionic dissolution products of MBG-75S on the resorption activity of osteoclast-like cells, Ca^{2+} , phosphate and soluble silica species levels were measured into the culture medium during the differentiation process after 3 and 7 days of treatment with 1 mg/ml of this powdered material (Fig. 10). A significant increase of Ca^{2+} , a significant decrease of phosphate and a very pronounced significant increase of silica levels ($p < 0.005$) were observed after 3 and 7 days of treatment with 1 mg/ml MBG-75S (Fig. 10).

Different authors have demonstrated that the bone-resorbing activity of osteoclasts is regulated by extracellular Ca^{2+} concentration and that high levels of this ion produce osteoclast retraction and dissipation of sealing zone, decreasing the cell spread area with actin reorganization and podosomal disassembly, which resulted in a dramatic reduction of bone resorption [35,36]. The high soluble silica levels detected into the medium can also contribute to this effect due to the inhibitory action of this ion on the osteoclastic activity [27,37]. In this sense, the ionic exchange between MBG-75S and the surrounded fluids would be facilitated by the high surface area, porosity, pore size/wall thickness ratio and, in general, by the highly ordered mesoporous structure of the MBG-75S.

Since Ca^{2+} and soluble silicate ions also stimulate the proliferation and differentiation of osteoblasts [11,27,38], MBG-75S presents a high potential for bone regeneration due to its capability for releasing these two ions.

3.4. Effects of MBG-75S on polarization of RAW-264.7 macrophages towards pro-inflammatory M1 phenotype

The implantation of a biomaterial is accompanied by tissue injury through the surgical procedure that initiates an inflammatory response, starting with the formation of a provisional matrix. Thus, after the first contact between the biomaterial and the tissue, proteins from blood and interstitial fluids adsorb to the biomaterial surface, determining the activation of coagulation cascade, complement system, platelets and immune cells. These facts result in the formation of a transient provisional matrix and the onset of the inflammatory response. On the other hand, the immune response is additionally affected by the ions and the products eluted from the biomaterial implanted in the body. All these products could reach the bloodstream affecting lymphocytes and macrophages which release reactive oxygen species (ROS) and cytokines, events which play an important role in the inflammatory response towards the biomaterial. An immune response involves the action of all types of macrophages, classical activated macrophages (M1) in the early phase and wound-healing macrophages (M2) in the resolution stage. However, when inflammatory stimuli persist at the implant site, macrophages attached to the biomaterial can foster invasion of additional inflammatory cells by secreting chemokines like IL-8, MCP-1, MIP-1b leading to chronic inflammation [39].

In order to know if MBG-75S promotes the pro-inflammatory M1 macrophage phenotype, RAW-264.7 macrophages were cultured in the absence or the presence of 1 mg/ml of this material

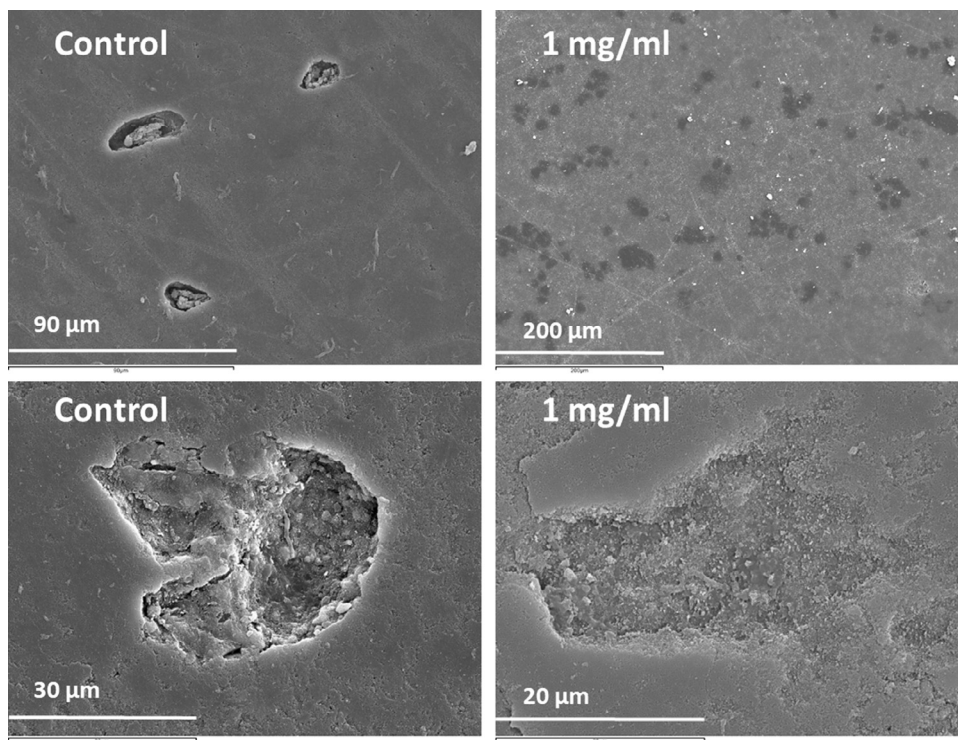


Fig. 8. Scanning electron microscopy images of the resorption cavities left by osteoclast-like cells cultured on nanocrystalline hydroxyapatite disks after 7 days of culture in the absence (control) and the presence of 1 mg/ml of powdered MBG-75S. Bottom images shows a higher magnification of a resorption cavity in the absence (control) and the presence of MBG-75S.

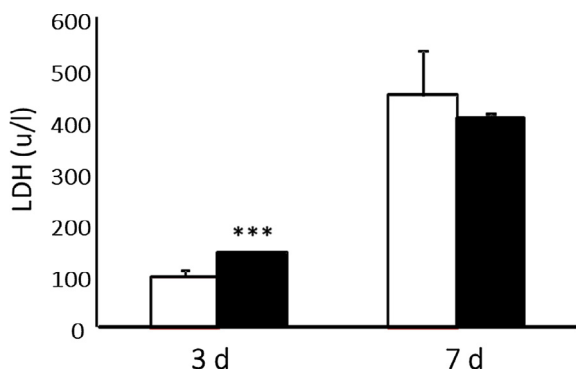


Fig. 9. Effects of 1 mg/ml of powdered MBG-75S on lactate dehydrogenase (LDH) released into the media of osteoclast-like cells during the differentiation process after 3 and 7 days of treatment. Controls without material were carried out in parallel (white). Statistical significance: *** $p < 0.005$.

for 24 h without or with *E. coli* lipopolysaccharide and interferon- γ , as inflammatory stimuli [28]. The expression of CD80 as M1 marker [29], was quantified by flow cytometry and observed by confocal microscopy with a phycoerythrin (PE) conjugated anti-mouse CD80 antibody. Previously, the effects of MBG-75S on RAW-264.7 proliferation were evaluated.

As it can be observed in Fig. 11, MBG-75 allowed RAW-264.7 macrophages to proliferate but more slowly than control cells (white), inducing a significant decrease of the cell number ($p < 0.005$), as it has been previously observed with others powdered materials for bone tissue [40]. In previous studies with other mesoporous bioactive glass MBG-85, the release of high Ca^{2+} concentrations reduced Saos-2 osteoblast proliferation whereas Si concentration did not produce negative effect on the cell proliferation [41].

The effects of 1 mg/ml of powdered MBG-75S on pro-inflammatory M1 macrophage phenotype were quantified by flow

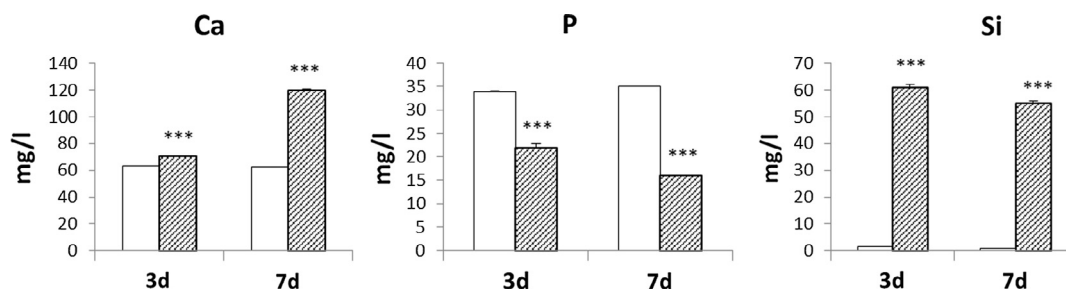


Fig. 10. Ca^{2+} , phosphorous and silicon levels measured into the culture medium of osteoclast-like cells during the differentiation process after 3 and 7 days of treatment with 1 mg/ml of powdered MBG-75S. Controls without material were carried out in parallel (white). Statistical significance: *** $p < 0.005$.

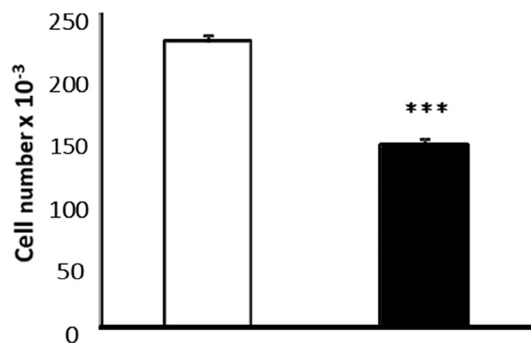


Fig. 11. Effects of 1 mg/ml of powdered MBG-75S on proliferation of RAW-264.7 macrophages after 24 h of treatment. Controls without material were carried out in parallel (white). Statistical significance: *** $p < 0.005$.

cytometry through the CD80 expression as described above in both basal and LPS/IFN- γ stimulated conditions. As it can be observed in Fig. 12, the addition of LPS/IFN- γ induced a significant increase of CD80⁺ macrophages ($p < 0.005$) in the absence (white) and in the presence (black) of MBG-75S. However, no significant differences were observed between control cells and MBG-75S treated macrophages in both basal and LPS/IFN- γ stimulated conditions. Fig. 13 shows CD80 expression of M1 RAW-264.7 macrophages observed by confocal microscopy after 24 h of treatment with *E. coli* lipopolysaccharide and interferon- γ as inflammatory stimuli.

These results evidence that MBG-75S did not induce the macrophage polarization towards M1 pro-inflammatory phenotype,

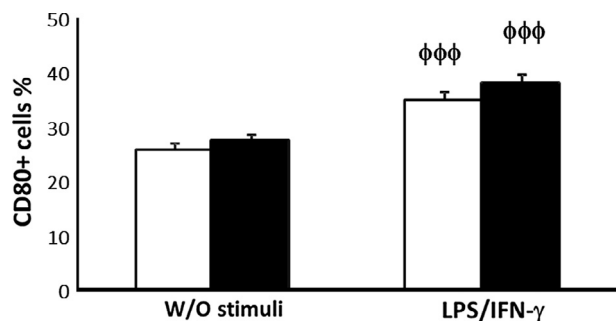


Fig. 12. Effects of 1 mg/ml of powdered MBG-75S on pro-inflammatory M1 macrophage phenotype after 24 h of treatment without or with *E. coli* lipopolysaccharide and interferon- γ (LPS/IFN- γ) as inflammatory stimuli. Controls without material were carried out in parallel (white). Statistical significance: $\phi\phi\phi$ $p < 0.005$ (comparison between basal and LPS/IFN- γ stimulated conditions).

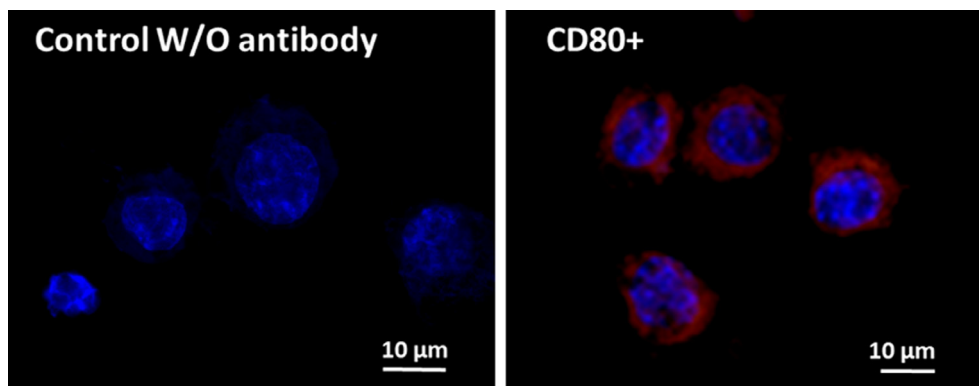


Fig. 13. CD80 expression of M1 RAW-264.7 macrophages observed by confocal microscopy after 24 h of treatment with *E. coli* lipopolysaccharide and interferon- γ as inflammatory stimuli. CD80 (red) was detected with PE conjugated anti-mouse CD80 antibody and nuclei were stained with DAPI (blue). Controls without antibody were carried out in parallel (left). (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

ensuring an appropriate immune response to this mesoporous bioactive glass.

Bone remodeling is a very complex process that involves different cellular types to reach an equilibrium between bone formation, bone resorption and inflammatory response. In a scenario of degenerative bone disease as osteoporosis, bone formation by osteoblasts is decreased respect to resorption driven by osteoclasts. For this reason, the osteoinductive effect of MBGs has been widely studied by different research groups, demonstrating significant increases in osteoblast proliferation [42–44] and a key role as differentiation stimuli from mesenchymal stem cells to osteoblast phenotype [45,46]. However, the effect of MBGs over other cell types as osteoclasts and macrophages have been poorly studied.

Bone grafts intended for bone regeneration purposes in osteoporotic patients not only should boost the osteoblastic pathway, but also to decrease the resorptive activity of osteoclast without inhibiting osteoclastogenic function. The inhibition of osteoclastogenesis could result in adynamic bone scenarios, similarly to those observed with the systemic administration of bisphosphonates, thus preventing bone regeneration.

Besides, the bone graft should not produce a strong inflammatory response, without inhibiting the innate immune response mediated by macrophages. This response is mandatory to trigger the tissue healing process, but it must be controlled to avoid chronic inflammations that would impede the appropriated bone healing.

The results observed in this study with MBG-75S with the three cell types (osteoblasts, osteoclasts and macrophages) point out very interesting responses to be considered as bone grafts, especially for osteoporotic patients. For concentration of 1 mg/ml, MBG-75S does not alter the osteoblasts cycle and their morphology. Besides, osteoclastogenesis from macrophages was not hindered in the presence of this material and their plasma membrane were not altered, indicating that the osteoclast formation pathway is not blocked by MBG-75S. However, the resorptive capability of these osteoclasts was significantly hampered, probably due to the high and fast silicon and calcium release from the materials to the culture media. In this sense, the mesoporous structure of this material is likely to play a very important role. The activity of MBG-75S over osteoclasts opens the possibility for obtaining bone grafts, which could reduce the osteoclast resorption without resulting in adynamic bone scenarios.

Finally, MBG-75S evidences an excellent behavior respect to innate immune response, as this material allows the appropriated development of macrophages without polarization towards M1 pro-inflammatory phenotype.

4. Conclusions

The ions released from MBGs can stimulate the expression of several genes of osteoblastic cells [16] and could also regulate immune responses by altering the ionic microenvironment between the implants and hosts [18]. In the present study, a mesoporous bioactive glass with molar composition 75SiO₂-20CaO-5P₂O₅ (MBG-75S) has been synthesized and its effects on osteoblasts, osteoclasts and macrophages have been evaluated jointly. This MBG exhibits a high mesoporous order and large surface area and porosity, thus allowing an efficient ionic exchange of Ca²⁺ and soluble silica with the surrounding media. MBG-75S shows *in vitro* biocompatibility respect to osteoblasts and concentrations up to 1 mg/ml do not alter cell cycle of Saos-2 cells. MBG-75S does not inhibit osteoclastogenesis but decreases the resorptive activity of osteoclast cells. This fact indicates that MBG-75S would maintain bone remodeling but would slow down the bone resorption, thus favoring faster bone regeneration. MBG-75S allows macrophage proliferation without inducing polarization towards M1 pro-inflammatory phenotype. This fact is indicative that MBG-75S would allow the innate immune response required for healing process without further inflammatory complications. Overall, the *in vitro* results obtained with osteoblasts, osteoclasts and macrophages suggest that MBG-75S is an interesting candidate as bone graft for bone regeneration purposes, especially in osteoporotic patients. Further studies are currently being performed with *in vivo* models in order to determine the advantages of this MBG respect to other bioceramics; these results will be included in a future manuscript.

Acknowledgements

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

References

- [1] X. Yan, C. Yu, X. Zhou, J. Tang, D.Y. Zhao, Highly ordered mesoporous bioactive glasses with superior *in vitro* bone-forming bioactivities, *Angew. Chem. Int. Edit.* 43 (2004) 5980–5984.
- [2] R. Li, A.E. Clark, L.L. Hench, An investigation of bioactive glass powders by sol-gel processing, *J. Appl. Biomater.* 2 (1991) 231–239.
- [3] X.X. Yan, X.H. Huang, C.Z. Yu, H.X. Deng, Y. Wang, Z.D. Zhang, S.Z. Qiao, C.Q. Lu, D.Y. Zhao, The *in-vitro* bioactivity of mesoporous bioactive glasses, *Biomaterials* 27 (2006) 3396–3403.
- [4] A. López-Noriega, D. Arcos, I. Izquierdo-Barba, Y. Sakamoto, O. Terasaki, M. Vallet-Regí, Ordered mesoporous bioactive glasses for bone tissue regeneration, *M. Chem. Mater.* 18 (2006) 3137–3144.
- [5] A. García, M. Cicuendez, I. Izquierdo-Barba, D. Arcos, M. Vallet-Regí, Essential role of calcium phosphate heterogeneities in 2d-hexagonal and 3d-cubic SiO₂-CaO-P₂O₅ mesoporous bioactive glasses, *Chem. Mater.* 21 (2009) 5474–5484.
- [6] C.T. Wu, J. Chang, Multifunctional mesoporous bioactive glasses for effective delivery of therapeutic ions and drug/growth factors, *J. Control. Rel.* 193 (2014) 282–295.
- [7] C. Wu, R. Miron, A. Sculean, S. Kaskel, T. Doert, R. Schulze, Y. Zhang, Proliferation, differentiation and gene expression of osteoblasts in boron-containing associated with dexamethasone deliver from mesoporous bioactive glass scaffolds, *Biomaterials* 32 (2011) 7068–7078.
- [8] C. Wu, Y. Zhou, C. Lin, J. Chang, Y. Xiao, Strontium-containing mesoporous bioactive glass scaffolds with improved osteogenic/cementogenic differentiation of periodontal ligament cells for periodontal tissue engineering, *Acta Biomater.* 8 (2012) 3805–3815.
- [9] S. Shruti, A.J. Salinas, E. Ferrari, G. Malavasi, G.A. Lusvardi, A.L. Doadrio, L. Menabue, M. Vallet-Regí, Curcumin release from cerium, gallium and zinc containing mesoporous bioactive glasses, *Micropor. Mesopor. Mat.* 180 (2013) 92–101.
- [10] A. Philippart, N. Gómez-Cerezo, D. Arcos, A.J. Salinas, E. Boccardi, M. Vallet-Regí, Aldo R. Boccaccini, Novel ion-doped mesoporous glasses for bone tissue engineering: Study of their structural characteristics influenced by the presence of phosphorous oxide, *J. Non-Cryst. Solids* 455 (2017) 90–97.
- [11] L. Mao, L. Xia, J. Chang, J. Liu, L. Jiang, C. Wu, B. Fang, The synergistic effects of Sr and Si bioactive ions on osteogenesis, osteoclastogenesis and angiogenesis for osteoporotic bone regeneration, *Acta Biomater.* 61 (2017) 217–232.
- [12] N. Gómez-Cerezo, I. Izquierdo-Barba, D. Arcos, M. Vallet-Regí, Tailoring the biological response of mesoporous bioactive materials, *J. Mater. Chem. B* 3 (2015) 3810–3819.
- [13] C. Wu, J. Chang, Mesoporous bioactive glasses: structure characteristics, drug/growth factor delivery and bone regeneration application, *Interface Focus* 2 (2012) 292–306.
- [14] I. Izquierdo-Barba, M. Vallet-Regí, Mesoporous bioactive glasses: Relevance of their porous structure compared to that of classical bioglasses, *Biomed. Glasses* 1 (2015) 140–150.
- [15] I. Izquierdo-Barba, D. Arcos, Y. Sakamoto, O. Terasaki, A. López-Noriega, M. Vallet-Regí, High-performance mesoporous bioceramics mimicking bone mineralization, *Chem. Mater.* 20 (2008) 3191–3198.
- [16] A. Hoppe, N.S. Güldal, A.R. Boccaccini, A review of the biological response to ionic dissolution products from bioactive glasses and glass-ceramics, *Biomaterials* 32 (2011) 2757–2774.
- [17] A.A. Gorustovich, J.A. Roether, A.R. Boccaccini, Effect of bioactive glasses on angiogenesis: A review of *in vitro* and *in vivo* evidences, *Tissue Eng. Part. B Rev* 16 (2009) 199–207.
- [18] Y. Huang, C. Wu, X. Zhang, J. Chang, K. Dai, Regulation of immune response by bioactive ions released from silicate bioceramics for bone regeneration, *Acta Biomater.* 66 (2018) 81–92.
- [19] Z. Chen, T. Klein, R.Z. Murray, R. Crawford, Ji. Chang, C. Wu, Y. Xiao, Osteoimmunomodulation for the development of advanced bone biomaterials, *Mater. Today* 19 (2016) 304–321.
- [20] T. Luhmann, O. Germershaus, J. Groll, L. Meinel, Bone targeting for the treatment of osteoporosis, *J. Control Release* 161 (2012) 198–213.
- [21] M.C. Matesanz, J. Linares, M. Oñaderra, M.J. Feito, F.J. Martínez-Vázquez, D. Arcos, S. Sánchez-Salcedo, M.T. Portolés, M. Vallet-Regí, Response of osteoblasts and preosteoblast to calcium deficient and Si substituted hydroxyapatites treated at different temperatures, *Colloids Surf. B* 133 (2015) 304–313.
- [22] M.C. Matesanz, J. Linares, I. Lilue, S. Sánchez-Salcedo, M.J. Feito, D. Arcos, M. Vallet-Regí, M.T. Portolés, Nanocrystalline silicon substituted hydroxyapatite effects on osteoclast differentiation and resorptive activity, *J. Mater. Chem. B* 2 (2014) 2910–2919.
- [23] X. Feng, Regulatory roles and molecular signaling of TNF family members in osteoclasts, *Gene* 350 (2005) 1–13.
- [24] H.K. Väänänen, T. Laitala-Leinonen, Osteoclast lineage and function, *Arch Biochem. Biophys.* 473 (2008) 132–138.
- [25] G.J. Atkins, D.R. Haynes, S.M. Geary, M. Loric, T.N. Crotti, D.M. Findlay, Coordinated cytokine expression by stromal and hematopoietic cells during human osteoclast formation, *Bone* 26 (2000) 653–661.
- [26] J.E. Aubin, Perspectives: Osteoclast adhesion and resorption: The role of podosomes, *J. Bone Miner. Res.* 7 (1992) 365–368.
- [27] G.R. Beck, S.-W. Ha, C.E. Camalier, M. Yamaguchi, Y. Li, J.-K. Lee, M.N. Weitzmann, Bioactive silica-based nanoparticles stimulate bone-forming osteoblasts, suppress bone-resorbing osteoclasts, and enhance bone mineral density *in vivo*, *Nanomedicine* 8 (2012) 793–803.
- [28] D.M. Mosser, J.P. Edwards, Exploring the full spectrum of macrophage activation, *Nat. Rev. Immunol.* 8 (2008) 958–969.
- [29] S.E. Burastero, Z. Magnani, C. Confetti, L. Abbruzzese, S. Oddera, P. Balbo, G.A. Rossi, E. Crimi, Increased expression of the CD80 accessory molecule by alveolar macrophages in asthmatic subjects and its functional involvement in allergen presentation to autologous TH2 lymphocytes, *J. Allergy Clin. Immunol.* 103 (1999) 1136–1142.
- [30] S.B. Rodan, Y. Imai, M.A. Thiede, G. Wesolowski, D. Thompson, Z. Bar-Shavit, S. Shull, K. Mann, G.A. Rodan, Characterization of a human osteosarcoma cell line (Saos-2) with osteoblastic properties, *Cancer Res.* 47 (1987) 4961–4966.
- [31] M. Alcaide, M.C. Serrano, J. Román, M.V. Cabañas, J. Peña, E. Sánchez-Zapardiel, M. Vallet-Regí, M.T. Portolés, Suppression of anoikis by collagen coating of interconnected macroporous nanometric carbonated hydroxyapatite/agarose scaffolds, *J. Biomed. Mater. Res. A* 95 (2010) 793–800.
- [32] J. Grossmann, K. Walther, M. Artinger, S. Kiessling, J. Scholmerich, Apoptotic signaling during initiation of detachment-induced apoptosis (anoikis) of primary human intestinal epithelial cells, *Cell Growth Differ.* 12 (2001) 147–155.
- [33] J.M. Udall, R.A. Moscicki, F.I. Preffer, P.D. Ariniello, E.A. Carter, A.K. Bhan, K.J. Bloch, Flow cytometry: a new approach to the isolation and characterization of Kupffer cells, *Adv. Exp. Med. Biol.* 216 (1987) 821–827.
- [34] J. Scheel, S. Weimans, A. Thiemann, E. Heisler, M. Herrmann, Exposure of the murine RAW-264.7 macrophage cell line to hydroxyapatite dispersions of various composition and morphology: assessment of cytotoxicity, activation and stress response, *Toxicol. In Vitro* 23 (2009) 531–538.
- [35] Z. Li, K. Kong, W. Qi, Osteoclast and its roles in calcium metabolism and bone development and remodeling, *Abbreviation, Biochem. Biophys. Res. Commun.* 343 (2006) 345–350.

- [36] S.Y. Hwang, J.W. Putney, Calcium signaling in osteoclasts, *Biochim. Biophys. Acta* 2011 (1813) 979–983.
- [37] Z. Mladenovic, A. Johansson, B. Willman, K. Shahabi, E. Bjorn, M. Ransjo, Soluble silica inhibits osteoclast formation and bone resorption *in vitro*, *Acta Biomater.* 10 (2014) 406–418.
- [38] X. Zhang, D. Zeng, N. Li, J. Wen, X. Jiang, C. Liu, Y. Li, Functionalized mesoporous bioactive glass scaffolds for enhanced bone tissue regeneration, *Sci. Rep.* 6 (2016) 19361–19375.
- [39] S. Franz, S. Rammelt, D. Scharnweber, J.C. Simon, Immune responses to implants: A review of the implications for the design of immunomodulatory biomaterials, *Biomaterials* 32 (2011) 6692–6709.
- [40] M.C. Matesanz, M.J. Feito, M. Oñaderra, C. Ramírez-Santillán, C. da Casa, D. Arcos, M. Vallet-Regí, J.M. Rojo, M.T. Portolés, Early *in vitro* response of macrophages and T lymphocytes to nanocrystalline hydroxyapatites, *J. Colloid Interface Sci.* 416 (2014) 59–66.
- [41] M. Alcaide, P. Portolés, A. López-Noriega, D. Arcos, M. Vallet-Regí, M.T. Portolés, Interaction of an ordered mesoporous bioactive glass with osteoblasts, fibroblasts and lymphocytes, demonstrating its biocompatibility as a potential bone graft material, *Acta Biomater.* 6 (2010) 892–899.
- [42] Y. Zhu, M. Zhu, X. He, J. Zhang, C. Tao, Substitutions of strontium in mesoporous calcium silicate and their physicochemical and biological properties, *Acta Biomater.* 9 (2013) 6723–6731.
- [43] J. Lu, J. Wei, Q. Gan, X. Lu, J. Hou, W. Song, Y. Yan, J. Mac, H. Guo, T. Xiao, C. Liu, Preparation, bioactivity, degradability and primary cell responses to an ordered mesoporous magnesium–calcium silicate, *Micropor. Mesopor. Mater.* 163 (2012) 221–228.
- [44] H.-S. Yun, J.-W. Park, S.-H. Kim, Y.-J. Kim, J.-H. Jang, Effect of the pore structure of bioactive glass balls on biocompatibility *in vitro* and *in vivo*, *Acta Biomater.* 7 (2011) 2651–2660.
- [45] C. Wu, Y. Zhou, W. Fan, P. Han, J. Chang, J. Yuen, M. Zhang, Y. Xiao, Hypoxia-mimicking mesoporous bioactive glass scaffolds with controllable cobalt ion release for bone tissue engineering, *Biomaterials* 33 (2012) 2076–2085.
- [46] C. Wu, Y. Zhou, M. Xu, P. Han, L. Chen, J. Chang, Y. Xiao, Copper-containing mesoporous bioactive glass scaffolds with multifunctional properties of angiogenesis capacity, osteostimulation and antibacterial activity, *Biomaterials* 34 (2013) 422–433.

3.1.5 Incorporación de dopantes catiónicos en MBGs SiO₂-CaO-P₂O₅ para el tratamiento de la osteoporosis

La capacidad de los MBG para intercambiar iones con los fluidos circundantes plantea la posibilidad de aplicarlos como portadores de iones terapéuticos. De esta forma, especies químicas como Li⁺, Sr²⁺, Cu²⁺ Co²⁺, Ag⁺ o B³⁺ han sido incorporados en MBGs de composición SiO₂-CaO-P₂O₅, con el objetivo de proporcionar propiedades osteogénicas, cementogénicas, angiogénicas y antibacterianas [39,41,73,74]. La liberación de estas especies químicas puede producir efecto sinérgico con el comportamiento bioactivo de los MBGs al mismo tiempo que tratan patologías. Generalmente, los iones terapéuticos se incorporan a los MBG como sales inorgánicas disueltas junto con los precursores del SiO₂, CaO, P₂O₅. Estos iones pueden permanecer en los MBGs asociados a los fosfatos o como modificadores de la red de la matriz de sílice, de forma similar al papel desempeñado por los cationes de calcio. En la mayoría de los casos iones divalentes o monovalentes como son el Cu (II), Co (II), Sr (II), Li (I) o Ag (I) poseen elevados volúmenes y /o una intensa capacidad de polarización por lo que incluso a bajas concentraciones conducen a una desorganización en la estructura mesoporosa. Sin embargo, el comportamiento químico de algunos iones trivalentes como son el B³⁺, el Al³⁺ o el Ga³⁺ les permite actuar como formadores o modificadores de la red de silicio que forma parte de los MBGs.

Para estudiar la influencia de iones con actividad terapéutica en la estructura de MBGs se llevó a cabo en colaboración con el Departamento de Ciencia e Ingeniería de Materiales perteneciente al Instituto de Biomateriales de la Universidad de Erlangen-Nuremberg.

Resumen de: *“Novel ion-doped mesoporous glasses for bone tissue engineering: Study of their structural characteristics influenced by the presence of phosphorous oxide”*

Se ha llevado a cabo la síntesis de MBGs modificados con iones que presentan actividad osteogénica y angiogénica como son Sr²⁺/Cu²⁺ o Co²⁺ con la finalidad de estudiar cómo afecta la presencia de estos iones a la estructura de los MBGs. Para este propósito se sintetizaron cuatro MBGs a los que se les incorporó Sr²⁺/Cu²⁺ o Co²⁺ a partir de sus precursores en forma de nitratos. Conociendo la capacidad de las especies

ortofosfato para interactuar con las especies catiónicas en los MBGs, hemos preparado composiciones con y sin P_2O_5 como indica la tabla 5.

Tabla 5. Composiciones molares de los MBGs sintetizados con iones terapéuticos.

Nomenclatura	Composición (% mol)
SrCu/ P_2O_5	78SiO ₂ -20CaO-1.2P ₂ O ₅ -0.8CoO
Co/ P_2O_5	79.2SiO ₂ -20CaO-0.8CoO
SrCu/no P_2O_5	78SiO ₂ -20CaO-1.2P ₂ O ₅ -0.4SrO-0.4CuO
Co/no P_2O_5	79.2SiO ₂ -20CaO -0.4SrO-0.4-CuO

Los cuatro MBGs presentan propiedades texturales similares y superficies específicas elevadas. Los resultados de TEM demostraron que la incorporación de una pequeña cantidad (0,8% en moles) de iones Sr^{2+}/Cu^{2+} o Co^{2+} conduce a estructuras mesoporosas sin orden, sin embargo, con 1,2% en mol de P_2O_5 , los MBGs exhibieron mesoestructuras altamente ordenadas.

Los datos de RMN-²⁹Si mostraron que la incorporación de P_2O_5 aumentaba la conectividad de la red pues actúa capturando los iones Sr^{2+} , Cu^{2+} y Co^{2+} , impidiendo que se comporten como modificadores de red. Además, los resultados de RMN-³¹P revelaron que la naturaleza del catión influye directamente en las características de los grupos de fosfato

Estos hechos se pueden explicar debido a la capacidad del P_2O_5 para formar grupos con cationes divalentes, como ya se ha descrito con Ca^{2+} , evitando así que estos dopantes interfieran durante la formación de la mesofase. Por lo tanto con este trabajo su puede concluir que añadir P_2O_5 es una forma efectiva de mantener la mesoestructura de los MBG, incluso cuando se incorporan cationes como Sr^{2+}/Cu^{2+} o Co^{2+} durante la síntesis para producir MBG con actividad terapéutica.

Incorporación de iones Ga^{3+} en MBGs SiO_2 - CaO - P_2O_5

Dentro de los iones terapéuticos el catión Ga^{3+} destaca especialmente en el campo de las patologías óseas pues puede interferir en el proceso de activación de los osteoclastos [39,75,76]. Su similitud química con el aluminio favorece la formación de redes

covalentes y por este motivo es habitual encontrarlo formando parte de la red de diferentes silicatos, boratos o fosfatos [77–80].

El galio reduce la actividad de resorción, la diferenciación y la formación de osteoclastos sin efectos citotóxicos de una manera dosis-dependiente, mostrando un excelente potencial para el tratamiento de la osteoporosis asociada a los implantes óseos. El Ga^{3+} ha sido evaluado para el tratamiento de esta patología asociado a cementos de fosfato de calcio con buenos resultados tanto *in vitro* como *in vivo* [81,82]. Aunque se han llevado a cabo algunos estudios que describen los efectos del Ga^{3+} en la estructura de los MBGs, así como los efectos hemostáticos y antibacterianos [83], no se encuentra en la bibliografía ningún estudio que haya considerado los efectos de MBGs con galio en células óseas, como osteoblastos u osteoclastos.

El proceso de activación de los osteoclastos ha sido ampliamente estudiado, pues resulta una etapa clave en la regeneración ósea. La homeostasis del tejido óseo se mantiene principalmente gracias a la comunicación osteoblasto-osteoclasto. Los osteoblastos sobreexpresan OPG para inhibir la formación de osteoclastos y RANKL para activar la osteoclastogénesis. El OPG y el RANKL compiten por el receptor que se encuentra en la membrana de los OC activándolo o inhibiendo la diferenciación de los macrófagos hacia fenotipo osteoclástico. El estrógeno juega un papel determinante en el equilibrio OPG/RANKL. Como consecuencia la osteoporosis afecta en mayor medida a mujeres menopáusicas [84,85]. En líneas generales, este proceso se sucede por la medicación de citoquinas y diferentes proteínas como IL-6 y TNF- α segregadas por los monocitos y los macrófagos. Concretamente el TNF- α reduce la expresión del OPG e incrementa la del RANKL, gracias a que en su estructura posee Fe^{3+} . La similitud química del Ga^{3+} con el Fe^{3+} , que actúa como transportador en el metabolismo celular, resulta indispensable para comprender su mecanismo como inhibidor de la osteoclastogénesis. Es ahí donde el Ga^{3+} compete con el receptor químico reduciendo los niveles de TNF en sangre, lo que se traduce en una inhibición del RANKL pudiendo actuar como inhibidor de la osteoclastogénesis [81,86–88].

Como se ha mencionado, la incorporación de iones a los MBGs se realiza generalmente incorporando sus precursores en forma de nitratos para posteriormente calcinar los geles y obtener MBGs dopados con iones [89,90]. Sin embargo, como se ha visto anteriormente añadir los iones terapéuticos en la estructura del vidrio, puede afectar a la

bioactividad de los MBG y a sus propiedades texturales, e incluso en algunas ocasiones no se consigue liberar al medio para llegar a dosis terapéuticas, por lo que los materiales pierden actividad. Esto sucede de forma especial con el galio que puede actuar como formador de red, por lo que al añadirlo en el método EISA como precursor pasa a formar parte de la red y muy poca cantidad se libera al medio [91].

En colaboración con el instituto “*Chimie et Interdisciplinarite: Synthese, Analyse, Modélisation*” (CEISAM)” perteneciente a la Universidad de Nantes se han llevado a cabo la síntesis y evaluación celular de MBGs con galio incorporado en su estructura.

Resumen de "The response of osteoblasts and osteoclasts to gallium containing mesoporous bioactive glasses"

El objetivo del trabajo expuesto en este apartado del capítulo ha sido obtener MBGs con aplicación como injertos óseos en hueso osteoporótico a través de la incorporación de galio. La finalidad de estos materiales es promover la regeneración ósea en hueso osteoporótico, favoreciendo el desarrollo osteoblástico e inhibiendo la osteoclastogénesis. Para ello se ha incorporado galio en forma $\text{Ga}(\text{NO}_3)_3 \cdot 4.5\text{H}_2\text{O}$ a los MBGs (58S-F127 y 85S-F127) en el sistema $\text{SiO}_2\text{-CaO-P}_2\text{O}_5$ por impregnación en medio acuoso.

Los resultados obtenidos demuestran que es posible incorporar galio a la estructura de los MBGs por impregnación post-síntesis en medio acuoso a pH básico. Los estudios realizados por RMN- ^{71}Ga y RMN- ^{29}Si mostraron que el galio se encuentra principalmente como unidades $[\text{GaO}_4]$ insolubles formando parte de la red de silicio. Sin embargo, también se pudieron detectar unidades de $[\text{GaO}_6]$ por lo que el galio también actúa como modificador de red en la estructura del MBG.

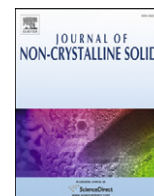
El método de síntesis impregnación post-síntesis resultó eficaz para conseguir la incorporación de elevadas cantidades de galio a los MBGs por este método. El mecanismo de incorporación del galio en forma de unidades GaO_4 se produce por condensaciones sobre la red de sílice, favorecida por el medio alcalino. La incorporación del galio como unidades GaO_6 se produce por intercambio $\text{Ga}^{3+}\text{-Ca}^{2+}$ que se encuentran como deformadores de red. Este segundo comportamiento se observa en mayor medida en el 58S-F127, por tratarse de un MBG con una elevada cantidad de calcio en su composición.

La bioactividad de los materiales no se vio afectada por la incorporación de galio. Tanto MBG-58SGa como MBG-85SGa desarrollaron una capa tipo apatita en su superficie después de seis horas en contacto con SBF. Esta prueba, aunque no es definitiva, es indicativa de la capacidad de osteointegración de este tipo de materiales en condiciones *in vivo*. En este sentido, la elevada área superficial y su porosidad serían responsables de la alta bioactividad, independientemente de la pérdida parcial de calcio en el proceso de sustitución por galio.

Los MBGs con y sin galio mostraron una elevada biocompatibilidad en contacto con células preosteoblásticas MC3T3-E1. Sin embargo, los MBGs-Ga favorecen la diferenciación celular, lo que parece indicar que la presencia de galio en los materiales favorece la proliferación y diferenciación de células osteoblásticas. Estos datos resultan relevantes, pues el galio asociado a otros cerámicos había mostrado biocompatibilidad, pero no se había observado que favoreciera la diferenciación hacia fenotipo osteoblástico.

Se ha demostrado que los materiales con galio inhiben la diferenciación hacia fenotipo osteoclástico de forma significativa incluso concentraciones muy bajas de galio liberadas al medio, lo que es indicativo de que el galio retenido en el material también es activo frente a osteoclastos.

Por todo ello podemos concluir que los MBGs-Ga son candidatos interesantes para la regeneración de defectos óseos en pacientes osteoporóticos, dado que presenta las propiedades bioactivas de los vidrios mesoporosos, buena biocompatibilidad *in vitro*, e inhibición de la osteoclastogénesis, inclinando el equilibrio de la remodelación ósea hacia una componente formadora de hueso en detrimento de la componente resorptiva.



Novel ion-doped mesoporous glasses for bone tissue engineering: Study of their structural characteristics influenced by the presence of phosphorous oxide



Anahí Philippart^a, Natividad Gómez-Cerezo^{b,c}, Daniel Arcos^{b,c}, Antonio J. Salinas^{b,c}, Elena Boccardi^a, Maria Vallet-Regi^{b,c,*}, Aldo R. Boccaccini^{a,**}

^a Institute of Biomaterials, University of Erlangen-Nuremberg, Cauerstraße 6, 91058 Erlangen, Germany

^b Departamento de Química Inorgánica y Bioinorgánica. Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid. Instituto de Investigación Sanitaria Hospital 12 de Octubre i + 12. Plaza Ramón y Cajal s/n, 28040 Madrid, Spain

^c CIBER de Bioingeniería, Biomateriales y Nanomedicina (CIBER-BBN), Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 14 August 2016

Received in revised form 19 October 2016

Accepted 20 October 2016

Available online 11 November 2016

Keywords:

Mesoporosity
Bioactive glasses
Ion-doped glasses
Therapeutic ions
NMR

ABSTRACT

Ion-doped binary SiO₂-CaO and ternary SiO₂-CaO-P₂O₅ mesoporous bioactive glasses were synthesized and characterized to evaluate the influence of P₂O₅ in the glass network structure. Strontium, copper and cobalt oxides in a proportion of 0.8 mol% were selected as dopants because the osteogenic and angiogenic properties reported for these elements. Although the four glass compositions investigated presented analogous textural properties, TEM analysis revealed that the structure of those containing P₂O₅ exhibited an increased ordered mesoporosity. Furthermore, ²⁹Si NMR revealed that the incorporation of P₂O₅ increased the network connectivity and that this compound captured the Si²⁺, Cu²⁺ and Co²⁺ ions preventing them to behave as modifiers of the silica network. In addition, ³¹P NMR results revealed that the nature of the cation directly influences the characteristics of the phosphate clusters. In this study, we have proven that phosphorous oxide entraps doping-metallic ions, granting these glasses with a greater mesopores order.

© 2016 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Bioactive glasses (BGs) are known to have an outstanding capability to stimulate bone regeneration [1] by their bone-bonding properties. Two processing methods are mainly used to prepare these glasses: the traditional melt-quenching process and the sol-gel technique. One of the main advantages of sol-gel glasses is their high bioactive behavior due to the rapid dissolution of this material originated from their fine porous structure and the important quantity of silanol groups present in their surface, which could act as nucleation sites for the formation of an apatite layer when in contact with simulated body fluid (SBF) [2–4]. Furthermore, in 2004 [5] a new generation of bioactive glasses, namely mesoporous bioactive

glasses (MBGs), was introduced. MBGs are characterized by presenting tailored (ordered) porosity at the nanometer scale, which is created by combination of supramolecular chemistry of surfactants and sol-gel chemistry and opened new application fields to these materials, such as drug delivery. Research on the application of MBGs in tissue engineering and drug delivery has been accelerated in recent years as emphasized in recent reviews [6–8]. These materials, whose composition is mostly based on the SiO₂-CaO-P₂O₅ system, have a highly ordered mesoporous structure, which induces an accelerated bioactive behavior and the capacity of confining drug molecules to be released in a controlled manner [6]. It has also been reported that the addition of phosphorous is not necessary to obtain silicate MBGs of high bioactivity [9]. However, P₂O₅ plays a significant role on the local structure of the MBGs network. In this sense, it has been reported that most of the phosphorous atoms are incorporated as orthophosphates within the silica network, thus resulting in the formation of small clusters with Ca²⁺ cations [10] that highly determines the bioactive behavior of these glasses.

During the last decade, metallic ions such as boron, copper, lithium, gallium, silver, strontium, cerium, cobalt and zinc, among others, have emerged as potential therapeutic agents with the ability to enhance bone formation by their stimulating effects on osteogenesis and angiogenesis [11,12]. In recent studies, new compositions of mesoporous

* Correspondence to: M. Vallet Regi, Departamento de Química Inorgánica y Bioinorgánica. Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid. Instituto de Investigación Sanitaria Hospital 12 de Octubre i + 12. Plaza Ramón y Cajal s/n, 28040 Madrid, Spain.

** Correspondence to: A.R. Boccaccini, Institute of Biomaterials, University of Erlangen-Nuremberg, Cauerstraße 6, 91058 Erlangen, Germany.

E-mail addresses: vallet@ucm.es (M. Vallet-Regi), aldo.boccaccini@ww.uni-erlangen.de (A.R. Boccaccini).

materials including the addition of therapeutic ions have been suggested in order to increase the materials' functionality and biological activity, particularly for applications in large-size bone defects, which are a significant clinical challenge [8]. A main property of some of the commonly used therapeutic ions such as boron, zinc, cerium and gallium, is that they are known to be osteogenic. Other functional properties such as angiogenesis and antibacterial activity can also be assigned to some therapeutic ions [8,11,12].

Notably, copper, strontium and cobalt ions have attracted particular interest as they have been reported to confer osteogenesis, angiogenesis and antibacterial properties to MBGs [8]. Cu^{2+} ions are known to stimulate the proliferation of endothelial cells, enhance cell activity and proliferation of osteoblastic cells, improve micro-vessel formation as well as to promote wound healing and to have antibacterial effects [8,12,13]. Furthermore, copper ions are not affected during scaffolds processing which involves high temperatures [14]. Sr^{2+} ions have been shown to promote osteoblast activity and to inhibit osteoclast differentiation, as well as to maintain excellent acellular bioactivity of the glasses [8,12]. Furthermore, it has been observed that the release of Sr^{2+} ions also stimulates significantly ALP activity [8,12]. Nevertheless, the doping amount within the glass must be carefully controlled as a high content of Sr will influence the glass network formation and decrease the degree of order of the mesoporous structure [8]. Co^{2+} ions are described in the literature as having angiogenic capacity determined by inducing a hypoxic cascade (including HIF-1 α stabilization and VEGF secretion from hBMSCs) [15]. Generally, Co^{2+} ions are added to the composition in order to develop hypoxia-mimicking (low oxygen pressure environment) materials [8,12,15,16]. It has been reported that by mimicking hypoxic condition, Co^{2+} ions could induce the coupling of osteogenesis and angiogenesis [15]. Nonetheless, it has also been reported that Co^{2+} ions lead easier to potential cytotoxicity compared to Cu^{2+} ions [8], an important aspect to be considered when doping the material with this ion. However, the role that even small amounts of these dopants can play on the mesoporous structure of MBG remains unclear.

In the present study, we attempt to demonstrate that the presence of phosphorous oxide in the composition allows capturing selected ionic dopants in the network, namely Sr and Co, thus conferring the material porosity of greater order. The incorporation of SrO and CuO in MBGs in an independent way has been previously reported in literature [8]. In the present investigation, both dopants were incorporated simultaneously with the aim of achieving a synergy role of both compounds for future biological assays. Results of structural characterization to elucidate the influence of the ion content on the developed MBGs are presented. Based on previous work performed on ion-doped glasses [17–20], the range of substituent's concentration was chosen so that they did not inhibit or decrease the bioactivity of the MBGs. Moreover, the amounts of the leached ions (Cu^{2+} , Sr^{2+} , Co^{2+}) were chosen to be below the toxic level in blood plasma [8,11,12,20].

2. Materials and methods

2.1. Preparation of ion-doped mesoporous glasses

Ion-doped mesoporous glasses in the systems 78SiO_2 20CaO $1.2\text{P}_2\text{O}_5$ $0.8X_{\text{ion oxide}}$ and 79.2SiO_2 20CaO $0.8X_{\text{ion oxide}}$ (in mol%) were

Table 1

Amounts of reactants for the synthesis of the different developed ion-doped glass compositions.

	TEOS [mL]	TEP [mL]	$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ [g]	$\text{Sr}(\text{NO}_3)_2$ [g]	$\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ [g]	$\text{Co}(\text{NO}_3)_2$ [g]	F127 [g]
$\text{SrCu}/\text{P}_2\text{O}_5$	9.597	0.112	2.576	0.046	0.05	–	4.5
$\text{Co}/\text{P}_2\text{O}_5$	9.597	0.112	2.576	–	–	0.128	4.5
$\text{SrCu}/\text{no P}_2\text{O}_5$	9.74	–	2.576	0.046	0.05	–	4.5
$\text{Co}/\text{no P}_2\text{O}_5$	9.74	–	2.576	–	–	0.128	4.5

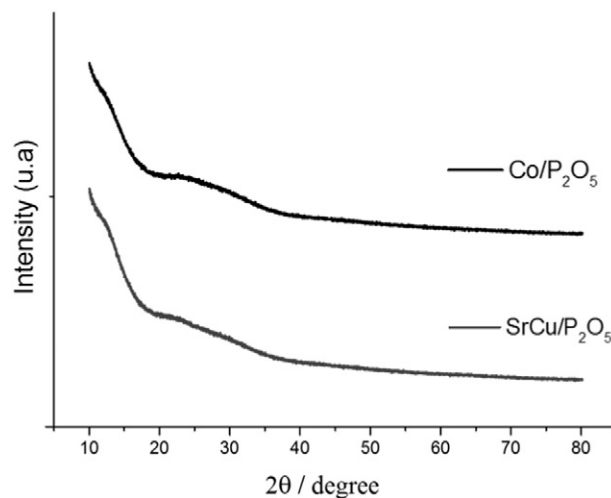


Fig. 1. High angle XRD patterns of samples $\text{SrCu}/\text{P}_2\text{O}_5$ and $\text{Co}/\text{P}_2\text{O}_5$.

synthesized, keeping the total amount of ion constant. The glasses were doped on the one hand with a mixture of strontium and copper ions, on the other hand with cobalt ions. The MBGs were prepared by the evaporation-induced self-assembly method (EISA) [20,21] and using Pluronic® F127 as structure-directing agent. Pluronic® F127 was dissolved overnight in 85 mL EtOH with 1.2 mL HNO_3 (0.5 N). Reactants were then added under continuous stirring in the following order: tetraethyl orthosilicate (TEOS), in the case of the phosphorous containing compositions triethyl phosphate (TEP), calcium nitrate $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ and strontium nitrate $\text{Sr}(\text{NO}_3)_2$ or copper nitrate $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 2.5\text{H}_2\text{O}$ or cobalt nitrate $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (Sigma-Aldrich, Germany), with a 3 h interval between each addition. The reaction was left under constant stirring at room temperature (RT) for 24 h, and was then poured into petri-dishes (15 mL/petri-dish) for EISA during 5 to 7 days before proceeding with the heat treatment. The dried gels were calcinated at 700 °C for 3 h. The exact amounts of reactants are mentioned in Table 1.

2.2. Characterization of the ion-doped MBGs

Powder X-ray diffraction (XRD) analysis was performed using a D8 ADVANCE diffractometer (Bruker, Madison, US) in a 2θ range from 20 to 80°. BG powders were dispersed in ethanol. Then, the solution was dripped on off-axis cut, low background silicon wafers (Bruker AXS, Germany). For the small angle measurements Philips X'Pert

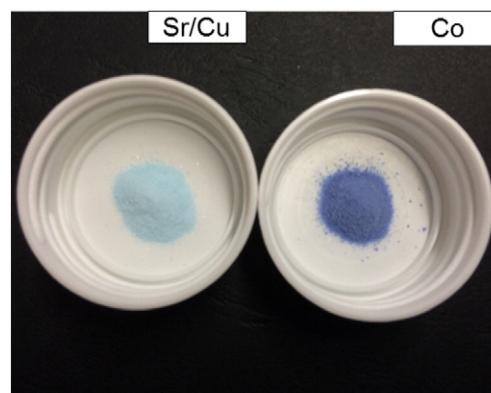


Fig. 2. Image showing optical characteristics of samples doped with SrCu ions (on the left) and with Co ions.

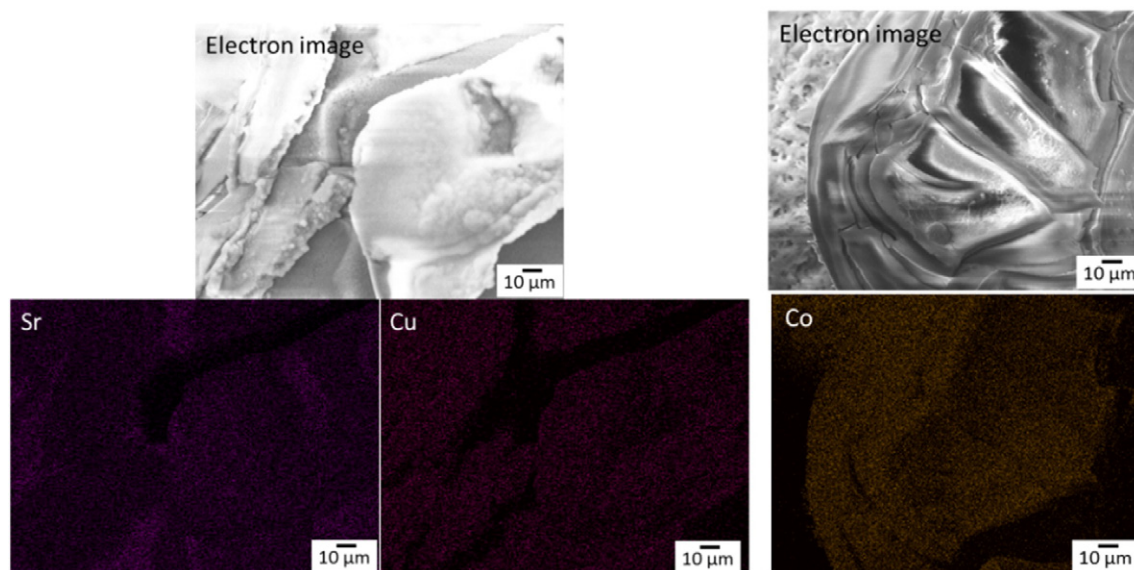


Fig. 3. Images showing SEM and EDX mapping analysis (Sr, Cu and Co elements) for sample SrCu/P₂O₅ (left side) and sample Co/P₂O₅ (right side).

diffractometer equipped with Cu K α radiation (wavelength 1.5418 Å) was used. XRD patterns were collected in the 2 θ range between 0.5 θ° and 6.5 θ° , with a step size of 0.02 θ° and counting time of 4 s per step.

Scanning electron microscope (SEM) micrographs of samples were recorded with an Auriga SEM Instrument (Zeiss, Germany). Energy dispersive spectroscopy (EDS) (Oxford Instruments) was performed to obtain a qualitative assessment of the ions in the different compositions.

For transmission electron microscopy (TEM) analysis, samples were dispersed with ethanol on a lacey carbon film. In order to observe the mesoporous structure of the materials a JEOL-3010 transmission electron microscope operating at an acceleration voltage of 300 kV was used. Images were obtained using a CCD camera (model Keen view, SIS analyses size 1024 \times 1024, pixel size 23.5 mm \times 23.5 mm) at 30 000 \times and 60 000 \times magnification using a low-dose condition. Fourier transform (FT) patterns were conducted using a digital micrograph (Gatan).

Nitrogen physisorption isotherms were measured at 77 K using Micrometrics ASAP 2010 and ASAP 2020 porosimetry instruments. Prior to the measurements the samples were outgassed at least for 12 h at 120–150 $^\circ\text{C}$ under vacuum. Pore size distribution curves were calculated from the adsorption branch of the isotherm according to the Barrett, Joyner and Halenda (BJH) method to determine mesoporous size distribution. The total pore volume was calculated from the adsorption point at 0.98 P/P₀. Specific surface areas were obtained from the BET equation in the linear range between 0.07 and 0.23 P/P₀.

$^1\text{H} \rightarrow ^{29}\text{Si}$ and $^1\text{H} \rightarrow ^{31}\text{P}$ CP (cross-polarization)/MAS (magic-angle-spinning) and single-pulse (SP) solid-state nuclear magnetic resonance (NMR) measurements were performed to evaluate the different silicon and phosphorus environments in the synthesized samples. The NMR spectra were recorded on a Bruker Model Avance 400 spectrometer. Samples were spun at 10 kHz for ^{29}Si and 6 kHz in the case of ^{31}P . Spectrometer frequencies were set to 79.49 and 161.97 MHz for ^{29}Si and ^{31}P , respectively. Chemical shift values were referenced to tetramethylsilane (TMS) and H₃PO₄ for ^{29}Si and ^{31}P , respectively. All spectra were obtained using a proton enhanced CP method, using a contact time of 1 ms. The time period between successive accumulations was 5 and 4 s for ^{29}Si and ^{31}P , respectively, and the number of scans was 10,000 for all spectra.

3. Results and discussion

The developed samples SrCu/P₂O₅ and Co/P₂O₅ were heat treated at 700 $^\circ\text{C}$. In order to confirm the amorphous state of the samples, XRD analyses were conducted. Results are shown in Fig. 1.

No diffraction peaks are observed from the XRD spectra (Fig. 1) of samples SrCu/P₂O₅ and Co/P₂O₅ indicating the amorphous state. A broad reflection in the range between 2 θ = 20 and 35 $^\circ$ is clearly noticed for both samples suggesting that no crystalline phase is developed within the sample. Similar curves were obtained for SrCu/noP₂O₅ and Co/noP₂O₅ samples (not shown).

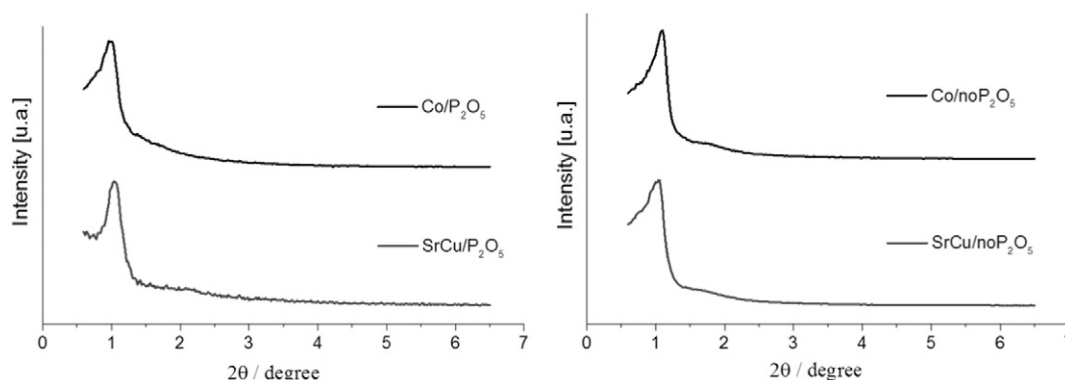


Fig. 4. SAXRD patterns of SrCu/P₂O₅ and Co/P₂O₅ (left side) as well as SrCu/noP₂O₅ and Co/noP₂O₅ (right side) measured in the small angle range (2 θ : 0.5 to 8).

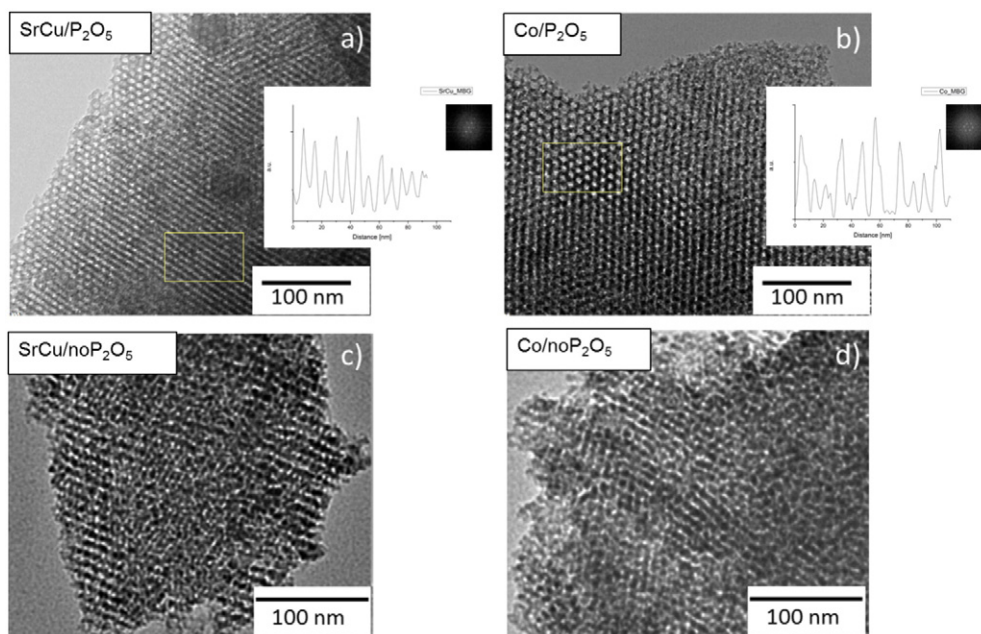


Fig. 5. TEM images showing the mesoporous structure of a) sample SrCu/P₂O₅, b) sample Co/P₂O₅, c) sample SrCu/noP₂O₅ and d) sample Co/noP₂O₅.

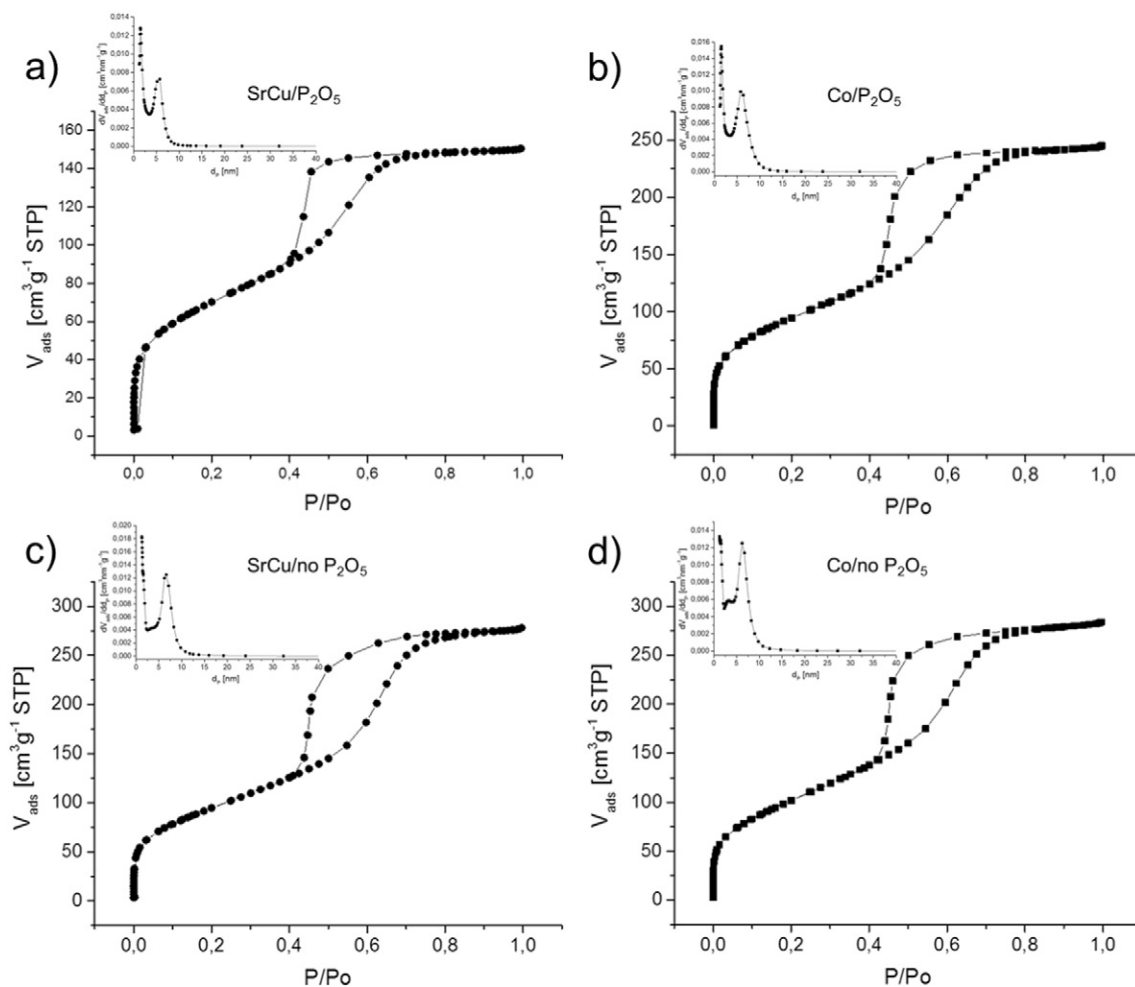


Fig. 6. Nitrogen adsorption isotherms of the synthesized samples and pore size distribution calculated from the adsorption isotherms (insets).

Table 2Structural parameters of samples SrCu/P₂O₅, SrCu/noP₂O₅, Co/P₂O₅, and Co/noP₂O₅.

Samples	S _{BET} [m ² /g]	V _p [cm ³ /g]	d _{p,mean} [nm]
SrCu/P ₂ O ₅	254	0.233	3.0
Co/P ₂ O ₅	346	0.379	3.6
SrCu/noP ₂ O ₅	346	0.417	6.6
Co/noP ₂ O ₅	377	0.439	6.4

Fig. 2 displays the general aspect of the two different ion-doped systems. The particular colours of the samples come directly from copper for samples SrCu/P₂O₅ and SrCu/no and cobalt for samples Co/P₂O₅ and Co/noP₂O₅.

A first appreciation of the homogeneity of the doped glasses was revealed by EDX analysis, as shown in Fig. 3.

From images of Fig. 3, it is observed that ions are well dispersed on the surface of the prepared materials. We have to take into consideration that EDS analysis is qualitative, thus the intensity of the elements coloured in the mapping images is not a quantitative representation of the doped-element amounts. Samples SrCu/noP₂O₅ and Co/noP₂O₅ showed similar results.

Fig. 4 shows the SAXRD spectra of the four samples, namely SrCu/P₂O₅, SrCu/noP₂O₅, Co/P₂O₅ and Co/noP₂O₅. The four patterns exhibit a unique peak at around $2\theta = 1.20^\circ$, typical for mesoporous materials, which could be attributed to the (1 0) maxima of a 2D-hexagonal p6m phase [4,17,22–24]. However, the information derived from these XRD patterns is not enough to assign a specific ordered phase for each sample and further evidences, as those provided by TEM, are required.

Fig. 5 revealed results obtained by TEM studies. After carrying out the observations of at least 6 crystals of each sample, it was concluded that a clear ordered 2D-hexagonal mesoporous structure is observed for all P₂O₅ containing samples. The images shown in Fig. 5 are only the representative ones of a much wider study. Visibly, sample Co/P₂O₅ appears to have a lightly higher ordered mesoporosity than sample SrCu/P₂O₅, which is likely due to the double element doping for sample SrCu/P₂O₅ that tends to decrease the order in the structure. For samples prepared without TEP addition during the synthesis, a clear decrease in the order of the structure is observed. Samples SrCu/noP₂O₅ and Co/noP₂O₅ exhibit porosity in the mesosize, but the order is only kept in small-range regions, whereas most of the material exhibits a very defective structure, which is difficult to assign to a specific space group.

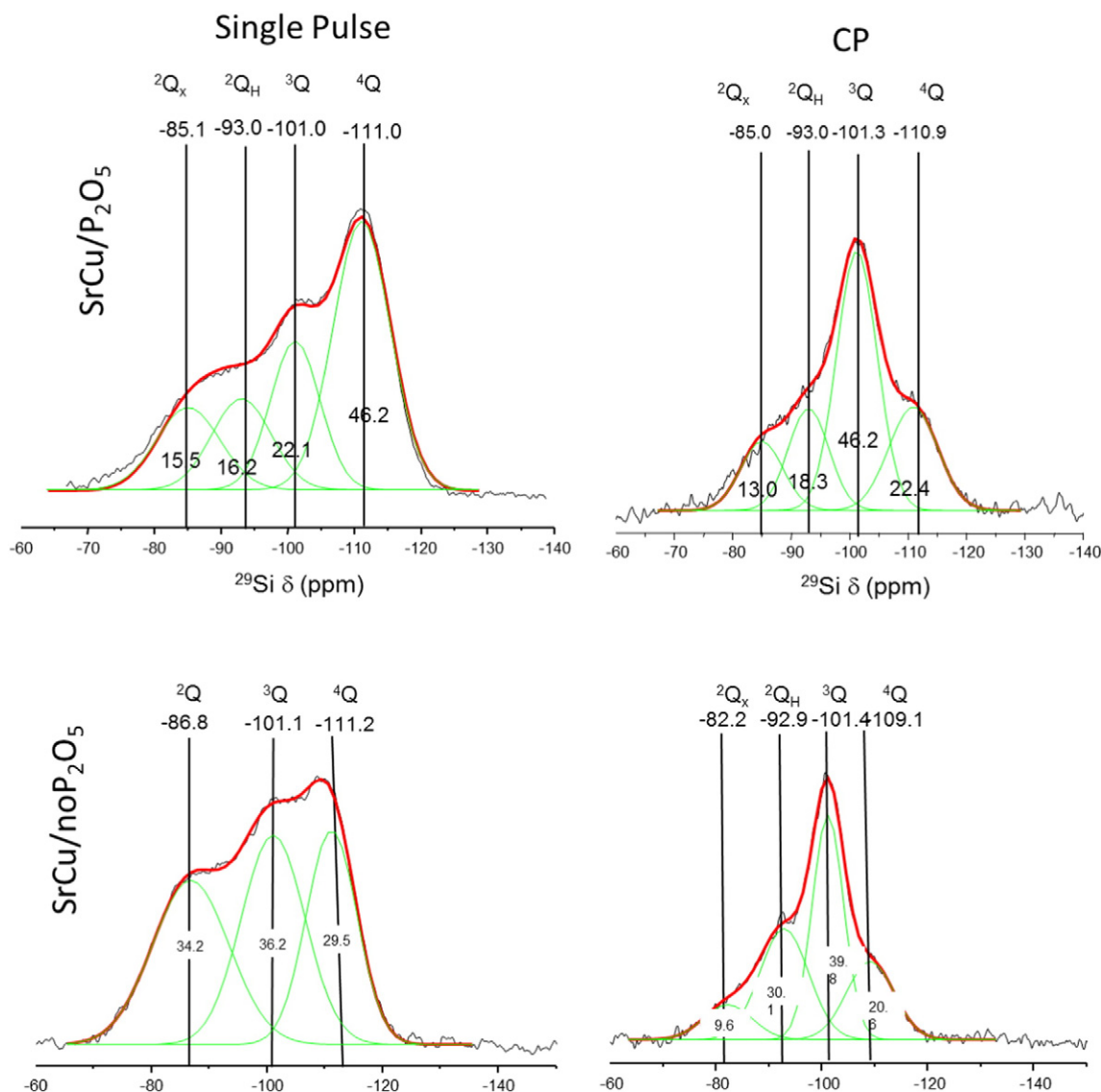


Fig. 7. Solid-state ²⁹Si single pulse (left) and ¹H cross-polarization (right) MAS NMR spectra (red) for solids SrCu/P₂O₅, SrCu/noP₂O₅. The areas for the Qⁿ units were calculated by Gaussian line-shape deconvolutions (green).

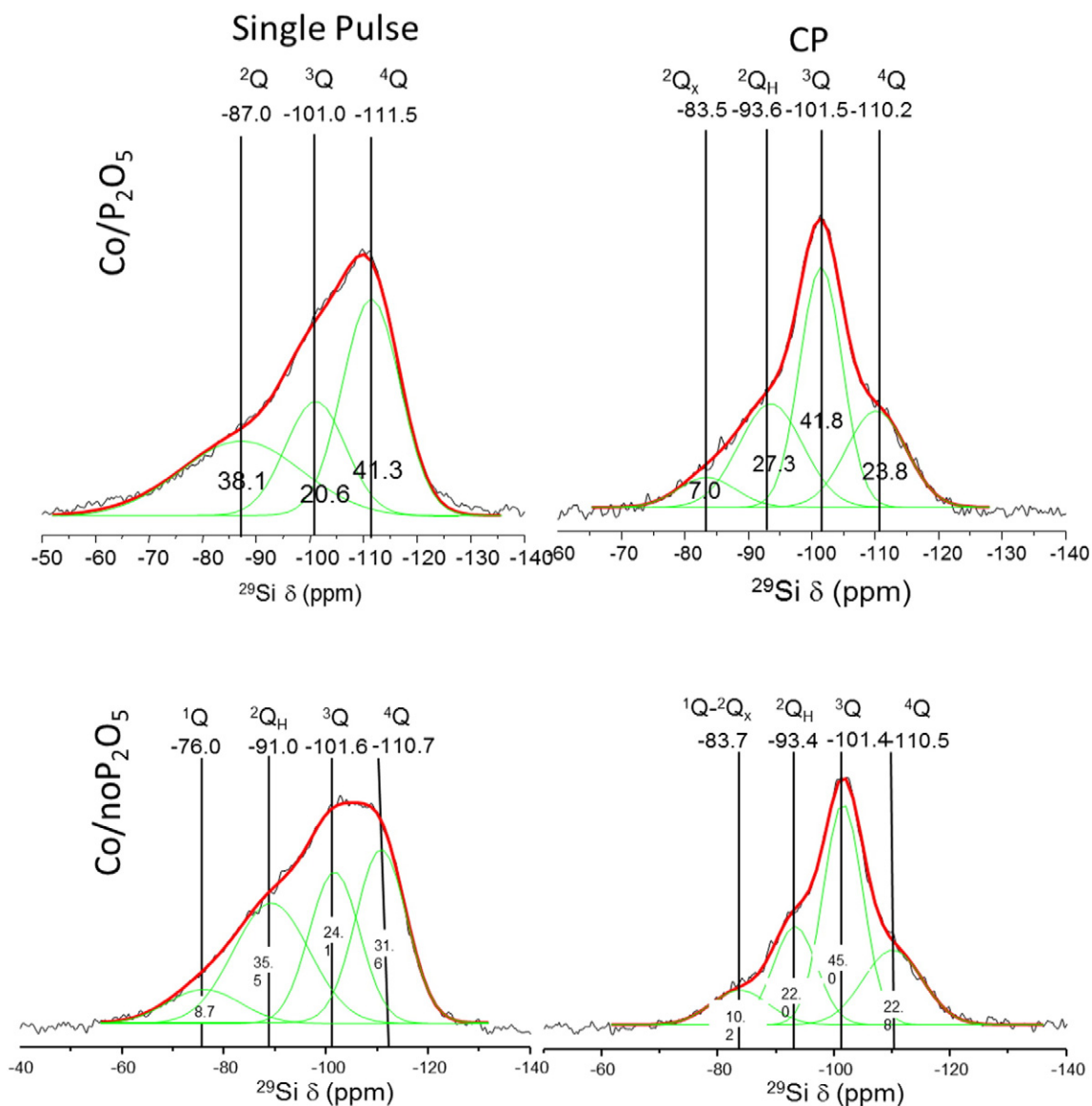


Fig. 8. Solid-state ^{29}Si single pulse (left) and ^1H cross-polarization (right) MAS NMR spectra (red) for solids $\text{Co}/\text{P}_2\text{O}_5$, $\text{Co}/\text{noP}_2\text{O}_5$. The areas for the Q^3 units were calculated by Gaussian line-shape deconvolutions (green).

N_2 physical sorption analyses were performed in order to determine pore-related parameters, such as surface properties, specific surface area, pore size distribution and pore volume.

Nitrogen adsorption isotherms of the four samples are shown in Fig. 6. Table 2 lists the data of the surface area, pore volume and pore size of samples $\text{SrCu}/\text{P}_2\text{O}_5$, $\text{SrCu}/\text{noP}_2\text{O}_5$, $\text{Co}/\text{P}_2\text{O}_5$ and $\text{Co}/\text{noP}_2\text{O}_5$. The data presented for the four prepared samples is typical of mesoporous structures. The isotherm obtained for all samples, $\text{SrCu}/\text{P}_2\text{O}_5$, $\text{Co}/\text{P}_2\text{O}_5$, $\text{SrCu}/\text{noP}_2\text{O}_5$ and $\text{Co}/\text{noP}_2\text{O}_5$, are identified as type IV, which is the general case for mesoporous materials presented in the literature [19]. The sharp curve in the capillary condensation region is an indicator of narrow pore-size distribution. It has been reported [25] that hysteresis loops are included in isotherms obtained from those mesoporous materials with pore sizes large enough to allow the N_2 condensation within them. Hysteresis loops differ among samples. In the case of $\text{SrCu}/\text{noP}_2\text{O}_5$ sample the loop exhibits slope changes in both adsorption and desorption branches, indicating a defective mesoporous structure. When P_2O_5 is incorporated (sample $\text{SrCu}/\text{P}_2\text{O}_5$), the loop can be identified as type H2, corresponding to ink-bottle pores [4,26], that is, pores narrow along their morphology that could be a consequence of the

formation of phosphate based clusters with the different cations incorporated. Besides, the sharp slopes in both branches seem to indicate a higher ordering after P_2O_5 incorporation, in agreement with the results observed by TEM. The isotherms obtained for $\text{Co}/\text{P}_2\text{O}_5$ and $\text{Co}/\text{noP}_2\text{O}_5$ samples exhibit a similar situation, although in this case the loop of $\text{Co}/\text{noP}_2\text{O}_5$ seems to be less defective in comparison with $\text{SrCu}/\text{noP}_2\text{O}_5$. Pore size distribution curves were calculated from the adsorption branch using the BJH model, which is also suited for this kind of mesoporous material. Samples $\text{SrCu}/\text{P}_2\text{O}_5$ and $\text{Co}/\text{P}_2\text{O}_5$ present a single-modal pore size distribution. The narrow size distribution is centered at 3 nm for sample $\text{SrCu}/\text{P}_2\text{O}_5$ and at 3.6 nm for sample $\text{Co}/\text{P}_2\text{O}_5$. The BET surface areas of samples $\text{SrCu}/\text{P}_2\text{O}_5$ and $\text{Co}/\text{P}_2\text{O}_5$ reached 254 and 346 m^2/g respectively and the total pore volumes calculated at $P/P_0 = 0.99$ were 0.233 cm^3/g for sample $\text{SrCu}/\text{P}_2\text{O}_5$ and 0.379 cm^3/g for sample $\text{Co}/\text{P}_2\text{O}_5$. These results are in accordance with the literature, where mesoporous glasses are reported to exhibit S_{BET} in the range of 200–500 m^2/g depending on the silica content [7]. Samples prepared without the addition of TEP during the synthesis do not show any difference in structural characteristics, thus it is not possible to evaluate the advantage of adding phosphorous oxide. Besides, the pore size

Table 3
Chemical shifts, relative peak areas, and silica connectivity obtained by Solid-state single pulse ^{29}Si MAS NMR.

	Q^4		Q^3		Q_{H}^2		Q_{x}^2		NC
	δ_{Si} (ppm)	%	δ_{Si} (ppm)	%	δ_{Si} (ppm)	%	δ_{Si} (ppm)	%	
SrCu/ P_2O_5	−111.0	46.2	−101.0	22.1	−93.0	16.2	−85.1	15.5	3.13
SrCu/no P_2O_5	−111.2	29.5	−101.1	36.2	−86.8	34.2	–	–	2.96
Co/ P_2O_5	−111.5	41.3	−101.0	20.6	−87.0	38.1	–	–	3.02
Co/no P_2O_5	−110.7	30.3	−101.6	52.2	−91.0	35.5	−76.0	8.7	2.78

distribution for samples without P_2O_5 seems to be wider and centered in larger pore diameter, indicating a pore size heterogeneity associated with defective mesoporous structures. The role of P_2O_5 has been widely studied in MBGs by HRTEM and NMR. Studies have shown that this oxide induces the formation of orthophosphate nanoclusters, which can produce changes in the local environment of MBGs. These changes could be responsible for the apparent anomalies found in the pore size distribution.

In our study, TEM and porosimetry studies indicate that the incorporation of P_2O_5 tends to increase ordered mesoporosity (samples SrCu/ P_2O_5 and Co/ P_2O_5 compared to SrCu/no P_2O_5 and Co/no P_2O_5 without addition of TEP). It is suggested that the addition of this component in the doped-glass allows incorporating more efficiently the cations within the network by cluster formation. In order to corroborate this hypothesis solid state NMR analysis was carried out to investigate the details of the network structure.

^{29}Si NMR spectroscopy was used to evaluate the network connectivity of MBGs as a function of the presence or absence of phosphorous in the chemical composition. Q^1 , Q^2 , Q^3 and Q^4 represent the silicon atoms (denoted Si^*) in $(\text{NBO})_3\text{Si}^*-(\text{OSi})_1$, $(\text{NBO})_2\text{Si}^*-(\text{OSi})_2$, $(\text{NBO})\text{Si}^*-(\text{OSi})_3$, and $\text{Si}^*(\text{OSi})_4$ (NBO = non-bonding oxygen), respectively. The signals in the region of −109 ppm to −112 ppm are from Q^4 , those in the region −100 ppm to −102 ppm are from Q^3 . The Q^2 signal appears approximately at −93 ppm to −85 ppm. Q^2 signals can be divided into two different signals associated with different types of silicon, related to with hydrogen and associated with network modifiers. On the one hand, Q_{H}^2 signals appear at −91 to −93 ppm and Q_{x}^2 is associated with signals between −82 to −85 ppm. Finally, signals at lower shifts (~76 ppm) are assigned to Q^1 units. [10,27].

Fig. 7 and Fig. 8 show Single Pulse ^{29}Si (left) and Cross Polarization (right) spectra for SrCu and Co doped samples, respectively. Single

pulse spectra show higher contribution of Q^4 compared to ^1H CP spectra, as could be expected from the lower connectivity of silica tetrahedron in those regions enriched in protons, i.e. the glass surface. On the contrary, the silica units located at the surface exhibit higher amounts of Q^3 units that would correspond with the presence of Si—OH groups. Table 3 shows the chemical shifts, deconvoluted peak areas, and silica network connectivity of the four samples studied in this work. By comparing samples with and without P_2O_5 , it is clear that the incorporation of this compound leads to an increase of network connectivity. This fact evidences that P_2O_5 entraps the divalent cations and removes them from the silica network.

^{31}P -NMR results were used to evaluate the local environment of P atoms, thus elucidating the phosphate species contained in the different samples (Fig. 9). The spectra recorded by single pulse show one signal at ~2 ppm assignable to q0 units present in the PO_4^{3-} species. The signals for Co/ P_2O_5 show full width at half-maximum height (FWHM) of around 12 ppm, which is typical of an amorphous orthophosphate [28]. On the contrary, the FWHM for SrCu/ P_2O_5 sample is much narrow indicating that the clusters are larger and more crystalline in this sample. These results evidence that most of the P atoms are included as independent PO_4^{3-} tetrahedra within the silica network, thus avoiding polyphosphate formation. The orthophosphates would be balanced with the divalent cations introduced in the system and the nature of the cations (Sr^{2+} , Cu^{2+} or Co^{2+}) seems to play an important role on the characteristics of the phosphate clusters.

It has been reported in the literature [8] that MBGs are efficient systems for the simultaneous delivery of drugs and therapeutic ions. These delivery properties confer multifunctional features to mesoporous glasses which may enhance considerably the regeneration of large-bone defects. Although the beneficial effects of these cations have been widely reported, our results point out to an important drawback

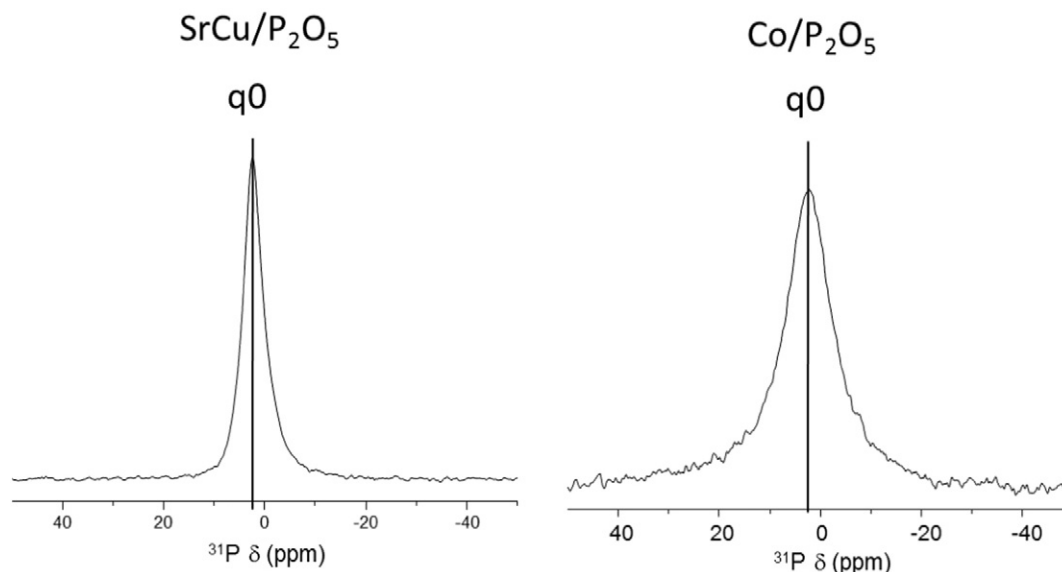


Fig. 9. Solid-state ^{31}P single-pulse MAS NMR spectra of SrCu/ P_2O_5 and Co/ P_2O_5 samples.

associated to their incorporation, i.e. the mesoporous structure is significantly affected even with small amounts of these dopants. This effect could be related with the high polarization effects of Co^{2+} and Cu^{2+} , or with the large size of Sr^{2+} cations. In previous studies [24,25], the capability of phosphorous oxide entrapping divalent cations such as Ca^{2+} has been demonstrated. The consequence is that cations are removed from the silica network, thus suppressing their role as network modifiers and leading to higher silica network connectivity.

4. Conclusions

Mesoporous bioactive glasses doped with $\text{Sr}^{2+}/\text{Cu}^{2+}$ or Co^{2+} have been synthesized. In order to evaluate the role of P_2O_5 in the mesoporous structure, two series with and without P_2O_5 were prepared. The incorporation of a small amount (0.8 mol%) of $\text{Sr}^{2+}/\text{Cu}^{2+}$ or Co^{2+} ions was shown to lead to defective mesoporous structures, as evidenced by TEM. However, when 1.2 mol% of P_2O_5 is present, the MBGs exhibited a highly ordered mesoporous structure. This fact is due to the capability of P_2O_5 to form clusters with divalent cations, thus avoiding these dopants to interfere during the mesophase formation. The findings of this work indicate an effective way to keep the high mesoporous structure of MBGs, even when cations such as $\text{Sr}^{2+}/\text{Cu}^{2+}$ or Co^{2+} are incorporated during the synthesis to produce multifunctional MBGs.

Acknowledgments

This study was supported by research grants from the Ministerio de Economía y Competitividad (projects MAT2013-43299-R and MAT2015-64831-R), European Research Council (ERC-2015-AdG). Advanced Grant Verdi-694160, Ageing Network of Excellence (CSO2010-11384-E), Instituto de Salud Carlos III (PI15/00978), and EU-ITN project GlaCERCo (GA 264526). The authors thank the staff of the ICTS National Center for Electron Microscopy, UCM, Madrid (Spain) for the assistance in the scanning and transmission electron microscopy.

References

- [1] L.L. Hench, Opening paper 2015- some comments on bioglass: four eras of discovery and development, 2015. *Biomed. Glasses* 1 1–11, <http://dx.doi.org/10.1515/bglass-2015-0001>.
- [2] M. Vallet-Regí, C. Victoria Ragel, A.J. Salinas, M. Vallet-Regí, C.V. Ragel, Glasses with medical applications, 2003. *Eur. J. Inorg. Chem.* 1029–1042, <http://dx.doi.org/10.1002/ejic.200390134>.
- [3] M. Vallet-Regí, D. Arcos, J. Pérez-Pariente, Evolution of porosity during in vitro hydroxycarbonate apatite growth in sol-gel glasses, 2000. *J. Biomed. Mater. Res.* 51 23–28, [http://dx.doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-4636\(200007\)51:1<23::AID-JBM4>3.0.CO;2-B](http://dx.doi.org/10.1002/(SICI)1097-4636(200007)51:1<23::AID-JBM4>3.0.CO;2-B).
- [4] M. Vallet-Regí, M. Manzano García, M. Colilla, *Biomedical Applications of Mesoporous Ceramics*, CRC Press, 2013.
- [5] X. Yan, C. Yu, X. Zhou, J. Tang, D. Zhao, Highly ordered mesoporous bioactive glasses with superior in vitro bone-forming bioactivities, 2004. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 43 5980–5984, <http://dx.doi.org/10.1002/anie.200460598>.
- [6] M. Vallet-Regí, I. Izquierdo-Barba, M. Colilla, Structure and functionalization of mesoporous bioceramics for bone tissue regeneration and local drug delivery, 2012. *Philos. Transact. A. Math. Phys. Eng. Sci.* 370 1400–1421, <http://dx.doi.org/10.1098/rsta.2011.0258>.
- [7] C. Wu, J. Chang, Mesoporous bioactive glasses: structure characteristics, drug/growth factor delivery and bone regeneration application, 2012. *Interface Focus*. 2 292–306, <http://dx.doi.org/10.1098/rsfs.2011.0121>.
- [8] C. Wu, J. Chang, Multifunctional mesoporous bioactive glasses for effective delivery of therapeutic ions and drug/growth factors, 2014. *J. Control. Release* 193 282–295, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jconrel.2014.04.026>.
- [9] M. Vallet-Regí, A.J. Salinas, J. Ramírez-Castellanos, J.M. González-Calbet, Nanostructure of bioactive sol-gel glasses and organic-inorganic hybrids, 2005. *Chem. Mater.* 17 1874–1879, <http://dx.doi.org/10.1021/cm047956j>.
- [10] A. García, M. Cicuéndez, I. Izquierdo-Barba, D. Arcos, M. Vallet-Regí, Essential role of calcium phosphate heterogeneities in 2D-hexagonal and 3D-cubic $\text{SiO}_2\text{-CaO-P}_2\text{O}_5$ mesoporous bioactive glasses, 2009. *Chem. Mater.* 21 5474–5484, <http://dx.doi.org/10.1021/cm9022776>.
- [11] A. Hoppe, V. Mouriño, A.R. Boccaccini, Therapeutic inorganic ions in bioactive glasses to enhance bone formation and beyond, 2013. *Biomed. Sci.* 1 254–256, <http://dx.doi.org/10.1039/c2bm00116k>.
- [12] A. Hoppe, N.S. Güldal, A.R. Boccaccini, A review of the biological response to ionic dissolution products from bioactive glasses and glass-ceramics, 2011. *Biomaterials* 32 2757–2774, <http://dx.doi.org/10.1016/j.biomaterials.2011.01.004>.
- [13] C. Wu, Y. Zhou, M. Xu, P. Han, L. Chen, J. Chang, Y. Xiao, Copper-containing mesoporous bioactive glass scaffolds with multifunctional properties of angiogenesis capacity, osteostimulation and antibacterial activity, 2013. *Biomaterials* 34 422–433, <http://dx.doi.org/10.1016/j.biomaterials.2012.09.066>.
- [14] S.N. Rath, A. Brandl, D. Hiller, A. Hoppe, U. Gbureck, R.E. Horch, A.R. Boccaccini, U. Kneser, Bioactive copper-doped glass scaffolds can stimulate endothelial cells in co-culture in combination with mesenchymal stem cells, 2014. *PLoS One* 9 1–24, <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0113319>.
- [15] C. Wu, Y. Zhou, W. Fan, P. Han, J. Chang, J. Yuen, M. Zhang, Y. Xiao, Hypoxia-mimicking mesoporous bioactive glass scaffolds with controllable cobalt ion release for bone tissue engineering, 2012. *Biomaterials* 33 2076–2085, <http://dx.doi.org/10.1016/j.biomaterials.2011.11.042>.
- [16] A. Hoppe, B. Jokic, D. Janackovic, T. Fey, P. Greil, S. Romeis, J. Schmidt, W. Peukert, J. Lao, E. Jallot, A.R. Boccaccini, Cobalt-releasing 1393 bioactive glass-derived scaffolds for bone tissue engineering applications, *ACS Appl. Mater. Interfaces* 6 (2014) 2865–2877.
- [17] S. Shruti, A.J. Salinas, G. Lusvardi, G. Malavasi, L. Menabue, M. Vallet-Regí, Mesoporous bioactive scaffolds prepared with cerium-, gallium- and zinc-containing glasses, 2013. *Acta Biomater.* 9 4836–4844, <http://dx.doi.org/10.1016/j.actbio.2012.09.024>.
- [18] S. Shruti, A.J. Salinas, G. Malavasi, G. Lusvardi, L. Menabue, C. Ferrara, P. Mustarelli, M. Vallet-Regí, Structural and in vitro study of cerium, gallium and zinc containing sol-gel bioactive glasses, 2012. *J. Mater. Chem.* 22 13698, <http://dx.doi.org/10.1039/c2jm31767b>.
- [19] A.J. Salinas, S. Shruti, G. Malavasi, L. Menabue, M. Vallet-Regí, Substitutions of cerium, gallium and zinc in ordered mesoporous bioactive glasses, 2011. *Acta Biomater.* 7 3452–3458, <http://dx.doi.org/10.1016/j.actbio.2011.05.033>.
- [20] S. Sánchez-Salcedo, S. Shruti, A.J. Salinas, G. Malavasi, L. Menabue, M. Vallet-Regí, In vitro antibacterial capacity and cytocompatibility of $\text{SiO}_2\text{-CaO-P}_2\text{O}_5$ mesoporous glass scaffolds enriched with ZnO, 2014. *J. Mater. Chem. B* 2 4836–4847, <http://dx.doi.org/10.1039/c4tb00403e>.
- [21] C.J. Brinker, Y. Lu, A. Sellinger, H. Fan, Evaporation-induced self-assembly: nanostructures made easy, 1999. *Adv. Mater.* 11 579–585, [http://dx.doi.org/10.1002/\(SICI\)1521-4095\(199905\)11:7<579::AID-ADMA579>3.3.CO;2-I](http://dx.doi.org/10.1002/(SICI)1521-4095(199905)11:7<579::AID-ADMA579>3.3.CO;2-I).
- [22] D. Grosso, F. Cagnol, G.J. de, A.A. Soler-Illia, E.L. Crepaldi, H. Amenitsch, A. Brunet-Bruneau, A. Bourgeois, C. Sanchez, Fundamentals of mesostructuring through evaporation-induced self-assembly, 2004. *Adv. Funct. Mater.* 14 309–322, <http://dx.doi.org/10.1002/adfm.200305036>.
- [23] X.X. Yan, H.X. Deng, X.H. Huang, G.Q. Lu, S.Z. Qiao, D.Y. Zhao, C.Z. Yu, Mesoporous bioactive glasses. I. Synthesis and structural characterization, 2005. *J. Non-Cryst. Solids* 351 3209–3217, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jnoncrysol.2005.08.024>.
- [24] A. López-Noriega, D. Arcos, I. Izquierdo-Barba, Y. Sakamoto, O. Terasaki, M. Vallet-Regí, Ordered mesoporous bioactive glasses for bone tissue regeneration, *Chem. Mater.* 18 (2006) 3137–3144.
- [25] D. Zhao, Y. Wan, W. Zhou, *Ordered Mesoporous Materials*, 2013.
- [26] F. Balas, D. Arcos, J. Pérez-Pariente, M. Vallet-Regí, Textural properties of $\text{SiO}_2\text{-CaO-P}_2\text{O}_5$ glasses obtained by the sol-gel method, *J. Mater. Res.* 16 (2001) 1345–1348.
- [27] C. Coelho, T. Azaïs, L. Bonhomme-coury, J. Maquet, C. Bonhomme, More insight in the structure of silicophosphate gels by 31P – 29Si CP MAS multidimensional experiments and 1H – 31P – 29Si triple resonance experiments, 2006. 9, 2006 472–477, <http://dx.doi.org/10.1016/j.crci.2005.06.025>.
- [28] E. Leonova, I. Izquierdo-Barba, D. Arcos, A. López-Noriega, N. Hedin, M. Vallet-Regí, M. Edén, Multinuclear solid-state NMR studies of ordered mesoporous bioactive glasses, 2008. *J. Phys. Chem. C* 112 5552–5562, <http://dx.doi.org/10.1021/jp7107973>.

The response of pre-osteoblasts and osteoclasts to gallium containing mesoporous bioactive glasses

N. Gómez-Cerezo^{1,2}, E. Verron³, V. Montouillout⁴, F. Fayon⁴, P. Lagadec⁵, J.M. Bouler³, B. Bujoli³, D. Arcos^{1,2,*}, M. Vallet-Regí^{1,2,*}.

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

2. CIBER de Bioingeniería Biomateriales y Nanomedicina (CIBER-BBN), Spain

3. Université de Nantes, CNRS, UMR 6230, CEISAM, UFR Sciences et Techniques, 2 Rue de la Houssinière, 44322 NANTES Cedex 3, France.

4. CNRS, UPR 3079, CEMHTI, 1D Avenue de la Recherche Scientifique, 45071 Orléans Cedex 02, France.

5. Université Côte d'Azur, CNRS, Inserm, institut de Biologie Valrose (iBV), 28 Av. de Valombrose, 06107 Nice cedex 2, France

*Corresponding authors

E-mail address : arcosd@ucm.es (Daniel Arcos), vallet@ucm.es (María Vallet-Regí)

Abstract

Mesoporous bioactive glasses (MBGs) in the system $\text{SiO}_2\text{-CaO-P}_2\text{O}_5\text{-Ga}_2\text{O}_3$ have been synthesized by the evaporation induced self-assembly method and subsequent impregnation with Ga cations. Two different compositions have been prepared and the local environment of Ga(III) has been characterized using ^{29}Si , ^{71}Ga and ^{31}P NMR analysis, demonstrating that Ga(III) is efficiently incorporated as both, network former (GaO_4 units) and network modifier (GaO_6 units). *In vitro* bioactivity tests evidenced that Ga-containing MBGs retain their capability for nucleation and growth of an apatite-like layer in contact with a simulated body fluid with ion concentrations nearly equal to those of human blood plasma. Finally, *in vitro* cell culture tests evidenced that Ga incorporation results in a selective effect on osteoblasts and osteoclasts. Indeed, the presence of this element enhances the differentiation towards osteoblast phenotype while disturbing osteoclastogenesis. Considering these results, Ga-doped MBGs might be proposed as bone substitutes, especially in osteoporosis scenarios.

Keywords: gallium, mesoporous bioactive glasses, osteoblast, osteoclast, osteoporosis

1. Introduction

Mesoporous bioactive glasses (MBGs) are a kind of bioceramics with potential application for bone tissue regeneration purposes. Since Yan et al prepared MBGs for the first time in 2004[1], these materials have arisen great interest in the field of regenerative medicine of bone due to their excellent bioactive properties, which have been demonstrated both in vitro [2,3] and in vivo[4,5]. MBGs are commonly synthesized in the ternary $\text{SiO}_2\text{-CaO-P}_2\text{O}_5$ system, with similar chemical compositions to those used for conventional bioactive sol-gel glasses [2,6][7]. However, the incorporation of a structure directing agent during the hydrolysis and condensation processes leads to the formation of a mesophase, which eventually results into ordered mesoporous structures with very high surface areas and porosities[8]. The bone regeneration properties of bioglasses come up from their capability to exchange ions with the surrounding fluids, mainly Ca^{2+} by H^+ , with the subsequent growth of an apatite-like phase on the surface, similar to the mineral component of bones and teeth[9]. Besides, the dissolution products of bioactive glasses (Ca^{2+} and silica species in solution) elicit the upregulation of pro-osteoblastic genes [10–12] thus enhancing their osteogenic potential.

The high surface area and porosity of MBGs accelerate the chemical reactions at the implants surface and, consequently, MBGs exhibit the fastest bioactive behaviour observed so far in the field of bioceramics [13]. The ordered mesoporous structure of MBGs brings about their potential applications as drug delivery systems [14] and are excellent matrixes to host and release active agents such as antibiotics [15], antiosteoporotics [16] or antitumoral drugs [17], which can even be released in a stimuli-responsive manner [18,19].

The efficiency of MBGs to trigger the ionic exchange with the surrounding fluids has recently fostered their application as carriers of therapeutic ions. In this way species, such as Li^+ , Sr^{2+} , Cu^{2+} , Co^{2+} or B^{3+} have been incorporated into $\text{SiO}_2\text{-CaO-P}_2\text{O}_5$ MBGs, with the aim of providing osteogenic, cementogenic, angiogenic and antibacterial properties [20] [21–24]. The release of these

chemical species can yield very interesting synergies with the bioactive behaviour of MBGs and the pharmacological treatment loaded in the mesopores. Therapeutic ions are commonly incorporated to MBGs as inorganic salts dissolved together with the MBGs precursors. At the end of the synthesis these ions can stay in the MBGs associated to phosphates or as network modifiers of the silica matrix, similarly to the role played by calcium cations [25–29] . In most cases, the large volume and/or the polarization capacity of these ions are so intense that even low concentrations lead to the disorganization of the mesoporous structure [30].

One of the most interesting therapeutic ions in the field of bone pathologies is Ga (III). The inhibition of bone resorption driven by Ga (III) has been widely reported [31–35]. Ga reduces the resorption activity, differentiation and formation of osteoclasts without cytotoxic effects in a dose-dependent manner, pointing out an excellent potential for the treatment of osteoporotic bone fractures associated to bone implants [36,37]. In this sense, Ga ions have been successfully combined with apatitic calcium phosphate cements and tested both *in vitro* and *in vivo* [38].

Although some studies have been carried out describing the effects of Ga^{3+} on the structure of MBGs [39–42], as well as haemostatic and antibacterial effects [43] , from the best of our knowledge no study has considered the effects of Ga containing MBGs on bone cells, such as osteoblasts or osteoclasts. This is quite surprising considering the very interesting synergy between Ga^{3+} and MBGs for the treatment of osteoporotic bone fractures. Moreover, contrarily to monovalent or divalent Cu(II), Co (II), Sr (II), Li (I), etc. cations, which act as modifiers of the silica network when incorporated into MBGs, Ga (III) cations can act as both network formers (NF) and network modifier (NM). The distribution and local environment of Ga species into MBGs are still poorly understood and the influence of Ga on bone remodelling cannot be explained without understanding the relationship between the local structure of this inhibitor of bone resorption with the resulting biological response.

In this paper we evaluate for the first time the biological response of Ga doped MBGs with respect to bone forming cells (osteoblasts) and bone resorptive cells (osteoclasts), together with a deep study of the local environment of this cation into the mesoporous matrix of these bioceramics.

2. Materials and methods

2.1 Synthesis of materials

Two different MBGs in the system $\text{SiO}_2\text{-CaO-P}_2\text{O}_5$ were synthesized by evaporation induced self-assembly (EISA) method [44]. For this aim, triblock copolymer F127 $(\text{EO})_{100}\text{-(PO)}_{65}\text{-(EO)}$ was used as structure directing agent. Tetraethyl orthosilicate (TEOS) (98%), triethyl phosphate (TEP) (99%) and calcium nitrate tetrahydrate $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2\cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (99%) were used as SiO_2 , P_2O_5 and CaO sources, respectively. In a typical synthesis 2 g of surfactant were dissolved in ethanol with HCl 0,5 M solution at room temperature. Afterward TEOS, TEP and $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2\cdot 4\text{H}_2\text{O}$ were added under stirring in 3 hours intervals to obtain two different MBG denoted MBG-58S and MBG-85S. The different reagents and amounts are shown in Table 1. The resulting solution was kept under stirring for 12 hours and poured into Petri dishes (9 cm in diameter). The colourless solution was evaporated at 30°C for 7 days. Eventually, the dried gels were removed as homogeneous and transparent membranes and calcined at 700°C for 3 hours under air atmosphere.

Table 1. Amounts of reagents used for the synthesis of the MBGs.

Sample	TEOS (g)	TEP (g)	$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2\cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (g)	$\text{Ga}(\text{NO}_3)_3\cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (g)
MBG-58S	3.49	0.51	2.47	-
MBG-58SGa	3.49	0.51	2.47	0.1
MBG-85S	3.70	0.34	0.49	-
MBG-85SGa	3.70	0.34	0.49	0.026

Solids MBG-58SGa and MBG-85SGa were synthesized from MBG-58S and MBG-85S respectively. In a typical procedure, a certain amount of $\text{Ga}(\text{NO}_3)_3\cdot 4\text{H}_2\text{O}$ was dissolved in a vessel containing 100 mL of ultrapure water. Then 500 mg of the corresponding MBG (MBG-58S or MBG-85S) were

added to the solution in such a way that the Ga/Ca molar ratio was 0.38 (see Table 1). The pH of the solution was adjusted in the 9.2-9.8 range by means of a concentrated ammonia solution. The mixture was stirred for 24 hours at room temperature and the solids obtained were filtered under vacuum. Finally, solids were dried at 100°C for 24 hours. All reactants were purchased from Aldrich and used without further purification.

2.2 Physicochemical characterization of MBGs

Low angle powder X-ray diffraction experiments were performed with a Philips X'Pert diffractometer equipped with Cu K α radiation (wavelength 1.5406 Å). XRD patterns were collected in the 2 θ ° range between 0,5 and 6,5 with a step size of 0.02 2 θ ° and counting time of 4s per step.

The textural properties of the calcined materials were determined by nitrogen adsorption with a Micromeritics ASAP 2010 equipment. To perform the N₂ adsorption measurements, the samples were previously degassed under vacuum for 20 h, at 100 °C. The surface area was determined using the Brunauer-Emmett-Teller (BET) method. The pore size distribution between 0.5 and 40 nm was determined from the adsorption branch of the isotherm by means of the Barret-Joyner-Halenda (BJH) method. This experiment was made in triplicate using different batches of each sample.

Chemical compositions of MBGs were determined by X-ray fluorescence (XRF) spectroscopy, using a Philips PANalytical AXIOS spectrometer (Philips Electronics NV), with X-rays generated by the RhK α line at $\lambda = 0.614$ Å.

²⁹Si MAS and {¹H}-²⁹Si CP-MAS NMR spectra were recorded on a Bruker Avance 400WB spectrometer operating at a magnetic field of 9.4 T (²⁹Si Larmor frequency of 79.5MHz) at a spinning frequency of 12 kHz. The ²⁹Si quantitative MAS spectra were acquired using a 90° flip angle with a recycling delay of 5s and around 10000 scans were co-added. The {¹H}-²⁹Si CP-MAS spectra were recorded using a contact time of 3.5 ms. 135000 transients were co-added with a recycle delay of 5s. The ⁷¹Ga NMR experiments were performed on a Bruker Avance III spectrometer

operating at 20.0 T (^{71}Ga Larmor frequency of 259.3MHz) equipped with a 1.3mm double-resonance MAS probe head. The ^{71}Ga central transition (CT)-selective MAS spectra were recorded using a Hahn echo sequence with whole echo acquisition. The echo delay was synchronized with the rotor period and the rf-field strength was 60 kHz corresponding to a CT-selective $\pi/2$ pulse of 2.1 μs . Approximately, 28 000 transients were accumulated for MBG-58SGa and 122 500 for MBG-85SGa with 0.5 s recycling delay. The ^{31}P quantitative MAS spectra were recorded using single pulse ($\pi/10$) acquisition; ~ 500 scans were co-added with a recycle delay of 120 s to ensure complete recovering of the longitudinal magnetization. ^1H SPINAL-64 decoupling with a nutation frequency of 70 kHz was applied during signal acquisition [45]. Chemical shift values were referenced to tetramethylsilane (TMS), H_3PO_4 and $\text{Ga}(\text{NO}_3)_3 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ for ^{29}Si , ^{31}P and ^{71}Ga , respectively

Transmission electron microscopy (TEM) was carried out using a JEOL-2100 microscope, operating at 300 kV (Cs 0.6 mm, resolution 1.7 \AA). Images were recorded using a CCD camera (model Keen view, SIS analyses size 1024 x 1024, pixel size 23.5 mm x 23.5mm) at 30000x and 60000x magnification using a low-dose condition.

2.3 *In vitro* bioactivity tests

Assessments of *in vitro* bioactivity were carried out on powder samples. For this purpose, 50 mg of powder were soaked into 7 mL of filtered simulated body fluid (SBF), in polyethylene containers at 37 $^\circ\text{C}$ under sterile conditions. SBF solution was prepared according to Kokubo et al. [46] by dissolving NaCl, KCl, NaHCO_3 , $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, CaCl_2 , and Na_2SO_4 into distilled water. It was buffered at pH = 7.38 by using tris(hydroxymethyl)-aminomethane/HCl (TRIS/HCl) and then passed through 0.22 μm Millipore filters to avoid bacterial contamination. In order to avoid false positive responses, we included $\alpha\text{-Al}_2\text{O}_3$ as inert control (Fig S5 in supporting information). The evolution of the glass surface was analysed by Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy with a Nicolet Magma IR 550 spectrometer and by scanning electron microscopy (SEM) using a JEOL F-6335 microscope. To assess the Ca^{2+} - H^+ ionic exchange between MBGs and SFB, calcium

concentration and pH changes were analysed as a function of soaking time by using an Ilyte Na⁺ K⁺ Ca²⁺ pH system. All the experiments were carried out in triplicate

2.4 Ga *in vitro* release

Ga release study was performed suspending 2 mg of solids in 2 mL of α -MEM (Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, USA). 0.5 mL of this suspension was placed on a transwell permeable support with polycarbonate membrane (0.4 μ m). The well was filled with 1.5 mL of α MEM and the suspension was stirred at 37 C at 100 rpm for 10 days. The amount of Ga released was determined by inductively coupled plasma spectroscopy (ICP), and the solution outside the transwell insert was replaced with fresh medium after each measurement. All the experiments were carried out in triplicate.

2.5 Pre-osteoblast cell culture tests

Murine MC3T3-E1 pre-osteoblasts ($2 \cdot 10^4$ cell/mL) were cultured in α -MEM with 10% fetal bovine serum (FBS, Gibco, BRL), 1 mM L-glutamine (BioWhittaker Europe, Belgium), penicillin ($200 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, BioWhittaker Europe, Belgium), and streptomycin ($200 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, BioWhittaker Europe, Belgium), under a CO₂ (5%) atmosphere at 37 °C for 12 hours to reach the confluence in each cell plate. After that the MBGs powders were added on the cells at 1mg/ml of concentration.

2.5.1 Fluorescence microscopy assays.

To evaluate cells morphology after 4 days in contact with the materials, MC3T3-E1 cells were cultured in 24 well plates at density of 10^4 cells/mL in the presence of 1mg/mL of the different MBGs. Thereafter, cells were rinsed with PBS twice and fixed in 4% (w/v) paraformaldehyde in PBS for 2 hours. The samples were incubated 15 min with Atto 565-conjugated phalloidin (dilution 1:40, Molecular Probes) which stains actin filaments. Samples were then washed with PBS and the cell nuclei were stained with IM40-6 diamino-20-phenylindole in PBS (DAPI) (Molecular Probes). Fluorescence microscopy was performed with an Evos FL Cell Imaging System equipped with tree

Led Lights Cubes (LEX (nm); IEM (nm)): DAPY (357/44; 447/60), GFP (470/22; 525/50), RFP (531/40; 593/40) from AMG (Advance Microscopy Group). Red channel was used to evaluate the cytoskeleton and blue for cell nucleus. All the experiments were carried out in triplicate.

2.5.2 Pre-osteoblast proliferation studies

The proliferation was determined by means of the Alamarblue® method at 1, 4, and 7 days of culture in contact with the different samples. The Alamarblue® method is based on the reduction of blue fluorogen (resazurin) to a red fluorescent compound (resofurin) by intracellular redox enzymes. A solution of resazurin sodium salt (Sigma Aldrich) at 0.01 mg/mL was prepared in phosphate-buffered saline (PBS) and then diluted 1:10 with culture medium supplemented with 10 % FBS. The cells were exposed to resazurin solution for 3 h at 37° C under CO₂ (5 %) atmosphere. Then fluorescence signal was read at $\lambda_{em}=590$ nm using a $\lambda_{exc}= 560$ nm with a fluorescence spectrometer Biotek Synergy 4 device. Thereafter, the medium was renewed to continue the cell proliferation measurements at different times. Polystyrene culture plate was used as control and all the experiments were carried out in n = 4.

2.5.3 Pre-Osteoblasts differentiation studies

The alkaline phosphatase (ALP) activity after 7 and 14 days in the presence of 1mg/mL of the MBGs, was measured to evaluate the influence of the Ga as a differentiation marker in assessing the expression of the osteoblast phenotype. For this purpose, $3 \cdot 10^4$ MC3T3-E1 cells were seeded with a 1 mg/mL using supplemented medium with β -glycerolphosphate (50 mg mL^{-1} , Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, USA) and L-ascorbic acid (10 mM, Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, USA). Solids were irrigated with PBS two times to remove as much residual serum possible. The cells were detached by subjecting the plates to cycles of freezing and thawing before measuring the ALP activity and total protein content. ALP activity was measured based on the hydrolysis of p-nitrophenylphosphate to p-nitrophenol. After 30 min incubation at 37°C the reaction was stopped by

the addition of 125 μL of 2M NaOH. The solution obtained was measured using a Helios Zeta UV-VIS spectrophotometer at 410 nm. Total protein content was determined using a colorimetric method at 540 nm (Bio-Analítica,S.L.) with a Helios Zeta UV-VIS spectrophotometer. Polystyrene culture plate was used as control and all the experiments were carried out in triplicate.

2.6 Osteoclasts culture tests

The mouse monocyte cell line RAW 264.7 was obtained from ATCC (Ref. # TIB-71; LGC Standards, Molsheim, France). Cells were cultured in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, Gibco, Paisley, UK) containing 5% Hyclone serum (Thermo Scientific Braunschweig, Germany) and 1% penicillin/streptomycin (Gibco, Paisley, UK). For osteoclast differentiation experiments, RAW 264.7 cells were seeded at 5,000 cells/cm² in alpha Minimum Essential Medium (α -MEM, Gibco, Paisley, UK) containing 5% Hyclone serum and effectors were added immediately. RANKL (Receptor Activator of Nuclear Factor- B Ligand) was used at 20 nM. Mouse effector GST-RANKL was produced as described by Strazic et al [47], and a GST protein was produced and purified using the same protocol and was used as a control. Cells were cultured for four days with a renewal of the medium at day 2.

2.6.1 Viability assay

Raw 264.7 cells were seeded at a density of 5000 cells/cm² and treated with the different MBGs at 10mg/mL or culture medium as control. After 4 days of incubation, the cells were incubated in a solution of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromide (MTT) at 0.5mg/mL for 4h. Then, the MTT solution was removed and replaced by the same amount of the eluting buffer (DMSO/Ethanol 50:50). After 2h agitation on an orbital shaker, 80 μl of the colourful supernatant were transferred into a new 96-well plate which was read at 562 nm.

2.6.2 Tartrate-resistant acid phosphatase (ACP5) staining

Raw 264.7 cells were seeded as previously described and treated with the different types of MBGs (10mg/mL) for 4 days. For control, cells were cultured without MBG. After 4 days, cells were rinsed two times in PBS and fixed in citrate/acetone solution for 30 s. ACP5⁺ cells were revealed using the Acid Phosphatase, Leukocyte kit following manufacturer's instructions (# 387A; Sigma-Aldrich, USA). Stained cells were observed using a light microscope (Axioplan 2, Zeiss, Germany) and the number of TRAP-positive multinucleated cells was evaluated by comparing 8 fields between the different treatments. To further quantify the TRAP staining, DMSO was added, and the plate was centrifuged for 15 min at 150 rpm at room temperature in dark. Finally, optical density at 562 nm was read [47].

Statistical analysis

The statistics data are expressed as means-standard deviations of experiments. Statistical analysis was performed using the Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) version 11.5 software. Statistical comparisons were made by analysis of variance (ANOVA). Subsequently, post hoc analyses were carried out to correct for multiple comparisons. In all the statistical evaluations, $P < 0.05$ was considered as statistically significant.

3. Results

3.1 Physicochemical characterization of MBGs

The mesoporous structure of the MBGs was studied by XRD and TEM (Figure 1). Both studies showed a highly defective mesoporous structure for MBG-58S and MBG-58SGa materials, as usually found for MBGs with high calcium content. On the contrary, MBG-85S and MBG-85SGa exhibit a highly ordered hexagonal structure with planar group $p6mm$ and parallel channels with a d-spacing of 5-6 nm, similarly to the silica mesoporous material SBA-15 [48]. In order to obtain a deeper knowledge of the mesoporous structure, textural properties were analyzed by N₂ adsorption/desorption method. All the curves could be identified as type IV isotherms characteristic of mesoporous materials (Figure S1 in supporting information). Surface areas, pore volumes and pore sizes of the four MBGs are collected in Table 2. Gallium-free MBGs show surface areas and

pore volumes of in the range commonly observed for MBGs when prepared with F127 as structure directing agent [8]. After Ga incorporation, a decrease of surface area and pore volume is observed for both compositions (MBG-58SGa and MBG-85SGa). Regarding pore size, Ga incorporation comprises a significant increment of this parameter for MBG-58SGa. On the contrary, pore size remains almost constant for MBG-85S after Ga incorporation.

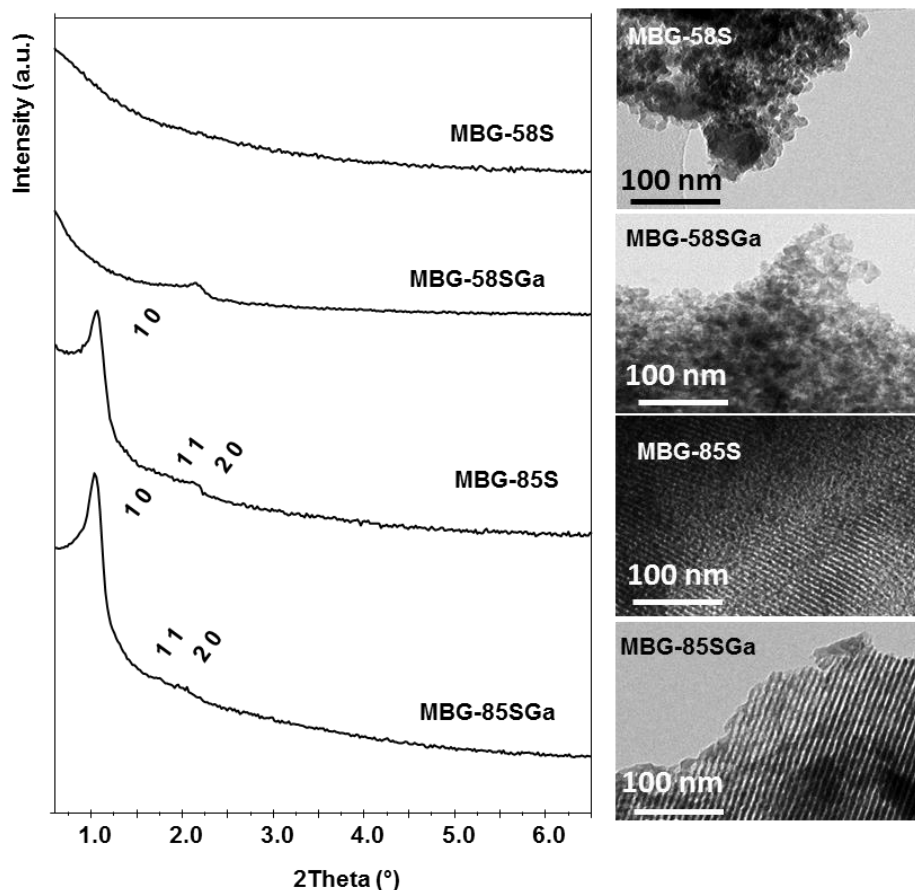


Figure 1. Low angle XRD patterns (left) and TEM images of the different MBGs synthesized (right).

Table 2. Textural parameters obtained by N₂ adsorption porosimetry for the MBGs synthesized.

Standard deviations are indicated in brackets.

Sample	Surface area (m ² ·g ⁻¹)	Pore volume (cm ³ ·g ⁻¹)	Pore size (nm)
MBG-58S	158.2 (13.1)	0.14 (0.05)	5.8 (0.9)
MBG-58SGa	104.9 (0.6)	0.23 (0.01)	9.8 (0.6)
MBG-85S	287.5	0.29	5.4

	(1.1)	(0.04)	(0.6)
MBG-85SGa	87.0 (0.1)	0.12 (0.07)	5.5 (0.7)

The chemical compositions of the MBGs are shown in Table 3. The incorporation of Ga³⁺ was carried out based on an ionic exchange with Ca²⁺ and the theoretical values displayed in Table 3 correspond to this assumption. The results obtained by XRF elemental analysis demonstrate that Ga incorporates to the MBGs in a very efficient way. In the case of MBG-58SGa, Ga incorporation is associated with a calcium loosening respect to MBG-58S, in agreement with the assumed mechanism that involved a Ca²⁺ versus Ga³⁺ ionic exchange. On the other hand, Ga incorporation within MBG-85SGa did not result in a significant calcium decrease.

Table 3. Theoretical and experimental chemical compositions determined by XRF spectroscopy for the MBGs studied. Error values are indicated in brackets

Sample	Theoretical composition (% mol) ^a	Experimental composition (% mol) ^b
MBG-58S	58 SiO ₂ -37 CaO -5 P ₂ O ₅	55.5 SiO ₂ - 36.6 CaO - 7.9 P ₂ O ₅ (±0.20) (±0.15) (±0.11)
MBG-58SGa	58 SiO ₂ -31 CaO -5 P ₂ O ₅ -6 Ga ₂ O ₃	55.8 SiO ₂ -29.5 CaO -7.7 P ₂ O ₅ -7.0 Ga ₂ O ₃ (±0.25) (±0.18) (±0.1) (±0.085)
MBG-85S	85 SiO ₂ -10 CaO -5 P ₂ O ₅	85.2 SiO ₂ - 10.6 CaO - 4.2 P ₂ O ₅ (±0.45) (±0.13) (±0.085)
MBG-85SGa	85 SiO ₂ -8.4CaO- 5P ₂ O ₅ - 1.6 Ga ₂ O ₃	83.5 SiO ₂ -10.2 CaO -4.3 P ₂ O ₅ -2.0 Ga ₂ O ₃ (±0.62) (±0.081) (±0.002) (±0.05)

^a Assuming that Ca²⁺ is substituted by Ga³⁺; ^b Chemical composition determined by EDX spectroscopy

To study the local atomic environment in the MBGs and the effect of Ga incorporation, solid-State ²⁹Si MAS NMR experiments were performed. Ga free MBGs (Figure 2) show the resonances corresponding to the silicon species Q⁴, Q³, Q² and Q²_{Ca} (with non-bonding oxygens associated to calcium cations). ¹H→²⁹Si CP MAS spectra provide valuable information about the Si environment at the MBGs surface. The ¹H→²⁹Si CP spectrum for MBG-58S decreases the intensity of the Q⁴ resonances and emphasizes the resonances for Q³ and Q² due to the presence of Si-OH groups at the

MBG surface. The Q^2 resonance associated to the presence of Ca^{2+} is emphasized in a higher degree, pointing out that the MBG surface is enriched in Ca^{2+} with respect to the inner part of the MBG walls. On the other hand, MBG-85S does not show $Q^2(Ca^{2+})$ resonance in the single-pulse MAS spectrum and only a weak resonance can be observed in the $^1H \rightarrow ^{29}Si$ CP experiment. After Ga incorporation, both single pulse and $^1H \rightarrow ^{29}Si$ CP MAS spectra showed very similar results (Figure S2 in supporting information). The network connectivity of the different MBGs was calculated from the de-convoluted peak areas of single pulse spectra and are shown in Table 4. The results show that MBGs with higher Ca contents (MBG-58S and MBG-58SGa) have lower network connectivity compared to MBG-85S and MBG-85SGa. Moreover, ^{29}Si MAS NMR experiments indicate that the connectivity of the silica network is not significantly affected after Ga incorporation.

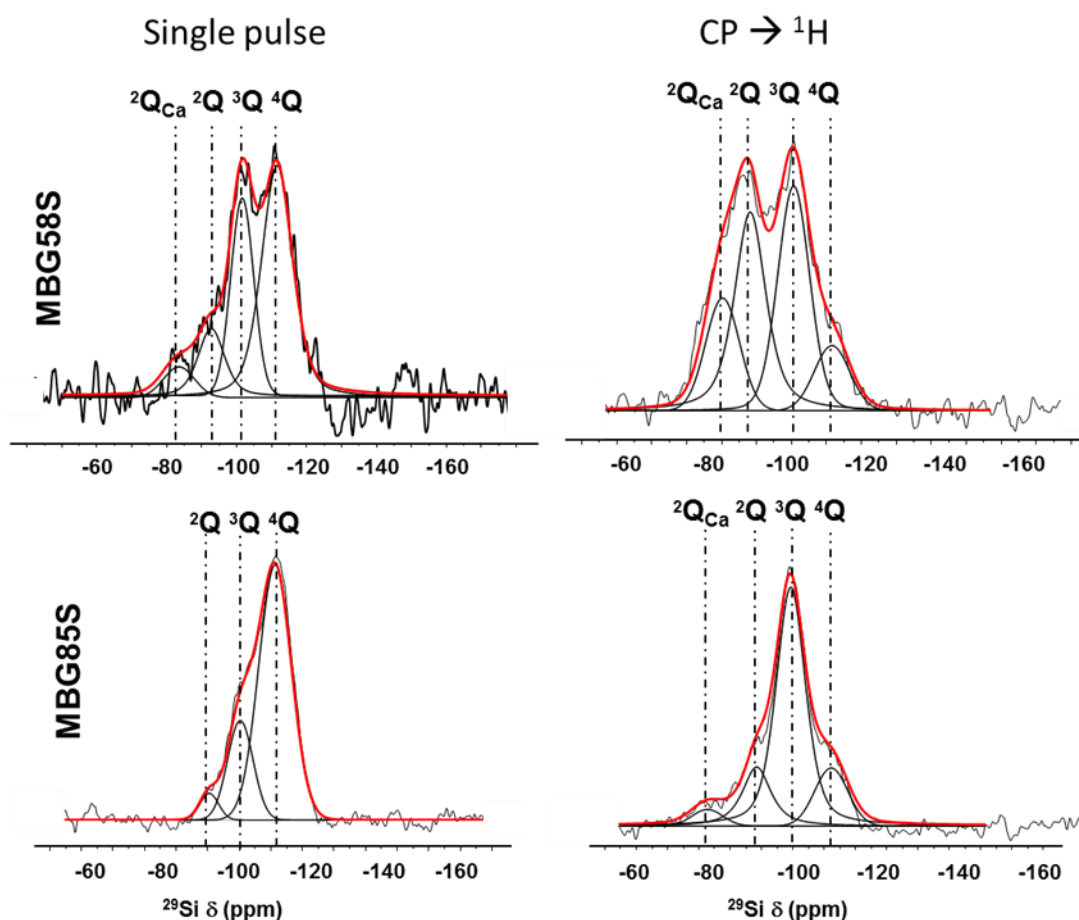


Figure 2. Solid-state ^{29}Si single-pulse (left) and cross-polarization (right) MAS NMR spectra of Ga free MBGs.

To probe the Ga local environment in the Ga-containing MBGs, ^{71}Ga solid-state MAS NMR experiments were performed at very high magnetic field (20.0 T). As shown in Figure 3, the experimental ^{71}Ga central transition (CT) MAS NMR spectra of the MBGs exhibit two resolved resonances with asymmetric lineshapes characteristic of a distribution of the quadrupolar interaction. To account for this distribution, the ^{71}Ga MAS NMR lineshapes were reconstructed according to the Gaussian Isotropic Model (GIM) in which the distribution of the electric field gradient is assumed to correspond to a statistical disorder [49,50]. For the two observed resonances, the mean ^{71}Ga isotropic chemical shifts determined from fits of the experimental spectra are characteristic of respectively six-fold ($\delta_{\text{ISO}} = 47$ ppm) and four-fold ($\delta_{\text{ISO}} = 172$ ppm) coordinated Ga in silicate environments, thus ruling out interaction between Ga ions and calcium phosphate groups[51–53]. This is also supported by the ^{31}P MAS NMR spectra of the MBGs which remain similar before and after the $\text{Ga}^{3+}/\text{Ca}^{2+}$ exchange process (see supporting information). For the two MBG compositions investigated, the ^{71}Ga MAS NMR spectra therefore reveal that the Ga^{3+} cations are mainly incorporated in the silicate network as GaO_4 units (about 67 and 73% for MBG-58S and MBG-85S respectively) and that only a weak amount of them forms GaO_6 units (about 33 and 27 % for MBG-58S and MBG-85S respectively). This suggests that Ga incorporation into MBG is not only related to a Ga/Ca exchange process but also involves the formation of GaO_4 units via Ga-O-Si covalent bonds. It should also be noted that the observed incorporation of GaO_4 units in the silicate network requires charge balancing which can be ensured either by Ca^{2+} or H^+ cations.

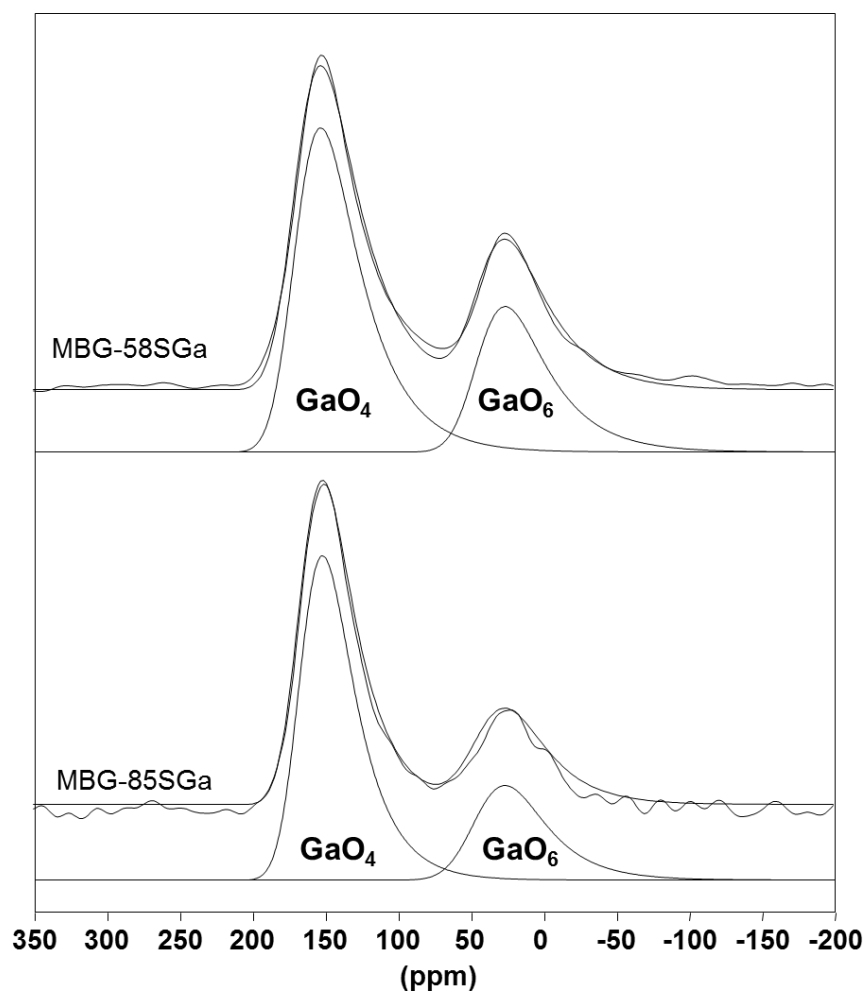


Figure 3: ^{71}Ga solid state NMR MAS spectra of MBG-58SGa and MBG-85SGa and their deconvolution.

Table 4. Relative peak areas and network connectivity (NC) of silica in MBGs, obtained by Solid-State Single Pulse ^{29}Si MAS NMR. Errors values are included in brackets

Sample	Q^4	Q^3	Q^2	$Q^2 (X^{n+})^a$	N.C
MBG-58S	52.8 (0.47)	28.9 (0.86)	13.3 (0.85)	6.0 (0.78)	3.35
MBG-58SGa	30.2 (0.34)	41.9 (0.28)	18.4 (0.32)	9.4 (0.22)	3.37
MBG-85S	73.5	22.1	4.4	-	3.69

	(0.58)	(0.83)	(0.15)		
MBG-85SGa	70.3 (0.25)	24.2 (0.19)	5.6 (0.04)	-	3.64

^a Associated to Ca²⁺ and/or Ga³⁺ cations

3.2 In vitro bioactivity test

Figure 4 shows the Ca²⁺ concentration and pH values of SBF as a function of soaking time of the different MBGs. Calcium levels (Figure 4.a) increase for all the samples during the first 24 h and, the calcium concentration slowly decreases until the end of the assay. Figure 4.b plots the pH evolution of SBF as a function of soaking time, showing a decrease of H⁺ concentration in SBF because of the ionic exchange with Ca²⁺ from the MBGs.

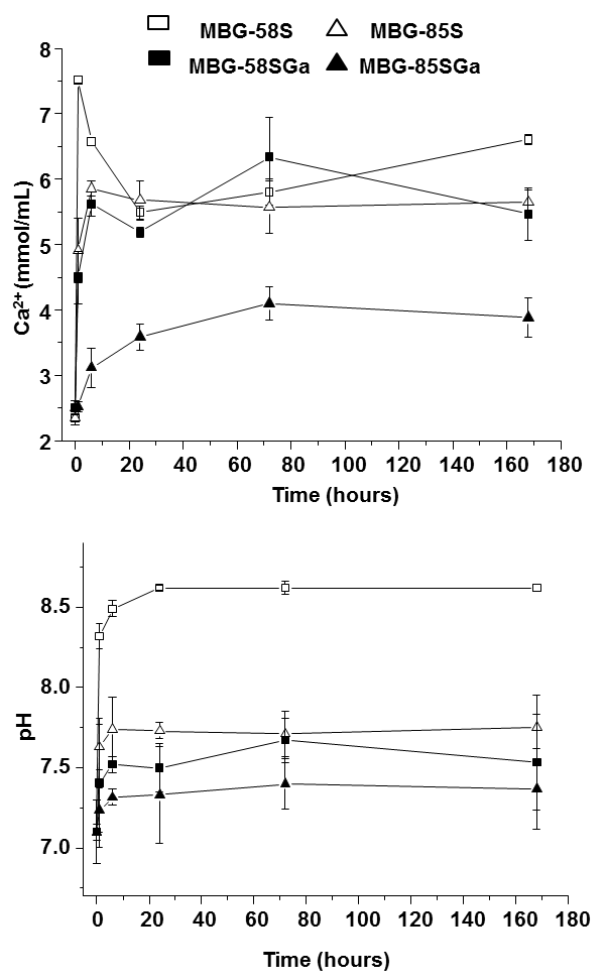


Figure 4. Ionic dissolution in different media. (a) Ca²⁺ concentration and (b) pH changes as a function of soaking time in SBF.

The evolution of the MBGs surfaces as a function of soaking time was followed by FTIR spectroscopy through. (Figure S4 in supporting information). Before soaking, the MBGs show a weak singlet absorption band at 600 cm^{-1} corresponding to the bending vibrational mode of phosphate groups in an amorphous environment, as correspond to P_2O_5 included in MBGs compositions. After 6h in SBF, this band increases the intensity and split into a doublet at 560 and 610 cm^{-1} . The appearance of this doublet is commonly assigned to the formation of an apatite-like phase when bioactive glasses are in contact with SBF or similar biomimetic solutions [54]. In the case of MBG-58S and MBG-58SGa, an intense band at $1400\text{-}1550\text{ cm}^{-1}$ corresponding to the stretching vibrational mode of CO_3^{2-} groups increases as a function of soaking time, indicating that the newly growth phase is a crystalline carbonated hydroxyapatite. This fact is related with the different morphology observed for the apatite crystallites in these samples. SEM observations at higher magnification (supporting information Figure S6) demonstrate that MBG-58S and MBG-58SGa develop an apatite phase made up of agglomerated spherical particles composed by very small crystallites, whereas MBG-85S and MBG85S-Ga form apatite with flake-shape morphology and larger crystallites.

Besides, the presence of a newly formed apatite like phase was confirmed by SEM (Figure 5), indicating that, regardless the Ga presence or absence, the new apatite like phase nucleate and grows on these materials.

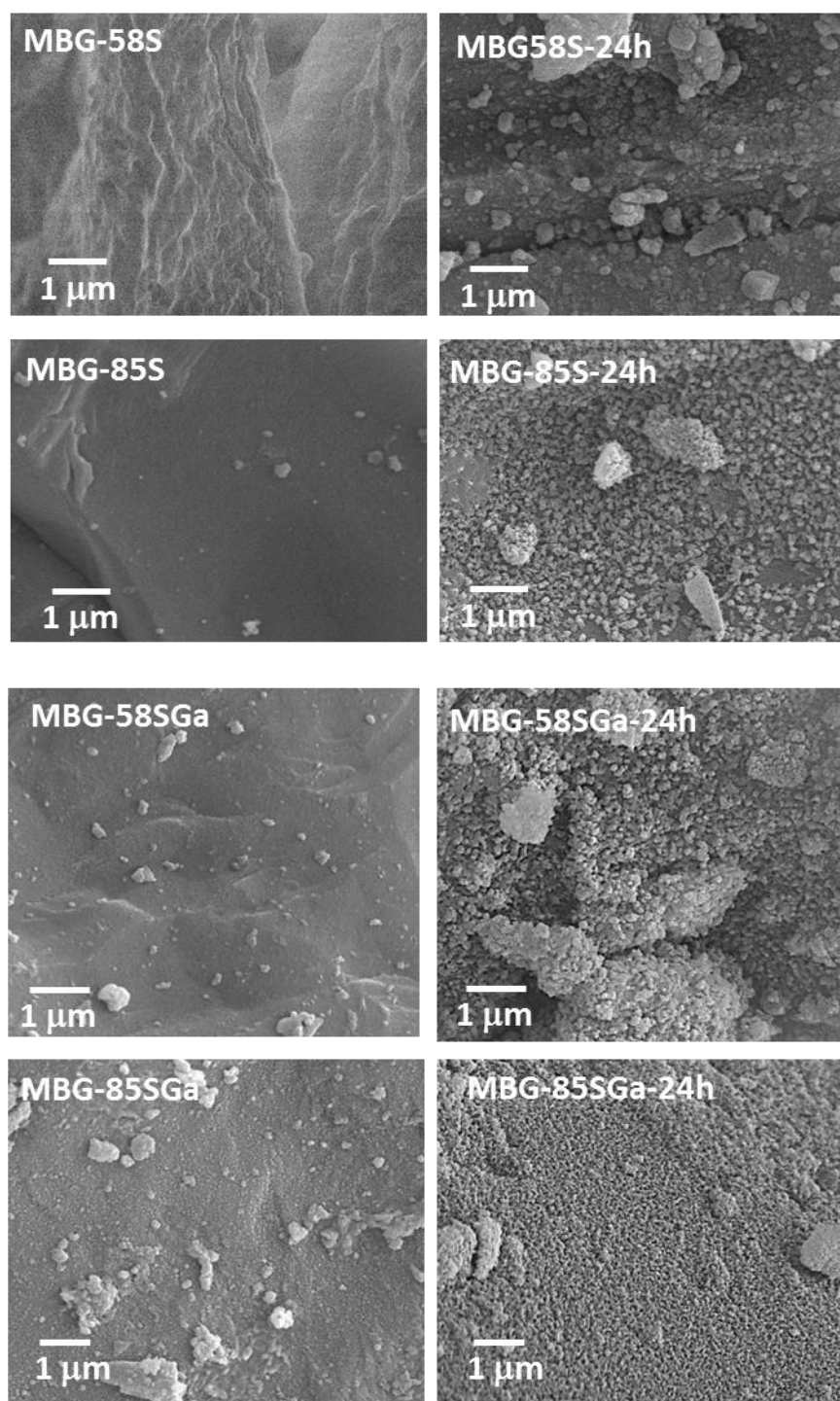


Figure 5. SEM micrographs of the MBGs before (left) and after soaking in SBF for 24 hours (right).

3.3 Ga in vitro release

Prior to put in contact the cells with the MBGs, we analysed the Ga solubility from the materials in α -MEM (figure S7 in supporting information). After 7 days, Ga(III) concentration in α -MEM reached 803 μ M and 71 μ M for MBG-58SGa and MBG-85SGa, respectively. After 10 days, the

concentrations of Ga released were 860 μM and 86 μM for MBG-58SGa and MBG-85SGa, respectively. These results indicate that, after this period, MBG-58SGa releases the 40% of the its gallium content whereas MBG-85SGa releases only the 12 %.

3.4 Effect of Ga on MC3T3-E1 pre-osteoblast like cells

In order to evaluate Ga effect in osteoblastic bone forming cells, cell culture tests were carried out with MC3T3-E1 pre-osteoblast in the presence and absence of the materials for 1, 4 and 7 days. Fluorescence microscopy images (Figure 6) show that MC3T3-E1 pre-osteoblast cultured in the presence of MBG are flattened and attached to the wells similarly to the cells in absence of materials (supporting information Fig S8). The cells show well-developed actin cytoskeletons organized into long parallel bundles, together with the nuclei in blue stained with DAPI. The purple bodies observed in the images correspond to MBGs particles that absorbed both stains in their mesoporous structure. MBG particles, which are in direct contact with MC3T3-E1 pre-osteoblast (see Figure S9 in supporting information), do not lead to any morphological anomaly of the cytoskeleton.

Figure 7.a shows the proliferation of MC3T3-E1 in contact with MBGs. In agreement with the images observed by confocal microscopy, pre-osteoblast cells exhibit a good proliferative behaviour in contact with both, gallium free and gallium containing materials.

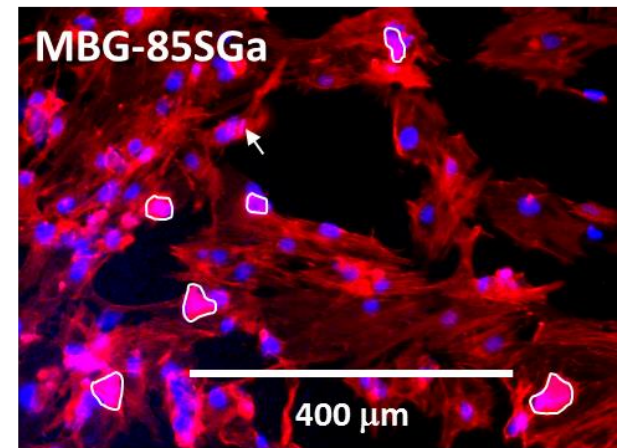
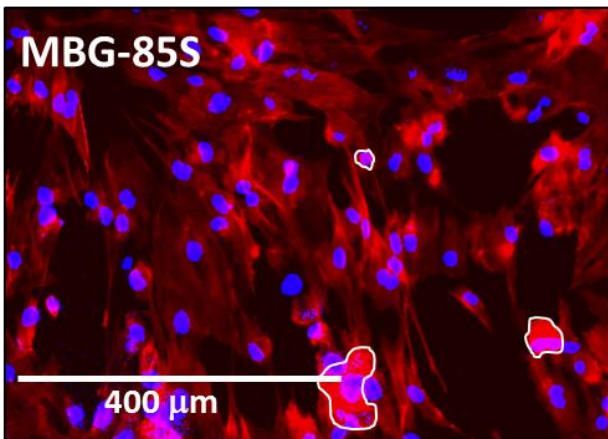
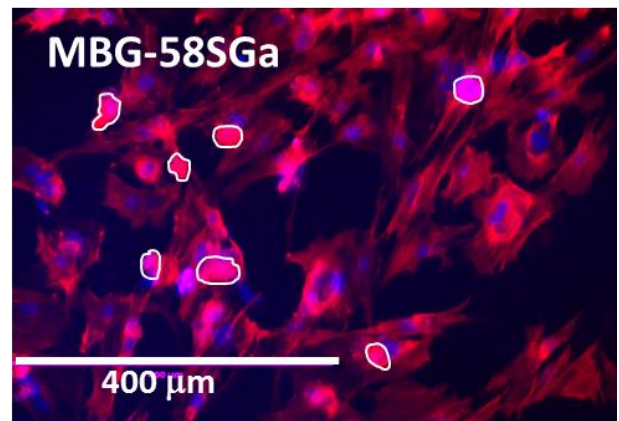
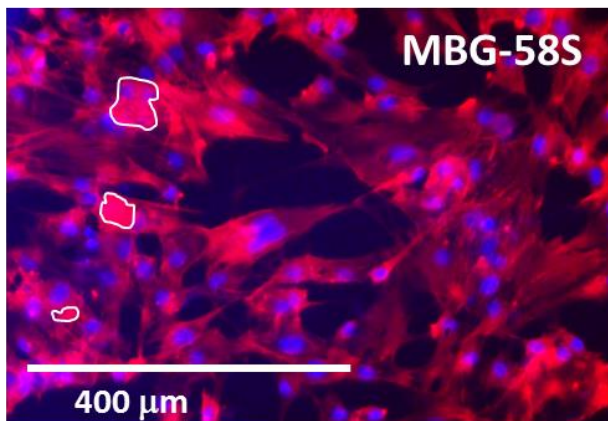
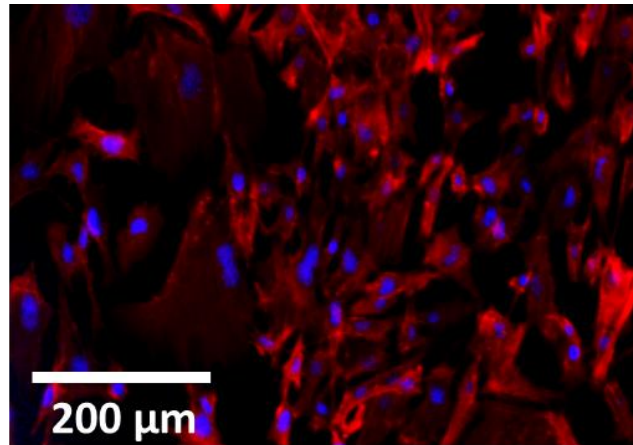


Figure 6. Fluorescence microscopy images of MC3T3-E1 after 4 days in contact with MBGs. Some MBG particles are observed in purple and delimited into a white line. Control image shows MC3T3-E1 after 4 days in the absence of material.

The effect of Ga on the MC3T3-E1 activity and differentiation was studied by measuring the ALP and total protein after 7 and 14 days of incubation in contact with the materials (**Figure 7.b**).

Significant differences in ALP activity were observed by comparing MBGs with and without Ga. In this case, MC3T3-E1 expressed higher ALP phosphatase activity when they were cultured in the presence of MBG-58SGa and MBG-85SGa, when compared to their Ga-free analogues.

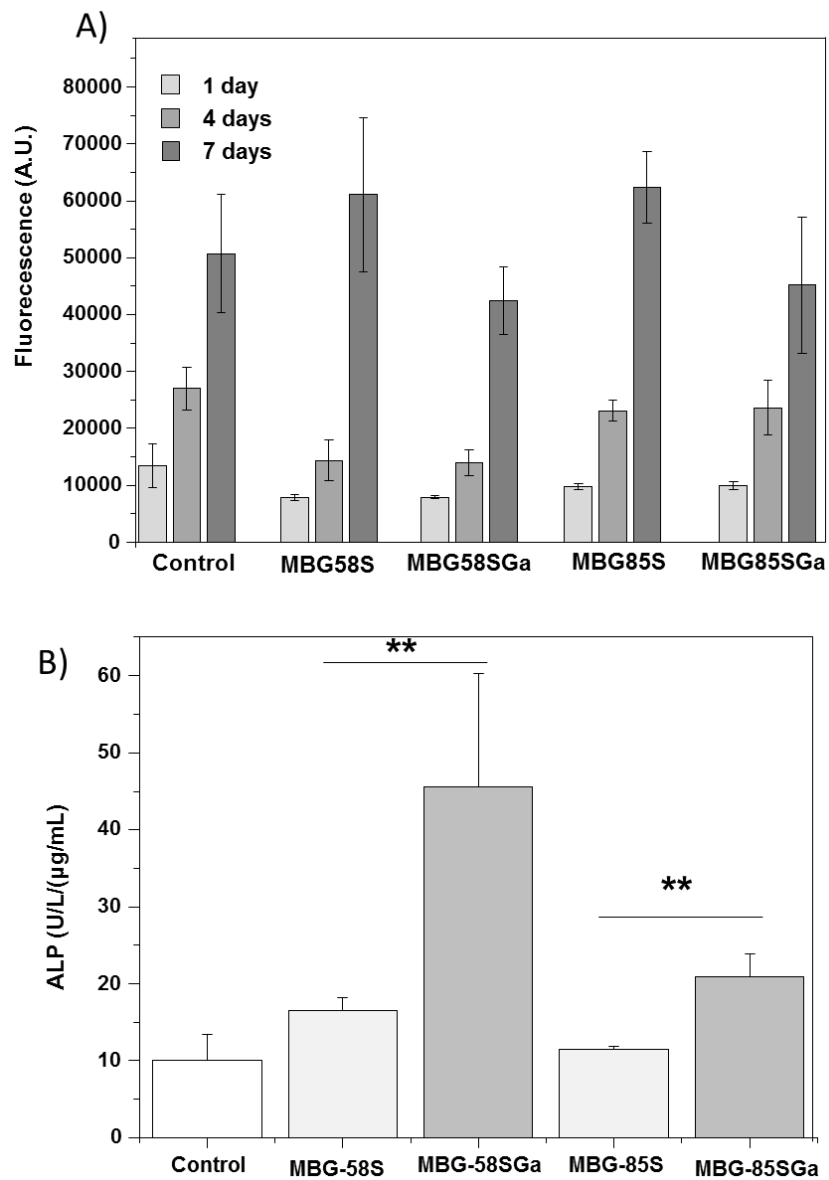


Figure 7. (A) Proliferation of MC3T3-E1 pre-osteoblast like cells at 1, 4 and 7 days of culture in contact with the different MBGs synthesized. (B) ALP activity of MC3T3-E1 pre-osteoblast like cells after 7 days of culture in contact with the different MBGs synthesized. Statistical significance: * $p < 0.05$

3.5 Effect of Ga-doped MBGs on osteoclast cells

First, we measured the effect of the 4 different MBGs on the viability of RAW 264.7 monocytic cells stimulated with RANK-L (Figure 8A). Compared to the control, both MBG-58S and MBG-85S significantly decreased the viability of RAW 264.7 (respectively 27 and 22 %) but, Ga had no supplementary impact.

In order to evaluate the antiresorptive capability of Ga doped MBGs, the measurement of TRAP expression of mature osteoclasts has been carried out. The evaluation of positive multinucleated stained cells by microscopy let know that Ga dramatically affected the viability of mature OC whereas cells were normal when treated with control MBGs (i.e MBG-58S or MBG-85S). This inhibition is more pronounced in the case of MBG-85SGa. In order to quantify Ga effect on the osteoclast differentiation, we measured TRAP staining. We have previously demonstrated that TRAP quantification can be considered as a reliable marker of osteoclastogenesis [47]. Indeed, a correlation between the TRAP content per well and the number of TRAP+ multinucleated cells per well has been observed. Figure 8B evidences that the presence of Ga in MBG-58SGa and MBG-85SGa, strongly inhibited the expression of TRAP as compared to control condition.

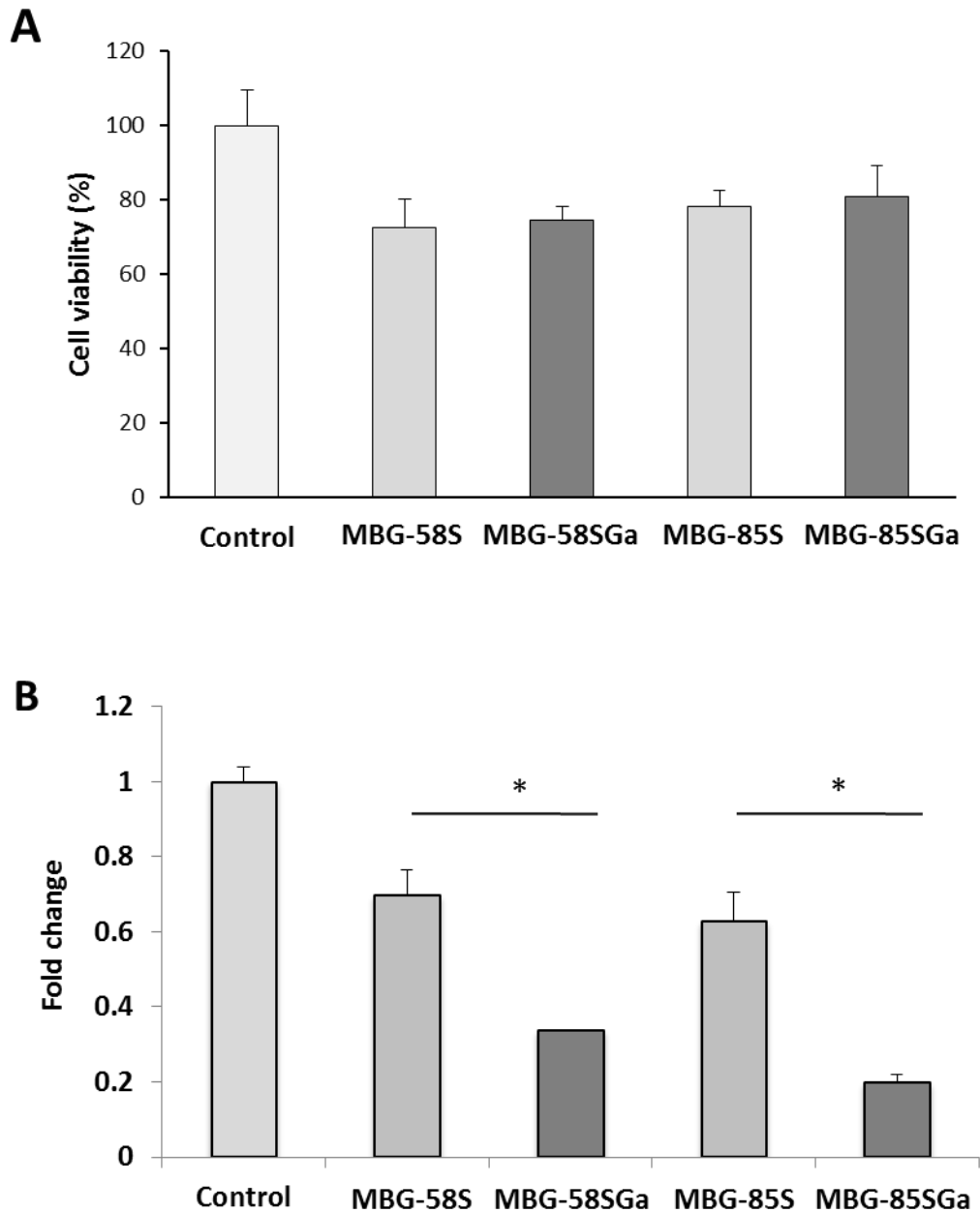


Figure 8. (A) Viability of Raw 264,7 mouse monocyte cells after 4 days of culture with 20 nM RANKL and in contact with 10 mg/ml of the different MBGs. (B) Effect of MBGs on the TRAP expression of mature OC. Cells were cultured for 4 days in presence of 20 nM RANKL. Then TRAP dosage of cellular extracts was performed, and optical density was read at 562 nm. Results were normalized according to control condition. * $p < 0.05$, statistically significant compared to control condition.

4. Discussion

In this work we propose the incorporation of Ga(III) ions within MBGs as a strategy to improve the bone forming capability of these bioceramics. On the assumption that Ga(III) can inhibit osteoclastogenesis while fostering osteoblasts differentiation, we envision that Ga-containing MBGs would be excellent bone grafting materials for osteoporotic patients. In order to understand the potential activity of Ga(III) ions over pre-osteoblasts and osteoclasts, we have carried out a deep physicochemical study, paying special attention to the Ga local environment in Ga-containing MBGs. Our results demonstrate that Ga(III) ions are mainly incorporated as tetrahedral GaO_4 units. In this sense Ga (III) would covalently contribute as non-soluble species to the network connectivity of the $\text{SiO}_2\text{-CaO-P}_2\text{O}_5$ MBGs. The covalent bonding would be a consequence of the polycondensation of $[\text{GaO}_4]$ units with the $[\text{SiO}_4]$ tetrahedrons at the surface of MBGs, favoured by the alkaline conditions during the Ga incorporation process. This mechanism takes place in both MBG-58SGa and MBG-85SGa. Additionally, Ga(III) ions are also incorporated as $[\text{GaO}_6]$ octahedral species, thus acting as network modifiers and would constitute the main fraction of soluble Ga in MBGs. The incorporation of GaO_6 species occurs by means of Ca (II)-Ga(III) ionic exchange with Ca(II) cations of the MBGs. This second incorporation mechanism takes place to a higher extent in MBG-58SGa, as this composition contains more soluble Ca (II) ions acting as network modifiers in MBG-58S. During the Ca(II)-Ga(III) exchange, Ca^{2+} cations are released and the partial dissolution of MBG-58S takes place. Consequently, an enlargement of the pore size occurs, which is reflected in the higher values of pore size distribution observed for MBG-58SGa. In the case of MBG-85SGa, Ca(II)-Ga(III) exchange occurs to a lesser extent due to the smaller amount of Ca(II) available as network modifier. It must be highlighted that the presence of P_2O_5 as orthophosphate entraps most of the Ca^{2+} cations in calcium phosphate clusters, as could be observed by ^{31}P NMR studies and previously reported by our group [26-29]. In addition, the higher silica

network connectivity of MBG-85S avoids the dissolution of this MBG during Ga(III) incorporation and, consequently, the pore size remains almost constant (Table 2). Depending on the composition of the MBG, surface area and porosity change differently after gallium incorporation. In the case of MBG-58SGa, it proceeds by means of calcium-gallium exchange. This mechanism involves the partial dissolution of MBG-58S, thus decreasing the surface area and increasing the pore size. On the other hand, MBG-85SGa evidences a higher decrease of surface area while keeping the pore size after gallium incorporation. These data point out that gallium mainly incorporates on the outer surface of MBG-85S without affecting the inner porous structure by dissolution. These results would agree with those obtained by Ga-NMR that indicate that gallium is mainly incorporated on MBG-85SGa through the polycondensation of $[\text{GaO}_4]$ units on the surface.

Despite of the Ca(II) decrease associated to Ga(III) incorporation, Ga-containing MBGs exhibit an excellent *in vitro* bioactive behavior. Both MBG-58SGa and MBG-85SGa developed an apatite like-layer on their surface after 6 hours in contact with SBF. This test, although not definitive, is indicative of the osseointegration capability of this kind of materials under *in vivo* conditions [46, 55]. In this sense, the high surface area and porosity of MBGs would be responsible of the high bioactivity, regardless the calcium loss.

Ga (III) ions do not affect pre-osteoblast proliferation and stimulate the differentiation toward osteoblast phenotype. The increment of ALP activity of pre-osteoblasts in contact with Ga-containing MBGs respect to Ga-free MBGs indicate that this ion provides signals to stimulate differentiation toward bone forming cells. It must be highlighted that a very small amount of Ga(III) in MBG-85SGa is enough to produce a significant increase of this differentiation marker respect to MBG-85S. On the other hand, Ga incorporation in MBGs influences TRAP expression suggesting that the presence of Ga disturbs the osteoclastogenesis. These *in vitro* results are in concordance with our previous data relative to the biological effects of Ga in solution and loaded in a calcium phosphate matrix [36,56,57]. Interestingly, the activity of Ga has been closely related with its

capability for being released as soluble species. At physiological pH, most of the dissolved Ga is present as gallate, $\text{Ga}(\text{OH})_4^-$ although the pH variability in the different bone compartments can modify both, solubility and speciation of Ga. In the case of our MBGs, although Ga solubility is very low (specially for MBG85S-Ga) is enough to inhibit osteoclastogenesis. After ten days in α -MEM, the released gallium reached 70 and 810 μmolar concentrations for MBG85S-Ga and MBG58S-Ga, respectively. Blair et al demonstrated that gallium concentrations between 7-12 μmolar in vivo and around 100 μmolar in vitro, are enough to promote inhibition of osteoclastogenesis [58]. In this sense, both MBGs would be able to supply soluble gallium species to impact on the cultured cells. However, it must be highlighted that osteoclast inhibition is more pronounced in the case of MBG-85SGa, although the amount of Ga released is much lower compared to MBG-58SGa. This fact suggests that gallium bonded at the MBG85S-Ga surface is active, similarly to the experiment of Hall and Chambers, who demonstrated that bonded gallium to bone remain active [32]. In fact, in the case of MBG85S-Ga, gallium is mainly incorporated at the external surface of the MBG85S as indicated by the dramatic reduction of textural properties after Ga incorporation (Table 3). Our results suggest that, in addition to the solubilized gallium, this element would be also incorporated into macrophages in contact with MBG particles, thus inhibiting the differentiation toward osteoclast phenotype.

Conclusions

Mesoporous bioactive glasses in the system $\text{SiO}_2\text{-CaO-P}_2\text{O}_5\text{-Ga}_2\text{O}_3$ have been prepared by impregnation of Ga(III) on two different $\text{SiO}_2\text{-CaO-P}_2\text{O}_5$. Ga (III) incorporation proceeds according to two different mechanisms: direct condensation within the silica network and ionic exchange with Ca (II), resulting in the formation of network formers GaO_4 units and network modifiers GaO_6 .

The incorporation of Ga within $\text{SiO}_2\text{-CaO-P}_2\text{O}_5$ MBGs does not inhibit their excellent bioactive behavior.

The presence of Ga in MBGs shows a selective behavior with respect to different cell types. Whereas Ga-doped MBGs stimulate the differentiation of pre-osteoblast towards osteoblastic phenotype, our experiments also demonstrate that Ga disturbs the osteoclastogenesis. Interestingly, these effects of Ga on bone cells does not require the dissolution of this element.

Considering the excellent bioactive behavior of $\text{SiO}_2\text{-CaO-P}_2\text{O}_5\text{-Ga}_2\text{O}_3$ based MBGs and their selective behavior with respect to osteoblasts and osteoclasts, these bioceramics might be considered as excellent bone substitutes for regenerative purposes in osteoporotic patients.

Acknowledgements

This study was supported by research grants from the Ministerio de Economía y Competitividad (projects MAT2015-64831-R and MAT2016-75611-R AEI/FEDER, UE. M.V.-R. acknowledges funding from the European Research Council (Advanced Grant VERDI; ERC-2015-AdG Proposal 694160).

References

- [1] X. Yan, C. Yu, X. Zhou, J. Tang, D. Zhao, Highly ordered mesoporous bioactive glasses with superior in vitro bone-forming bioactivities, *Angew. Chemie. Int. Ed.* 43 (2004) 5980–5984.
- [2] X. Yan, X. Huang, C. Yu, H. Deng, Y. Wang, Z. Zhang, S. Qiao, G. Lu, D. Zhao, The in-vitro bioactivity of mesoporous bioactive glasses, *Biomaterials.* 27 (2006) 3396–3403.
- [3] A. López-Noriega, D. Arcos, I. Izquierdo-Barba, Y. Sakamoto, O. Terasaki, M. Vallet-Regí, Ordered Mesoporous Bioactive Glasses for Bone Tissue Regeneration, *Chem. Mater.* 18 (2006) 3137–3144.
- [4] X. Chen, Y. Zhao, S. Geng, R.J. Miron, Q. Zhang, C. Wu, Y. Zhang, In vivo experimental study on bone regeneration in critical bone defects using PIB nanogels/boron-containing mesoporous bioactive glass composite scaffold, *Int J Nanomedicine.* 10 (2015) 839–846.
- [5] N. Cheng, Y. Wang, Y. Zhang, B. Shi, The Osteogenic Potential of Mesoporous Bioglasses/Silk and Non-Mesoporous Bioglasses/Silk Scaffolds in Ovariectomized Rats: In vitro and In vivo Evaluation, *PLoS One.* 8 (2013) e81014.
- [6] C. Wu, J. Chang, Mesoporous bioactive glasses: structure characteristics, drug/growth factor delivery and bone regeneration application, *Interface Focus.* 2 (2012) 292–306.
- [7] M. Vallet-regí, D. Arcos, Mesoporous Materials for Biomedical applications, in: P. J. Pannone (Ed), *Trends in Biomaterials Research*, Nova Science Publishers, Inc, (2007) 109–142.
- [8] N. Gómez-Cerezo, I. Izquierdo-Barba, D. Arcos, M. Vallet-Regí, Tailoring the biological response of mesoporous bioactive materials, *J. Mater. Chem. B.* (2015) 3810–3819.
- [9] J.R. Jones, Reprint of: Review of bioactive glass: From Hench to hybrids, *Acta Biomater.* 23 (2015) 53–82.

- [10] L.L. Hench, I.D. Xynos, J.M. Polak, Bioactive glasses for in situ tissue regeneration, *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* 15 (2004) 543–562.
- [11] I.D. Xynos, A.J. Edgar, L.D.K. Buttery, L.L. Hench, J.M. Polak, Gene-expression profiling of human osteoblasts following treatment with the ionic products of Bioglass®45S5 dissolution, *J. Biomed. Mater. Res.* 55 (2001) 151–157.
- [12] I.D. Xynos, M.V.J. Hukkanen, J.J. Batten, L.D. Buttery, L.L. Hench, J.M. Polak, Bioglass®45S5 Stimulates Osteoblast Turnover and Enhances Bone Formation In Vitro: Implications and Applications for Bone Tissue Engineering, *Calcif. Tissue Int.* 67 (2000) 321–329.
- [13] I. Izquierdo-Barba, D. Arcos, Y. Sakamoto, O. Terasaki, A. López-Noriega, M. Vallet-Regí High-Performance Mesoporous Bioceramics Mimicking Bone Mineralization, *Chem. Mater.*, 20 (2008) 3191–3198.
- [14] C. Wu, J. Chang, Multifunctional mesoporous bioactive glasses for effective delivery of therapeutic ions and drug/growth factors, *J. Control. Release.* 193 (2014) 282–295.
- [15] Y. Li, Y.Z. Liu, T. Long, X. Bin Yu, T.T. Tang, K.R. Dai, B. Tian, Y.P. Guo, Z.A. Zhu, Mesoporous bioactive glass as a drug delivery system: Fabrication, bactericidal properties and biocompatibility, *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 24 (2013) 1951–1961.
- [16] M. Zhu, J. Shi, Q. He, L. Zhang, F. Chen, Y. Chen, An emulsification-solvent evaporation route to mesoporous bioactive glass microspheres for bisphosphonate drug delivery, *J. Mater. Sci.* 47 (2012) 2256–2263.
- [17] F. Wang, D. Zhai, C. Wu, J. Chang, Multifunctional mesoporous bioactive glass/upconversion nanoparticle nanocomposites with strong red emission to monitor drug delivery and stimulate osteogenic differentiation of stem cells, *Nano Res.* 9 (2016) 1193–1208.

- [18] L. Polo, N. Gómez-Cerezo, E. Aznar, J. Vivancos, F. Sancenón, D. Arcos, M. Vallet-Regí, R. Martínez-Máñez, Molecular gates in mesoporous bioactive glasses for the treatment of bone tumors and infection, *Acta Biomater.* 50 (2017) 114–126.
- [19] H.M. Lin, W.K. Wang, P.A. Hsiung, S.G. Shyu, Light-sensitive intelligent drug delivery systems of coumarin-modified mesoporous bioactive glass, *Acta Biomater.* 6 (2010) 3256–3263.
- [20] P. Han, C. Wu, J. Chang, Y. Xiao, The cementogenic differentiation of periodontal ligament cells via the activation of Wnt/ α -catenin signalling pathway by Li⁺ ions released from bioactive scaffolds, *Biomaterials.* 33 (2012) 6370–6379.
- [21] Y. Zhang, L. Wei, J. Chang, R.J. Miron, B. Shi, S. Yi, C. Wu, Strontium-incorporated mesoporous bioactive glass scaffolds stimulating in vitro proliferation and differentiation of bone marrow stromal cells and in vivo regeneration of osteoporotic bone defects, *J. Mater. Chem. B.* 1 (2013) 5711.
- [22] J. Ye, J. He, C. Wang, K. Yao, Z. Gou, Copper-containing mesoporous bioactive glass coatings on orbital implants for improving drug delivery capacity and antibacterial activity, *Biotechnol. Lett.* 36 (2014) 961–968.
- [23] C. Wu, Y. Zhou, W. Fan, P. Han, J. Chang, J. Yuen, M. Zhang, Y. Xiao, Hypoxia-mimicking mesoporous bioactive glass scaffolds with controllable cobalt ion release for bone tissue engineering., *Biomaterials.* 33 (2012) 2076–85.
- [24] C. Wu, R. Miron, A. Sculean, S. Kaskel, T. Doert, R. Schulze, Y. Zhang, Proliferation, differentiation and gene expression of osteoblasts in boron-containing associated with dexamethasone deliver from mesoporous bioactive glass scaffolds, *Biomaterials.* 32 (2011) 7068–7078.

- [25] R. Mathew, P.N. Gunawidjaja, I. Izquierdo-barba, K. Jansson, A. García, D. Arcos, M. Vallet-regí, M. Ed, Solid-State ^{31}P and ^1H NMR Investigations of Amorphous and Crystalline Calcium Phosphates Grown Biomimetically From a Mesoporous Bioactive Glass, *J. Phys. Chem.* (2011) 0–10.
- [26] E. Leonova, I. Izquierdo-Barba, D. Arcos, A. López-Noriega, N. Hedin, M. Vallet-Regí, M. Edén, Multinuclear Solid-State NMR Studies of Ordered Mesoporous Bioactive Glasses, *J. Phys. Chem. C*. 112 (2008) 5552–5562.
- [27] P.N. Gunawidjaja, R. Mathew, A.Y.H. Lo, I. Izquierdo-Barba, A. García, D. Arcos, M. Vallet-Regí, M. Edén, Local structures of mesoporous bioactive glasses and their surface alterations in vitro: inferences from solid-state nuclear magnetic resonance, *Phil. Trans. R. Soc. A*. 370 (2012) 1376–1399.
- [28] R. Mathew, C. Turdean-Ionescu, B. Stevansson, I. Izquierdo-Barba, A. García, D. Arcos, M. Vallet-Regí, M. Edén, Direct probing of the phosphate-ion distribution in bioactive silicate glasses by solid-state NMR: Evidence for transitions between random/clustered scenarios, *Chem. Mater.* 25 (2013) 1877–1885.
- [29] A. García, M. Cicuéndez, I. Izquierdo-Barba, D. Arcos, M. Vallet-Regi, Essential role of calcium phosphate heterogeneities in 2D-hexagonal and 3D-cubic $\text{SiO}_2\text{-CaO-P}_2\text{O}_5$ mesoporous bioactive glasses, *Chem. Mater.* 21 (2009) 5474–5484.
- [30] A. Philippart, N. Gómez-Cerezo, D. Arcos, A.J. Salinas, E. Boccardi, M. Vallet-Regi, A.R. Boccaccini, Novel ion-doped mesoporous glasses for bone tissue engineering: Study of their structural characteristics influenced by the presence of phosphorous oxide, *J. Non. Cryst. Solids*. 455 (2017) 90-97.
- [31] P. Ridefelt, E. Gylfe, G. Akerström, J. Rastad, Effects of the antihypercalcemic drugs Ga

nitrate and pamidronate on hormone release of pathologic human parathyroid cells, *Surgery*. 117 (1995) 56–61.

- [32] T.J. Hall, T.J. Chambers, Ga inhibits bone resorption by a direct effect on osteoclasts, *Bone Miner.* 8 (1990) 211–216.
- [33] R.S. Bockman, A.L. Boskey, N.C. Blumenthal, N.W. Alcock, R.P. Warrell, Ga increases bone calcium and crystallite perfection of hydroxyapatite, *Calcif. Tissue Int.* 39 (1986) 376–381.
- [34] M.A. Repo, R.S. Bockman, F. Betts, A.L. Boskey, N.W. Alcock, R.P. Warrell Jr., Effect of Ga on bone mineral properties, *Calcif. Tissue Int.* 43 (1988) 300–306.
- [35] R.P. Warrell, Ga nitrate for the treatment of bone metastases, *Cancer*. 80 (1997) 1680–1685.
- [36] E. Verron, M. Masson, S. Khoshniat, L. Duplomb, Y. Wittrant, M. Baud’Huin, Z. Badran, B. Bujoli, P. Janvier, J.C. Scimeca, J.M. Bouler, J. Guicheux, Ga modulates osteoclastic bone resorption in vitro without affecting osteoblasts, *Br. J. Pharmacol.* 159 (2010) 1681–1692.
- [37] E. Verron, J.M. Bouler, J.C. Scimeca, Ga as a potential candidate for treatment of osteoporosis, *Drug Discov Today*. 17 (2012) 1127–1132.
- [38] C. Mellier, F. Fayon, F. Boukhechba, E. Verron, M. Leferrec, G. Montavon, J. Lesoeur, V. Schnitzler, D. Massiot, P. Janvier, O. Gauthier, J. Bouler, B. Bujoli, Design and properties of novel Ga-doped injectable apatitic cements, *Acta Biomater.* 24 (2015) 322–332.
- [39] S. Shruti, F. Andreatta, E. Furlani, E. Marin, S. Maschio, L. Fedrizzi, Cerium, Ga and zinc containing mesoporous bioactive glass coating deposited on titanium alloy, *Appl. Surf. Sci.* 378 (2016) 216–223.
- [40] S. Shruti, A.J. Salinas, G. Lusvardi, G. Malavasi, L. Menabue, M. Vallet-Regi, Mesoporous bioactive scaffolds prepared with cerium-, Ga- and zinc-containing glasses, *Acta Biomater.* 9

(2013) 4836–4844.

- [41] S. Shruti, A.J. Salinas, E. Ferrari, G. Malavasi, G. Lusvardi, A.L. Doadrio, L. Menabue, M. Vallet-Regí, Curcumin release from cerium, Ga and zinc containing mesoporous bioactive glasses, *Microporous Mesoporous Mater.* 180 (2013) 92–101.
- [42] A.J. Salinas, S. Shruti, G. Malavasi, L. Menabue, M. Vallet-Regí, Substitutions of cerium, Ga and zinc in ordered mesoporous bioactive glasses, *Acta Biomater.* 7 (2011) 3452–3458.
- [43] S. Pourshahrestani, E. Zeimaran, N. Adib Kadri, N. Gargiulo, S. Samuel, S.V. Naveen, T. Kamarul, M.R. Towler, Ga-containing mesoporous bioactive glass with potent hemostatic activity and antibacterial efficacy, *J. Mater. Chem. B.* 4 (2016) 71–86.
- [44] C.J. Brinker, Y. Lu, A. Sellinger, H. Fan, Evaporation-Induced Self-Assembly: Nanostructures Made Easy, *Adv. Mater.* 11 (1999) 579–585.
- [45] B.M. Fung, A.K. Khitrin, K. Ermolaev, An Improved Broadband Decoupling Sequence for Liquid Crystals and Solids, *J. Magn. Reson.* 142 (2000) 97–101.
- [46] T. Kokubo, H. Kushitani, S. Sakka, T. Kitsugi, T. Yamamuro, Solutions able to reproduce in vivo surface-structure changes in bioactive glass-ceramic, *J. Biomed. Mater. Res.* 24 (1990) 721–34.
- [47] I. Strazic-Geljic, I. Guberovic, B. Didak, H. Schmid-Antomarchi, A. Schmid-Alliana, F. Boukhechba, J.-M. Bouler, J.-C. Scimeca, E. Verron, Ga, a promising candidate to disrupt the vicious cycle driving osteolytic metastases, *Biochem. Pharmacol.* 116 (2016) 11–21.
- [48] D. Zhao, Q. Huo, J. Feng, B.F. Chmelka, G.D. Stucky, Nonionic triblock and star diblock copolymer and oligomeric surfactant syntheses of highly ordered, hydrothermally stable, mesoporous silica structures. *J. Am. Chem. Soc.* 120 (1998) 6024-6036

- [49] B. Bureau, G. Silly, J. Buzaré, C. Legein, D. Massiot, From crystalline to glassy Ga fluoride materials: an NMR study of ^{69}Ga and ^{71}Ga quadrupolar nuclei, *Solid State Nucl. Magn. Reson.* 14 (1999) 181–190.
- [50] G. Czjzek, J. Fink, F. Götz, H. Schmidt, J.M.D. Coey, J.-P. Rebouillat, A. Liénard, Atomic coordination and the distribution of electric field gradients in amorphous solids, *Phys. Rev. B.* 23 (1981) 2513–2530.
- [51] C.-F. Cheng, H. He, W. Zhou, J. Klinowski, J.A.S. Gonçalves, L.F. Gladden, Synthesis and Characterization of the Gallosilicate Mesoporous Molecular Sieve MCM-41, *J. Phys. Chem.* 100 (1996) 390–396.
- [52] V. Montouillout, C.M. Morais, A. Douy, F. Fayon, D. Massiot, Towards a better description of gallo-phosphate materials in solid state NMR: 1D and 2D correlation studies, *Magn. Reson. Chem.* 44 (2006) 770-775.
- [53] C. Mellier, F. Fayon, V. Schnitzler, P. Deniard, M. Allix, S. Quillard, D. Massiot, J.-M. Bouler, B. Bujoli, P. Janvier, Characterization and Properties of Novel Ga-Doped Calcium Phosphate Ceramics, *Inorg. Chem.* 50 (2011) 8252–8260.
- [54] A.L.B. MaÇon, T.B. Kim, E.M. Valliant, K. Goetschius, R. K. Brow , D.E. Day, A. Hoppe, A. R. Boccaccini, I.Y. Kim, C. Ohtsuki, T. Kokubo, A. Osaka, M. Vallet-Regí, D. Arcos, L. Fraile, A.J. Salinas, A.V. Teixeira, Y. Vueva, R. M. Almeida, M. Miola, C. Vitale-Brovarone, E. Verné, W. Höland, J. R. Jones. A unified in vitro evaluation for apatite-forming ability of bioactive glasses and their variants, *J Mater Sci: Mater Med.* 26 (2015) 115-124.
- [55] M. Bohner, J. Lemaitre, Can bioactivity be tested in vitro with SBF solution?, *Biomaterials.* 30 (2009) 2175–2179.

- [56] I. Strazic Geljic, N. Melis, F. Boukhechba, S. Schaub, C. Mellier, P. Janvier, J.-P. Laugier, J.-M. Bouler, E. Verron, J.-C. Scimeca, Ga enhances reconstructive properties of a calcium phosphate bone biomaterial, *J. Tissue Eng. Regen. Med.* 12 (2018) e854-e866.
- [57] E. Verron, A. Loubat, G.F. Carle, C. Vignes-Colombeix, I. Strazic, J. Guicheux, N. Rochet, J.M. Bouler, J.C. Scimeca, Molecular effects of Ga on osteoclastic differentiation of mouse and human monocytes, *Biochem. Pharmacol.* 83 (2012) 671–679.
- [58] H.C. Blair, S.L. Teitelbaum, H.L. Tan, P.H. Schlesinger, Reversible inhibition of osteoclastic activity by bone-bound gallium (III). *J. Cell Biochem.* 48 (1992) 401-410

Supporting information

1. N₂ adsorption studies

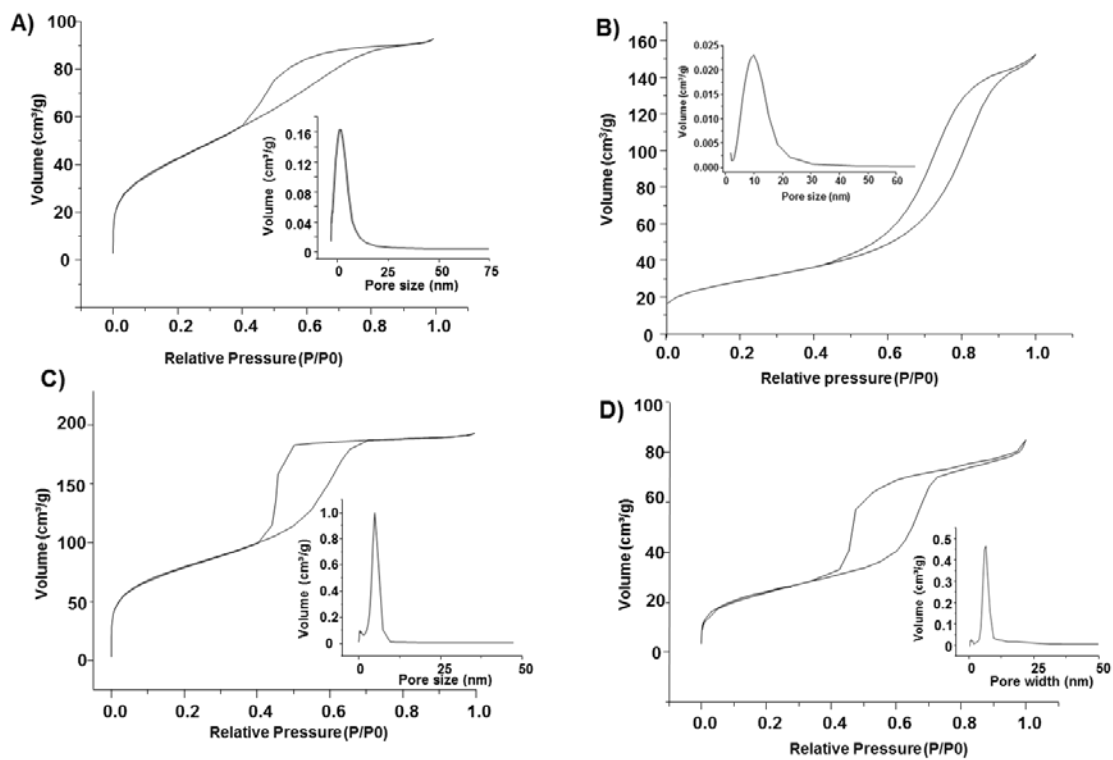


Figure S1. Nitrogen adsorption/desorption isotherms and pore size distributions at the mesopore range (insets). (a) MBG-58S, b) MBG-58SGa, c) MBG-85S, d) MBG-85SGa

3. Solid-state ^{31}P single-pulse MAS NMR spectroscopy

^{31}P NMR spectroscopy was used to evaluate the local environment of P atoms. Figure S1 shows the ^{31}P quantitative MAS spectra for the four MBGs synthesised. The four spectra show only one resonance at 2 ppm corresponding to the q^0 environment, thus indicating that only calcium orthophosphate is present in all the MBGs, without the presence of other polyphosphate species.

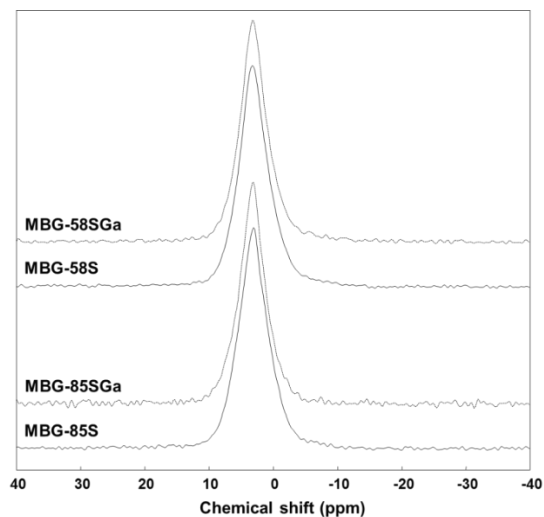


Figure S3. ^{31}P -NMR spectra of the different MBGs synthesized.

4. In vitro bioactivity tests.

FTIR spectroscopy of MBGs as a function of soaking time in SBF. As inert control, $\alpha\text{-Al}_2\text{O}_3$ was also soaked for 1 week in SBF, evidencing that no changes occurs on the surface of control material. Arrows indicate the doublet corresponding to the formation of a crystalline phosphate. Figure S3 shows the FTIR spectra of MBG-58S. Before soaking, the spectrum shows characteristic absorption bands of Si-O bonds at 1040, 800, and 470 cm^{-1} . After 6h of soaking in SBF, an intense band split into a doublet at 560 and 600 cm^{-1} is observed, indicating the formation of an apatite phase on the surface of the MBG. This behavior is also observed for the rest of the MBGs prepared in this work, pointing out that the bioactive behavior is preserved for both compositions regardless of the amount of gallium incorporated.

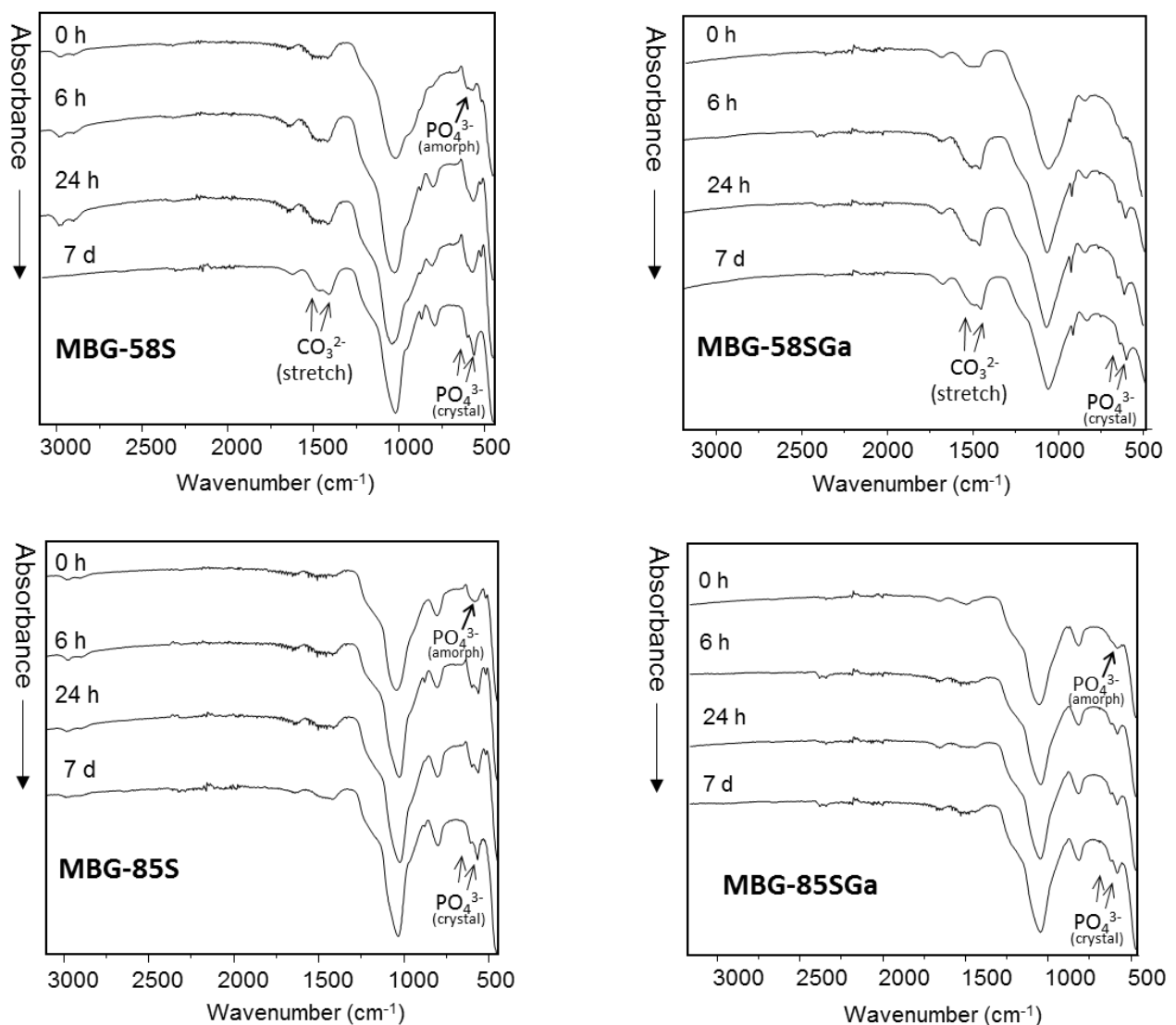


Figure S4. FTIR spectra collected from the different MBGs before and after soaking in SBF for 6, 24 and 168 hours.

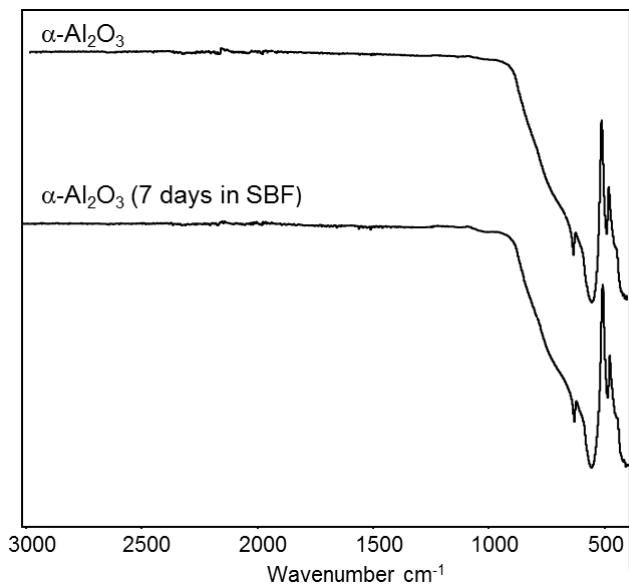


Figure S5. FTIR spectra for α -Al₂O₃ before and after being soaked in SBF for 1 week, used as inert control of the in vitro bioactivity test.

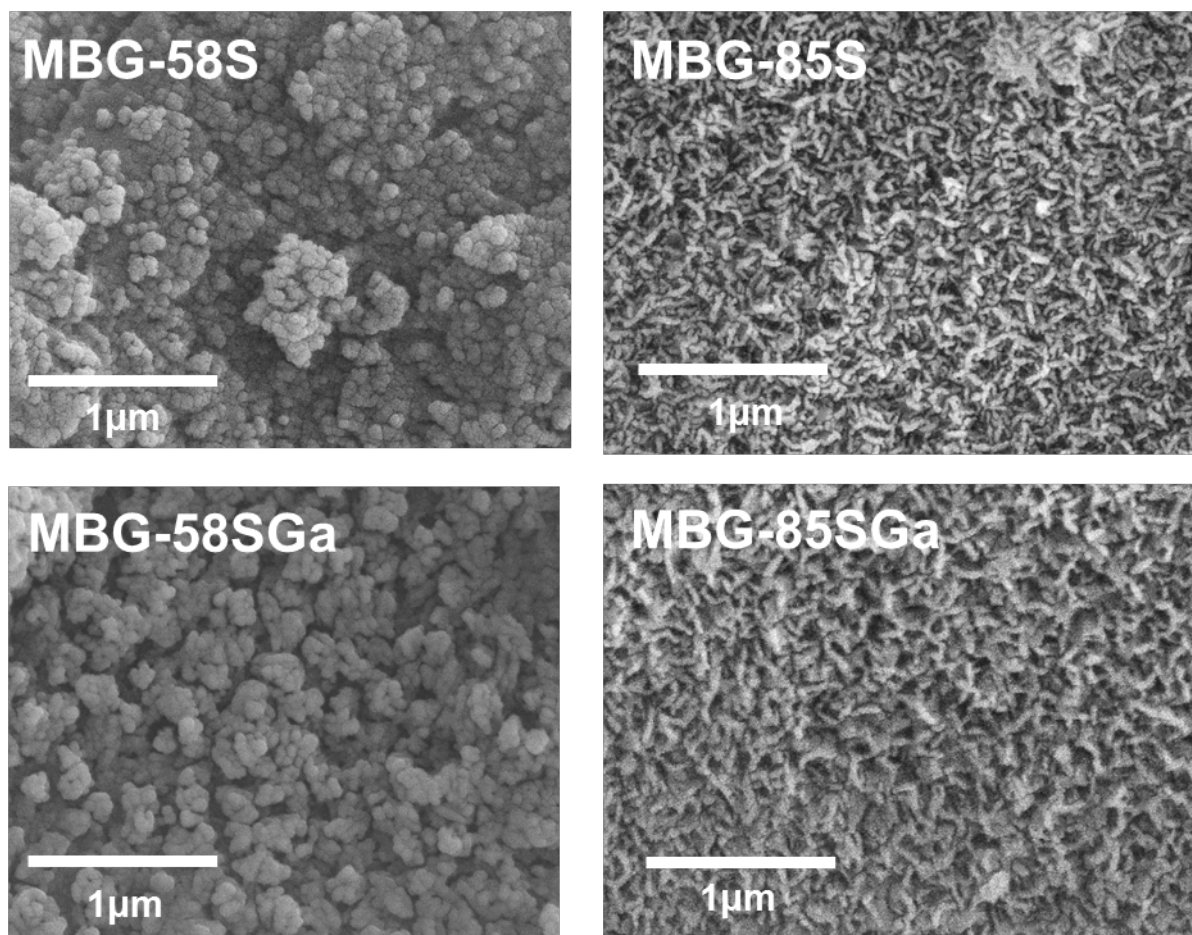


Figure S6. SEM images of the MBGs after being soaked in SBF for 1 week (magnification x 25000)

5. Gallium release in α MEM at pH=7.4

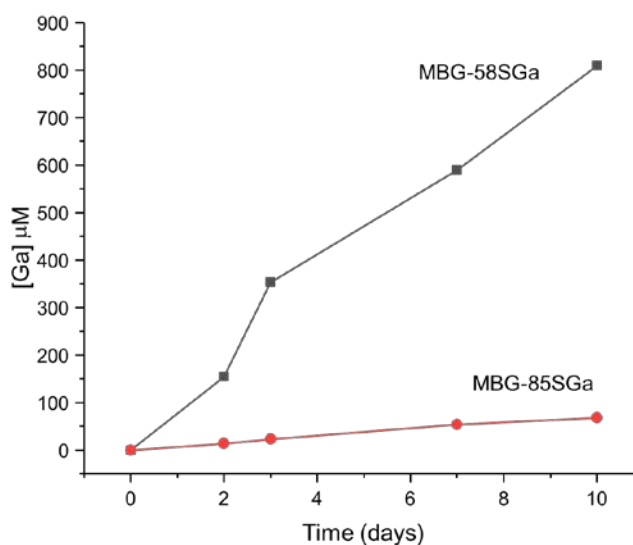


Figure S7. Gallium release from MBG-58SGa and MBG-85SGa as a function of soaking time in α MEM

% Ga released from MBG-58SGa after 10 days in α MEM= 40%

% Ga released from MBG-85SGa after 10 days in α MEM = 12%

6. Fluorescence microscopy studies

Pre-osteoblast were visualized by fluorescence microscopy as control sample for this experiment before being in contact with MBGs.

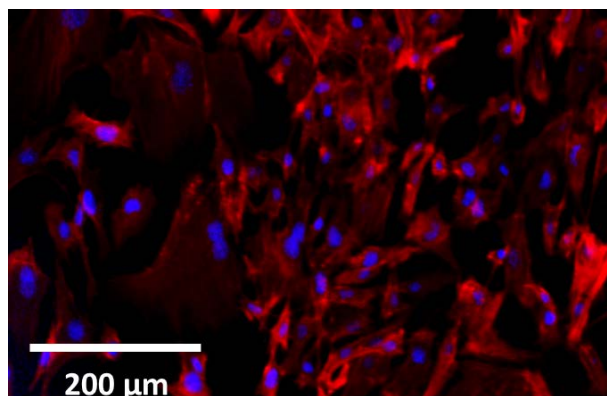


Figure S8. Fluorescence microscopy images of MC3T3-E1 cells in absence of MBGs.

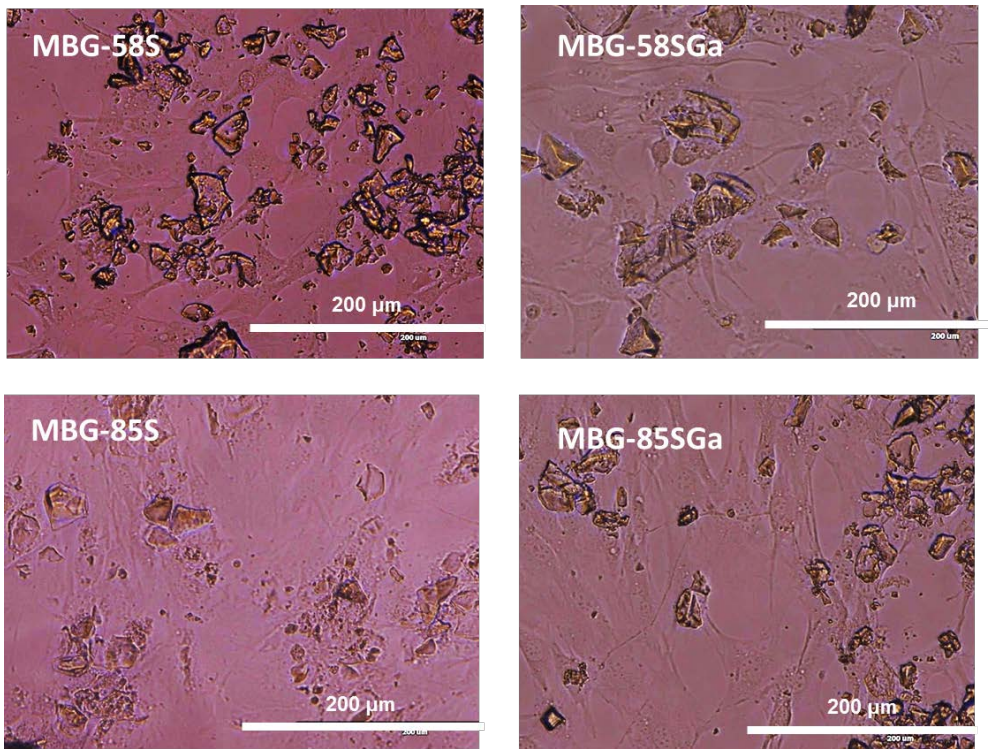


Figure S9. Light microscopy images of MC3T3 cells culture after 7 days in contact with MBGs particles

7. RAW 264.7 cell viability studies

RAW cell viability tests were carried out by suspending 10 mg/mL of each material in α MEM with 10^4 cells/mL. After 2 and 4 days the cytotoxicity, the test revealed a significant increase in the cytotoxicity after 4 days in all the materials. Figure S3 shows similar cytotoxicity for all the materials, with and without gallium which point out gallium does not affect to the cell viability. 58S materials present a high cytotoxicity due to the higher calcium content in the composition, which increases the solubility and ions exchanges.

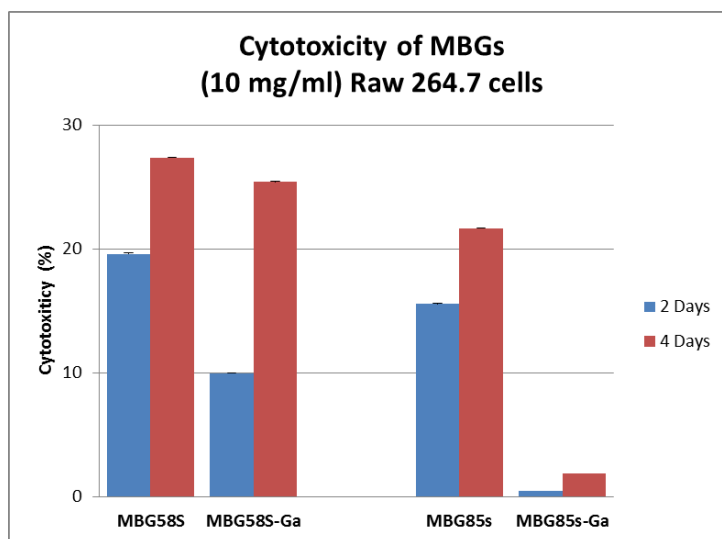


Figure S10. Cytotoxicity measurements of Raw 264.7 macrophages after 2 and 4 days in contact with the different MBGs (10 mg/ml).

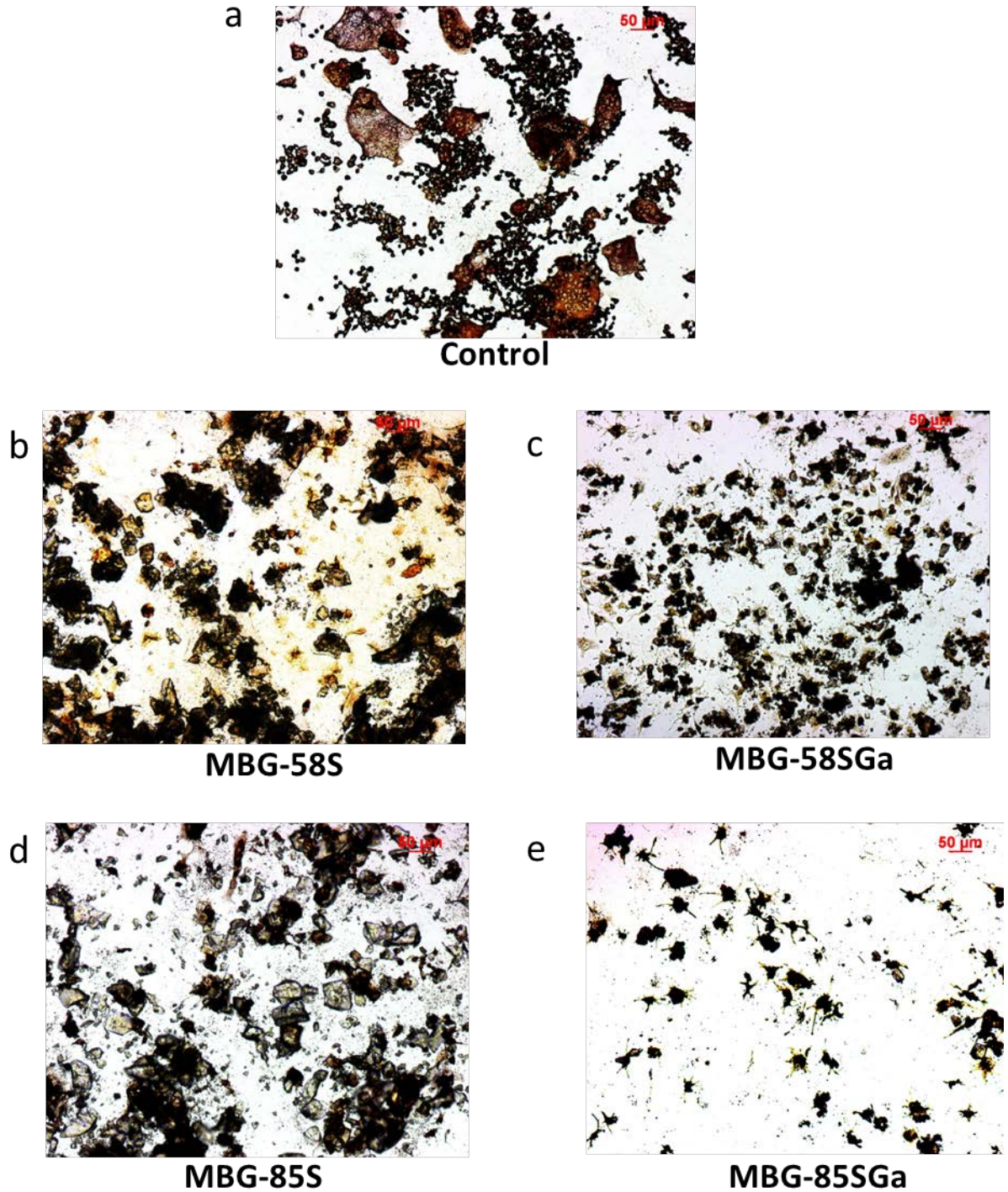


Figure S11. Microscopic observation of cells. a. Cells were stimulated with 20 nM RANK-L during 4 days; b. Cells were stimulated with 20 nM RANK-L and treated with 10 ng/mL MBG-58S for 4 days; c. Cells were stimulated with 20 nM RANK-L and treated with 10 ng/mL MBG-58SGa for 4 days; d. Cells were stimulated with 20 nM RANK-L and treated with 10 ng/mL MBG-85S for 4 days; e. Cells were stimulated with 20 nM RANK-L and treated with 10 ng/mL MBG-85SGa for 4 days. (Scale bar in red= 50 μ m).

Referencias

- [1] L.L. Hench, *Biomaterials, Science* (80). 208 (1980) 826–831.
- [2] M. Vallet-Regí, *Ceramics for medical applications*, *J. Chem. Soc. Dalt. Trans.* 0 (2001) 97.
- [3] F. Baino, S. Fiorilli, C. Vitale-Brovarone, *Bioactive glass-based materials with hierarchical porosity for medical applications: Review of recent advances*, *Acta Biomater.* 42 (2016) 18.
- [4] M. Vallet-Regí, E. Ruiz-Hernández, *Bioceramics: From bone regeneration to cancer nanomedicine*, *Adv. Mater.* 23 (2011) 5177.
- [5] P. Jayakumar, L. Di Silvio, *Osteoblasts in bone tissue engineering*, *Proc. Inst. Mech. Eng. Part H J. Eng. Med.* 224 (2010) 1415.
- [6] B.D. Ratner, A.S. Hoffman, F. J. Schoen, J.E. Lemons, *Biomaterials science : an introduction to materials in medicine*, third edition , Elsevier, Oxford, 2013.
- [7] X. Feng, *Regulatory roles and molecular signaling of TNF family members in osteoclasts*, *Gene.* 350 (2005) 1.
- [8] P. Makras, S. Delaroudis, A.D. Anastasilakis, *Novel therapies for osteoporosis*, *Metabolism.* 64 (2015) 1199.
- [9] J.E. Aubin, *Perspectives: Osteoclast adhesion and resorption: The role of podosomes*, *J. Bone Miner. Res.* 7 (2009) 365.
- [10] S.L. Teitelbaum, *Bone resorption by osteoclasts*, *Science* 289 (2000) 1504.
- [11] C. Mattia, F. Coluzzi, L. Celidonio, R. Vellucci, *Clinical Cases in Mineral and Bone Metabolism Clin Cases Miner Bone Metab.* 2 (2016) 97.
- [12] C. Schlundt, H. Schell, S.B. Goodman, G. Vunjak-Novakovic, G.N. Duda, K. Schmidt-Bleek, *Immune modulation as a therapeutic strategy in bone regeneration*, *J. Exp. Orthop.* 2 (2015) 1.

- [13]Z. Chen, T. Klein, R.Z. Murray, R. Crawford, J. Chang, C. Wu, Y. Xiao, Osteoimmunomodulation for the development of advanced bone biomaterials, *Mater. Today*. 19 (2016) 304.
- [14]M. Cicuéndez, P. Portolés, M. Montes-Casado, I. Izquierdo-Barba, M. Vallet-Regí, M.T. Portolés, Effects of 3D nanocomposite bioceramic scaffolds on the immune response, *J. Mater. Chem. B*. 2 (2014) 3469.
- [15]S. Han, Z. Chen, P. Han, Q. Hu, Y. Xiao, Activation of Macrophages by Lipopolysaccharide for Assessing the Immunomodulatory Property of Biomaterials, *Tissue Eng. Part A*. 23 (2017) 1100.
- [16]Z. Chen, T. Klein, R.Z. Murray, R. Crawford, J. Chang, C. Wu, Y. Xiao, Osteoimmunomodulation for the development of advanced bone biomaterials, *Mater. Today*. 19 (2016) 304.
- [17]Z. Xia, J.T. Triffitt, A review on macrophage responses to biomaterials, *Biomed. Mater.* 1 (2006) 1.
- [18]X. Yan, C. Yu, X. Zhou, J. Tang, D. Zhao, Highly ordered mesoporous bioactive glasses with superior in vitro bone-forming bioactivities., *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 43 (2004) 5980.
- [19]C.T. Kresge, M.E. Leonowicz, W.J. Roth, J.C. Vartuli, J.S. Beck, Ordered mesoporous molecular sieves synthesized by a liquid-crystal template mechanism, *Nature*. 359 (1992) 710.
- [20]A. Dominguez, A. Fernandez, N. Gonzalez, E. Iglesias, L. Montenegro, Determination of Critical Micelle Concentration of Some Surfactants by Three Techniques, *J. Chem. Educ.* 74 (1997) 1227.
- [21]I. Amar-Yuli, A. Aserin, N. Garti, Some Characteristics of Lyotropic Liquid-Crystalline Mesophases, in: *Self-Organized Surfactant Struct.*, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, Germany, 2010: pp. 89–120.
- [22]S.P. Moulik, Micelles: Self-organized surfactant assemblies, *Curr. Sci.* 71 (n.d.) 368.

- [23] J.W. Park, D.S. Jung, M.E. Seo, S.Y. Kim, W.-J. Moon, C.-H. Shin, G. Seo, Preparation of mesoporous materials with adjustable pore size using anionic and cationic surfactants, *Microporous Mesoporous Mater.* 112 (2008) 458.
- [24] Q. Hu, J.E. Hampsey, N. Jiang, C. Li, Y. Lu, Surfactant-Templated Organic Functionalized Mesoporous Silica with Phosphino Ligands, *Chem. Mater.* 17 (2005) 1561.
- [25] Y. Wan, Y. Shi, D. Zhao, Designed synthesis of mesoporous solids via nonionic-surfactant-templating approach., *Chem. Commun. (Camb).* (2007) 897.
- [26] J.R. Jones, Review of bioactive glass: from Hench to hybrids., *Acta Biomater.* 9 (2013) 4457.
- [27] L.L. Hench, J. Wilson, *An Introduction to Bioceramics*, World Scientific Publishing Co. Pte. Ltd. 1993.
- [28] L.L. Hench, Bioceramics: From Concept to Clinic, *J. Am. Ceram. Soc.* 74 (1991) 1487.
- [29] P.N. Gunawidjaja, A.Y.H. Lo, I. Izquierdo-Barba, A. García, D. Arcos, B. Stevansson, J. Grins, M. Vallet-Regí, M. Edén, Biomimetic Apatite Mineralization Mechanisms of Mesoporous Bioactive Glasses as Probed by Multinuclear ^{31}P , ^{29}Si , ^{23}Na and ^{13}C Solid-State NMR, *J. Phys. Chem. C.* 114 (2010) 19345.
- [30] A. López-Noriega, D. Arcos, I. Izquierdo-Barba, Y. Sakamoto, O. Terasaki, M. Vallet-Regí, Ordered Mesoporous Bioactive Glasses for Bone Tissue Regeneration, *Chem. Mater.* 18 (2006) 3137.
- [31] N. Gómez-Cerezo, S. Sánchez-Salcedo, I. Izquierdo-Barba, D. Arcos, M. Vallet-Regí, In vitro colonization of stratified bioactive scaffolds by pre-osteoblast cells, *Acta Biomater.* 44 (2016) 73.
- [32] H.S. Yun, S.E. Kim, Y.T. Hyeon, Highly ordered mesoporous bioactive glasses with Im3m symmetry, *Mater. Lett.* 61 (2007) 4569.
- [33] L. Zhao, X. Yan, X. Zhou, L. Zhou, H. Wang, J. Tang, C. Yu, Mesoporous bioactive glasses for controlled drug release, *Microporous Mesoporous Mater.* 109 (2008) 210.

- [34] X. Yan, G. Wei, L. Zhao, J. Yi, H. Deng, L. Wang, G. (Max) Lu, C. Yu, Synthesis and in vitro bioactivity of ordered mesostructured bioactive glasses with adjustable pore sizes, *Microporous Mesoporous Mater.* 132 (2010) 282.
- [35] N. Gómez-Cerezo, I. Izquierdo-Barba, D. Arcos, M. Vallet-Regí, Tailoring the biological response of mesoporous bioactive materials, *J. Mater. Chem. B.* (2015) 3810.
- [36] A. Hoppe, N.S. Güldal, A.R. Boccaccini, A review of the biological response to ionic dissolution products from bioactive glasses and glass-ceramics, *Biomaterials.* 32 (2011) 2757.
- [37] I.D. Xynos, A.J. Edgar, L.D.K. Buttery, L.L. Hench, J.M. Polak, Gene-expression profiling of human osteoblasts following treatment with the ionic products of Bioglass® 45S5 dissolution, *J. Biomed. Mater. Res.* 55 (2001) 151.
- [38] I.D. Xynos, M.V.J. Hukkanen, J.J. Batten, L.D. Buttery, L.L. Hench, J.M. Polak, Bioglass @45S5 Stimulates Osteoblast Turnover and Enhances Bone Formation In Vitro: Implications and Applications for Bone Tissue Engineering, *Calcif. Tissue Int.* 67 (2000) 321.
- [39] C. Wu, J. Chang, Mesoporous bioactive glasses: structure characteristics, drug/growth factor delivery and bone regeneration application, *Interface Focus.* 2 (2012) 292.
- [40] E. O'Neill, G. Awale, L. Daneshmandi, O. Umerah, K.W.-H. Lo, The roles of ions on bone regeneration, *Drug Discov. Today.* 4 (2018) 879.
- [41] A. Hoppe, V. Mouriño, A.R. Boccaccini, Therapeutic inorganic ions in bioactive glasses to enhance bone formation and beyond., *Biomater. Sci.* 1 (2013) 254.
- [42] A. López-Noriega, D. Arcos, I. Izquierdo-Barba, Y. Sakamoto, O. Terasaki, M. Vallet-Regí, Ordered Mesoporous Bioactive Glasses for Bone Tissue Regeneration, *Chem. Mater.* 18 (2006) 3137.
- [43] A. García, M. Cicuéndez, I. Izquierdo-Barba, D. Arcos, M. Vallet-Regí, Essential Role of Calcium Phosphate Heterogeneities in 2D-Hexagonal and 3D-Cubic SiO₂-CaO-P₂O₅ Mesoporous Bioactive Glasses, *Chem. Mater.* 21 (2009) 5474.

- [44] W. Xia, J. Chang, Well-ordered mesoporous bioactive glasses (MBG): A promising bioactive drug delivery system, *J. Control. Release.* 110 (2006) 522.
- [45] X.X. Yan, H.X. Deng, X.H. Huang, G.Q. Lu, S.Z. Qiao, D.Y. Zhao, C.Z. Yu, Mesoporous bioactive glasses. I. Synthesis and structural characterization, *J. Non. Cryst. Solids.* 351 (2005) 3209.
- [46] I. Izquierdo-Barba, D. Arcos, Y. Sakamoto, O. Terasaki, A. López-Noriega, M. Vallet-Regí, High-Performance Mesoporous Bioceramics Mimicking Bone Mineralization, *Chem. Mater.* 20 (2008) 3191.
- [47] E. Boanini, S. Panseri, F. Arroyo, M. Montesi, K. Rubini, A. Tampieri, C. Covarrubias, A. Bigi, Alendronate functionalized mesoporous bioactive glass nanospheres, *Materials (Basel).* 9 (2016) 135.
- [48] C. Wu, W. Fan, J. Chang, Functional mesoporous bioactive glass nanospheres: synthesis, high loading efficiency, controllable delivery of doxorubicin and inhibitory effect on bone cancer cells, *J. Mater. Chem. B.* 1 (2013) 2710.
- [49] A. López-Noriega, D. Arcos, I. Izquierdo-Barba, Y. Sakamoto, O. Terasaki, and M. Vallet-Regí, Ordered Mesoporous Bioactive Glasses for Bone Tissue Regeneration, *Chem. Mat.* 8 (2006) 3137.
- [50] X. Yan, X. Huang, C. Yu, H. Deng, Y. Wang, Z. Zhang, S. Qiao, G. Lu, D. Zhao, The in-vitro bioactivity of mesoporous bioactive glasses, *Biomaterials.* 27 (2006) 3396.
- [51] I. Izquierdo-Barba, M. Vallet-Regí, Mesoporous bioactive glasses: Relevance of their porous structure compared to that of classical bioglasses, *Biomed. Glas.* 1 (2015) 140.
- [52] E. Leonova, I. Izquierdo-Barba, D. Arcos, A. López-Noriega, N. Hedin, M. Vallet-Regí, M. Edén, Multinuclear Solid-State NMR Studies of Ordered Mesoporous Bioactive Glasses, *J. Phys. Chem. C.* 112 (2008) 5552.
- [53] L.L. Hench, I.D. Xynos, J.M. Polak, Bioactive glasses for in situ tissue regeneration, *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* 15 (2004) 543.

- [54] T. Kokubo, H. Kushitani, S. Sakka, T. Kitsugi, T. Yamamuro, Solutions able to reproduce in vivo surface-structure changes in bioactive glass-ceramic A-W., *J. Biomed. Mater. Res.* 24 (1990) 721.
- [55] M. Bohner, J. Lemaitre, Can bioactivity be tested in vitro with SBF solution?, *Biomaterials.* 30 (2009) 2175.
- [56] W.E. Brown, N. Eidelman, B. Tomazic, Octacalcium phosphate as a precursor in biomineral formation., *Adv. Dent. Res.* 1 (1987) 306.
- [57] I. Izquierdo-Barba, D. Arcos, Y. Sakamoto, O. Terasaki, A. López-Noriega, M. Vallet-Regí, High-Performance Mesoporous Bioceramics Mimicking Bone Mineralization, *Chem. Mater.* 20 (2008) 3191.
- [58] R. Mathew, C. Turdean-Ionescu, Y. Yu, B. Stevansson, I. Izquierdo-Barba, A. García, D. Arcos, M. Vallet-Regí, M. Edén, Proton Environments in Biomimetic Calcium Phosphates Formed from Mesoporous Bioactive CaO–SiO₂–P₂O₅ Glasses in Vitro : Insights from Solid-State NMR, *J. Phys. Chem. C.* 121 (2017) 13223.
- [59] S.N. Rath, A. Brandl, D. Hiller, A. Hoppe, U. Gbureck, R.E. Horch, A.R. Boccaccini, U. Kneser, Bioactive copper-doped glass scaffolds can stimulate endothelial cells in co-culture in combination with mesenchymal stem cells, *PLoS One.* 9 (2014) 1.
- [60] S. Zhao, J. Zhang, M. Zhu, Y. Zhang, Z. Liu, C. Tao, Y. Zhu, C. Zhang, Three-dimensional printed strontium-containing mesoporous bioactive glass scaffolds for repairing rat critical-sized calvarial defects, *Acta Biomater.* 12 (2015) 270.
- [61] C. Wu, L. Xia, P. Han, L. Mao, J. Wang, D. Zhai, B. Fang, J. Chang, Y. Xiao, Europium-Containing Mesoporous Bioactive Glass Scaffolds for Stimulating in Vitro and in Vivo Osteogenesis, *ACS Appl. Mater. Interfaces.* 8 (2016) 11342.
- [62] S. Zhao, J. Zhang, M. Zhu, Y. Zhang, Z. Liu, C. Tao, Y. Zhu, C. Zhang, Three-dimensional printed strontium-containing mesoporous bioactive glass scaffolds for repairing rat critical-sized calvarial defects, *Acta Biomater.* 12 (2015) 270.
- [63] D. Arcos, A.R. Boccaccini, M. Bohner, A. Díez-Pérez, M. Epple, E. Gómez-Barrena, A. Herrera, J.A. Planell, L. Rodríguez-Mañas, M. Vallet-Regí, The relevance

of biomaterials to the prevention and treatment of osteoporosis, *Acta Biomater.* 10 (2014) 1793.

[64] X. Yan, G. Wei, L. Zhao, J. Yi, H. Deng, L. Wang, G. (Max) Lu, C. Yu, Synthesis and in vitro bioactivity of ordered mesostructured bioactive glasses with adjustable pore sizes, *Microporous Mesoporous Mater.* 132 (2010) 282.

[65] Y. Deng, X. Li, Q. Li, Effect of Pore Size on the Growth of Hydroxyapatite from Mesoporous CaO–SiO₂ Substrate, *Ind. Eng. Chem. Res.* 48 (2009) 8829.

[66] S. Samavedi, A.R. Whittington, A.S. Goldstein, Calcium phosphate ceramics in bone tissue engineering: A review of properties and their influence on cell behavior, *Acta Biomater.* 9 (2013) 8037.

[67] R. Li, A.E. Clark, L.L. Hench, An investigation of bioactive glass powders by sol-gel processing, *J. Appl. Biomater.* 2 (1991) 231.

[68] J. Pérez-Pariente, F. Balas, J. Román, A.J. Salinas, M. Vallet-Regí, Influence of composition and surface characteristics on the in vitro bioactivity of SiO₂–CaO–P₂O₅–MgO sol-gel glasses, *J Biomed Mater Res.* 47 (1999) 170.

[69] Z. Zhang, X. Yan, B. Tian, C. Yu, B. Tu, G. Zhu, S. Qiu, D. Zhao, Synthesis of ordered small pore mesoporous silicates with tailorable pore structures and sizes by polyoxyethylene alkyl amine surfactant, *Microporous Mesoporous Mater.* 90 (2006) 23.

[70] D.M. Mosser, J.P. Edwards, Exploring the full spectrum of macrophage activation, *Nat. Rev. Immunol.* 8 (2008) 958.

[71] Ž. Mladenović, A. Johansson, B. Willman, K. Shahabi, E. Björn, M. Ransjö, Soluble silica inhibits osteoclast formation and bone resorption in vitro, *Acta Biomater.* 10 (2014) 406.

[72] M.C. Matesanz, J. Linares, I. Lilue, S. Sánchez-Salcedo, M.J. Feito, D. Arcos, M. Vallet-Regí, M.T. Portolés, Nanocrystalline silicon substituted hydroxyapatite effects on osteoclast differentiation and resorptive activity, *J. Mater. Chem. B.* 2 (2014) 2910.

[73] J. Ye, J. He, C. Wang, K. Yao, Z. Gou, Copper-containing mesoporous bioactive glass coatings on orbital implants for improving drug delivery capacity and antibacterial activity, *Biotechnol. Lett.* 36 (2014) 961.

- [74] E. Bonnelye, A. Chabadel, F. Saltel, P. Jurdic, Dual effect of strontium ranelate: stimulation of osteoblast differentiation and inhibition of osteoclast formation and resorption in vitro., *Bone*. 42 (2008) 129.
- [75] M. Vallet-Regí, A.J. Salinas, D. Arcos, Tailoring the Structure of Bioactive Glasses: From the Nanoscale to Macroporous Scaffolds, *Int. J. Appl. Glas. Sci.* 7 (2016) 195.
- [76] E. Verron, J.M. Bouler, J.C. Scimeca, Gallium as a potential candidate for treatment of osteoporosis, *Drug Discov Today*. 17 (2012) 1127.
- [77] J.J. Rogers, K.J.D. MacKenzie, W.J. Trompetter, G. Rees, J. V. Hanna, Novel photoluminescent materials based on gallium silicate inorganic polymer hosts activated with Sm³⁺ or Eu³⁺, *J. Non. Cryst. Solids*. 460 (2017) 98.
- [78] A.J. Salinas, S. Shruti, G. Malavasi, L. Menabue, M. Vallet-Regí, Substitutions of cerium, gallium and zinc in ordered mesoporous bioactive glasses, *Acta Biomater.* 7 (2011) 3452.
- [79] A. Rahimnejad, M. Towler, The effect of the addition of gallium on the structure of zinc borate glass with controlled gallium ion release, *J. Biomed. Mater. Res. B*. 92 (2016) 1018.
- [80] J. Ren, C. Doerenkamp, H. Eckert, High Surface Area Mesoporous GaPO₄-SiO₂ Sol-Gel Glasses: Structural Investigation by Advanced Solid-State NMR, *J. Phys. Chem. C*. 120 (2016) 1758.
- [81] E. Verron, M. Masson, S. Khoshniat, L. Duplomb, Y. Wittrant, M. Baud'Huin, Z. Badran, B. Bujoli, P. Janvier, J.C. Scimeca, J.M. Bouler, J. Guicheux, Gallium modulates osteoclastic bone resorption in vitro without affecting osteoblasts, *Br. J. Pharmacol.* 159 (2010) 1681.
- [82] I. Strazic Geljic, N. Melis, F. Boukhechba, S. Schaub, C. Mellier, P. Janvier, J.-P. Laugier, J.-M. Bouler, E. Verron, J.-C. Scimeca, Gallium enhances reconstructive properties of a calcium phosphate bone biomaterial, *J. Tissue Eng. Regen. Med.* 2 (2017) e854.

- [83] S. Pourshahrestani, E. Zeimaran, N. Adib Kadri, N. Gargiulo, S. Samuel, S.V. Naveen, T. Kamarul, M.R. Towler, Gallium-containing mesoporous bioactive glass with potent hemostatic activity and antibacterial efficacy, *J. Mater. Chem. B.* 4 (2016) 71.
- [84] U.H. Lerner, Bone Remodeling in Post-menopausal Osteoporosis, *J. Dent. Res.* 85 (2006) 584.
- [85] X. Feng, J.M. McDonald, Disorders of Bone Remodeling, *Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.* 6 (2011) 121.
- [86] E. Verron, A. Loubat, G.F. Carle, C. Vignes-Colombeix, I. Strazic, J. Guicheux, N. Rochet, J.M. Bouler, J.C. Scimeca, Molecular effects of gallium on osteoclastic differentiation of mouse and human monocytes, *Biochem. Pharmacol.* 83 (2012) 671.
- [87] T.J. Hall, T.J. Chambers, Gallium inhibits bone resorption by a direct effect on osteoclasts, *Bone Miner.* 8 (1990) 211–216.
- [88] I. Strazic-Geljic, I. Guberovic, B. Didak, H. Schmid-Antomarchi, A. Schmid-Alliana, F. Boukhechba, J.-M. Bouler, J.-C. Scimeca, E. Verron, Gallium, a promising candidate to disrupt the vicious cycle driving osteolytic metastases, *Biochem. Pharmacol.* 116 (2016) 11.
- [89] A. Philippart, N. Gómez-Cerezo, D. Arcos, A.J. Salinas, E. Boccardi, M. Vallet-Regí, A.R. Boccaccini, Novel ion-doped mesoporous glasses for bone tissue engineering: Study of their structural characteristics influenced by the presence of phosphorous oxide, *J. Non. Cryst. Solids.* 455 (2017) 90.
- [90] S. Shrutí, A.J. Salinas, G. Malavasi, G. Lusvardi, L. Menabue, C. Ferrara, P. Mustarelli, M. Vallet-Regí, Structural and in vitro study of cerium, gallium and zinc containing sol–gel bioactive glasses, *J. Mater. Chem.* 22 (2012) 13698.
- [91] S. Sánchez-Salcedo, G. Malavasi, A. Salinas, G. Lusvardi, L. Rigamonti, L. Menabue, M. Vallet-Regí, Highly-Bioreactive Silica-Based Mesoporous Bioactive Glasses Enriched with Gallium(III), *Materials (Basel).* 11 (2018) 367.

3.2 Preparación de MBGs como sistemas de liberación de fármacos frente a patologías óseas

3.2 Preparación de MBGs como sistemas de liberación de fármacos frente a patologías óseas

3.2.1. Introducción y antecedentes

Los estudios precedentes mostrados en esta tesis, así como los trabajos tanto *in vitro* como *in vivo* de diferentes grupos de investigación, demuestran que los MBGs son excelentes matrices para la reparación de defectos óseos [1–4], fundamentalmente por su capacidad de biomineralización y por la respuesta que generan sobre los diferentes tipos celulares implicados en la remodelación ósea. Sin embargo, muchos de estos defectos tienen su origen en patologías que llevan a la pérdida de masa ósea como consecuencia de las mismas. De este modo, los defectos óseos pueden ser consecuencia de [5–7]:

- Extirpación de tumores
- Infecciones
- Traumatismos consecuencia de osteoporosis

Es en estas situaciones donde los MBGs presentan un valor añadido gracias a su estructura mesoporosa, la cual no solo incrementa su capacidad osteogénica, sino que proporciona una excelente matriz para la carga y liberación de antitumorales, antibióticos o antiosteoporóticos, para el tratamiento o prevención secundaria de estas enfermedades.

Los sistemas de liberación de fármacos a partir de matrices mesoporosas de SiO₂ han sido ampliamente estudiados desde que en el año 2001 la profesora Vallet-Regí propusiera el MCM-41 como matriz para la liberación de fármacos [8]. Posteriormente, la inclusión de grupos funcionales sobre la superficie de estos materiales, permitió obtener liberación de fármacos que seguían cinéticas de orden cero, es decir, sistemas cuya cinética de liberación era continua y que no dependía de la cantidad de fármaco que quedara retenida en la matriz [9,10].

El mismo grupo de investigación planteó, años más tarde, la posibilidad de que los materiales mesoporosos de SiO₂ tuvieran comportamiento bioactivo [11,12]. Teniendo en cuenta los trabajos precedentes de los profesores Kokubo y Hench para materiales basados en sílice [13,14], se llevaron a cabo ensayos de bioactividad *in vitro* en tres materiales mesoporos de sílice diferentes: SBA-15, MCM-14 y MCM-48. Los

resultados indicaron que las propiedades texturales de los materiales permitían la nucleación de una fase tipo apatita en superficie en contacto con el SBF. Sin embargo, el proceso de nucleación necesitó más de 30 días de inmersión en SBF, lo que posiblemente induciría a la formación de una capsula fibrosa alrededor del implante antes que la osteointegración. Sin embargo, podemos considerar estos trabajos como el punto de partida que impulsó el estudio de los materiales mesoporosos como materiales para regeneración ósea [15].

Entre los años 2004 y 2008, los Profesores Victor Lin y Jeffrey Zink fueron pioneros en la preparación de sistemas estímulo-respuesta soportados sobre MCM-41, diseñando compuertas moleculares sensibles a la presencia de gran cantidad de estímulos, por ejemplo pH, carácter redox, enzimas, luz, etc. [16–19]. Desde entonces, el diseño de sistemas tipo estímulo-respuesta ha llamado la atención de la comunidad científica en el terreno del tratamiento de diversas enfermedades mediante la liberación controlada de fármacos [20–22].

En 2010 se publicó por primera vez un sistema estímulo-respuesta soportado por MBGs [23]. Este sistema se basaba en compuertas moleculares de cumarina que se abrían en presencia de luz ultravioleta [24]. Sin embargo, el trabajo presentado en esta tesis doctoral constituye la primera evidencia de una potencial aplicación de los MBGs como injertos en regeneración ósea y sistemas de liberación de fármacos estímulo-respuesta frente a tumores óseos e infección.

Estructura de sistemas estímulo-respuesta sensibles a enzimas

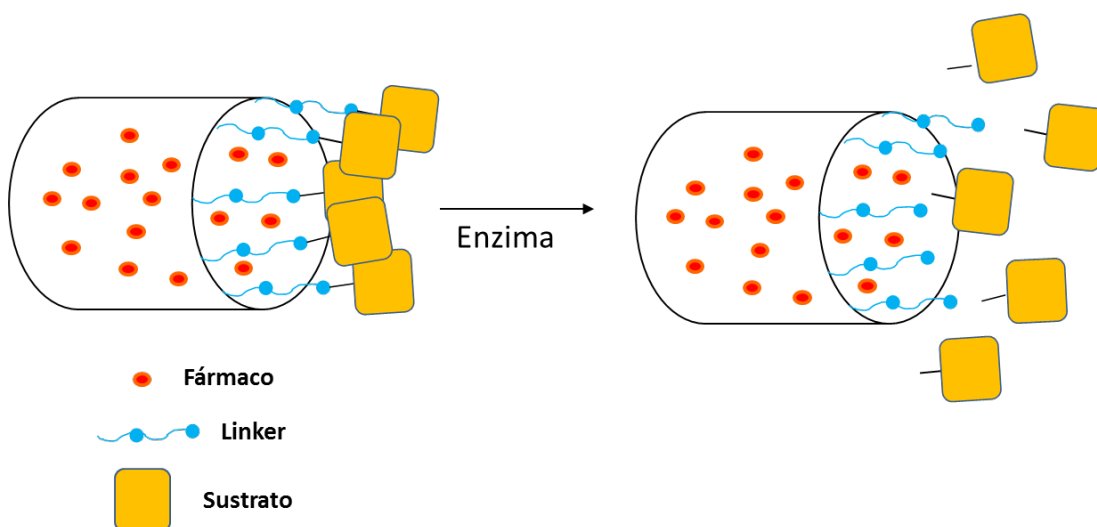
La estructura de los sistemas estímulo-respuesta basados en compuertas moleculares está constituida de forma general por [25,26]:

- a. Un reservorio o matriz que contiene el fármaco
- b. Una especie sensible al estímulo.
- c. Un *linker* que enlace covalentemente la matriz con la especie sensible al estímulo, si bien este componente no siempre es necesario

En el caso de los sistemas sensibles a estímulos enzimáticos, la especie sensible al estímulo suele ser una molécula más o menos voluminosa, que es sustrato de la enzima. De esta forma su papel es doble en estos sistemas:

- 1) Mantener retenido el fármaco en la matriz ocluyendo los poros de la misma
- 2) Desprenderse total o parcialmente por ruptura del enlace, en presencia de la enzima o por sobreexpresión del mismo. Esta ruptura, que debería ser lo más rápida y selectiva posible, permitiría la cesión del fármaco incluido en la matriz mesoporosa.

En el esquema 1 se muestra el funcionamiento de los sistemas para liberar moléculas cargadas en su interior por medio de la ruptura enzimática de las compuertas moleculares. La imagen representa a la enzima desprendiendo la compuerta molecular y liberando la carga del interior de los poros [25,27].



Esquema 1. Esquema del funcionamiento de un sistema estímulo-respuesta enzimático

En el presente trabajo se han desarrollado dos tipos de compuertas moleculares sensibles a estímulos enzimáticos. El primero de ellos es un sistema basado en MBGs con una compuerta sensible a fosfatasa alcalina (ALP). Este sistema es capaz de estimular la regeneración de tejido óseo gracias a la matriz MBG y de actuar como sistema de prevención secundaria de ciertos cánceres de hueso, especialmente osteosarcoma, los cuales llevan asociado un incremento del ALP en su desarrollo [28,29]. Por ello el sistema MBG-compuerta sensible a ALP se propone como injerto para el relleno del hueso tras la extirpación de un tumor, generalmente osteosarcoma, y como prevención secundaria del cáncer. La matriz mesoporosa sería portadora de un fármaco antitumoral que se liberaría rápidamente de forma local ante el incremento de la actividad de la ALP [30].

El segundo tipo de compuerta que hemos desarrollado está basado en el mismo tipo de matrices MBG, pero con una compuerta sensible a enzimas proteasas. Este tipo de enzimas son segregadas por algunas bacterias presentes en infecciones óseas como *E. coli*. En este caso la matriz MBG puede ir cargada con uno o varios antibióticos y presentaría aplicación en el relleno de defectos óseos causados por infección bacteriana y como prevención secundaria de la misma. Este sistema también encontraría aplicación como recubrimientos de implantes metálicos para favorecer la osteointegración, proporcionando prevención primaria frente a infecciones [5,31]. En cualquiera de sus potenciales aplicaciones el sistema debe diseñarse de forma que libere su carga rápidamente ante el incremento de la actividad de las proteasas durante procesos de infección bacteriana [30].

Selección de la matriz MBG.

El MBG que actúa como matriz del sistema debe cumplir una serie de requisitos. El primero de ellos es presentar bioactividad, propiedad a través de la cual se favorecen los procesos de regeneración ósea. El segundo requisito es tener un volumen de poro y una superficie específica suficiente para alojar la dosis suficiente de fármaco necesaria para el tratamiento de las patologías, durante un determinado periodo de tiempo. Por último el tamaño de poro del MBG que actúa a modo de tamiz molecular, determina el tipo de fármaco que puede cargarse en su interior y cuyo factor limitante es el tamaño.

Para el diseño de nuestros sistemas, el primero de los objetivos que se llevó a cabo fue la elección de la matriz que iba a soportarlos. Con esta finalidad, se sintetizaron diferentes MBGs en función de dos composiciones químicas diferentes (85S y 75S) en las que la cantidad de CaO (% mol) es el doble en la 75S frente a la 85S. Así mismo se emplearon dos SDA diferentes (F68 y F127), cuya estructura y composición se describieron en el capítulo anterior. Las propiedades texturales de los MBGs sintetizados se recogen en la tabla 1 a modo de recordatorio.

Tabla 1. MBGs utilizados como matrices para la fabricación del sistema estímulo-respuesta. La tabla incluye las propiedades texturales de los mismos.

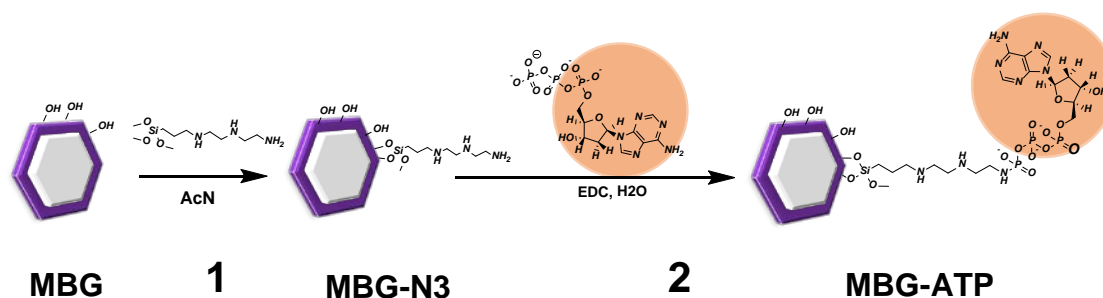
SDA	F68		F127	
Composición (% mol)	85SiO ₂ -10CaO- 5P ₂ O ₅	75SiO ₂ -20CaO- 5P ₂ O ₅	85SiO ₂ -10CaO- 5P ₂ O ₅	75SiO ₂ -20CaO- 5P ₂ O ₅
Nomenclatura	85S-F68	75S-F68	85S-F127	75S-F127
Volumen de poro	0.38	0.27	0.29	0.46
Superficie específica	307,1 m ² /g	303,6 m ² /g	272,2 m ² /g	314,5 m ² /g
Tamaño de poro	4,2 nm	4,8 nm	7,5 nm	6,1 nm
Estructura mesoporosa	p6mm	desordenada	p6mm	p6mm

3.2.2 Síntesis de las compuertas moleculares

Compuerta molecular sensible a enzima ALP

La compuerta sensible a ALP se sintetizó siguiendo el mecanismo propuesto en el esquema 2. La superficie del MBG se funcionalizó con N-3(trietoxisililpropil)dietilentriamina. Para ello 1g de MBG se secó a vacío y 80°C durante 12 horas. A continuación, se suspendió en 50 mL de acetonitrilo seco y se añadió 1,0 mL de N-3(trimetoxisililpropil)dietilentriamina (exceso) en agitación durante 6 horas. Se filtró y secó a vacío obteniéndose el sólido MBG-N3 (esquema 2) que incorpora N-3(trietoxisililpropil)dietilentriamina en superficie. A continuación, 200 mg del sólido MBG-N3 se suspendieron en 5 mL de una solución 1.8 M de adenosintrifosfato (ATP), previamente activado con una disolución acuosa 0.1 M de etilcarbodiimida (EDC) en agua. La mezcla se mantuvo en agitación a temperatura ambiente durante 6 horas, dando lugar a la unión covalente del grupo amino terminal del N-3(trietoxisililpropil)dietilentriamina y el grupo fosfato terminal del ATP, obteniéndose el material MBG-ATP en el esquema 2.

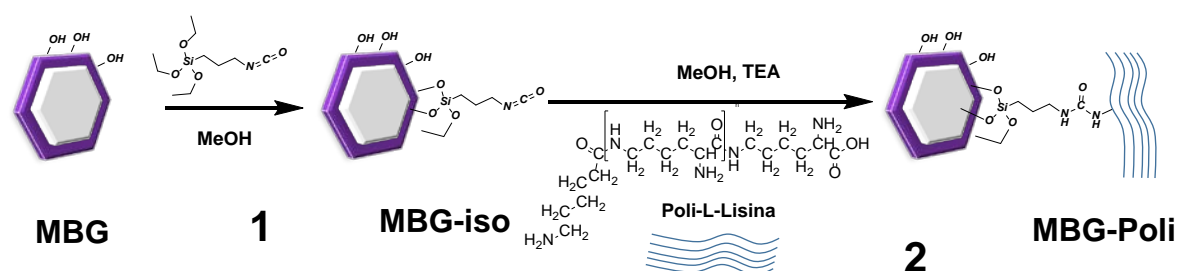
De este modo, el mecanismo de apertura de la compuerta se fundamenta en la ruptura de los enlaces fosfato del ATP, mediada por ALP, liberándose la carga [32].



Esquema 2. Mecanismo de funcionalización del MBG con la compuerta sensible a ALP. (1) Alcoxilación de la superficie con el compuesto N-3(trimetoxisililpropil)dietilentriamina. (2) Unión entre el fosfato terminal (gamma) del ATP y el grupo amino terminal del compuesto N-3(trimetoxisililpropil)dietilentriamina.

Compuerta molecular sensible a enzima proteasas

La síntesis de la compuerta molecular con respuesta a proteasas se describe en el esquema 3. Se partió de 1 g de MBG, secado a vacío y 80°C durante horas, se funcionalizó con 1.2 g de 3-(trietoxisilil)propilisocianato (exceso) en atmosfera inerte en metanol seco durante 6 horas, dando lugar al sólido MBG-iso. Una vez filtrado, lavado y secado, se hizo reaccionar con 1 g de ε-poli-L-lisina en metanol previamente activada con 1.6 mL de trietilamina, formando el sólido MBG-Poli [33]. El mecanismo de apertura de este sistema se basa en la acción de las proteasas sobre la ε-poli-L-lisina que romperían los enlaces peptídicos que la forman.



Esquema 3. Mecanismo de funcionalización del MBG con la compuerta sensible a proteasas. (1) Alcoxilación de la superficie con el compuesto 3-

(trietoxisilil)propilisocianato. (2) Formación del enlace entre las amidas de la ϵ -poli-L-lisina y el grupo isocianato terminal del 3-(trietoxisilil)propilisocianato.

El conjunto de los materiales sintetizados con cada uno de los MBG, se muestra en la tabla 2, donde se incluyen su nomenclatura y composición.

Tabla 2. Nomenclatura y composición de los sistemas estímulo respuesta sintetizados.

Nomenclatura	Composición
75S-F68-ATP	75S-F68@N-3(trimetoxisililpropil)dietilentriamina@ATP
75S-F68-Poli	75S-F68@N-3 (trietoxisilil)propilisocianato@ ϵ -poli-L-lisina
85S-F68-ATP	85S-F68@N-3(trimetoxisililpropil)dietilentriamina@ATP
85S-F68-Poli	85S-F68@N-3(trietoxisilil)propilisocianato@ ϵ -poli-L-lisina
75S-F127-ATP	75S-F127@N-3(trimetoxisililpropil)dietilentriamina@ATP
75S-F127-Poli	75S-F127@N-3(trietoxisilil)propilisocianato@ ϵ -poli-L-lisina
85S-F127-ATP	85S-F127@N-3(trimetoxisililpropil)dietilentriamina@ATP
85S-F127-Poli	85S-F127@N-3(trietoxisilil)propilisocianato@ ϵ -poli-L-lisina

Los diferentes materiales sintetizados fueron caracterizados por espectroscopia de FTIR (figura 1) y TG (tabla 3). Los espectros muestran bandas de absorción a 1050 y 800 cm^{-1} que se corresponden con las vibraciones de enlaces $\nu(\text{Si-O-Si})$ y $\rho(\text{Si-O-Si})$ respectivamente. Los MBGs funcionalizados con la compuerta sensible a ALP (**MBG-ATP**) muestran bandas asignables a $\nu(\text{C-H})$, $\delta(\text{C-H})$ y $\nu(\text{C-C})$ que aparecen a 2900, 1650 y 1469 cm^{-1} respectivamente, y que están presentes en el N-3(trimetoxisililpropil)dietilentriamina y del ATP.

Los espectros de los materiales con respuesta a proteasas (**MBG-Poli**) muestran la presencia de 2 bandas que se pueden asociar a $\nu(\text{C=O})$ a 1650 cm^{-1} y $\nu(\text{C-N})$ a 1400 cm^{-1} , vibraciones características de los enlaces amida de ϵ -poli-L-lisina. Estas bandas muestran mayor intensidad en el material 85S-F68-Poli que además presenta bandas a 2980, 2820 cm^{-1} , correspondientes a las vibraciones simétrica y asimétrica $\nu(\text{C-H})$.

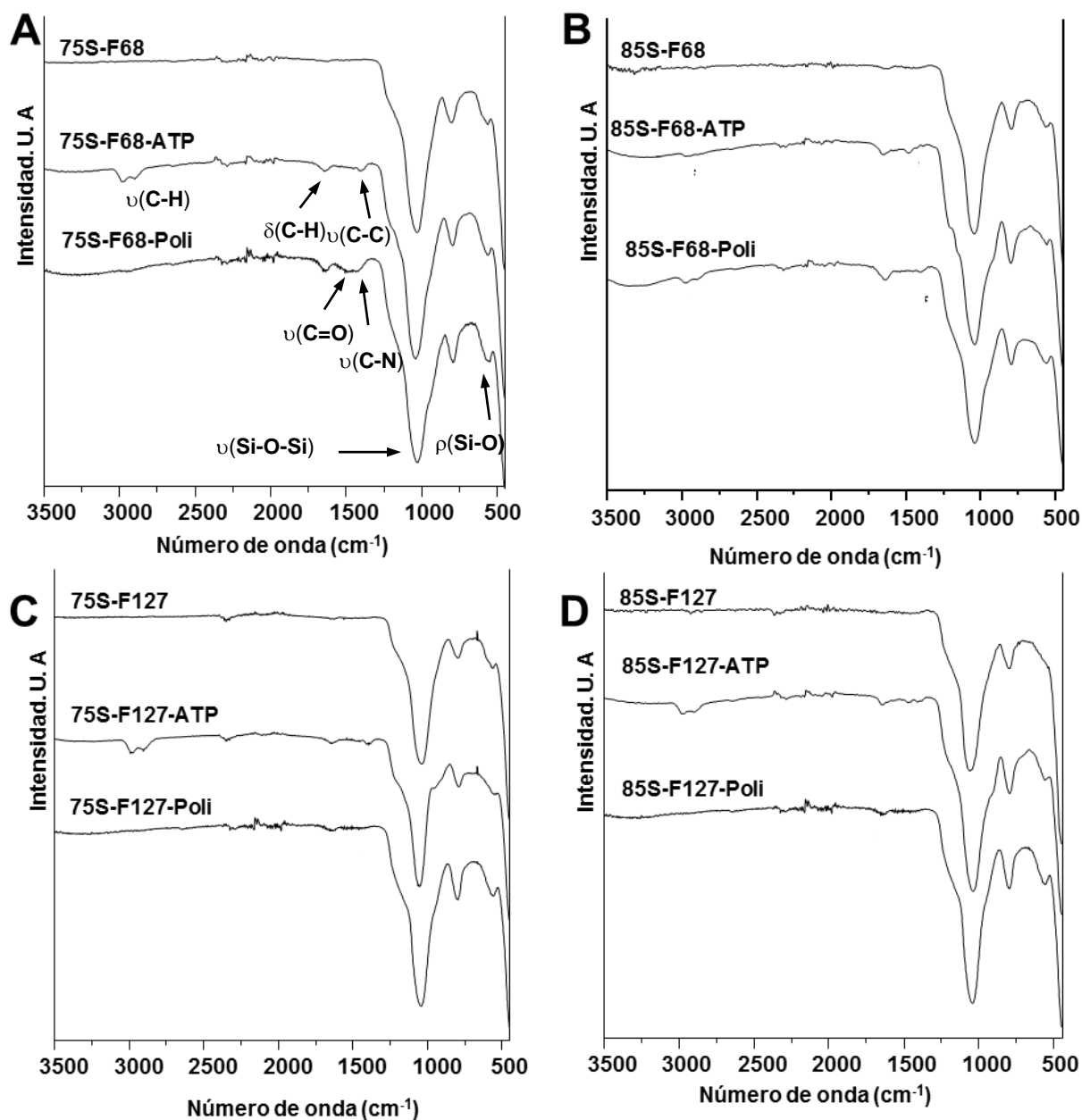


Figura 1. Espectros de FTIR de los materiales de partida, funcionalizados con la compuerta sensible a ALP y con la compuerta sensible a proteasas (A) **75S-F68**, (B) **85S-F68**, (C) **75S-F127** y (D) **85S-F127**.

La tabla 3 muestra las pérdidas de masa calculadas por TG de los materiales funcionalizados, las cuales se pueden relacionar con la cantidad de materia orgánica que se encuentra anclada a los MBGs.

Tabla 3. Pérdida de masa de los materiales tras la funcionalización medida por termogravimetría.

Nomenclatura	Pérdida de masa (%)
75S-F68-ATP	18
75S-F68-Poli	9
85S-F68-ATP	22
85S-F68-Poli	18
75S-F127-ATP	15
75S-F127-Poli	8
85S-F127-ATP	14
85S-F127-Poli	6

Los datos de TG están en consonancia con los obtenidos por FTIR, dado que los materiales **75S-F127-Poli** y **85S-F127-Poli** presentan menores pérdidas de masa que sus análogos con F68, indicando que una menor cantidad de materia orgánica entra a formar parte del sistema. Para los materiales funcionalizados con ATP se observan mayores pérdidas de masa en porcentaje, lo que significa que una mayor cantidad de materia orgánica está formando parte del sistema. En este sentido cabe destacar que el material MBG **85S-F68** es la matriz mesoporosa que parece presentar un mayor grado de funcionalización para ambos tipos de compuerta.

Carga de molécula modelo y evaluación de su cinética de liberación al medio

La función primaria de una compuerta molecular es obstruir los poros de los MBGs, lo que permite retener fármacos en el interior de la matriz y controlar su liberación al medio. Para evaluar el funcionamiento de la compuerta se cargó una molécula fluorescente en el interior de los poros, en este caso $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$, que emite fluorescencia en medio acuoso a 593 nm cuando es excitado a 454 nm. $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ se incorporó a los MBGs (previamente secados a vacío) en acetonitrilo anhidro y se mantuvo en agitación 24 horas a temperatura ambiente. Tras este proceso, se incorporaron las compuertas moleculares según se describe en el apartado anterior. El estudio de las cinéticas de liberación al medio se llevó a cabo midiendo la emisión de

fluorescencia del sobrenadante en contacto con los MBGs en ausencia y presencia de los estímulos. 2 mg/mL de los materiales suspendidos en agua fueron puestos tanto en presencia como en ausencia del estímulo y se tomaron alícuotas a distintos tiempos para comparar la cantidad de $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ liberada al medio.

La figura 2 muestra las cinéticas de liberación de $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ para los materiales sintetizados con F68. Los MBG funcionalizados con la compuerta sensible a ALP (figura 2 A y B) muestran los perfiles de liberación de $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ en presencia y ausencia de ALP. En ambos casos, la presencia del estímulo (ALP) produce un incremento en la liberación del fármaco. Sin embargo, mientras que el sistema **85S-F68-ATP** presenta un excelente comportamiento estímulo-respuesta con liberación prematura cercana a cero en ausencia de estímulo y cesión total del $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ en contacto con ALP, el material **75S-F68-ATP**, no retiene la molécula en el interior de los poros, presentando una liberación temprana (en ausencia de estímulo) de más del 60% al cabo de 8 horas.

La liberación del $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ desde el material **75S-F68-ATP** sugiere que la compuerta cubre solo parcialmente los poros, por lo que parte de la carga difunde al medio aunque la compuerta esté cerrada. Por el contrario, la composición **85S-F68-ATP** presenta cinéticas en las que la liberación es varias veces mayor en presencia de la ALP, con un perfil típico de los sistemas estímulo-respuesta en el que el agente de carga se libera rápidamente en los primeros momentos de exposición al estímulo y posteriormente la cinética de la liberación se ralentiza llegando a la meseta de liberación [34,35]. Este comportamiento nos indica que la carga está retenida en el interior de los poros por acción de la compuerta y que esta se rompe en presencia de la ALP, permitiendo la liberación de la molécula cargada.

De forma análoga, las compuertas sensibles a proteasas (figura 2 C y D) muestran que el sólido **75S-F68-Poli** no retiene el fármaco en su interior e incluso la presencia de la enzima parece favorecer la retención del fármaco en el material. Por el contrario, el sólido **85S-F68** evidencia una excelente capacidad para retener el fármaco, así como una rápida e intensa respuesta a la presencia de proteasas, lo que se traduce en el 100 % de liberación al cabo de pocas horas.

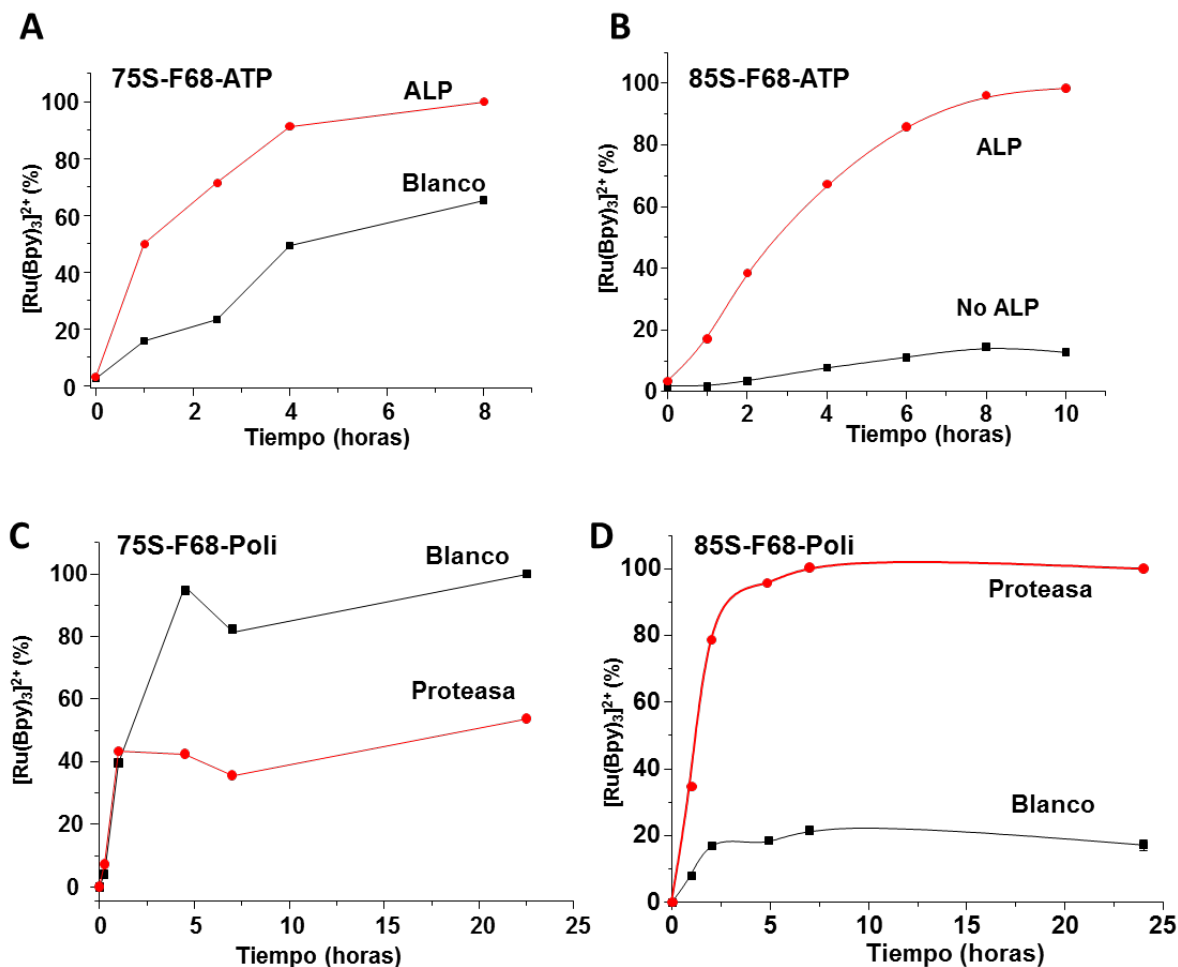


Figura 2. Cinéticas de liberación de $[\text{Ru}(\text{Bpy})_3]^{2+}$ en presencia y ausencia de estímulo (ALP y proteasa) para los MBGs obtenidos a partir de F68 (A) **75S-F68-ATP** (B) **85S-F68-ATP** (C) **75S-F68-Poli** (D) **85S-F68-Poli**.

Las cinéticas de liberación para los sólidos obtenidos a partir de F127 como SDA se muestran en la figura 3. Los materiales funcionalizados con la compuerta sensible a ALP (figura 3 A y B) muestran perfiles de liberación similares en presencia y ausencia de estímulo lo que indica que la carga no se mantiene retenida en el interior de los poros. En el caso de la compuerta sensible a proteasa (figura 3 C y D) se observa que el material **75S-F127** retiene el $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ en su interior, y este es liberado en presencia del estímulo. Sin embargo se observa un perfil de liberación un tanto errático, en el que la liberación de $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ alcanza un 70 % al cabo de 2,5 horas para disminuir después a las 7,5 horas y posteriormente alcanza la liberación total al cabo de 24 horas sin seguir un perfil asintótico.

En el caso del **85S-F127-Poli** se observa una mayor liberación de $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ en contacto con la enzima, pero la liberación no sigue un patrón estímulo-respuesta como el observado en los materiales **85S-F68-ATP** y **85S-F68-Poli**. Por el contrario, su perfil parece indicar una cesión sostenida del $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ tanto en presencia como ausencia del estímulo.

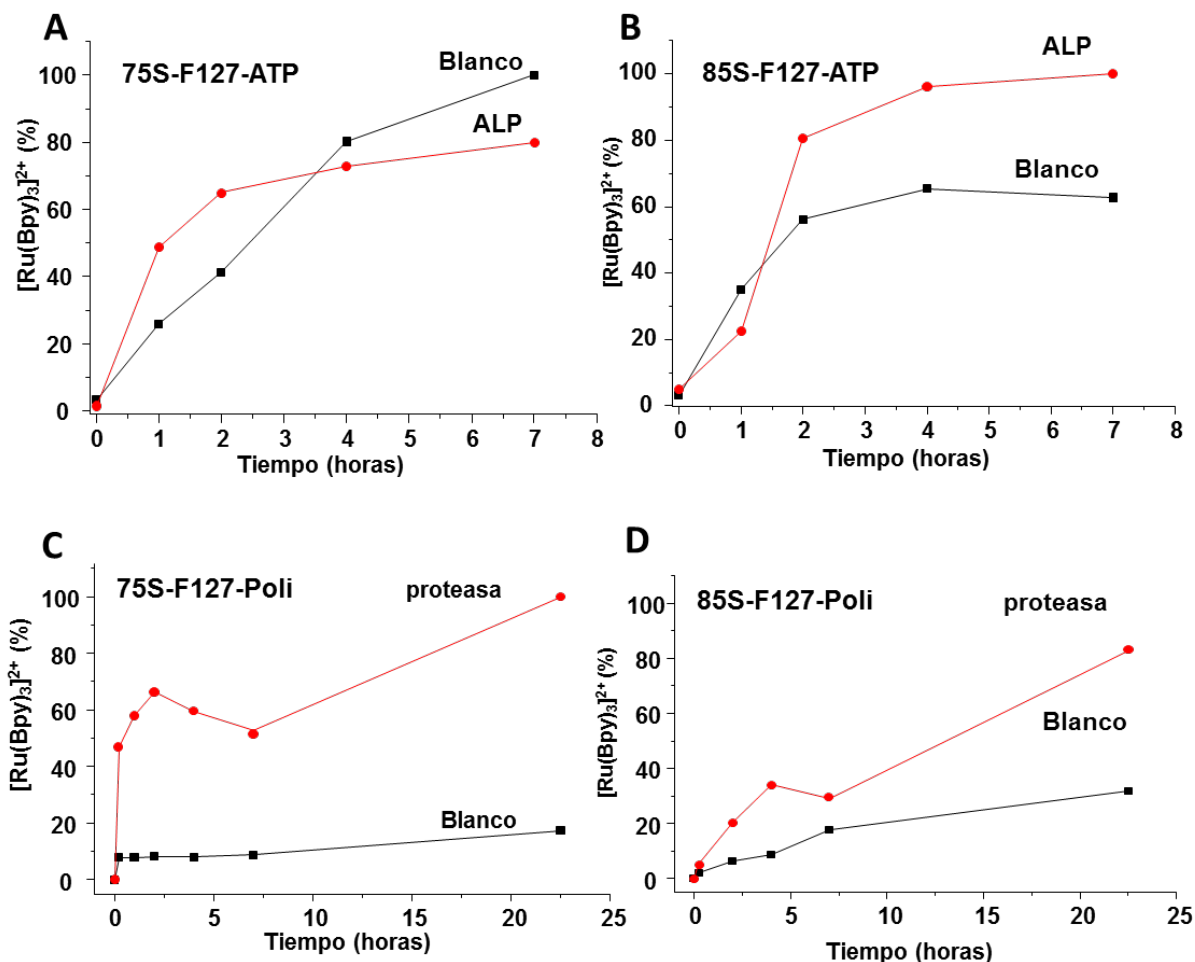


Figura 3. Cinéticas de liberación de $[\text{Ru}(\text{Bpy})_3]^{2+}$ en presencia y ausencia de estímulo (ALP y proteasa) para los materiales obtenidos a partir de F127, (A) **75S-F127-ATP** (B) **85S-F127-ATP** (C) **75S-F127-Poli** (D) **85S-F127-Poli**.

El estudio en conjunto de estos perfiles de liberación indica que el comportamiento estímulo-respuesta se ve alterado por la solubilidad y el tamaño de poro de la matriz mesoporosa. Los materiales con composición 75S presentan una mayor solubilidad debido a su alto contenido en CaO (20% en mol), lo que dificulta la funcionalización de la superficie y favorece difusión del $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ al medio tanto en presencia como en ausencia del estímulo. Esto es indicativo de que la cesión de la carga estará regida, no

solo por la compuerta sino también por la solubilidad de la matriz, lo que hace de estos materiales sistemas de liberación de fármacos difíciles de controlar mediante compuertas moleculares.

Los materiales de composición 85S parecen no presentar este problema, sin embargo su comportamiento estímulo-respuesta no es satisfactorio con ambos tipos de SDA. El sistema basado en **85S-F127** presenta cinéticas de liberación similares en presencia y ausencia del estímulo en ambas compuertas. Este comportamiento puede explicarse por el mayor tamaño de poro producido por el surfactante F127 comparado con el que produce el F68, lo que dificulta el bloqueo de los poros y la liberación se produciría sin poder ser controlada por la compuerta.

Por el contrario, el MBG **85S-F68** que además de presentar una composición con un 10% de CaO (% en mol), estructura mesoporosa ordenada y un tamaño de poro de 4,2 nm, hacen de este material un buen candidato como matriz del sistema. Los resultados de espectroscopia FTIR y TG muestran que el material esta funcionalizado con una mayor cantidad de materia orgánica que el resto de sistemas. Por su parte, el $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ se libera al medio únicamente en presencia de los estímulos demostrando buen comportamiento estímulo-respuesta. Por esta razón, se eligió el MBG **85S-F68**, como la matriz mesoporosa más adecuada para soportar estos sistemas y llevar a cabo estudios en mayor profundidad.

3.2.3 Sistema estímulo-respuesta sensible a fosfatasa alcalina

Una vez determinado que la matriz mesoporosa 85S-F68 era la más adecuada para soportar ambas compuertas moleculares, se llevó a cabo la caracterización estructural, textural y química del sistema **85S-F68-ATP**.

Microscopía electrónica de transmisión (TEM)

La figura 4 muestra imágenes de TEM para **85S-F68** y **85S-F68-ATP** en las que se observa que la estructura porosa ordenada se mantiene tras dicho acoplamiento, indicando que las diferentes etapas de la funcionalización no afectan a la porosidad.

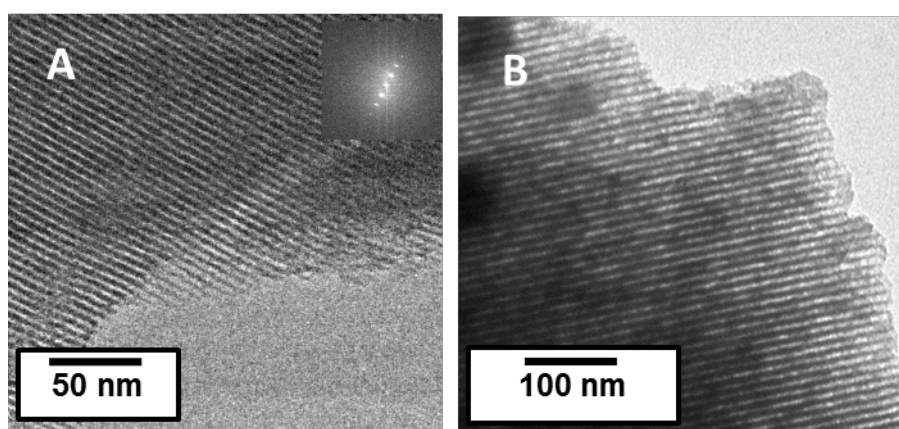


Figura 4. Imágenes de TEM (A) **85S-F68** (B) **85S-F68-ATP**.

Estudios de adsorción de nitrógeno

La figura 5 muestra las isothermas de adsorción-desorción de nitrógeno de los materiales **85S-F68** y **85S-F68-ATP**. Ambas curvas se corresponden con isothermas de tipo IV características de materiales mesoporosos, si bien pueden observarse diferencias en los ciclos de histéresis. En este sentido, el material **85S-F68** presenta un ciclo de histéresis de tipo H₁ característico de poros cilíndricos, mientras que **85S-F68-ATP** presenta una menor adsorción de N₂ y un cambio en el ciclo de histéresis hacia un tipo H₂, característico de poros con morfologías de tipo tintero. Este cambio en los ciclos de histéresis se relaciona con el estrechamiento de la salida de los poros producido por la funcionalización con la compuerta molecular.

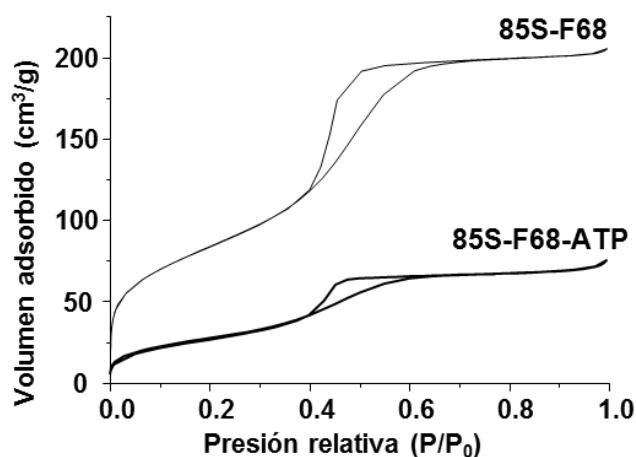


Figura 5. Isothermas de adsorción-desorción de nitrógeno de los materiales **85S-F68** y **85S-F68-ATP**.

La tabla 4 recoge las propiedades texturales antes y después de la funcionalización. Los valores de área superficial, tamaño y volumen de poro demuestran que la porosidad del MBG disminuye sustancialmente tras la funcionalización con la compuerta sensible a ALP

Tabla 4. Propiedades texturales del MBG antes y después de su modificación con la compuera sensible a ALP.

Muestra	Superficie específica ($\text{m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$)	Volumen de Poro ($\text{cm}_3 \cdot \text{g}^{-1}$)	Tamaño de poro (nm)
85S-F68	307,1	0,32	4,2
85S-F68-ATP	90,4	0,10	3,7

Resonancia Magnética Nuclear de sólidos (RMN)

La resonancia magnética nuclear de sólidos, permite estudiar el entorno químico de núcleos magnéticos como ^{29}Si , ^{13}C , ^{71}Ga ... en estado sólido, lo que aporta información sobre la estructura química y la disposición atómica en los materiales.

Para el caso concreto del ^{29}Si , los desplazamientos pueden atribuirse a diferentes entornos químicos para los átomos de silicio. La zona Q se sitúa entre -75 y -140 ppm, y se asocia a los enlaces Si-O. En esa zona se pueden distinguir silicios unidos a oxígenos

enlazantes (unidos a otro silicio) u oxígenos no enlazantes (NEO) (unidos a oxígenos que no forman enlaces con otro silicio).

En los materiales, se pueden distinguir resonancias asociadas a los silicios Q^4 que corresponden a estructuras $Si-(OSi)_4$, los Q^3 (NEO)- $Si-(OSi)_3$ y los silicios Q^2 (NEO) $_2$ - $Si-(OSi)_2$. Las poblaciones de cada tipo de silicio están relacionadas con el índice de conectividad, que viene determinado por los iones introducidos en la red. Los desplazamientos a los que se encuentran las resonancias suelen estar alrededor de (-109 y -140 ppm) Q^4 , (-95 y -105 ppm) Q^3 y (-95 y -75) Q^2 [4]. Las resonancias entre -75 y -40 ppm se denominan T y corresponden a enlaces C-Si [36]. Los espectros de polarización cruzada $^{29}Si \rightarrow ^1H$, muestran resonancias de ^{29}Si cercanas a protones, lo que en el caso de los MBGs se relaciona con las especies de sílice presentes en la superficie del material.

Los espectros de ^{29}Si , (figura 6), presentan tres resonancias para el material 85S-F68 a aproximadamente -111, -101, -95 ppm en el espectro de pulso simple, asociadas a las especies Q^4 , Q^3 y Q^2 respectivamente. En las muestras funcionalizadas se puede observar también resonancias a -67 y -60 ppm, correspondientes a T^3 y T^2 , respectivamente lo que indica la presencia de enlaces covalentes C-Si entre el material y el alcoxilano aminado. Estas señales se incrementan en el espectro de polarización cruzada desacoplado de hidrógeno, pues la funcionalización se da en superficie que es donde hay mayor presencia de protones. La figura 6 recoge también los desplazamientos químicos y las poblaciones de cada tipo de silicio para el material 85S-F68-ATP.

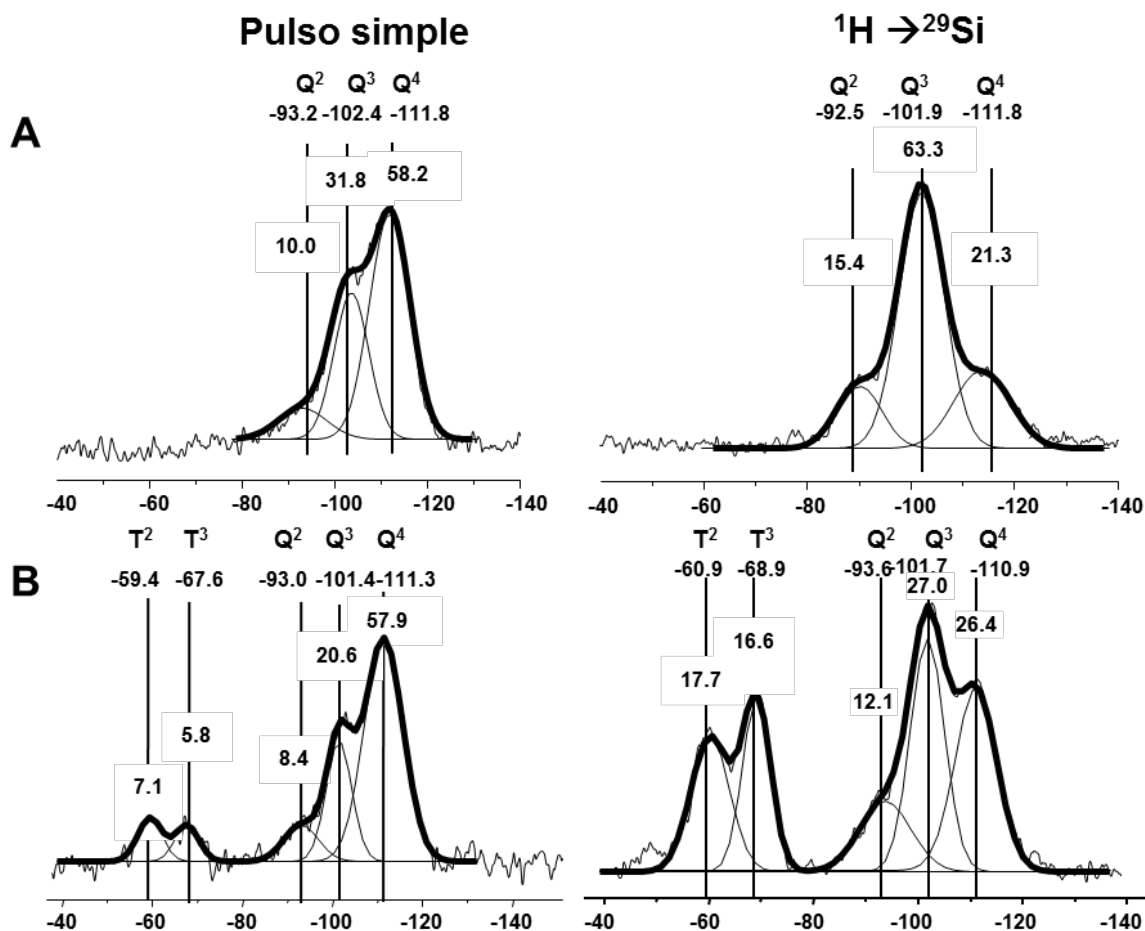


Figura 6. Espectros de ^{29}Si -RMN de sólido, a la izquierda pulso simple y a la derecha de polarización cruzada (A) **85S-F68** (B) **85S-F68-ATP**. En la parte superior de cada espectro se indica la especie de Silicio y el desplazamiento. El porcentaje de cada tipo de silicio se muestra para cada señal.

La figura 7 muestra los espectros de ^{13}C -RMN y la asignación de los carbonos del sistema del material sensible a ALP. En el espectro se observan señales correspondientes al *linker* a desplazamientos más bajos (C1-C7) y señales correspondientes al ATP, características del anillo pirano (C8-C12) y del grupo aromático heterocíclico a mayores desplazamientos (C13-C17). En la tabla 6, quedan asignados todos los carbonos presentes en la compuerta a las diferentes resonancias del espectro.

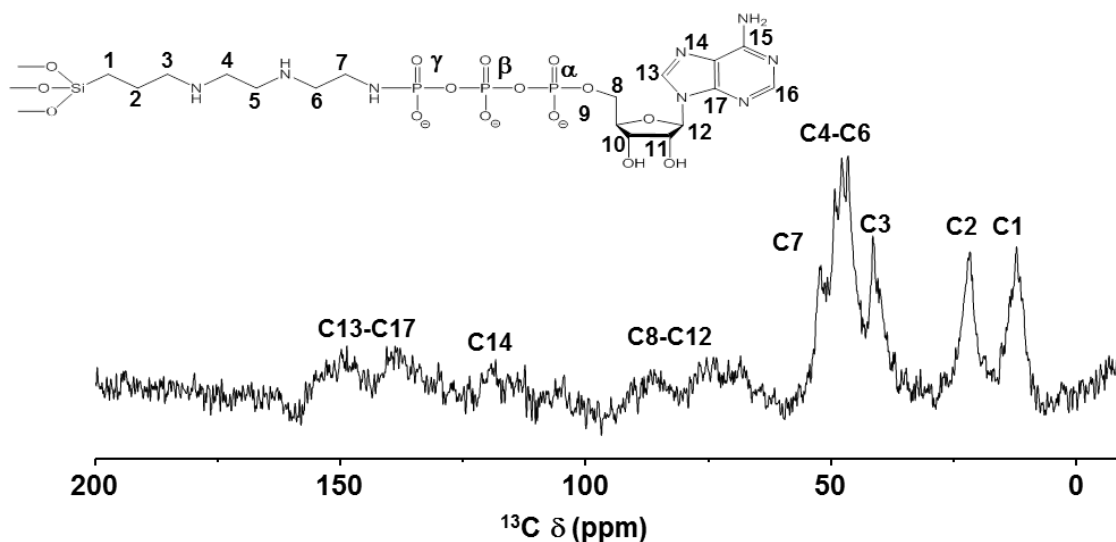


Figura 7. Espectro de ^{13}C -RMN de sólido para el material **85S-F68-ATP**. En la figura se muestra la estructura de la molécula y la asignación de cada carbono con el espectro.

Tabla 6. Asignación de las señales de ^{13}C -RMN para el sistema **85S-F68-ATP**.

Número de carbono	δ_{C} (ppm)
C1	12,4
C2	22,2
C3	41,7
C4,C5,C6	46,5 – 50
C7	52.2
C8,C10,C11	70 – 80
C9,C12	82 – 95
C14	120
C13-C17	139 – 152

El espectro de ^{31}P -RMN de **85S-F68** (figura 8) muestra una única resonancia a 1.8 ppm asignable a unidades de ortofosfato inorgánico. Este resultado está de acuerdo con la situación del entorno local del fósforo en el MBG del sistema $\text{SiO}_2\text{-CaO-P}_2\text{O}_5$, donde la práctica totalidad del fósforo se encuentra en forma de PO_4^{3-} formando clusters de fosfato de calcio [37]. Para las muestras funcionalizadas con ATP se observan tres resonancias, además de la asignable al ortofosfato, que corresponden a cada uno de los

grupos fosfato del ATP [38]. El valor del desplazamiento del fosfato gamma del ATP hacia valores más negativos está relacionado con la unión covalente entre el grupo amino terminal del grupo aminado y el fosfato gamma del ATP.

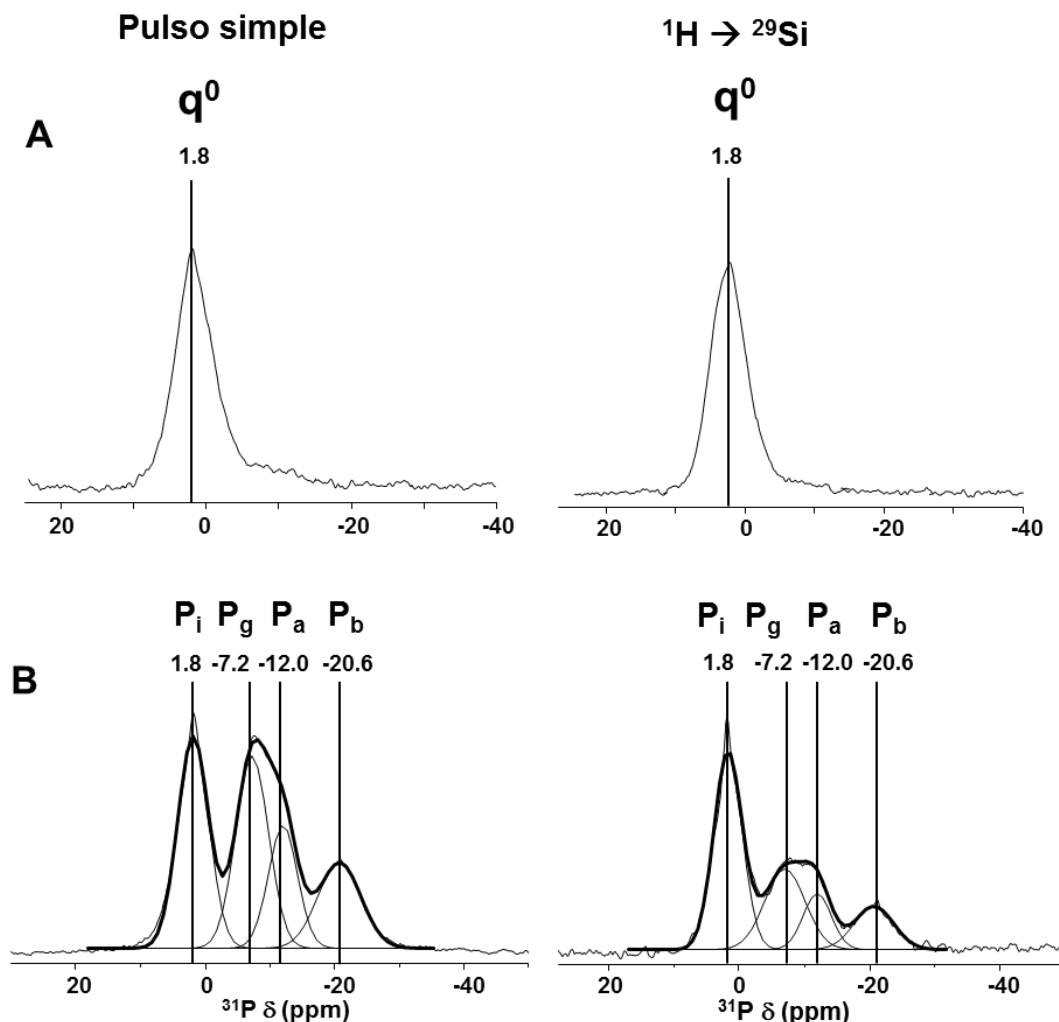


Figura 8. Espectros de ^{31}P -RMN de sólido, a la izquierda pulso simple y a la derecha de polarización cruzada de los materiales A) **85S-F68** B) **85S-F68-ATP**. La figura incluye los datos de desplazamiento en ppm para cada uno de los fósforos identificados.

MBG 85S-F68-ATP como sistema de liberación de antitumorales sensible a ALP

La capacidad del material **85S-F68-ATP** para actuar como sistema estímulo-respuesta frente a tumores óseos se realizó cargando un antitumoral como la doxorubicina en el interior de los poros. Este fármaco es uno de los más utilizados para el tratamiento de cánceres tipo sarcoma, normalmente en terapia combinada con cisplatino u otros antitumorales [39]. La carga del fármaco se llevó a cabo tras secar el material a vacío

durante 24 horas en una disolución al 6 % p/v en metanol. Posteriormente se realizaron las etapas recogidas en el esquema 2 para obtener los correspondientes sólidos **MBG-N3** y el material final **MBG-ATP**, pero cargados de doxorubicina (**85S-F68-ATP-Dox**).

La liberación del fármaco se llevó a cabo añadiendo 2 mg de material en las canastillas de los *transwells* en un volumen final de 2 mL. Tras ese proceso se tomaron alícuotas a diferentes tiempos, refrescando con medio nuevo a cada tiempo y se midió la fluorescencia de la doxorubicina a 514 nm cuando es previamente excitada a 490 nm en los medios. La figura 9 muestra la cinética de liberación de la doxorubicina desde el material en presencia y ausencia de ALP. Se puede observar que el fármaco se libera al medio en presencia del estímulo y en pequeña cantidad en ausencia de este, permaneciendo la mayor parte de la doxorubicina retenida en la matriz. La afinidad de la doxorubicina por la sílice ralentiza la cinética de liberación del fármaco, alcanzándose la meseta de liberación a partir de las 24h. La figura 9 muestra también la cantidad de doxorubicina liberada por miligramo de material, lo que indica que una parte de la doxorubicina sigue retenida en el material tras la carga.

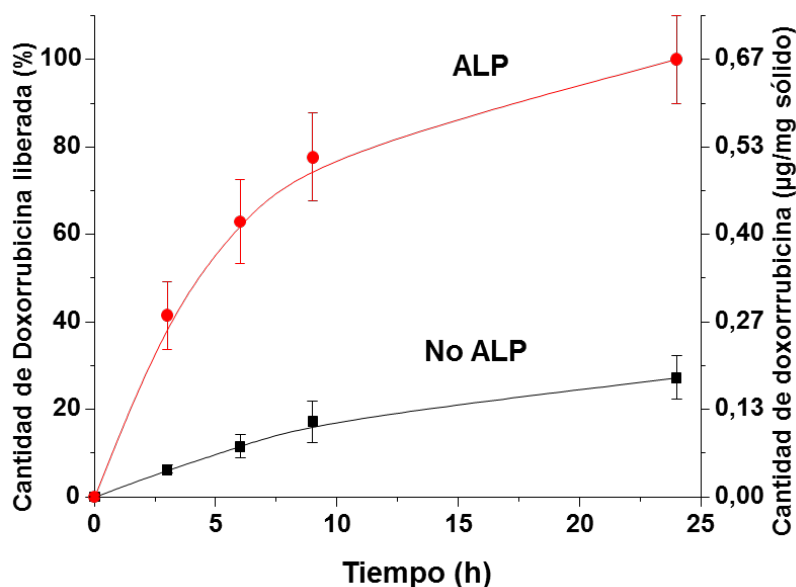


Figura 9. Cinética de liberación de la doxorubicina desde el material **85S-F68-ATP** en medio acuoso, en presencia y ausencia de estímulo.

Comportamiento in vitro con células de osteosarcoma humano (HOS)

La capacidad del sistema para actuar frente a tumores óseos se estudió poniendo en contacto el material (**85S-F68-ATP-Dox**) con un cultivo celular de HOS en presencia y ausencia de ALP en exceso. Las células HOS se sembraron con una densidad de 40000 células/mL en DMEM con un 10% de suero fetal bovino, 1 mM de L-glutamina, penicilina (200 mg·mL⁻¹), y estreptomycin (200 mg·mL⁻¹), bajo atmosfera de CO₂ (5%) a 37 °C y durante 24 h hasta conseguir la media confluencia en los pocillos. Para conocer el comportamiento de la compuerta, la mitad de las células fueron estimuladas con un exceso de ALP.

La evaluación de la viabilidad celular en contacto con 250 µg/mL de los materiales sin cargar o cargados con doxorubicina fue determinada por el método MTT a las 6, 24, 48 y 144 horas. Para ello, se añadieron 0,5 mL de una disolución al 50-50 de isopropanol-HCl (%v/v) y las muestras fueron incubadas durante 4 horas a 37 °C y 5% CO₂ en oscuridad. Posteriormente se midió la absorbancia de la disolución resultante a 460 nm, pudiéndose relacionar el valor de absorbancia con la viabilidad celular.

Con el fin de determinar la posible citotoxicidad intrínseca del material **85S-F68-ATP** sin doxorubicina las células HOS se cultivaron también en presencia del material sin cargar. La figura 10 muestra la viabilidad celular de las células HOS en contacto con **85S-F68-ATP** tanto en presencia como en ausencia de estímulo. Los valores de viabilidad celular son muy semejantes a los del control para todos los tiempos de ensayo, independientemente de la presencia de ALP. Estos datos evidencian la no citotoxicidad del compuesto **85S-F68-ATP**.

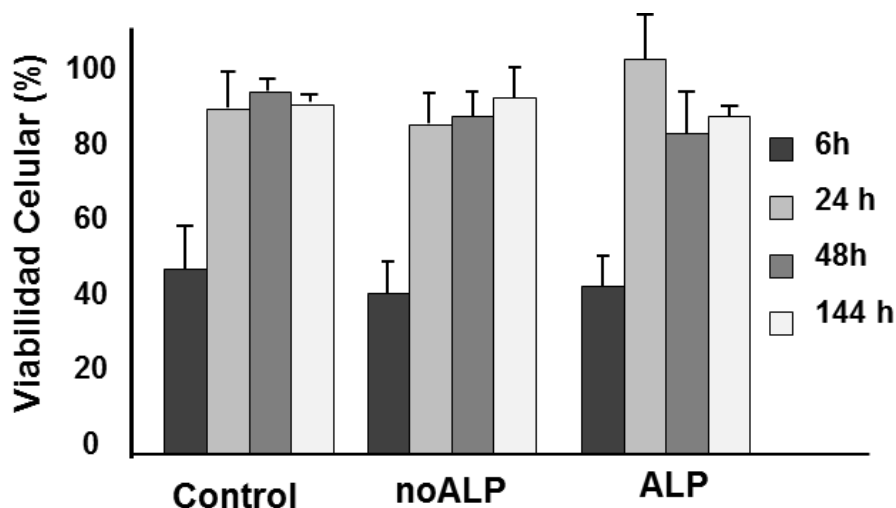


Figura 10. Viabilidad celular del material **85S-F68-ATP** en presencia y ausencia de ALP a diferentes tiempos.

La figura 11 muestra la proliferación celular de las células HOS en contacto con **85S-F68-ATP-dox**. En las primeras horas se observa una disminución de la viabilidad celular, tanto en presencia como ausencia de ALP. Sin embargo, a partir de las 48 h de experimento, la viabilidad celular es significativamente menor en presencia de ALP, mientras que aumenta en su ausencia.

Estos datos indican una liberación prematura de doxorubicina, que no ha quedado retenida por la compuerta y que afecta a la viabilidad celular durante las primeras horas de ensayo. Sin embargo, los datos a 48 h indican que la compuerta se abre en presencia de ALP incrementando la muerte de células HOS. Para tiempos más prolongados la viabilidad celular vuelve a disminuir en ambos casos, lo que parece indicar que tras 144 horas la compuerta no puede retener el fármaco, posiblemente por la solubilidad parcial del MBG.

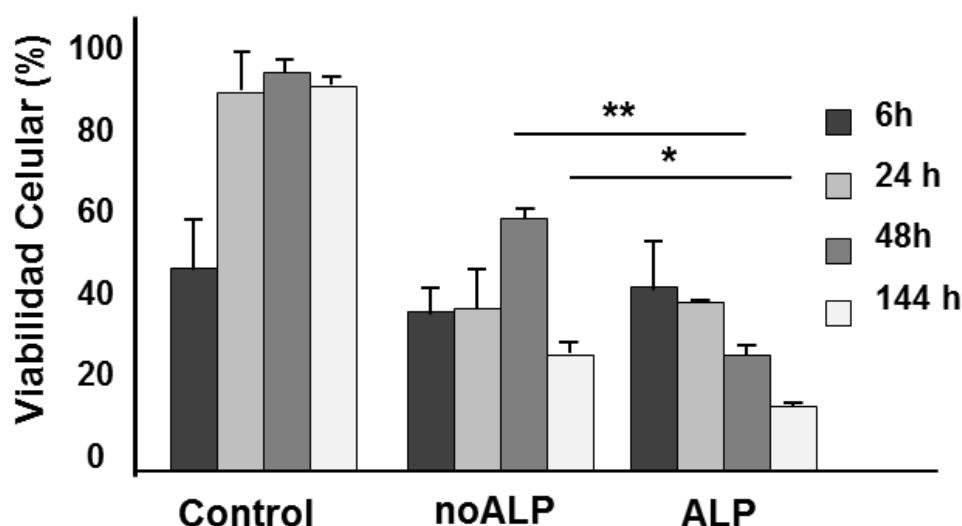


Figura 11. Viabilidad celular del material **85S-F68-ATP** cargado con doxorrubicina y sin cargar en presencia y ausencia de ALP. N=3 $p^{**} < 0.01$ y $p^* < 0.05$.

Ensayos de bioactividad in vitro

La evaluación de la bioactividad *in vitro* de los materiales se llevó a cabo poniendo en contacto 50 mg de material en 7 mL de SBF. Con la finalidad de determinar la influencia que el comportamiento de la compuerta pudiera tener sobre la bioactividad del MBG, se hizo un estudio en paralelo en el cual se añadió ALP al medio fisiológico simulado. La superficie de los materiales se evaluó por FTIR, EDS y SEM.

Los estudios de espectroscopia FTIR de **85S-F68-ATP** antes y tras la inmersión en SBF se muestran en la figura 12, tanto en presencia como en ausencia de ALP. En presencia de ALP (a uno y tres días) se observa una banda doblete a $580-600\text{ cm}^{-1}$ que se asocia con la presencia de fosfatos en entorno cristalino. Además se observa un desplazamiento y un estrechamiento en la banda a 1040 cm^{-1} (correspondiente al Si-O) hacia valores más bajos (1010 cm^{-1}) que se asocia con enlaces P-O. La presencia de estas bandas denota la formación de una nueva fase tipo apatita en la superficie del material. De estos datos se puede concluir que la bioactividad del material se ve comprometida en ausencia de ALP, pues no se observan cambios en los espectros que indiquen la formación de una nueva fase apatita.

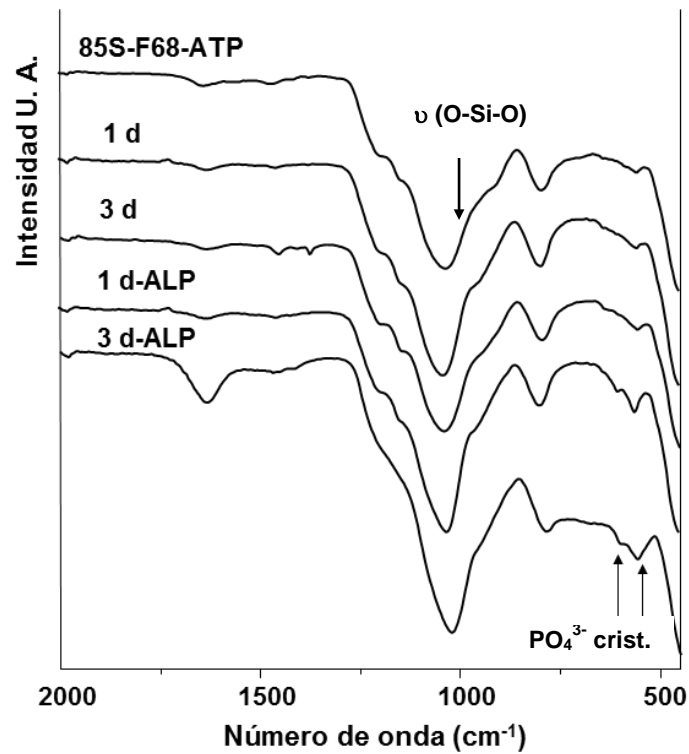


Figura 12. Espectros de infrarrojo del sólido **85S-F68-ATP** tras 1 y 3 días en SBF (1d y 3d) en ausencia y presencia de estímulo (1d-ALP y 3d-ALP).

Las imágenes de SEM (figura 13) muestran las superficies de los materiales durante el ensayo de bioactividad. En ausencia de ALP la superficie del material **85S-F68-ATP** no se modifica. Sin embargo, en presencia de ALP se observa una nueva fase en superficie formada por partículas redondeadas constituida a su vez por pequeños cristales aciculares característicos de la fase apatita crecida sobre materiales bioactivos [40].

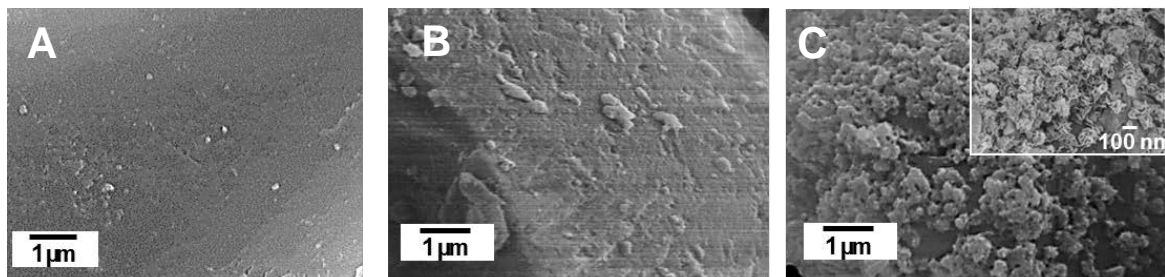


Figura 13. micrografías de SEM para el sistema **85S-F68-ATP** A) antes de la inmersión en SBF, B) tras tres días de inmersión en SBF en ausencia de ALP y C) tras tres días de inmersión en SBF en presencia de ALP.

Los datos de EDS muestran una relación Ca/P de 1.66 en los materiales que han sido sumergidos tres días en SBF en presencia de ALP. Esta relación Ca/P es muy semejante

a la de HA (1.67). Por lo que, se puede asociar la HA a la fase cristalina que aparece en la superficie del material. Estos datos vienen a confirmar lo observado por FTIR es decir que la compuerta sensible a ALP inhibe la formación de la fase apatita, pero una vez abierta por acción de ALP este material puede nuclear y crecer una fase apatita en superficie. La fuerte inhibición del comportamiento bioactivo *in vitro* como consecuencia de la compuerta puede explicarse por la presencia de ATP, el cual posee grupos fosfato en su estructura, con gran afinidad por el calcio. En presencia de ATP el calcio queda retenido en el material ralentizando el intercambio iónico con el medio. Tras la degradación del ATP por la ALP, los grupos fosfato se liberan al medio permitiendo el intercambio iónico Ca^{2+} - H^+ lo que constituye la etapa inicial del proceso bioactivo.

Este hecho se pudo confirmar evaluando la cantidad de calcio liberada al medio durante el ensayo de bioactividad *in vitro*. La figura 14 muestra como el MBG **85S-F68**, favorece una liberación rápida de calcio al medio, descendiendo la concentración en el medio a las 24 h debido a la precipitación de la fase apatita en la superficie del MBG. El comportamiento del material **85S-F68-ATP** muestra una escasa liberación de calcio, lo que confirma que la compuerta está reteniendo el calcio en el material.

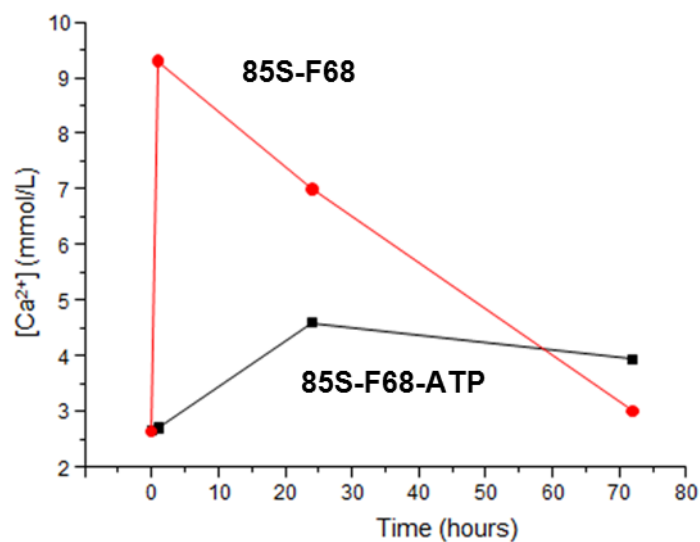


Figura 14. Concentraciones de calcio en el medio durante el ensayo de bioactividad, para el material sin funcionalizar (85S-F68) y para el material funcionalizado con la compuerta de ATP (85S-F68-ATP).

3.2.4 Sistema estímulo-respuesta sensible a proteasas

De forma análoga al sistema propuesto para el tratamiento de osteosarcoma, se llevó a cabo el estudio por TEM, adsorción de N₂, y RMN de sólidos del material **85S-F68-Poli** diseñado para el tratamiento y prevención de infecciones.

Microscopia Electrónica de Transmisión

La figura 15 muestra las imágenes de TEM de los materiales **85S-F68** y **85S-F68-Poli**. Las imágenes indican que, de igual modo que en el caso de la compuerta sensible a ALP, la estructura mesoporosa no se ve afectada por el proceso de funcionalización con polilisina, pues ambos materiales mantienen su porosidad tras la incorporación de la compuerta a la matriz.

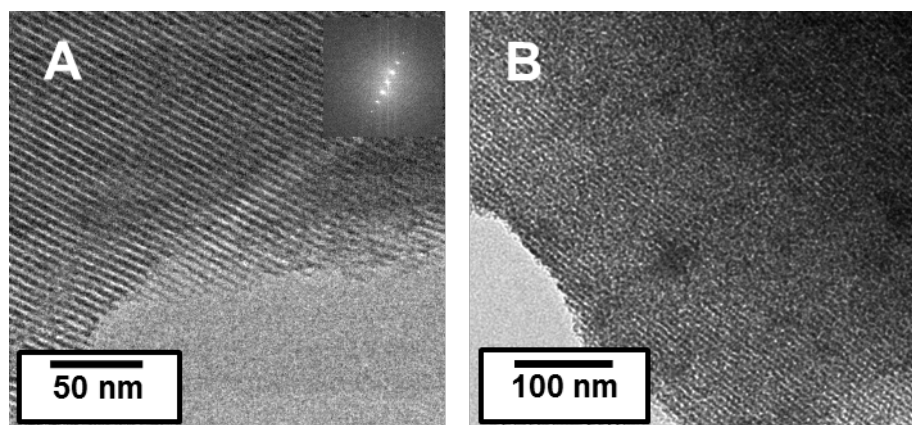


Figura 15. Imágenes de TEM (A) **85S-F68** (B) **85S-F68-Poli**.

Estudios de adsorción de Nitrógeno

Las isothermas de adsorción-desorción de N₂ de ambos materiales (figura 16) se corresponden con curvas de tipo IV, característicos de materiales mesoporosos, observándose una disminución en el volumen de N₂ absorbido tras la incorporación de la compuerta sensible a proteasa.

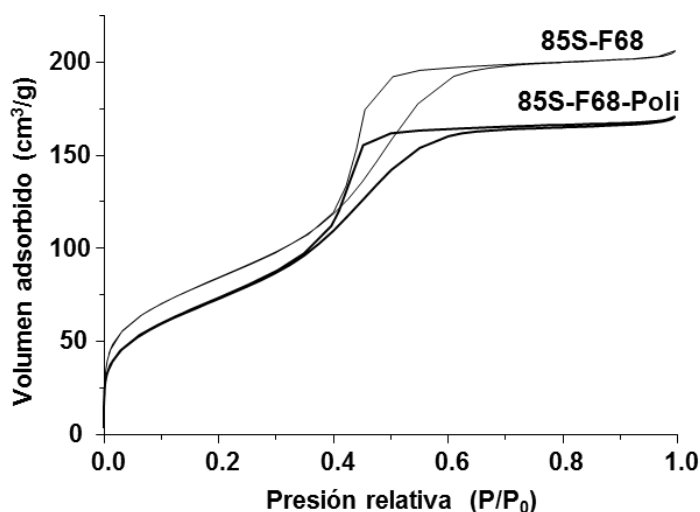


Figura 16. Isotermas de adsorción-desorción de nitrógeno para los materiales 85S-F68 y 85S-F68-Poli.

La tabla 7 muestra un resumen de las propiedades texturales de los materiales antes y después de la funcionalización. Tras la funcionalización se observa una disminución en el área superficial, el volumen y el tamaño de poro, lo cual indica que la superficie del material se ha modificado tras el proceso de incorporación de la compuerta. La menor variación de estos valores, respecto a lo observado para la compuerta sensible a ALP, parece indicar que la funcionalización con polilisina sucede en la superficie externa del material y no en el interior de los poros, formándose un recubrimiento de polímero sobre el material.

Tabla 7. Propiedades texturales del MBG antes y después de su modificación con polilisina para fabricar un sistema con respuesta a infección.

Muestra	Superficie específica ($\text{m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$)	Volumen de Poro ($\text{cm}_3 \cdot \text{g}^{-1}$)	Tamaño de poro (nm)
85S-F68	307.1	0.318	4.2
85S-F68-Poli	268.4	0.263	3.6

Resonancia magnética nuclear de sólidos

Los espectros de ^{29}Si -RMN (figura 17) para los sólidos **85S-F68** y **85S-F68-Poli** muestran resonancias correspondientes a los Q^4 , Q^3 , Q^2 a -111, -101, -91 ppm respectivamente en los espectros de pulso simple para los materiales 85S-F68 y 85S-

F68-Poli. Los espectros de polarización cruzada muestran bandas en la zona T a -67.9 y -58.6 para el 85S-F68-Poli, lo que indica la presencia de enlaces covalentes Si-C entre el MBG y el 3-(trietoxisilil)propilisocianato en la superficie del sistema.

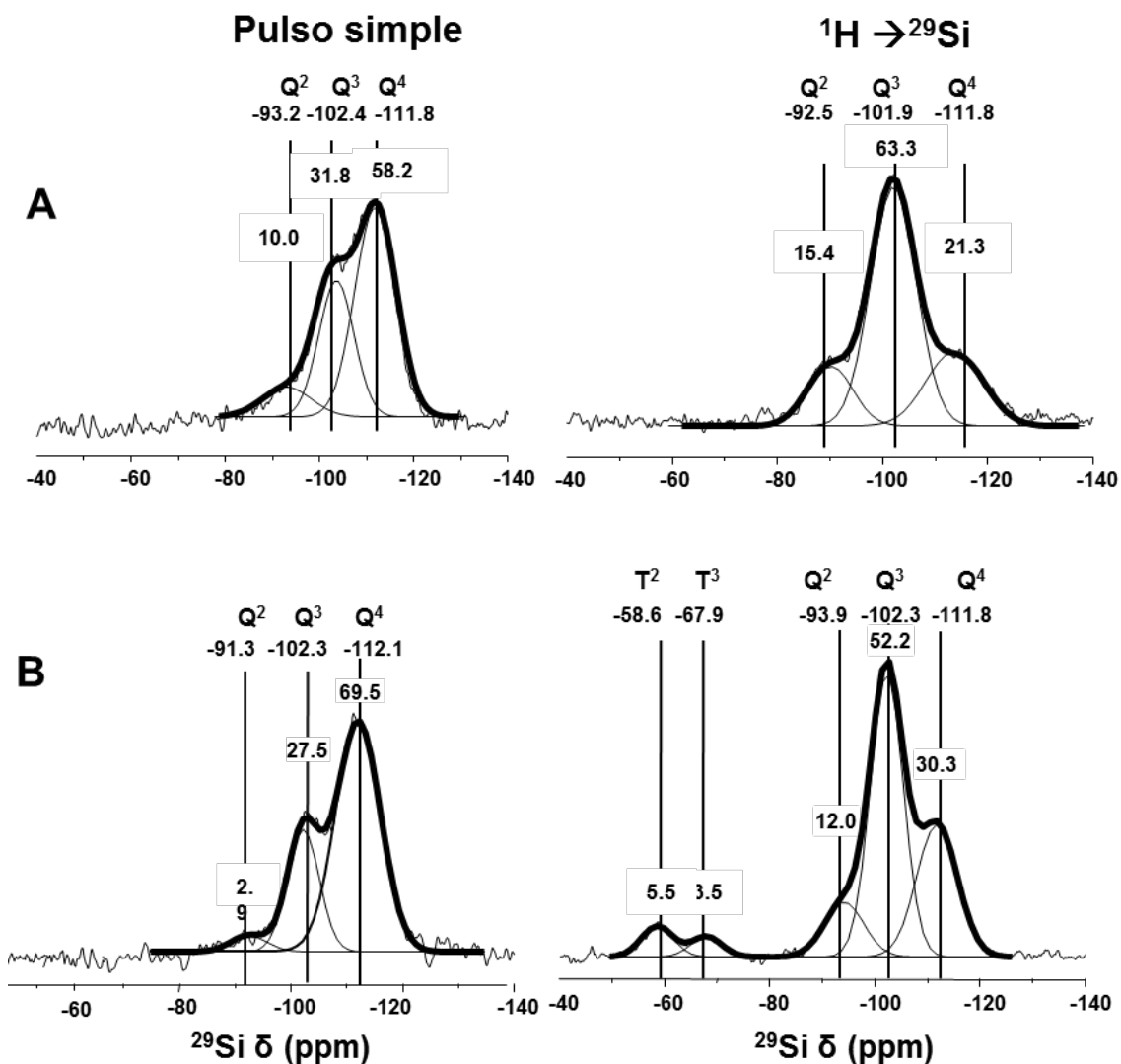


Figura 17. Espectros de RMN de ^{29}Si . Espectros de pulso simple (izquierda), espectros de polarización cruzada (derecha) A) 85S-F68 y B) 85S-F68 -Poli. En la parte superior de cada espectro se indica la especie de silicio y el desplazamiento. El porcentaje de cada tipo de silicio se muestra para cada señal.

El espectro de ^{13}C -RMN, (figura 18) muestra resonancias entre 10.5 y 178 ppm que se asignan al 3-(trietoxisilil)propilisocianato y a la ϵ -poli-L-lisina (tabla 9). Los

desplazamientos de los C4 y C5 muestran que la ϵ -poli-L-lisina está unida covalentemente con el grupo isocianato del 3-(trietoxisilil)propilisocianato.

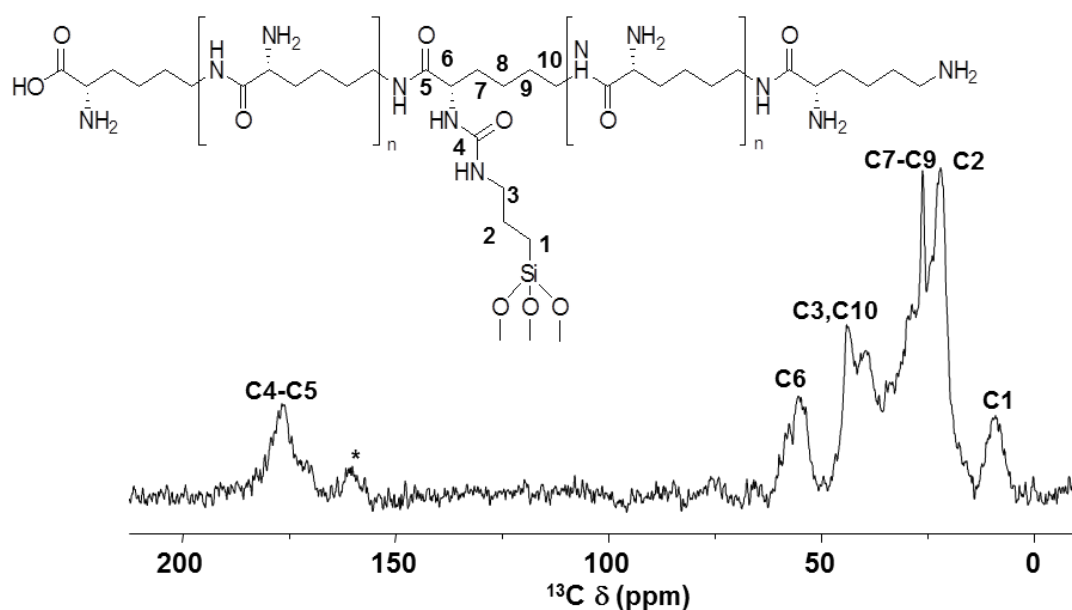


Figura 18. Espectro de ^{13}C -RMN de sólido para el material 85S-F68-Poli. En la figura se muestra la estructura de la molécula y la asignación de cada carbono con el espectro.

* Señal asignable a 3-(trietoxisilil)propilisocianato sin reaccionar.

Tabla 9. Asignación de las señales de ^{13}C -RMN para el sistema **85S-F68-Poli**.

Número de carbono	δc (ppm)
C1	10.5
C2	23.6
C7-C9	28 – 35.7
C10	40.7
C3	45.8
C6	56.44
C4-C5	172.3 – 178.3

MBG 85S-F68-Poli como sistema de liberación de antibióticos sensible a proteasas

El estudio de la cinética de liberación de fármacos con la compuerta sensible a proteasas se realizó previa carga con levofloxacin. El levofloxacin es un antibiótico de amplio espectro que se utiliza contra algunas de las bacterias con mayor incidencia en

infecciones óseas como son *S. Aureus* o *E. Coli* [31]. La carga del fármaco se llevó a cabo suspendiendo 4 mg de **85S-F68** en una disolución al 1.1 mmol de levofloxacino en metanol durante 24 horas. Tras ese proceso, se funcionalizó el sistema según el esquema 3, para obtener el material **85S-F68-Poli-Levo**.

La liberación del levofloxacino se realizó suspendiendo 4 mg de en 10 mL de agua en presencia y ausencia de *E coli* y se tomaron alícuotas de 250 μ L a diferentes tiempos. La cantidad liberada de levofloxacino en el medio se cuantificó midiendo la fluorescencia a 494 nm, tras excitar a una longitud de onda de 292 nm, en los extractos de la liberación tomados a diferentes tiempos.

Como muestra la figura 19, la liberación del fármaco se produce en contacto con las bacterias pero no en ausencia de las mismas, evidenciando la capacidad estímulo-respuesta del MBG **85S-F68-Poli**.

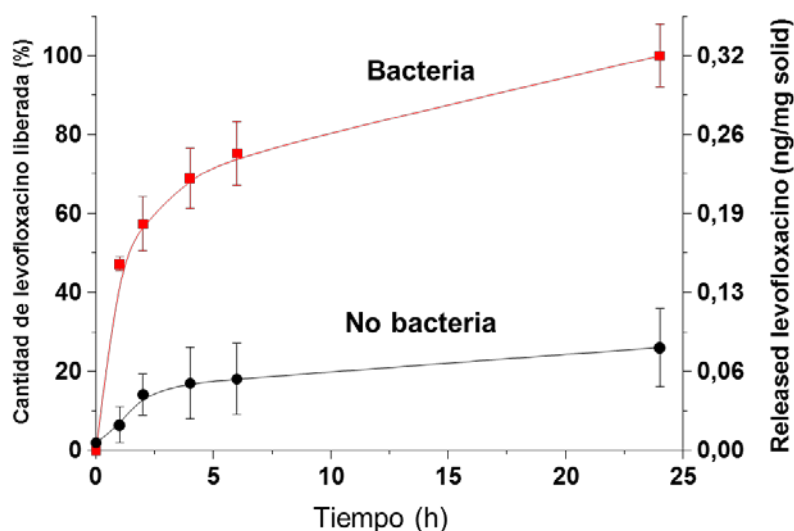


Figura 19. Cinética de liberación del levofloxacino desde el material **85S-F68-Poli** en medio acuoso, en presencia y ausencia de *E. Coli*.

Capacidad bactericida in vitro del sistema 85S-F68-Poli frente a E coli.

Como parámetro para evaluar la capacidad antibacteriana *in vitro* del **85S-F68-Poli** cargado con levofloxacino, se utilizó la variación en el número de unidades formadoras de colonias (CFU) de *E. coli*. Para ello una concentración fija de bacterias (10^4 cell/mL) se puso en contacto con diferentes concentraciones del material. Las suspensiones, que contenían bacterias y materiales, fueron incubadas a 37° C durante 10 minutos y

posteriormente se sembraron en placas de agar durante 24 horas, para posteriormente cuantificar las unidades de colonias crecidas en cada placa Petri. Como controles se utilizaron el levofloxacino libre y la polilisina libre y como control negativo se utilizó el 85S-F68-ATP cargado con levofloxacino (**85S-F68-ATP-Levo**).

La figura 20 muestra el número de CFU en función del material con el que las bacterias fueron incubadas. Se puede observar una disminución en el número de colonias bacterianas cuando estas se ven sometidas a contacto con el **85S-F68-Poli** en comparación con la **ϵ -Poli-L-lilisina** y el **levofloxacino** libres. Esto indica un comportamiento sinérgico entre la **ϵ -Poli-L-lilisina** que forma la compuerta y el fármaco liberado, lo cual da un valor añadido al material [41]. En la figura 20 se muestra como el material **85S-F68-ATP-levo** no libera el fármaco en presencia de las bacterias, lo cual prueba la especificidad de ambos sistemas para responder de manera selectiva al estímulo para el que fue diseñado.

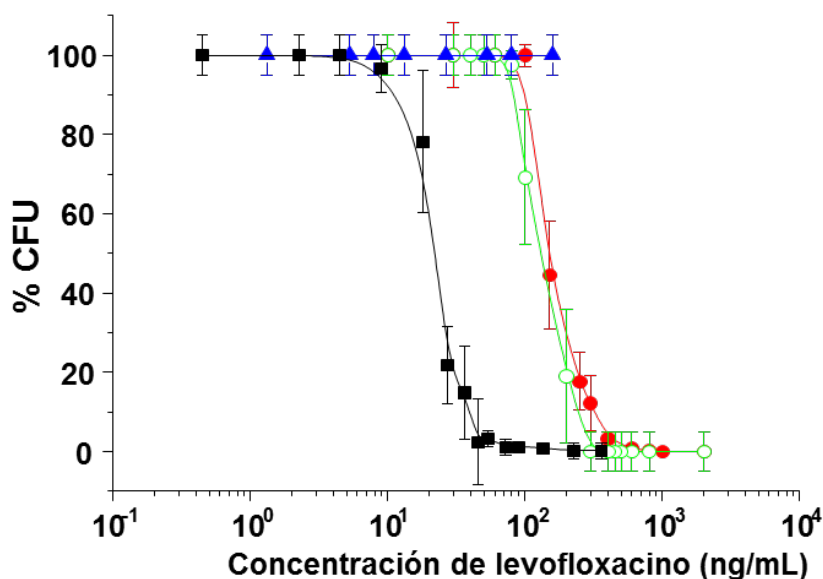


Figura 18. Porcentaje de CFU en función de la concentración de levofloxacino liberada al medio. (Cuadrado sólido) **85S-F68-Poli-Levo**, (círculo sólido) **levofloxacino**, (círculos huecos) **ϵ -Poli-L-lilisina** libre, (triángulo sólido) **85S-F68-ATP-Levo** cargado con levofloxacino.

Estudios de bioactividad in vitro de los materiales 85S-F68-Poli

La evaluación de la bioactividad *in vitro* de **85S-F68-Poli**, se llevó a cabo poniendo en contacto 50 mg de material con 7 mL de SBF, en presencia y ausencia de proteasas durante uno y tres días. La figura 21 muestra la evolución de la superficie de los materiales seguida por FTIR antes de la inmersión en SBF y tras uno y tres días (en presencia o ausencia de proteasas). Los espectros muestran una banda doblete en 580-600 cm^{-1} característica de fosfato en entorno cristalino tras la inmersión en SBF tanto en presencia como en ausencia de proteasa. En ese sentido, es posible observar un desplazamiento y estrechamiento en la banda a 1040 cm^{-1} (correspondiente a la vibración Si-O) hacia valores más bajos, también asociado a la presencia de enlaces P-O en la superficie del MBG.

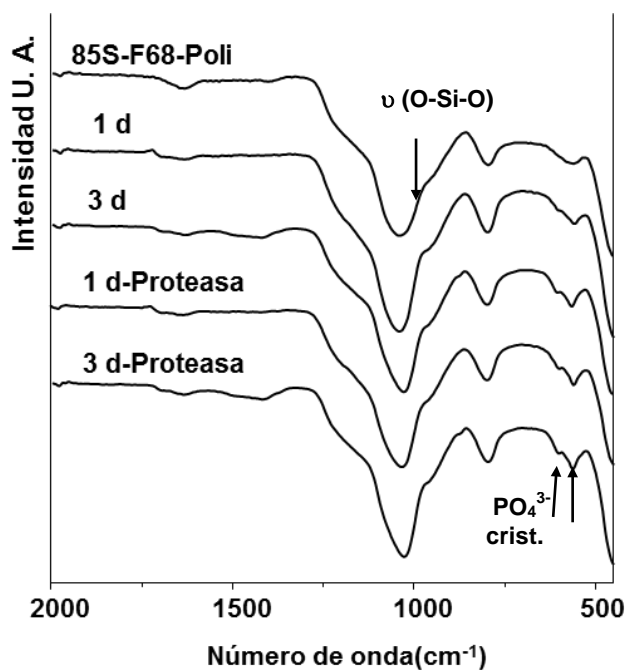


Figura 21. Espectros de FTIR del material **85S-F68-Poli** tras 1 y 3 días en SBF (1d y 3d) en ausencia y presencia de estímulo (1d-proteasa y 3d-proteasa).

Las imágenes de SEM (figura 22) permiten observar la presencia de una nueva fase en la superficie del material, tanto en presencia como ausencia de proteasas. La fase cristalina que se observa en la superficie del material se puede asociar a HA, dadas las condiciones de pH y temperatura a las que fue realizado el ensayo. Estos resultados demuestran que el material mantiene su bioactividad *in vitro* tras la funcionalización.

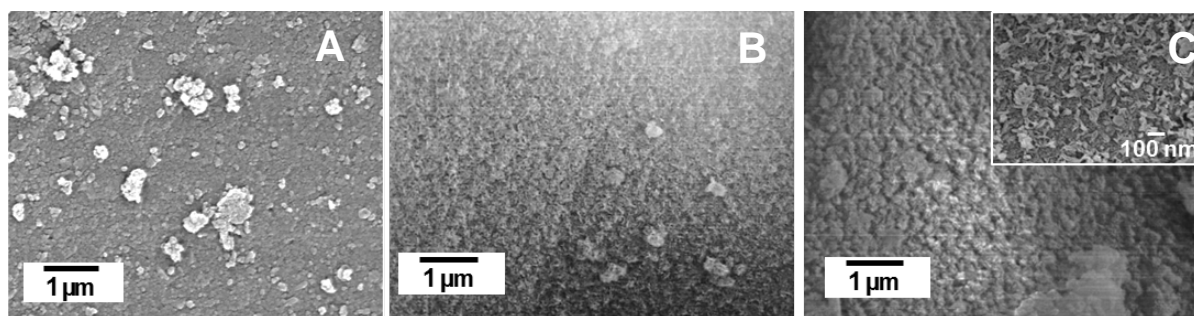


Figura 22. micrografías de SEM para el sistema **85S-F68-Poli** (A) antes de la inmersión en SBF, (B) tras tres días de inmersión en SBF en ausencia de proteasas (C) tras tres días de inmersión en SBF en presencia de proteasas.

3.2.5 Discusión

El objetivo del trabajo expuesto en este capítulo ha sido obtener sistemas de liberación de fármacos estímulo-respuesta sobre MBGs. La finalidad de estos materiales es la de promover la regeneración tisular de defectos óseos causados por la extirpación de tumores o por infección bacteriana. Para ello hemos incorporado compuertas moleculares sobre MBGs que contenían un antitumoral o un antibiótico dependiendo del caso a tratar. Dichas compuertas se han diseñado para contener al fármaco en el interior del MBG y degradarse por la presencia de enzimas que aparecen o se sobreexpresan como consecuencia de la patología.

Los resultados expuestos demuestran la necesidad de diseñar y controlar cuidadosamente las diferentes etapas que constituyen la preparación de este sistema. En primer lugar la elección del MBG. Nuestros resultados demuestran que el control sobre el tamaño de poro determina el éxito o el fracaso de la compuerta. En el capítulo anterior se ha demostrado que este parámetro se puede controlar a través del agente director de estructura y del contenido de calcio en el sistema. Por lo tanto nuestras investigaciones previas nos permitieron preparar de forma controlada un conjunto de MBGs, cuya porosidad podíamos diseñar con las estrategias expuestas [42,43]. Fruto de este diseño experimental hemos podido deducir que para el buen funcionamiento de la compuerta, el MBG debía presentar tamaños de poro en torno a 4.2 nm y una estabilidad química que proporcionan únicamente las composiciones de bajo contenido en CaO, es decir alrededor de un 10% en moles. De otro modo, poros más grandes conducían a la liberación temprana de fármaco, que escapa al control de la compuerta y composiciones de mayor contenido en CaO hacen del MBG una matriz demasiado

soluble, que no permite el control sobre la liberación del fármaco con la compuerta. El conjunto de nuestra investigación permite deducir que el MBG 85S sintetizado con F68 como SDA reúne los requisitos necesarios para ser soporte de las dos compuertas sensibles a ALP y proteasas.

La compuerta sensible a niveles elevados de ALP se basa en la ruptura de ATP por la presencia de esta enzima. La ALP actúa generalmente en el metabolismo óseo catalizando la ruptura de enlaces fosfato monoéster, para liberar fosfato inorgánico al medio [44,45]. Sin embargo, se ha descrito la posibilidad de que dicha enzima puede actuar catalizando la ruptura de enlaces más complejos, como podría ser el del ATP lo que estaría de acuerdo con el funcionamiento de nuestra compuerta [46,47]. A pesar de los diferentes sustratos que pueden romper ALP, el sistema es lo suficientemente selectivo para poder ser utilizado en patologías concretas. De este modo, nuestra compuerta sensible a ALP no pudo abrirse en presencia de proteasas bacterianas.

La elevada bioactividad de los MBGs es una de las razones que ha motivado el uso de estos materiales como matriz de un sistema estímulo-respuesta. La bioactividad es un fenómeno de superficie que puede verse modificado por cambios en la misma, por ejemplo la funcionalización. De hecho, los materiales con las compuertas moleculares incorporadas presentaron comportamientos bioactivos diferentes al material de partida y entre sí.

En el sólido sensible a ALP, la enzima cataliza la ruptura de enlaces fosfato hidrolizando el ATP. La naturaleza de la compuerta, que presenta tres grupos fosfato en superficie, retiene los iones Ca^{2+} ralentizando el intercambio iónico con el medio, por lo que no permite la nucleación y formación de fase apatita en superficie. La actuación de la enzima favorece la bioactividad del material, que tras actuar hidrolizando los enlaces fosfato del ATP permite el intercambio iónico $\text{Ca}^{2+}\text{-H}^+$ con el medio dando lugar a la nucleación y formación de la fase apatita [48,49].

La compuerta sensible a proteasa permite controlar la liberación de antibióticos al medio de forma controlada, presentando actividad bactericida. Además la naturaleza de la compuerta favorece el comportamiento bioactivo del material, pues no interfiere con el intercambio iónico con el medio, previo a la nucleación de la fase apatita en superficie. Dado que la ϵ -Poli-L-lisina no presenta ningún grupo funcional con afinidad

por el calcio en su superficie, el intercambio iónico Ca^{2+} - H^+ y la posterior precipitación de la fase apatita en superficie no se ven alterados.

El conjunto de resultados nos permite concluir que ambas compuertas presentan comportamiento estímulo-respuesta. La compuerta sensible a ALP permite la liberación de antitumorales de forma controlada en contacto con niveles elevados de enzima. La compuerta sensible a proteasas permite retener antibióticos en el interior de los poros del material y al contacto con bacterias se favorece la liberación del fármaco produciendo efecto bactericida. En presencia de sus estímulos, ambas compuertas permiten la liberación de fármacos al medio, conservando su comportamiento bioactivo necesario para la regeneración del tejido óseo.

3.2.6 Conclusiones

El MBG **85S-F68** presenta las características texturales y químicas más favorables para ser soporte de sistemas estímulo-respuesta para liberación controlada de fármacos. Utilizando **85S-F68** como soporte se han diseñado dos sistemas sensibles al aumento de la concentración enzimática en el organismo. El primero de ellos se ha basado en la incorporación de ATP a la superficie del MBG **85S-F68** que se desprende cuando los niveles de ALP sérica se incrementan en el organismo a causa de cáncer tipo osteosarcoma. El segundo se ha basado en la incorporación de ϵ -poli-L-lisina que se rompe en presencia de proteasas cuando se produce una infección bacteriana.

Ambos sólidos han demostrado comportamiento estímulo-respuesta en contacto con las enzimas correspondientes (ALP y proteasas) liberando fármacos al medio mientras que en ausencia de las mismas los fármacos permanecen retenidos en el interior de la matriz.

Se ha demostrado que ambos sistemas poseen diferentes comportamientos bioactivos. Mientras que el sistema sensible a proteasas permite la formación de una fase tipo apatita nanocristalina en su superficie, el sistema sensible a ALP requiere la apertura de la compuerta molecular para iniciar la formación de la fase apatita.

Se ha validado en comportamiento *in vitro* de ambos sistemas demostrándose que ambos sistemas presentan biocompatibilidad y no afectan por si mismos a la proliferación celular o bacteriana. El sistema sensible a ALP ha demostrado liberar doxorubicina e inhibir la proliferación de células HOS a concentraciones séricas de la enzima similares a las encontradas en pacientes con osteosarcoma. El sistema sensible a

proteasas se hidroliza en presencia de bacterias *E. coli* liberando levofloxacino inhibiendo la formación de colonias bacterianas.

De este modo, se ha demostrado una nueva aplicación para los MBGs como injertos para tratamiento y prevención secundaria de osteosarcoma e infección mientras se favorece la regeneración ósea, lo que permite establecer nuevas estrategias en el uso de los MBGs como sistemas estímulo-respuesta para el tratamiento de enfermedades relacionadas con el tejido óseo.

Referencias

- [1] Y. Zhang, L. Wei, J. Chang, R.J. Miron, B. Shi, S. Yi, C. Wu, , Strontium-incorporated mesoporous bioactive glass scaffolds stimulating in vitro proliferation and differentiation of bone marrow stromal cells and in vivo regeneration of osteoporotic bone defects, *J. Mater. Chem. B.* 1 (2013) 5711.
- [2] M. Vallet-Regí, C. V. Ragel, A.J. Salinas, Glasses with Medical Applications, *Eur. J. Inorg. Chem.* (2003) 1029.
- [3] Y. Huang, C. Wu, X. Zhang, J. Chang, K. Dai, Regulation of immune response by bioactive ions released from silicate bioceramics for bone regeneration, *Acta Biomater.* 66 (2018) 81.
- [4] Y. Zhu, C. Wu, Y. Ramaswamy, E. Kockrick, P. Simon, S. Kaskel, H. Zreiqat, Preparation, characterization and in vitro bioactivity of mesoporous bioactive glasses (MBGs) scaffolds for bone tissue engineering, *Microporous Mesoporous Mater.* 112 (2008) 494.
- [5] M. Cicuéndez, J.C. Doadrio, A. Hernández, M.T. Portolés, I. Izquierdo-Barba, M. Vallet-Regí, Multifunctional pH sensitive 3D scaffolds for treatment and prevention of bone infection, *Acta Biomater.* 65 (2018) 450.
- [6] G. Bacci, A. Longhi, M. Versari, M. Mercuri, A. Briccoli, P. Picci, Prognostic factors for osteosarcoma of the extremity treated with neoadjuvant chemotherapy: 15-Year experience in 789 patients treated at a single institution, *Cancer.* 106 (2006) 1154.
- [7] L. Kyllönen, M. D'Este, M. Alini, D. Eglin, Local drug delivery for enhancing fracture healing in osteoporotic bone, *Acta Biomater.* 11 (2015) 412.

- [8] M. Vallet-Regí, A. Rámila, R. P. del Real, J. Pérez-Pariente, A New Property of MCM-41: Drug Delivery System, *Chem. Mater.* 13 (2001) 308.
- [9] M. Vallet-Regí, F. Balas, D. Arcos, Mesoporous Materials for Drug Delivery, *Angew. Chemie Int. Ed.* 46 (2007) 7548.
- [10] P. Costa, J.M. Sousa Lobo, Modeling and comparison of dissolution profiles., *Eur. J. Pharm. Sci.* 13 (2001) 123.
- [11] P. Horcajada, A. Rámila, K. Boulahya, J. González-Calbet, M. Vallet-Regí, Bioactivity in ordered mesoporous materials, *Solid State Sci.* 6 (2004) 1295.
- [12] I. Izquierdo-Barba, L. Ruiz-González, J.C. Doadrio, J.M. González-Calbet, M. Vallet-Regí, Tissue regeneration: A new property of mesoporous materials, *Solid State Sci.* 7 (2005) 983.
- [13] L.L. Hench, J.K. West, The sol-gel process, *Chem. Rev.* 90 (1990) 33.
- [14] T. Kokubo, H. Kushitani, S. Sakka, T. Kitsugi, T. Yamamuro, Solutions able to reproduce in vivo surface-structure changes in bioactive glass-ceramic A-W., *J. Biomed. Mater. Res.* 24 (1990) 721.
- [15] M. Vallet-Regí, M. Manzano-García, M. Colilla, Biomedical applications of mesoporous ceramics, first ed., CRC press, Danvers, 2013.
- [16] J.L. Vivero-Escoto, I.I. Slowing, B.G. Trewyn, V.S.Y. Lin, Mesoporous Silica Nanoparticles for Intracellular Controlled Drug Delivery, *Small.* 6 (2010) 1952.
- [17] K. Patel, S. Angelos, W. R. Dichtel, A. Coskun, Y.-W. Yang, J. I. Zink, J.F. Stoddart, Enzyme-Responsive Snap-Top Covered Silica Nanocontainers, *J. Am. Chem. Soc.* 130 (2008) 2382.
- [18] T.D. Nguyen, K.C.-F. Leung, M. Liong, C.D. Pentecost, J.F. Stoddart, J.I. Zink, Construction of a pH-Driven Supramolecular Nanovalve, *Org. Lett.* 8 (2006) 3363.
- [19] D.P. Ferris, Y.L. Zhao, N.M. Khashab, H.A. Khatib, J.F. Stoddart, J.I. Zink, Light-operated mechanized nanoparticles, *J. Am. Chem. Soc.* 131 (2009) 1686.
- [20] A. Agostini, L. Mondragón, C. Coll, E. Aznar, M.D. Marcos, R. Martínez-Mañez, F. Sancenón, J. Soto, E. Pérez-Payá, P. Amorós, Dual enzyme-triggered controlled

- release on capped nanometric silica mesoporous supports., *ChemistryOpen*. 1 (2012) 17.
- [21] J.L. Paris, M.V. Cabanas, M. Manzano, M. Vallet-Regí, Polymer-Grafted Mesoporous Silica Nanoparticles as Ultrasound-Responsive Drug Carriers, *ACS Nano*. 9 (2015) 1102.
- [22] M. Gisbert-Garzarán, D. Lozano, M. Vallet-Regí, M. Manzano, Self-immolative polymers as novel pH-responsive gate keepers for drug delivery, *RSC Adv*. 7 (2017) 132–136.
- [23] X. Yan, C. Yu, X. Zhou, J. Tang, D. Zhao, Highly ordered mesoporous bioactive glasses with superior in vitro bone-forming bioactivities, *Angew. Chemie - Int. Ed.* 43 (2004) 5980.
- [24] H.M. Lin, W.K. Wang, P.A. Hsiung, S.G. Shyu, Light-sensitive intelligent drug delivery systems of coumarin-modified mesoporous bioactive glass, *Acta Biomater.* 6 (2010) 3256.
- [25] A. Baeza, M. Colilla, M. Vallet-Regí, Advances in mesoporous silica nanoparticles for targeted stimuli-responsive drug delivery, *Expert Opin. Drug Deliv.* 12 (2015) 319.
- [26] S. Mura, J. Nicolas, P. Couvreur, Stimuli-responsive nanocarriers for drug delivery, *Nat. Mater.* 12 (2013) 991.
- [27] L. Meseguer-Olmo, V. Vicente-Ortega, M. Alcaraz-Baños, J.L. Calvo-Guirado, M. Vallet-Regí, D. Arcos, A. Baeza, In-vivo behavior of Si-hydroxyapatite/polycaprolactone/DMB scaffolds fabricated by 3D printing, *J. Biomed. Mater. Res. Part A*. 101 (2013) 2038.
- [28] G. Bacci, A. Longhi, S. Ferrari, S. Lari, M. Manfrini, D. Donati, C. Forni, M. Versari, Prognostic significance of serum alkaline phosphatase in osteosarcoma of the extremity treated with neoadjuvant chemotherapy: Recent experience at Rizzoli Institute, *Oncol. Rep.* 9 (2002) 171.
- [29] S.H. Kim, K.H. Shin, S. H. Moon, J. Jang, H.S. Kim, J. S. Suh, W. I. Yang, Reassessment of alkaline phosphatase as serum tumor marker with high specificity in osteosarcoma, *Cancer Med.* 6 (2017) 1311.

- [30] L. Polo, N. Gómez-Cerezo, E. Aznar, J. Vivancos, F. Sancenón, D. Arcos, M. Vallet-Regí, R. Martínez-Máñez, Molecular gates in mesoporous bioactive glasses for the treatment of bone tumors and infection, *Acta Biomater.* 50 (2017) 114.
- [31] R. García-Alvarez, I. Izquierdo-Barba, M. Vallet-Regí, 3D scaffold with effective multidrug sequential release against bacteria biofilm, *Acta Biomater.* 49 (2017) 113.
- [32] N. Mas, D. Arcos, L. Polo, E. Aznar, S. Sánchez-Salcedo, F. Sancenón, A. García, M.D. Marcos, A. Baeza, M. Vallet-Regí, R. Martínez-Máñez, Towards the Development of Smart 3D “Gated Scaffolds” for On-Command Delivery, *Small.* 10 (2014) 4859.
- [33] L. Mondragón, N. Mas, V. Ferragud, C. de la Torre, A. Agostini, R. Martínez-Máñez, F. Sancenón, P. Amorós, E. Pérez-Payá, M. Orzáez, Enzyme-responsive intracellular-controlled release using silica mesoporous nanoparticles capped with e-poly-L-lysine, *Chemistry.* 20 (2014) 5271.
- [34] X. Chen, X. Cheng, A.H. Soeriyadi, S.M. Sagnella, X. Lu, J. a. Scott, S.B. Lowe, M. Kavallaris, J.J. Gooding, Stimuli-responsive functionalized mesoporous silica nanoparticles for drug release in response to various biological stimuli, *Biomater. Sci.* 2 (2014) 121.
- [35] Y. Lu, W. Sun, Z. Gu, Stimuli-responsive nanomaterials for therapeutic protein delivery, *J. Control. Release.* 194 (2014) 1.
- [36] S. Huh, J.W. Wiench, J. Yoo, M. Pruski, V.S. Lin, Organic Functionalization and Morphology Control of Mesoporous Silicas via a Co-Condensation Synthesis Method, (2003) 4247.
- [37] E. Leonova, I. Izquierdo-Barba, D. Arcos, A. López-Noriega, N. Hedin, M. Vallet-Regí, M. Edén, Multinuclear Solid-State NMR Studies of Ordered Mesoporous Bioactive Glasses, *J. Phys. Chem. C* 121 (2008) 5552.
- [38] M.J. Potrzebowski, J. Gajda, W. Ciesielski, I.M. Montesinos, Distance measurements in disodium ATP hydrates by means of ³¹P double quantum two-dimensional solid-state NMR spectroscopy, *J. Magn. Reson.* 179 (2006) 173.

- [39] A. Luetke, P.A. Meyers, I. Lewis, H. Juergens, Osteosarcoma treatment – Where do we stand? A state of the art review, *Cancer Treat. Rev.* 40 (2014) 523.
- [40] T. Kokubo, H. Kushitani, S. Sakka, T. Kitsugi, T. Yamamuro, Solutions able to reproduce in vivo surface-structure changes in bioactive glass-ceramic A-W3, *J. Biomed. Mater. Res.* 24 (1990) 721.
- [41] T. Yoshida, T. Nagasawa, epsilon-Poly-L-lysine: microbial production, biodegradation and application potential., *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 62 (2003) 21.
- [42] N. Gómez-Cerezo, I. Izquierdo-Barba, D. Arcos, M. Vallet-Regí, Tailoring the biological response of mesoporous bioactive materials, *J. Mater. Chem. B.* (2015) 3810.
- [43] A. López-Noriega, D. Arcos, I. Izquierdo-Barba, Y. Sakamoto, O. Terasaki, M. Vallet-Regí, Ordered Mesoporous Bioactive Glasses for Bone Tissue Regeneration, *Chem. Mater.* 18 (2006) 3137.
- [44] K. Štefková, J. Procházková, J. Pacherník, Alkaline Phosphatase in Stem Cells, *Stem Cells Int.* 2015 (2015) 1.
- [45] H. Orimo, The Mechanism of Mineralization and the Role of Alkaline Phosphatase in Health and Disease, *J. Nippon Med. Sch.* 77 (2010) 4.
- [46] J. Bilski, A. Mazur-Bialy, D. Wojcik, J. Zahradnik-Bilska, B. Brzozowski, M. Magierowski, T. Mach, K. Magierowska, T. Brzozowski, The Role of Intestinal Alkaline Phosphatase in Inflammatory Disorders of Gastrointestinal Tract, *Mediators Inflamm.* 2017 (2017) 1.
- [47] L. Zhang, M. Balcerzak, J. Radisson, C. Thouverey, S. Pikula, G. Rard-Azzar, R. Buchet, Phosphodiesterase Activity of Alkaline Phosphatase in ATP-initiated Ca^{2+} and Phosphate Deposition in Isolated Chicken Matrix Vesicles, *J. Biol. Chem.* 280 (2005) 37289.
- [48] R. Li, A.E. Clark, L.L. Hench, An investigation of bioactive glass powders by sol-gel processing, *J. Appl. Biomater.* 2 (1991) 231.
- [49] D. Arcos, M. Vila, A. López-Noriega, F. Rossignol, E. Champion, F.J. Oliveira, M. Vallet-Regí, Mesoporous bioactive glasses: Mechanical reinforcement by means of a biomimetic process, *Acta Biomater.* 7 (2011) 2952.

3.3 Diseño y preparación de andamios macroporosos tridimensionales

3.3 Diseño y preparación de andamios macroporosos tridimensionales

3.3.1 Introducción y antecedentes

Una de las estrategias más interesantes para la reparación de defectos críticos en el tejido óseo consiste en implantar estructuras que mimeticen la matriz extracelular y favorezcan la proliferación y adhesión celulares. Dentro estas matrices destacan los sistemas compuestos cerámica-polímero puesto que su estructura inorgánica-orgánica imita en cierto modo la naturaleza híbrida del hueso. La fabricación de este tipo de andamios puede llevarse a cabo por diferentes técnicas. Una de las más utilizadas para este tipo de propósitos es el *robocasting*, una técnica de preparación aditiva por impresión capa a capa, que permite obtener gran variedad de estructuras y un elevado control sobre la arquitectura de los andamios. El diseño del andamio se lleva a cabo a través de ficheros tipo CAD, como se demuestra en la figura 1 y su preparación se realiza por extrusión de una pasta en la que el polímero se encuentra disuelto y la cerámica dispersa como partículas en suspensión.

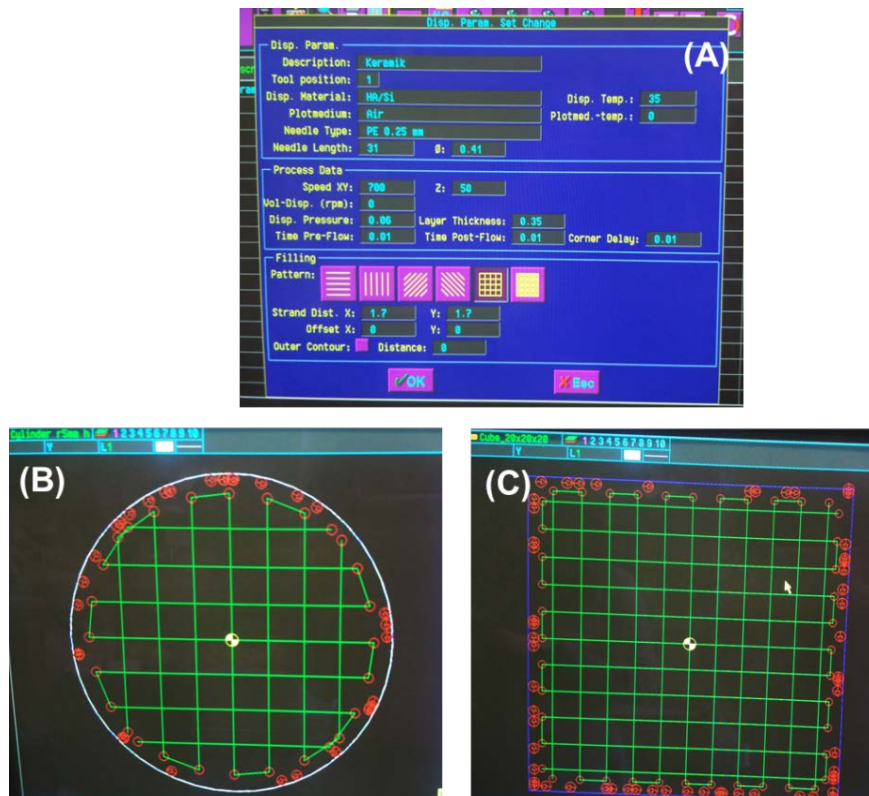


Figura 1. Imágenes del programa utilizado para la impresión de andamios tridimensionales (A) elección de parámetros (B) figura CAD para fabricar andamios cilíndricos (C) figura CAD para fabricar andamios cúbicos.

Los andamios fabricados por *robocasting* basados en MBGs y MBG-Polímero han sido desarrollados por varios grupos de investigación durante los últimos 10 años [1–4]. La motivación para fabricar andamios tridimensionales macroporosos con MBGs se explica por las características de biocompatibilidad, bioactividad, osteoinducción y osteoconducción, potenciada por su elevada porosidad y que hacen de los MBGs excelentes candidatos para fabricar andamios con aplicación en ingeniería del tejido óseo [5].

Los andamios cerámicos basados en MBGs se obtienen mediante la eliminación de la materia orgánica tras su fabricación por *robocasting* aplicando un tratamiento térmico, lo que introduce una porosidad adicional a la mesoporosa y macroporosa proporcionadas por el MBG y el diseño CAD del andamio, respectivamente [6,7]. El principal inconveniente de los andamios preparados por estos métodos es su fragilidad, lo que limita su aplicación clínica en el campo ortopédico. Aunque la formación de la nueva fase de apatita durante el comportamiento bioactivo refuerza la resistencia mecánica de los andamios basados en MBGs, esta mejora no es suficiente para satisfacer los requisitos mecánicos del tejido [8].

La fabricación de andamios macroporosos MBG-polímero ha permitido obtener sistemas con multitud de estructuras y aplicaciones debido a la sinergia entre sus componentes. Este tipo de andamios tridimensionales suponen una mejora cualitativa respecto a las piezas poliméricas pues la osteoconductividad, y osteogénesis se ven notablemente mejoradas, incrementando a su vez las propiedades mecánicas de los andamios cerámicos [2,9–13].

La figura 2 muestra un resumen de las etapas que se suceden tras implantar un andamio *in vivo* y la influencia de las propiedades en el comportamiento celular en su superficie [14]. Los andamios deben poseer una química superficial y topografías que garanticen la adhesión, proliferación, expansión y diferenciación celular en su superficie. En este sentido, la composición química y la rugosidad de la superficie están muy relacionadas con la adhesión celular pues pueden estimular la secreción de especies quimiotácticas que favorecen la migración celular hacia ubicaciones de andamios menos accesibles [15,16].

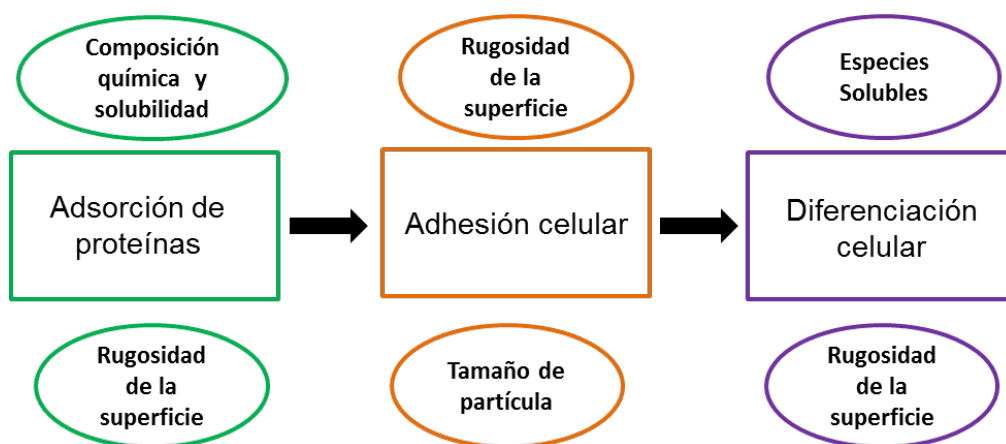


Figura 2. Etapas que se suceden tras la implantación de un andamio *in vivo*.

3.3.2 Preparación de andamios tridimensionales de MBG- ϵ -Policaprolactona (ϵ -PCL)

Para el diseño y preparación de andamios macroporosos MBG-Polímero hemos utilizado la ϵ -PCL como fase continua de nuestros materiales compuestos. La PCL ha sido ampliamente estudiada como biomaterial para la reparación de huesos y cartílagos [17–20] puesto que presenta elevada biocompatibilidad y no genera subproductos tóxicos para el organismo durante su degradación *in vivo* [17,21] siendo numerosos los sistemas preparados con PCL así como en combinación con cerámicas [20,22–25].

La estructura química de la ϵ -PCL (figura 3) confiere a este polímero carácter hidrofóbico y alto grado de cristalinidad, lo que se traduce en tiempos de degradación prolongados.

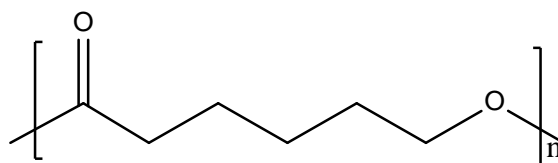


Figura 3. Estructura química de ϵ -policaprolactona

Numerosos estudios basados en andamios macroporosos de ϵ -PCL han demostrado que este polímero permite la adhesión, la proliferación y la función del citoesqueleto de los osteoblastos. Sin embargo, posee comportamiento inerte, si no es activada previamente [26] por lo que carece de comportamiento bioactivo en sí misma. La incorporación de

MBGs como fase inorgánica podría proporcionar comportamiento bioactivo respecto a los andamios exclusivamente poliméricos [27–29].

En esta parte de la tesis, planteamos como hipótesis que la incorporación de MBGs en andamios MBG-PCL no solo son biocompatibles, sino que muestran una mejor adhesión celular y proliferación de osteoblastos en comparación con los andamios fabricados únicamente con ϵ -PCL. Además, planteamos la hipótesis de que la disolución parcial del MBG, libera Ca^{2+} y especies solubles de sílice que actúan como estímulos de diferenciación celular hacia el fenotipo de osteoblástico, actuando como especies quimiotácticas que favorecen la migración celular hacia ubicaciones de menos accesibles de la estructura macroporosa del andamio. Esta migración resulta indispensable para la regeneración del defecto óseo, lo que llevaría a la reabsorción y curación final del paciente [30–32].

Resumen: *In vitro* colonization of stratified bioactive scaffolds by pre-osteoblast cells

En la presente tesis hemos preparado andamios macroporosos por *robocasting* compuestos por PCL y por MBG-PCL, con el objetivo de evaluar la capacidad de migración y colonización de células pre-osteoblásticas en su superficie sin asistencia de flujo dinámico, que facilitarían la migración celular a las regiones internas del andamio. De este modo se ha podido evaluar el efecto que la presencia del MBG y sus productos de disolución ejercen como especies quimiotácticas de los preosteoblastos.

Para este propósito se eligió el MBG $58\text{SiO}_2\text{-}37\text{CaO}\text{-}5\text{P}_2\text{O}_5$ (% en mol) que posee una elevada cantidad de calcio en su estructura, lo que favorecerá su solubilidad respecto a composiciones con menor contenido en calcio y permite el intercambio iónico rápido con el medio. La elevada solubilidad del MBG afecta a la ϵ -PCL que en las condiciones de pH que proporciona el MBG va a degradarse más rápidamente.

A través de un diseño experimental en forma de estratos (figura 4), que se prepararon de forma independiente, se pudo evaluar la migración de las células óseas desde los estratos inferiores hacia los superiores. Cada uno de los estratos se fabricaron en condiciones idénticas por *robocasting* con estructura cúbica, dimensiones 14 x 14 x 3 mm y con composición 60MBG-40PCL (% en masa).

La evaluación de la influencia de las señales químicas, la rugosidad y la estructura del andamio en la colonización celular se evaluaron sembrando en el estrato 1, y depositando los otros estratos sobre él. De este modo, la migración celular y la proliferación celular fueron estudiadas en cada uno de ellos.

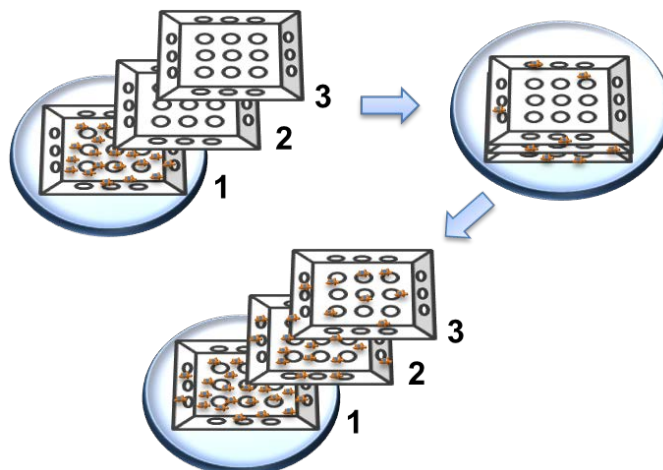
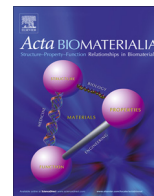


Figura 4. Representación del diseño del experimento por estratos, las células se siembran sobre el estrato 1.

Los estudios de proliferación, morfología y viabilidad celular obtenidos en los diferentes estratos han demostrado una mayor biocompatibilidad de los andamios MBG-PCL así como una mayor adhesión y colonización celular que en los andamios de ϵ -PCL. Mientras que en los estratos 2 y 3 de los andamios de PCL apenas fue posible determinar la presencia celular, en los andamios MBG-PCL se encuentran agrupaciones de tamaño significativo en estos mismos estratos. Estos hechos pueden ser explicados por las señales químicas producidas durante la disolución del MBG, por la formación de una capa de apatita en la superficie de los andamios y por la cantidad de puntos de contacto entre estratos sucesivos, que favorecen la migración celular a través los andamios hacia zonas más alejadas, respecto a la fuente de células inicial situada en el estrato 1.

La diferenciación celular hacia fenotipo celular tipo osteoblasto es otro de las respuestas celulares deseables en materiales utilizados para regeneración ósea. El estudio de la actividad de la ALP como marcador de diferenciación evidencia que la presencia de MBG mejora este proceso debido a las especies de sílice y calcio que se liberan al medio como productos de la disolución del MBG.

Estos resultados ponen de manifiesto los factores que deben tenerse en cuenta para acelerar los procesos de regeneración ósea con este tipo de andamios.



Full length article

In vitro colonization of stratified bioactive scaffolds by pre-osteoblast cells



N. Gómez-Cerezo¹, S. Sánchez-Salcedo¹, I. Izquierdo-Barba, D. Arcos^{*}, M. Vallet-Regí^{*}

Dpto. Química Inorgánica y Bioinorgánica, Universidad Complutense de Madrid, Madrid, Spain
 Instituto de Investigación Sanitaria Hospital 12 de Octubre i+12, Plaza Ramón y Cajal s/n, Madrid, Spain
 Networking Research Center on Bioengineering/Biomaterials and Nanomedicine, CIBER-BBN, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 21 April 2016
 Received in revised form 28 July 2016
 Accepted 10 August 2016
 Available online 10 August 2016

Keywords:

Mesoporous bioactive glasses
 ϵ -Caprolactone
 Scaffolds
 Robocasting
 Preosteoblast

ABSTRACT

Mesoporous bioactive glass-polycaprolactone (MBG-PCL) scaffolds have been prepared by robocasting, a layer by layer rapid prototyping method, by stacking of individual strati. Each stratus was independently analyzed during the cell culture tests with MC3T3-E1 preosteoblast-like cells. The presence of MBG stimulates the colonization of the scaffolds by increasing the cell proliferation and differentiation. MBG-PCL composites not only enhanced pre-osteoblast functions but also allowed cell movement along its surface, reaching the upper stratus faster than in pure PCL scaffolds. The cells behavior on each individual stratus revealed that the scaffolds colonization depends on the chemical stimuli supplied by the MBG dissolution and surface changes associated to the apatite-like formation during the bioactive process. Finally, scanning electron and fluorescence microscopy revealed that the kinetic of cell migration strongly depends on the architectural features of the scaffolds, in such a way that layers interconnections are used as migration routes to reach the farther scaffolds locations from the initial cells source.

Statement of Significance

This manuscript provides new insights on cell behavior in bioceramic/polymer macroporous scaffolds prepared by rapid prototyping methods. The experiments proposed in this work have allowed the evaluation of cell behavior within the different levels of the scaffolds, i.e. from the initials source of cells towards the farther scaffold locations. We could demonstrate that the *in vitro* cell colonization is encouraged by the presence of a highly bioactive mesoporous glass (MBG). This bioceramic enhances the cell migration towards upper strati through the dissolution of chemical signals and the changes occurred on the scaffolds surface during the bioactive process. In addition the MBG promotes preosteoblastic proliferation and differentiation respect to scaffolds made of pure polycaprolactone. Finally, this study reveals the significance of the architectural design to accelerate the cell colonization. These experiments put light on the factors that should be taken into account to accelerate the regeneration processes under *in vivo* conditions.

© 2016 Acta Materialia Inc. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Synthetic scaffolds for bone grafting are becoming a key topic in the field of bone regenerative therapies [1]. These devices are intended to restore the bone morphology and function after severe trauma, tumor extirpation or other causes resulting in skeletal non self-healing defects [2]. Scaffolds can be designed for two different

purposes [3]: i) *ex vivo* tissue engineering techniques and ii) *in situ* tissue regeneration. In the first one, the scaffold is used as a 3D substrate to prefabricate tissue under *ex vivo* conditions and, subsequently, to implant the construct in the defect. On the other hand, manufacturing scaffolds for *in situ* bone regeneration has experienced significant advances in the clinical field in part due to the development of rapid prototyping methods, which allow the fast preparation of scaffolds with customized morphology and pore architecture for each specific case [4–6].

Bone tissue scaffolds are commonly designed as interconnected macroporous structures, with pore sizes between 100 and 1000 μm [7]. These features facilitate the bone ingrowth,

^{*} Corresponding authors at: Dpto. Química Inorgánica y Bioinorgánica, Universidad Complutense de Madrid, Madrid, Spain.

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

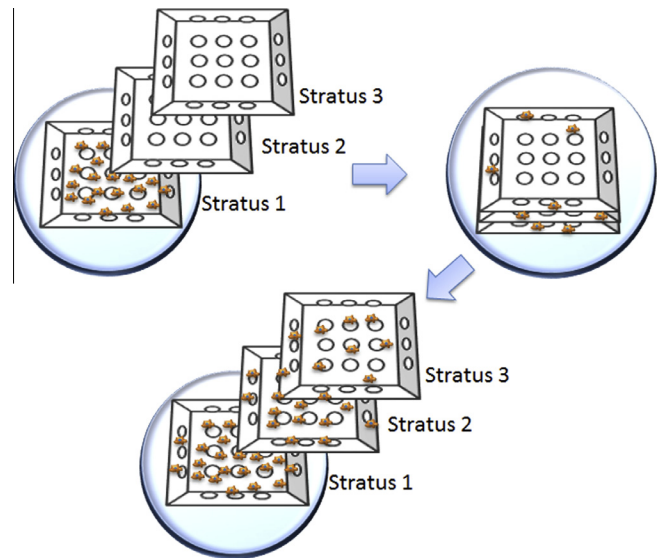
¹ These authors contributed equally to this work.

angiogenesis, as well as the supply of nutrients and withdrawal of metabolic wastes [8]. Together with the prototyped architecture, the design of scaffolds with mesoporous-macroporous hierarchical structures has become one of the most important topics in this field [9–12]. These scaffolds are commonly made of mesoporous bioceramics and contain two or more scaled pores: meso-sized pores, designed through the incorporation of a structure directing agent during the synthesis of the bioceramic and macro-sized pores produced by a rapid prototyped technique. The combination of both porous systems fulfills the tissue scaffolds requirements while providing higher bioactive behavior [13–17] and suggest the possibility of introducing different drugs for control release [9,14,18].

The composition, microstructure and topography of the scaffolds struts determine the success or failure of the implant. In this sense, the scaffolds must exhibit topographies that guarantee the cellular adhesion, spreading, proliferation and cytoskeletal function [19]. In addition, it is highly desirable that degradation byproducts act as cell differentiation stimuli towards osteoblast phenotype, as well as chemotactic species to enhance the cellular migration towards less accessible scaffold locations [20–22]. Occasionally, the lack of accessibility toward deeper locations involves a serious drawback under both *ex vivo* (tissue engineering techniques) and *in vivo* (*in situ* regeneration) conditions. In the *ex vivo* approach, the problem is commonly tackled by designing bioreactors that facilitate the scaffold colonization by means of biomechanical cues including perfusion systems, rotating systems and spinner flasks to perfuse the cell all through the scaffolds [23,24]. In the case of *in vivo* conditions, the colonization of the scaffold depends on its capability to attract osteoprogenitor cells towards the interior of the structure from the peri-implant tissue [25].

In this work, we have prepared macroporous scaffolds made of a mesoporous bioactive glass (MBG) and ϵ -polycaprolactone (PCL), with the aim of evaluating the migration and colonization capabilities of pre-osteoblast cells. PCL is a biocompatible polymer previously used as a component of macroporous scaffolds for bone and cartilage repair [26–33]. PCL has a long degradation time due to its high degree of crystallinity and hydrophobicity and exhibits non-toxicity and non-acidification effects of the byproducts upon the hydrolytic *in vivo* environment [34,35]. However it does not show bioactive behavior without pretreatment to activate the surface [36]. On the other hand, the incorporation of mesoporous bioactive glasses as the inorganic phase in MBG-polymer composite scaffolds provides very interesting features for bone regeneration purposes. Among this features, the improvement of mechanical properties [37,38] and the capability for supplying bioactive behavior [39–41] have largely justified their use as components of materials for bone regeneration purposes. The excellent bioactivity of MBGs is based on their superior surface area and porosity, which increase the amount and rate of ionic exchange with the surrounding fluids and accelerate the nucleation and growth of biomimetic carbonate hydroxyapatite [42–44].

The aim of this work is to evaluate the potential of a SiO_2 -CaO- P_2O_5 MBG to stimulate the colonization of 3D robocasted scaffolds by bone cells. For this purpose, our experimental design entails that bone cells migrate and proliferate against gravity without dynamic flow assistance, so that only the chemical cues, topography and architecture supplied by the scaffold stimulate/allow the cell colonization. The robocasted scaffolds have been printed as independent strati, thus allowing the separated study of each level as a function of culture time with bone cells as represented in Scheme 1. The results obtained in this work put light on the architectural and compositional features that facilitate the colonization from the source of cells towards the most internal regions of the scaffolds.



Scheme 1. Experimental set up for the cell culture tests onto stratified scaffolds. Stratus 1 is placed in contact with the polystyrene of the culture plate and pre-osteoblasts are seeded on it. Strati 2 and 3 are gently placed above in such a way that porous network keeps the continuity. The preosteoblast proliferation is analyzed at different culture times for each independent stratum.

2. Materials and methods

2.1. Reactants

The following reagents were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, USA) Inc.: tetraethylorthosilicate (TEOS), triethyl phosphate (TEP), calcium nitrate tetrahydrate, $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, Pluronic F127, ϵ -caprolactone (Mw = 58,000 Da) and hydrochloric acid (HCl, 37%). Absolute ethanol (EtOH) was purchased from Panreac Química SLU (Castellar del Valles, Barcelona, Spain). All reagents were used as received without further purification. Ultrapure deionized water with resistivity of 18.2 M Ω was obtained using a Millipore Milli-Q plus system (Millipore S.A.S., Molsheim, France).

2.2. Synthesis of mesoporous glasses

Mesoporous 58SiO_2 - 36CaO - $6\text{P}_2\text{O}_5$ (% mol) glasses were synthesized by evaporation induced self-assembly (EISA) process [45]. Tetraethylorthosilicate (TEOS), triethyl phosphate (TEP), and calcium nitrate, $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ were used as SiO_2 , P_2O_5 , and CaO sources, respectively. Non ionic surfactant Pluronic F127 was incorporated as structure-directing agent. F127 (3 g) was dissolved in 45 g of ethanol with 0.75 mL of 0.5 N HCl solution. Afterward TEOS (6 mL), TEP (0.71 mL), and $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (3.95 g) were added under continuous stirring in 3 h intervals. The sols were casted on Petri dishes (9 cm diameter) to undergo the EISA process at 30 °C. The gelation process occurred after 35 h, and the gels were aged for 7 days in Petri dishes at 30 °C. The dried gels were obtained as homogeneous and transparent membranes and treated at 700 °C for 3 h to obtain the final calcined glass powder.

2.3. Fabrication and characterization of PCL and MBG-PCL scaffolds

MBG-PCL scaffolds were prepared through the layer-by-layer deposition method. 3 g of ϵ -caprolactone were dissolved in 40 mL of dichloromethane. Subsequently 4.5 g of MBG suspended in 37.5 mL of dichloromethane were incorporated to this solution and mixed until obtain a homogeneous suspension. The solvent was partially evaporated at room temperature for 2 h. After this

period, the mixture exhibits an appropriated viscosity to be injected through the 3D printer rapid prototyping equipment. For comparison purposes, pure PCL scaffolds were also prepared following the same protocol.

Cuboid scaffolds were designed as a computer assisted design (CAD) file and prepared as a lattice of rods stacked with tetragonal symmetry. Macroporous stratified scaffolds were constructed via polymerization of this mixture using a robotic deposition apparatus (EnvisionTEC GmbH PrefactoryVR 3-D Bioplotter™, Gladbeck, Germany). Each stratus was individually plotted with dimensions $12 \times 12 \times 3$ mm by depositing through a cylindrical needle (diameter = 460 μm) at the volumetric flow rate required to maintain a constant x–y table speed. Finally, the scaffolds were kept at 50 °C overnight to remove the rest of remaining dichloromethane.

The textural properties of the scaffolds were determined by nitrogen adsorption porosimetry with a Micromeritics ASAP 2020 equipment (Micromeritics Co., Norcross, USA). To perform the N_2 adsorption measurements, the samples were previously degassed under vacuum for 24 h, at 45 °C. The surface area was determined using the Brunauer-Emmett-Teller (BET) method [46]. The pore size distribution between 0.5 and 40 nm was determined from the desorption branch of the isotherm by means of the Barret-Joyner-Halenda (BJH) method [47].

The study of meso/macroporosity was carried out by Hg intrusion with a Micromeritics Autopore IV 9500 porosimeter (Micromeritics Co., Norcross, USA). The strati were analyzed in the 0.01–600 μm range, obtaining the porosity percentage and pore volume distribution in the mesopore/macropore range.

Thermogravimetric analysis (TGA) was carried out using a TG/DTA Seiko SSC/5200 thermobalance (Seiko Instruments, Chiva, Japan) between 50 °C and 1000 °C at a heating rate of 1 °C min^{-1} , using platinum crucibles and $\alpha\text{-Al}_2\text{O}_3$ as reference.

Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) was carried out in a Nicolet (Thermo Fisher Scientific) Nexus equipped with a gold-engage attenuated total reflectance device (Thermo Electron Scientific Instruments LLC, Madison, WI USA).

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

2.4. Assessment of in vitro bioactivity

Individual strati of PCL and MBG-PCL scaffolds were soaked in 7 mL of filtered simulated body fluid (SBF) [48], in polyethylene containers at 37 °C under sterile conditions. SEM and FTIR spectroscopy were used to study the evolution of the surface of the glass as a function of soaking time. In order to check whether bioactivity was also observed in standard cell culture medium, the in vitro bioactivity tests were also carried out by soaking the scaffolds in α -Modified Eagle's Medium (α MEM, Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, USA).

Ionic exchange tests were conducted by measuring the Ca^{2+} and pH concentration as a function of soaking time in SBF and α MEM with an Ilyte system (Instrumentation Laboratory, Bedford, MS, USA). The silicon (or silica species) released were determined by Atomic Emission Spectroscopy inductively coupled plasma (ICP-OES). The analysis of the concentration of Silicon release tests was quantified through the emission line Si (250.69 nm) on a Varian, model view AX Pro (Varian Inc, Palo Alto, CA, USA). The concentration was in the calibration range between 0.1 and 10 mmol/L. The measurement was performed in the corresponding emission range of equipment = 167–758 nm.

2.5. Cell culture tests

The scaffolds were sterilized under ultraviolet light for 12 h each side. After that, scaffolds were stabilized in α -Modified Eagle's Medium (α -MEM, Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, USA) with 10% fetal bovine serum (FBS, Gibco, BRL), 1 mM L-glutamine (BioWhittaker Europe, Belgium), penicillin (400 mg mL^{-1} , BioWhittaker Europe, Belgium), and streptomycin (400 mg mL^{-1} , BioWhittaker Europe, Belgium), under a CO_2 (5%) atmosphere at 37 °C for 24 h.

Scheme 1 shows the experimental procedure followed for the cell culture tests. The scaffolds were formed by three stratus individually manufactured by robocasting. Since the strati are the exact replica of the prototype designed in computer assisted design (CAD) file, the morphology, dimensions and porosity are identical among them. Firstly, strati 1 were placed onto the polystyrene culture wells. Subsequently, murine MC3T3-E1 preosteoblasts suspended in complete α -MEM (3·10⁵ cells/mL) were seeded onto strati 1. The culture plates were kept in the incubator for 1 h and subsequently strati 2 and 3 were gently placed onto strati 1. Finally, the wells were filled with 2.5 mL of complete α -MEM and placed under CO_2 (5%) atmosphere at 37 °C for different periods. During the experiment medium wells was replaced every 3 days.

2.6. Cell proliferation: mitochondrial activity

The proliferation was determined in each individual stratus by means of the Alamarblue® method at 1, 5, 8, 15, 21 and 30 days of culture. The Alamarblue® method is based on the reduction of blue fluorogen (resazurin) to a red fluorescent compound (resofurin) by intracellular redox enzymes. A solution of resazurin sodium salt (Sigma Aldrich) at 0.01 mg/mL was prepared in phosphate-buffered saline (PBS) and then diluted 1:10 with culture medium supplemented with 10% FBS. The strati were moved to new wells and the cells were exposed to resazurin solution for 4 h at 37 °C under CO_2 (5%) atmosphere. Then fluorescence signal was read at $\lambda_{\text{em}} = 590$ nm using a $\lambda_{\text{exc}} = 560$ nm with a fluorescence spectrometer Biotek Synergy 4 device. Thereafter, the medium was renewed in order to continue the cell proliferation measurements at different times.

2.7. Cell differentiation: ALP activity

The alkaline phosphatase (ALP) activity of cells growing onto the scaffolds after 5 and 8 days of scaffolds was used as the key differentiation marker in assessing the expression of the osteoblast phenotype. For this purpose, MC3T3-E1 preosteoblasts (1·10⁵ cells/mL) were seeded on stratus 1 using supplemented medium with β -glycerolphosphate (50 mg mL^{-1} , Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, USA) and L-ascorbic acid (10 mM, Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, USA). After 5 and 8 days, the scaffolds were irrigated with PBS two times to remove as much residual serum possible. The cells were detached by subjecting the plates to cycles of freezing and thawing before measuring the ALP activity and total protein content. ALP activity was measured on the basis of the hydrolysis of p-nitrophenylphosphate to p-nitrophenol. After 30 min incubation at 37 °C the reaction was stopped by the addition of 125 μL of 1 M NaOH. The solution obtained was measured using a Helios Zeta UV–vis spectrophotometer at 410 nm.

2.8. Cytotoxicity assay: lactate dehydrogenase (LDH) activity

Extracellular lactate dehydrogenase (LDH) activity was measured in the culture medium after 1 and 4 days, using 33 μL of the culture medium and 1 mL of the kit for quantitative determination of LDH (Spinreact). The LDH activity was measured using a

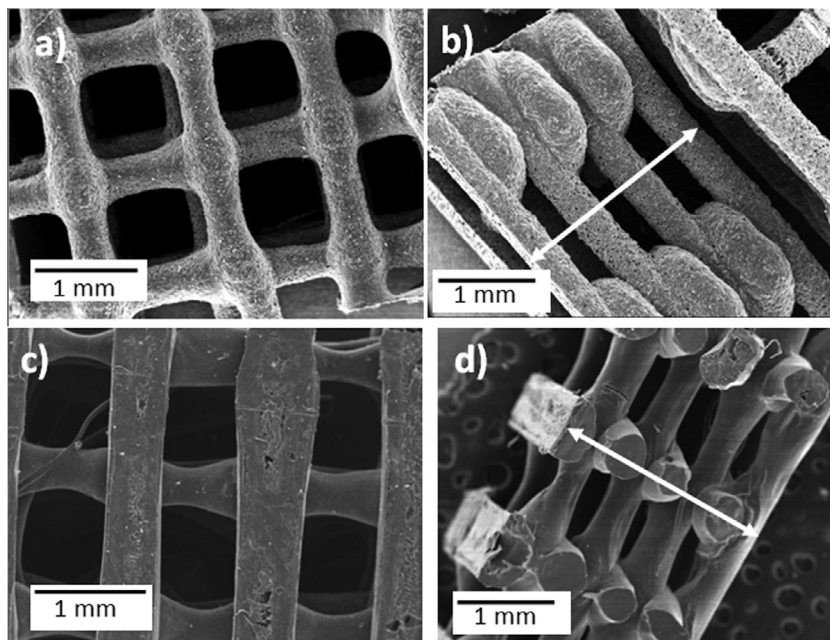


Fig. 1. Scanning electron micrographs obtained from (a) zenithal view of a MBG-PCL stratus; (b) lateral view of a MBG-PCL stratus; (c) zenithal view of a PCL stratus and (d) lateral view of a PCL stratus (magnification $\times 20$) The arrows indicate the height of an individual stratus observed from the lateral views.

Unicam UV 500 UV-Visible spectrophotometer (Spectronic Unicam, South Houston, TX, USA) at 340 nm in the culture medium following the manufacturer protocol.

2.9. Morphological studies by scanning electron microscopy

Cells cultured for 15 days on 3D scaffolds of either PCL or MBG-PCL were rinsed twice in PBS and fixed with 2.5 vol.% glutaraldehyde in PBS for 45 min. Dehydration was performed by slow water replacement by a series of graded ethanol solutions (30, 50, 70, 90, 95%), with final dehydration in absolute ethanol. The scaffolds were mounted on stubs and gold coated in vacuum using a sputter coater (Balzers SCD 004, Wiesbaden-Nordenstadt, Germany). Scanning electron microscopy was then carried out with a JEOL JSM-6400 scanning electron microscope operating at 25 kv.

2.10. Morphological studies by confocal laser scanning microscopy

Fluorescence microscopy was carried out for the observation of attached cells onto the strati 1, 2 and 3 of both kinds of scaffolds. Each stratus was rinsed twice in PBS and fixed in 4% (w/v) paraformaldehyde in PBS with 1% (w/v) sucrose at 37 °C for 20 min. Thereafter, they were washed again with PBS and permeabilized at 4 °C for 5 min with a buffered solution (pH 7.2), which contains 0.5 ml of Triton X-100, 10.3 g sucrose, 0.292 g NaCl, 0.06 g $MgCl_2$ and 0.476 g 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid (HEPES) in 100 ml of water. Non-specific binding sites were blocked with 1% (w/v) bovine serum albumin (BSA) in PBS at 37 °C for 20 min. Then the samples were incubated with Atto 565-conjugated phalloidin (dilution 1:40, Molecular Probes) which stains actin filaments. Samples were then washed with PBS and the cell nuclei were stained with 1 M 40-6 diamino-20-phenylindole in PBS (DAPI) (Molecular Probes). Fluorescence microscopy was performed with a confocal laser scanning microscope OLYMPUS FV1200 (OLYMPUS, Tokyo, Japan), using a 60 \times FLUOR water dipping lens (NA = 1.0). The images were prepared for analysis using Software 3D Imaris to project a single 2D image from the multiple Z sections by using an algorithm that displays the maximum value

of the pixel of each Z slice of 1 μm of depth. The resulting projection was then converted to a TIF file using this software. In the images, DAPI and Atto 565-phalloidin were visualized in blue and red, respectively. The reflection of the scaffold material was visualized in green.

2.11. Statistics

Statistics data are expressed as means-standard deviations of experiments. Statistical analysis was performed using the Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) version 22 software (IBM). Statistical comparisons were made by analysis of variance (ANOVA). Subsequently, post hoc analyses (Scheffé's method) were carried out to correct for multiple comparisons. In all of the statistical evaluations, $p < 0.05$ was considered as statistically significant.

3. Results

3.1. Scanning electron microscopy

Fig. 1 shows the SEM images of the robocasted cuboids strati designed by CAD methods. The strati are made of cylindrical struts of 380 μm in diameter, forming tetragonal pores. The interstitial distance between the struts is 800 μm observed along the z axis projection (**Fig. 1a** and **b**), and 250 μm in height (**Fig. 1c** and **d**). Each stratus is formed by 7 robocasted layers (4 and 3 layers parallel to x and y, respectively) with 2.25 mm in height. Scaffolds were built by stacking three strati as shown in **Scheme 1** and the total height of the scaffolds was 6.75 mm. SEM micrographs also show that the

Table 1
Textural properties of MBG (powder), PCL scaffold and PCL-MBG scaffold.

Material	Surface area ($m^2 \cdot g^{-1}$)	Pore volume ($cm^3 \cdot g^{-1}$)	Pore size (nm)
MBG (powder)	178.8 (± 3.5)	0.290 (± 0.006)	5.6 (± 0.1)
PCL (scaffold)	1.2 (± 0.1)	–	–
MBG-PCL (scaffold)	0.7 (± 0.1)	0.003 (± 0.001)	10.0 (± 0.1)

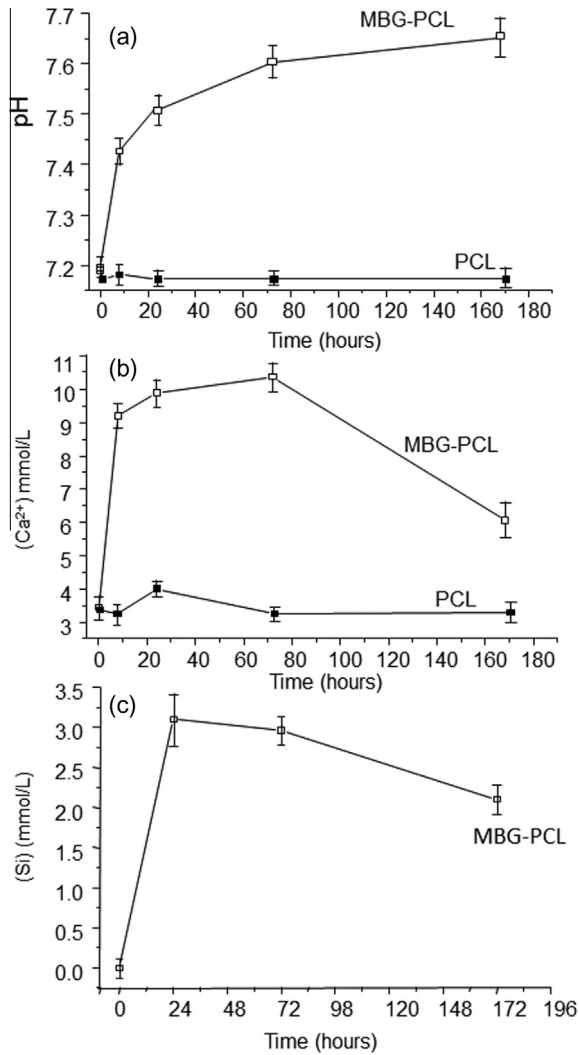


Fig. 2. Chemical changes observed in the Simulated Body Fluid (SBF) as a function of scaffolds soaking time. (a) Evolution of pH values; (b) evolution of Ca^{2+} concentration; (c) evolution of silicon concentration. No silicon was detected in SBF in the case of PCL scaffolds.

PCL scaffolds show a smooth surface (Fig. 1c and d) whereas the MBG-PCL scaffolds exhibit a certain degree of roughness (Fig. 1a and b).

3.2. Thermogravimetric analysis

The experimental PCL/MBG ratio was determined by thermogravimetric (TG) analysis from different parts of the scaffold. The thermograms (Fig. S1 in Supporting information) showed a mass loss of 46% (wt%) between 300 °C and 470 °C that correspond to the thermo oxidative decomposition of the PCL. The remaining 54% correspond with the amount of MBG added to the composite ink for the robocasting process. Similar results were obtained for different scaffolds, pointing out the homogeneous distribution of both phases as well as the concordance between the theoretical and experimental amounts of PCL and MBG.

3.3. Nitrogen adsorption porosimetry

Table 1 shows the textural values obtained by N_2 adsorption porosimetry for the MBG prepared in this work, as well as for PCL and PCL-MBG scaffolds. The MBG shows textural values similar to those reported for MBGs prepared in the SiO_2 -CaO- P_2O_5 system [49]. The isotherm obtained for the MBG (Fig. S2) corresponds with a type IV curve characteristic of mesoporous materials. On the contrary, the scaffolds PCL and MBG-PCL show textural parameters characteristic of non-porous materials, with pore volume values below the detection limit of the equipment.

3.4. In vitro bioactivity tests: materials-SBF ionic exchange

In order to study the in vitro bioactivity of PCL and MBG-PCL scaffolds, the pieces were soaked in SBF for different times. For comparison purposes the bioactivity of the MBG (in powder) was also tested (Fig. S3). The MBG showed a fast Ca^{2+} release to the SBF, together with a pH increase during the first hours, thus indicating a Ca^{2+} - H^+ proton exchange. Subsequently, the calcium concentration in SBF decreased. Fig. 2 shows the pH, Ca and Si concentration in SBF after soaking PCL and MBG-PCL scaffolds for one week. MBG-PCL scaffolds followed a similar ionic exchange than MBG, but with a slower Ca^{2+} release and a lower pH increase compared with pure MBG. In this sense MBG-PCL scaffolds

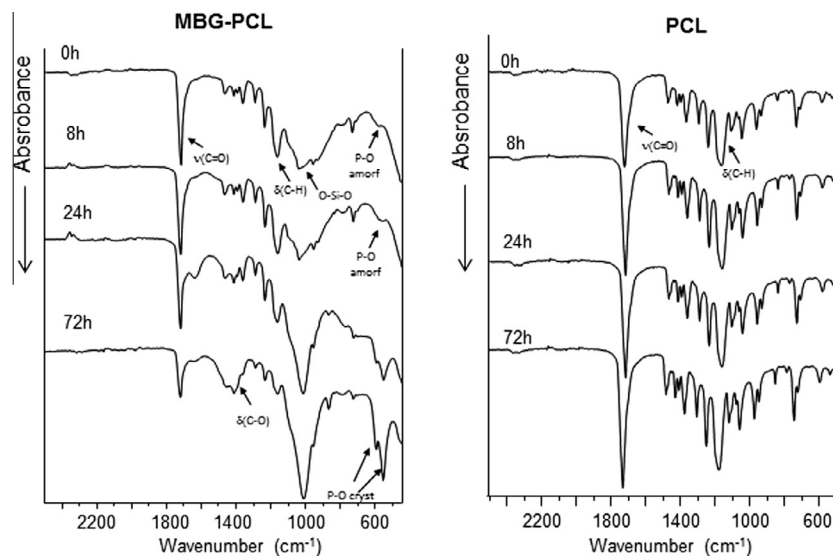


Fig. 3. Fourier Transform Infrared (FTIR) spectra collected from MBG-PCL (left) and PCL (right) scaffolds before and after being soaked in SBF for 8, 24 and 72 h.

required about 80 h for reaching the maximum concentration ($10.4 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$) of Ca^{2+} in SBF. On the other hand, PCL scaffolds did not lead to any significant change on the SBF composition. Fig. 2 also shows the changes of silicon concentration when MBG-PCL is soaked in SBF. The results indicate that MBG-PCL scaffolds release soluble silica species during the first 24 h in SBF (up to $3 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$) followed by a Si concentration decrease (down to $2.2 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$) until the end of the test. As expected, silicon was not detected in SBF when pure PCL scaffolds were soaked (data not shown).

3.5. *In vitro* bioactivity tests: FTIR studies of the scaffolds surface

Fig. 3 shows the FTIR spectra of PCL and MBG-PCL surface after different times in SBF. The spectra collected for MBG-PCL before soaking shows the absorption bands corresponding to the functional groups of PCL and the Si-O and P-O bonds present in the MBG. The weak singlet signal observed at 560 cm^{-1} corresponds to the phosphate (PO_4^{3-}) groups in an amorphous environment as correspond to the P_2O_5 component of the MBG. After 24 h in SBF, the FTIR spectra show an intense doublet at $580\text{--}620 \text{ cm}^{-1}$ characteristic of PO_4^{3-} groups in a crystalline environment and commonly assigned to the formation of an apatite-like phase when bioactive glasses are in contact with SBF or similar biomimetic solutions [50]. The signal at $1400\text{--}1550 \text{ cm}^{-1}$ corresponds to CO_3^{2-} groups and become more intense after 72 h in SBF. In the case of PCL scaffolds, no significant changes were observed in SBF after 7 days of incubation, and the scaffolds surface remained almost unaltered.

3.6. *In vitro* bioactivity tests: SEM studies of the scaffolds surface

Fig. 4a shows the SEM observations of MBG-PCL scaffolds before being soaked in SBF. The micrograph shows a surface with discrete grains coated by a continuous and porous phase, with macropores of $1 \mu\text{m}$ or less (Fig. 4a, inset). After 8 h in SBF, the SEM micrographs show the growth of a new phase onto the PCL-MBG scaffolds (Fig. 4b), which becomes thicker after 24 h in SBF (Fig. 4c). The EDS spectra (Fig. 4e and f) show a significant increase of the Ca and P signals as a function of soaking time, indicating that this new phase is a calcium phosphate based compound. In the case of PCL scaffolds, no significant changes were observed in SBF after 7 days of test, and the scaffolds surface remained almost unaltered (Fig. S4).

3.7. Cell proliferation: mitochondrial activity

Fig. 5 plots the mitochondrial activity measured on the different strati as a function of culture time. In the case of S1 (Fig. 5a), mitochondrial activity was observed in both PCL and MBG-PCL scaffolds, although it was significantly higher in MBG-PCL scaffolds. Interestingly, although the cells were seeded directly onto the strati S1, only a few cells were attached to this stratus after 24 h of culture, whereas most of the cells attached on polystyrene of the culture plate (see Fig. S5). After 5 and 8 days, MC3T3-E1 cells proliferated and colonized the stratus 1 of both PCL and MBG-PCL scaffolds without significant differences between them. After 15 days, MC3T3-E1 cells proliferated significantly better onto the S1 of MBG-PCL compared with the PCL scaffolds. In fact, for longer

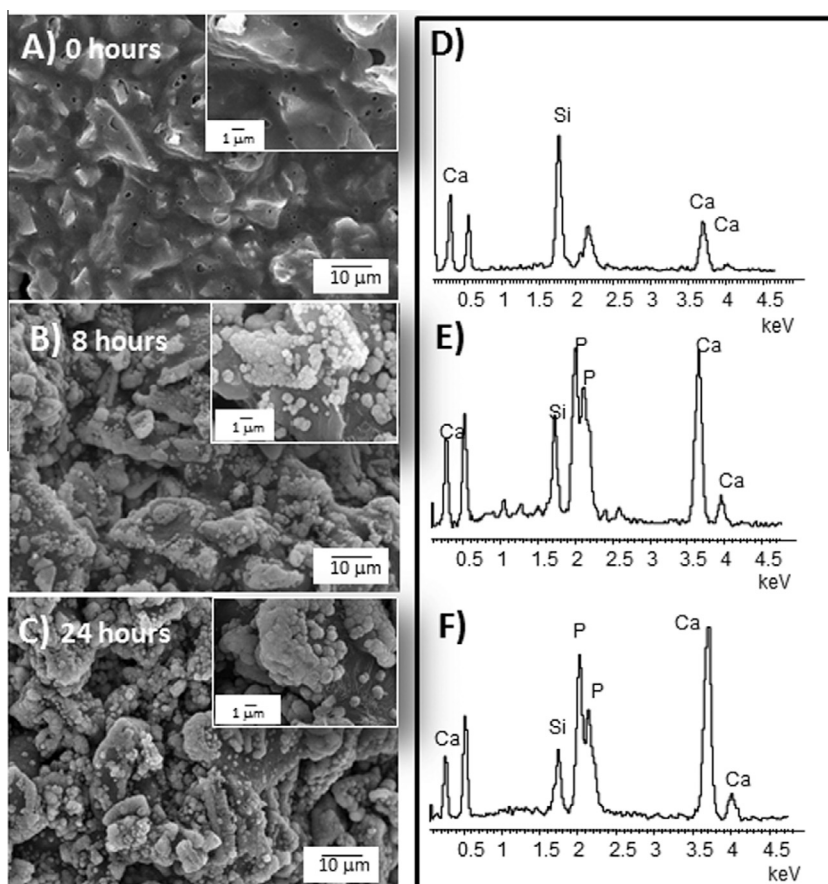


Fig. 4. Scanning electron micrographs of (A) MBG-PCL scaffolds before being soaked in SBF; (B) MBG-PCL scaffold after 8 h in SBF; (C) MBG-PCL scaffold after 24 h in SBF (magnification $\times 1000$). The insets correspond to the same samples collected at higher magnifications ($\times 5000$). Energy-dispersive X-ray (EDS) spectroscopy spectra obtained for (D) MBG-PCL scaffold before being soaked in SBF; (E) MBG-PCL scaffold after 8 h in SBF and (F) MBG-PCL scaffold after 24 h in SBF.

periods, the proliferation onto PCL reaches an asymptotic steady stage, whereas the MBG-PCL allows further proliferation. As a consequence, proliferation differences significantly increase after 30 days of culture. It must be highlighted that at 21 and 30 days, we could also measure a higher amount of MC3T3-E1 cells on S1 of MBG-PCL than in the polystyrene of the culture plate (see Fig. S5), pointing out the high biocompatibility of these scaffolds.

Mitochondrial activity on S2 was observed after 8 days of MC3T3-E1 cells culture in both MBG-PCL and PCL scaffolds (Fig. 5b). After this period, the mitochondrial activity increased in both scaffolds without showing significant differences. After

30 days, MBG-PCL exhibited cell proliferation significantly higher than PCL.

The mitochondrial activity measured in S3 (Fig. 5c) showed the lowest values, indicating that only a few number of cells reached this stratus. More than 8 days of cell culture were required to observe mitochondrial activity. The values measured were systematically higher in MBG-PCL scaffolds compared with PCL, although no statistically significant differences were achieved.

3.8. Morphological studies by scanning electron microscopy

Fig. 6 depicts the SEM micrographs obtained after 15 days of culture for the S1, S2 and S3 strati of both MBG-PCL and PCL scaffolds. The images indicate that S1 and S2 of both scaffolds supported preosteoblast attachment and spreading. After 15 days, cells are confluent and were able to spread well over the surface of S1 and S2. Interestingly, MC3T3-E1 cells spread onto MBG-PCL scaffolds exhibit dorsal ruffles and seem to form a multilayer (Fig. 6a and c), whereas the cells spread onto PCL exhibit smooth dorsal surfaces and seem to form a monolayer (Fig. 6b and d). The SEM observations onto the upper stratus S3 revealed a few agglomerations of cells in the case of MBG-PCL scaffolds, as that shown in Fig. 6e. In the case of PCL scaffolds, only after numerous observations we could find or distinguish isolated preosteoblast cells over this substrate after 15 days of culture (Fig. 6f).

3.9. Confocal laser scanning microscopy

The cells migrating toward upper strati were visualized by staining (Fig. 7). Actin cytoskeleton was stained with phalloidin and the nuclei with DAPI and cells were observed by confocal laser scanning microscopy. As a consequence of the phalloidin absorption by the MBG, actin filaments could not be observed in MBG-PCL scaffolds (Fig. 7a, b and c), although the external cell morphology could be visualized. The image observed for S1 strati in MBG-PCL (Fig. 7a) indicates that, after 21 days of culture, MC3T3-E1 cells have proliferated onto this stratus, in agreement with the images obtained by SEM. In order to visualize those cells migrating upward to S2 and S3, 200 sections of 1 μm thickness along Z axis were acquired and processed in single 2D images. Fig. 7b shows MC3T3-E1 cells migrating upward in S2 stratus of PCL-MBG. The image shows an aggregation of spread cells colonizing the pore walls of S2 from the lower stratus. Fig. 7c shows an image collected from S3 stratus of MBG-PCL scaffold. The image shows a small aggregation of spread cells colonizing the pore walls of S3 from the lower stratus (S2). This kind of aggregation was occasionally visualized on S3 stratus only in MBG-PCL scaffolds. On the contrary, we could not find it after numerous observations in different areas of S3 stratus of PCL scaffolds. Finally, Fig. 7d shows a processed single 2D image along Z axis of an aggregation of MC3T3-E1 cells. Since these scaffolds do not contain MBG, the actin filaments of MC3T3-E1 cells were clearly visualized. The cells show well-developed actin cytoskeletons organized into long parallel bundles, extending protrusions in the direction of migration.

Migrating cells were mainly localized in the crossing points of the scaffolds, i.e. those locations where two rods of successive layers were in contact. In order to explore this finding, we analyzed these locations over different strati of the MBG-PCL scaffolds. Fig. 8 is a representative micrograph of this scenario after 15 days of culture. The micrograph is focused on the crossing point of two layers in the S2 of a MBG-PCL scaffold and provides evidence for the colonization mechanism followed by the cells. Area 1 corresponds to the downward layer of S2 (that is, the one in contact with S1). After 15 days this layer appears fully colonized by MC3T3-E1 cells. Area 2 is occupied by confluent preosteoblasts but corresponds to the crossing point. Although the micrograph

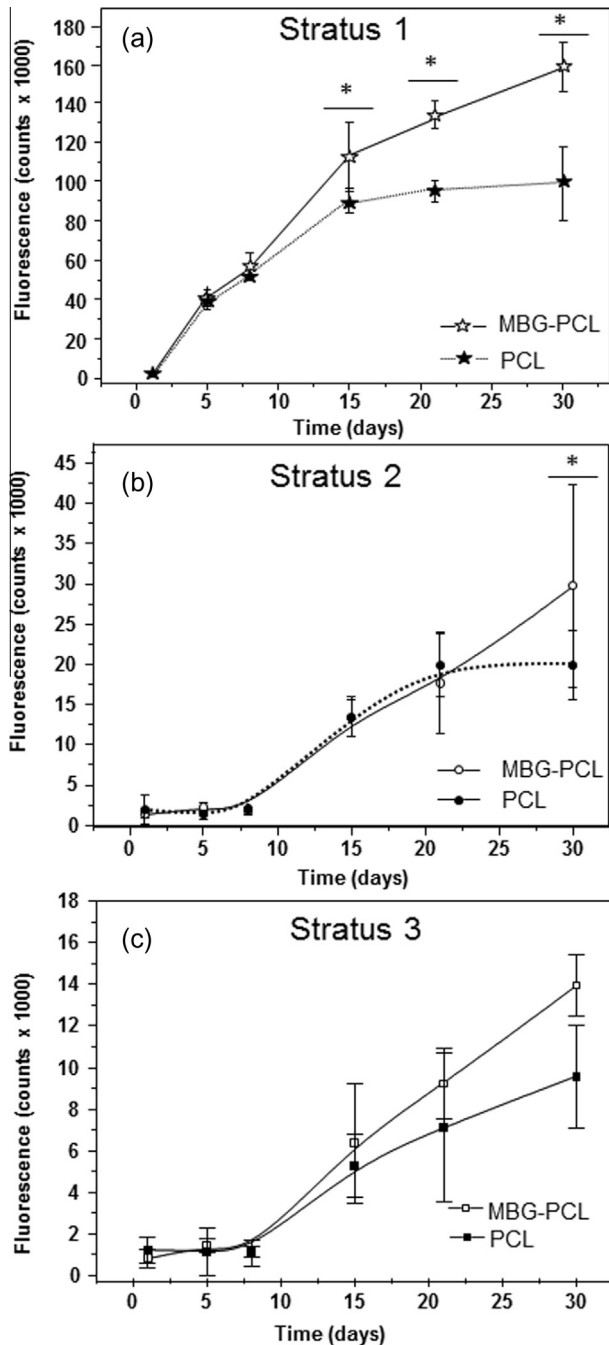


Fig. 5. Proliferation of MC3T3-E1 preosteoblast-like cells as a function of culture time onto MBG-PCL and PCL scaffolds. (a) Proliferation onto strati 1; (b) proliferation onto strati 2 and (c) proliferation onto strati 3. Statistical significance: * $p < 0.05$.

seems to show a flat cell monolayer, there is a slope of about $300\ \mu\text{m}$ (the height of the rods) that the cell monolayer overcomes to access and colonize the upper scaffold layer (area 3). The farthest area to the crossing point (area 4) appears empty of cells.

3.10. Cytotoxicity studies

LDH activity was evaluated as an indicator of cytotoxicity after 1 and 4 days (Fig. 9). Both PCL and MBG-PCL lead to lower LDH values than that observed for polystyrene control, evidencing that none of the scaffolds are cytotoxic.

3.11. Cell differentiation studies

ALP activity was measured as a marker of differentiation towards osteoblast phenotype (Fig. 10). After 5 days, ALP activity of MC3T3-E1 cells was significantly higher ($p < 0.01$) in MBG-PCL than in PCL scaffolds. After 8 days, the ALP activity value on MBG-PCL is even higher not only with respect to PCL scaffolds, but also compared with control.

4. Discussion

It is widely accepted that a scaffold for bone tissue regeneration must have an interconnected macroporosity to allow bone

ingrowth and angiogenesis. *In situ* bone regeneration strategy entails that, after the scaffold implantation in a bone defect, osteoprogenitor cells colonize the inner regions of the scaffolds, involving proliferation and migration mechanisms [51,52]. Whereas cell proliferation entails the scaffold colonization by means of increasing the number of cells, migration entails the cells motion from the bone-implant interface towards the inner scaffold locations. Cell migration onto biomaterials surface is a complex process that implies the reorganization of cytoskeleton to form filopodia and lamellipodia [53]. These elements allow the cellular motion through materials surface. Chemical composition, topography and architecture can be tailored to optimize the scaffolds performance [2,54]. In this work we have studied the behavior of MC3T3-E1 preosteoblast cells with PCL and MBG-PCL scaffolds prepared by robocasting. The architectural features of the CAD model can be easily replicated by the rapid prototyping method used in this work. The composite MBG-PCL scaffolds are homogeneous as could be observed by TGA and consist of MBG grains coated by a continuous phase of PCL.

The MBG exhibits large surface and porosity values, which contribute to the fast *in vitro* bioactivity shown by this compound. However, MBG-PCL scaffolds showed almost negligible textural values even with MBG content above 50% in weight. These results, together with the SEM observations, indicate that PCL is a continuous phase that coats the MBG grains (discrete phase) and masks

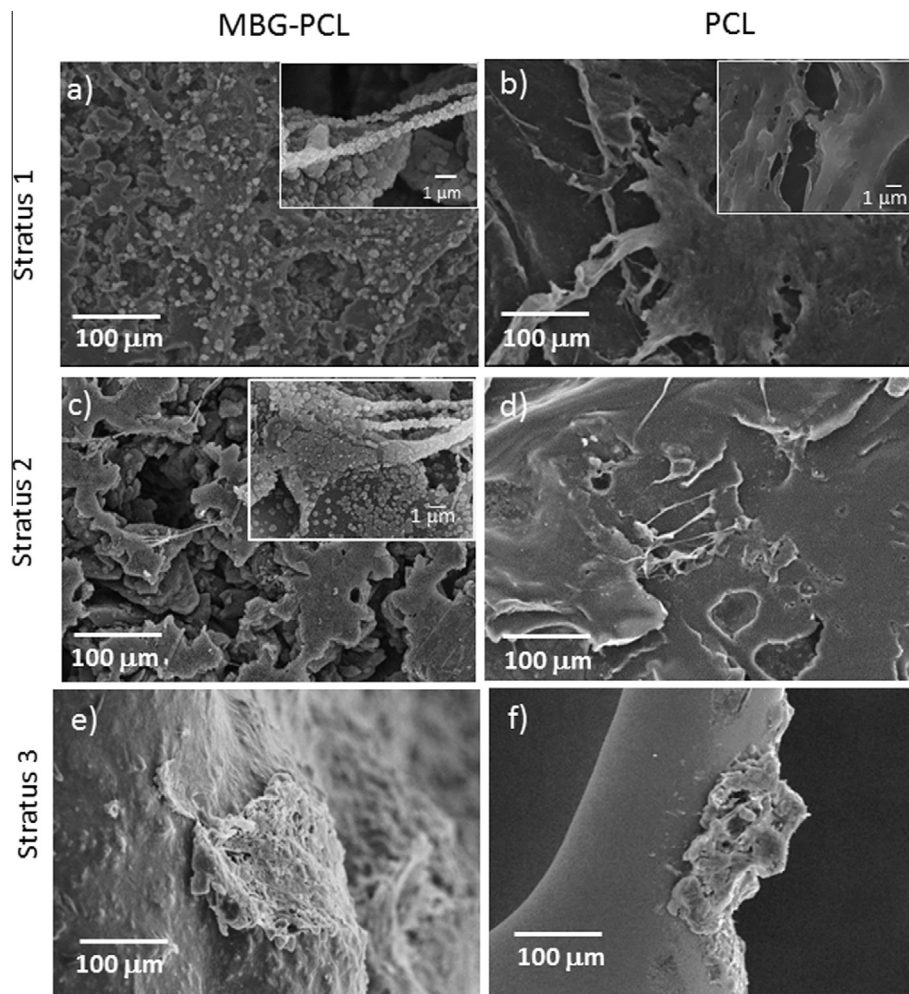


Fig. 6. Representative SEM images showing the spreading of MC3T3-E1 preosteoblast-like cells onto the different strati after 15 days of culture. (a) Stratus 1 of MBG-PCL scaffold; (b) Stratus 1 of PCL scaffold; (c) Stratus 2 of MBG-PCL scaffold; (d) Stratus 2 of PCL scaffold; (e) stratus 3 of MBG-PCL scaffold and (f) stratus 3 of PCL scaffold (magnification $\times 250$). The insets correspond to the same samples collected at higher magnifications ($\times 4000$).

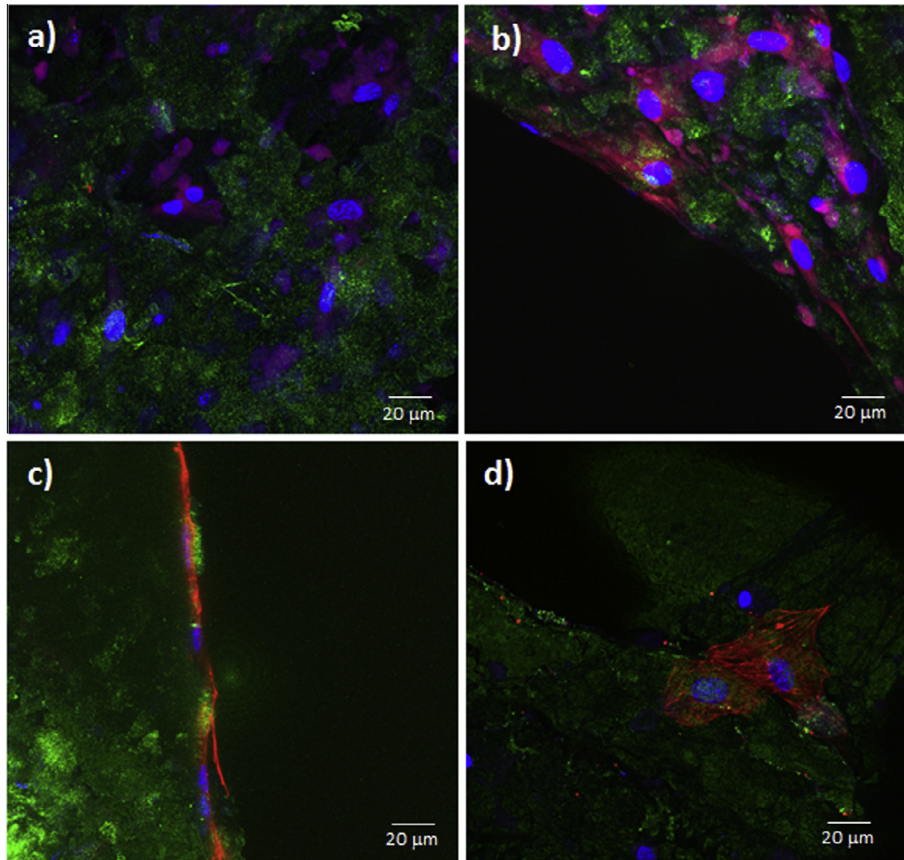


Fig. 7. Representative confocal laser scanning microscope images of PCL-MBG and PCL scaffolds after 21 days of culture (magnification $\times 60$). (a) Image obtained from the plane X-Y of the stratus 1 of MBG-PCL scaffolds. Projected single 2D image from Z sections of (b) stratus 2 of MBG-PCL scaffolds; (c) stratus 3 of MBG-PCL scaffolds and (d) stratus 2 of PCL scaffolds. Actin was stained with Atto 565-conjugated phalloidin (red), nuclei were stained with DAPI (blue) and the scaffolds material is visualized in green. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

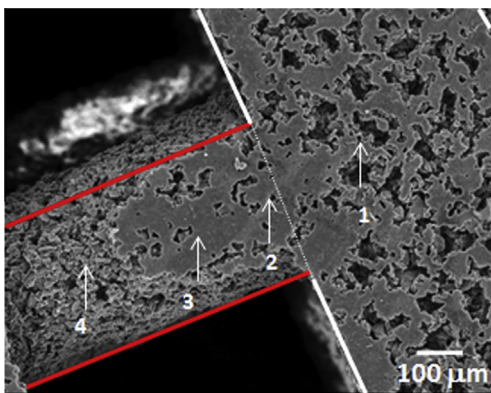


Fig. 8. SEM image (magnification $\times 100$) obtained for an intersection point of the Stratus 2 of MBG-PCL (15 days of culture). (1) Bottom side of the stratus; (2) Intersection point between scaffold struts. The one highlighted in red is sited in an upper height; (3) Area of the upper strut colonized by pre-osteoblasts; (4) Area of the upper strut non-colonized by pre-osteoblasts. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

the surface and porosity of the bioactive glass. This scenario could be a serious drawback, as the masking of the MBG porosity would inhibit the bioactive behavior of the MBG. However, the Ca^{2+} - H^+ ionic exchange occurs as could be demonstrated by the SBF as a function of soaking time. In this sense, the macropores observed by SEM and measured by Hg intrusion porosimetry (Fig. S6) would facilitate this ionic exchange. Taking into account the hydrophobic-

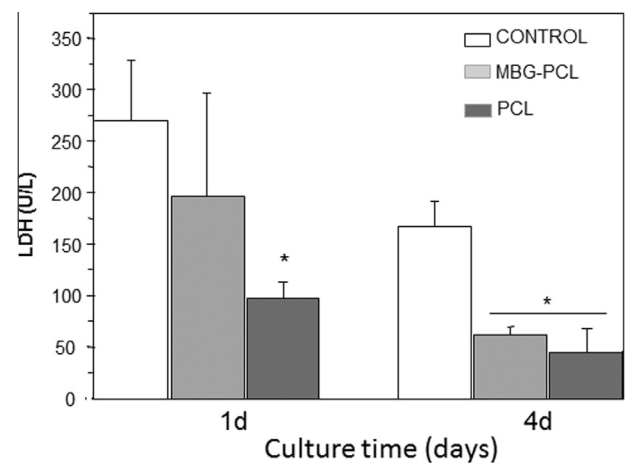


Fig. 9. LDH activity of preosteoblasts on MBG-PCL and PCL scaffolds after 1 and 4 days of culture. Statistical significance: * $p < 0.05$.

ity of PCL, this porosity seems to play an important role in the bioactive behavior, as it would allow the contact of the MBG with the surrounding fluids. The subsequent growth of an apatite-like phase is evidenced by the SEM studies and entails important changes in the scaffolds topography by increasing the roughness. After 8 h of treatment, the EDS and FTIR spectra indicate the nucleation and growth of a new carbonated calcium phosphate phase over this scaffold. FTIR spectra showed a singlet band at

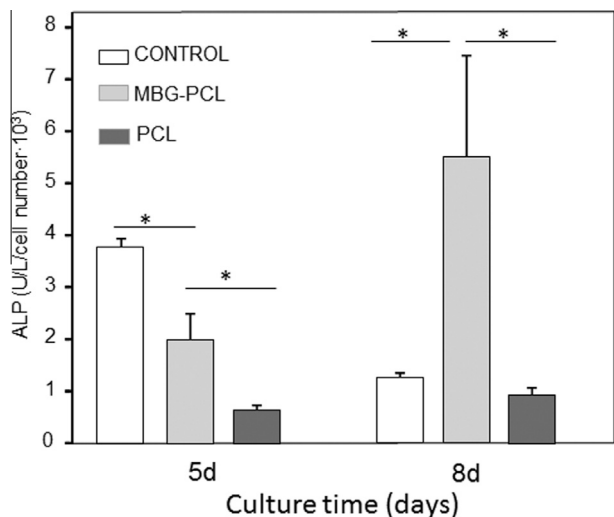


Fig. 10. ALP activity of preosteoblasts on MBG-PCL and PCL scaffolds after 5 and 8 days of culture. Statistical significance: $p < 0.05$.

600 cm^{-1} . This band correspond to the bending mode O–P–O characteristic of phosphate in an amorphous environment, which is a normal stage during the bioactive processes occurring on bioactive glasses when they are soaked into biomimetic solutions [55,56]. These results indicate that, despite of the masking of MBG textural properties by the PCL, the MBG develops its bioactive properties in a successful manner. After 24 h in SBF, MBG-PCL developed an apatite like phase on the surfaces, as can be deduced from the doublet at $580\text{--}610\text{ cm}^{-1}$. Very similar results were obtained when MBG-PCL scaffolds were soaked in α -MEM (Fig. S7), pointing out that this process also occurs not only in contact with SBF but also with the cell culture media used in this work. The formation of this apatite-like phase also occurs under *in vivo* conditions and has been described as an essential step during the bioglasses osteointegration *in vivo*. The newly formed apatite provides an excellent layer for the adhesion of osteoprogenitor cells and collagen deposition [57].

On the contrary, the *in vitro* bioactivity tests carried out on PCL scaffold demonstrated that PCL is a non-bioactive compound with certain stability in the physiological environment. Actually, after 24 h of treatment in SBF or α -MEM the surface of PCL scaffolds remains unaltered. This fact indicates that PCL scaffold will not osteointegrate under *in vivo* conditions, eliciting the formation of a fibrous tissue around the implant [58].

The experimental set up for cell culture tests used in this work provides valuable information about the cell proliferation rate in the different scaffold locations, i.e. from the nearest to the farthest site with respect to the source of cells. Moreover, we could also observe the migration routes used by the MC3T3-E1 to colonize the less accessible scaffold locations. Both PCL and MBG-PCL scaffolds are colonized by preosteoblast in their three strati, although the presence of MBG increases the cell proliferation, especially after 15 days of culture.

The higher cell proliferation is related with the bioactive behavior provided by this component, which enhances the scaffold colonization through a proliferation mechanism. The colonization stimulation would be mediated by the dissolution of ionic species such as soluble silica and Ca^{2+} together with the formation of an apatite like phase onto the scaffolds surface. These reactions that occur when the MBG-PCL scaffolds are in contact with SBF, also take place in contact with the culture medium. In this sense, Yun et al. [59] demonstrated that pre-coating PCL-MBG composites with apatite dramatically enhanced the proliferation and differentiation of preosteoblast MC3T3-E1 cells, because the new rougher topogra-

phy developed by the materials favors the adsorption of serum proteins and enhance the cell adhesion. Besides, the Ca^{2+} and silica species released could also improve the cell colonization in MBG-PCL scaffolds. The ability of extracellular calcium to regulate cell specific responses has been previously reported [60]. Increased levels of extracellular calcium induce osteoblast proliferation and chemotaxis through binding to a G-protein coupled extracellular calcium sensing receptor. Finally, although a cellular receptor for Si has not been identified, there are solid evidences of the action of this element over the bone metabolism [61]. Solutions of high silicon concentration induce proliferation in human osteoblast-like cells [62] and Xynos et al. demonstrated that solutions containing Ca^{2+} and soluble silica stimulated the induction of genes with known roles in processes relevant to osteoblast metabolism and bone homeostasis [63,64].

Migration entails the cell displacement over the scaffold surface. In this case, colonization of the upper S3 strati (initially without cells) involves the pre-osteoblast migration from the initial source of cells (the S1 stratus and the polystyrene bottom of the culture well) upward to the farther stratus on the top of the scaffold. The presence of MC3T3-E1 cells in S2 was observed after 8–15 days of culture in both PCL and PCL-MBG scaffolds, when the cells were already confluent on S1. A similar trend was observed in S3, where cells were also detected after 8–15 days of culture, although to a lesser extent. Cells migrate from S1 to upper strati after 7 days of culture and they have to reach S2 before getting to S3. The fact that cells were detected at the same time in S2 and S3 seems to be an artifact of the time points chosen. These data indicate that the confluence in the lower region of the scaffold (S1) is a cue to initiate the colonization of upper strati, which favors the proliferation and, consequently, promotes a faster colonization.

Cell migration onto the scaffolds surface entails the formation of lamellipodia through the reorganization of the cytoskeleton. Cells develop lamellipodia that establish contacts and adhere to the substrate. The contact lamellipodia-scaffold surface form focal adhesions and the cell moves forward, while retracting the rear part [65,66]. In order to develop this complex motion mechanism, pre-osteoblasts must follow the connections between layers to move towards upper layers and strati, as could be observed by the cell spread around the connection points. Besides, fluorescence microscopy studies evidence that the cells accumulated on S2 and S3 were also mainly located on the contact points between rods. In the case of PCL scaffolds, it could be observed that cells exhibit cytoskeleton organization characteristics of migrating cells or in the initial stages of migration [67,68]. Consequently, the number of contact points would influence the migration rate upwards to the upper strati, as they are the access routes towards the top of the scaffolds. In our case, the scaffolds architecture of PCL and MBG-PCL are almost identical, so that the time required to migrate from the polystyrene upwards to higher strati were similar in both kind of scaffolds. MBG-PCL (and also PCL) scaffolds can allow the cellular migration upwards to the farthest regions if they exhibit an appropriated architecture, i.e. with enough rod to rod orthogonal contacts that allows for cells to move upward to the top of the scaffolds. However, due to the enhanced cell proliferation mediated by the presence of MBG, the colonization of the scaffold proceeds faster in the case of MBG-PCL composites.

The low LDH levels in the scaffolds also indicate the high biocompatibility of the manufactured materials. Compared with the extracellular LDH measured on the polystyrene plate, scaffolds exhibited significantly lower values. This is indicative that after reaching the confluence in the culture plate, the detached cells become impaired releasing the LDH. When the scaffolds are present, after reaching the confluence in the polystyrene plate, the cells can colonize the additional surface of the scaffolds, avoiding the detachment and the cellular death by *anoikis* [69].

Finally, scaffolds for *in situ* bone tissue regeneration must also favor the differentiation of osteoprogenitors towards osteoblast phenotype. The results obtained by ALP activity evidence that the presence of MBG enhances the differentiation process. Several authors have explained the effects of dissolution products of bioactive glasses over the differentiation of bone cells. There is a common agreement about the stimulation role of silica, but the action of Ca^{2+} is unclear and depends on the cell lineage tested. For instance, Xynos et al. observed that the concentration of extracellular calcium resulted in a decrease of ALP activity in mature osteoblasts cultured onto Bioglass 45S5 [70], as well as in the presence with increased concentrations of CaCl_2 solutions. On the contrary, increased ALP activities are commonly observed in cells with higher differentiation capability than mature adult osteoblasts such as fetal osteoblasts [71] or mesenchymal stem cells [72–74] exposed to bioglass conditioned media. The positive effect of other cations such as Sr^{2+} [75,76] or Cu^{2+} [77] have been also observed. Since MC3T3-E1 preosteoblast also have a higher differentiation capability than mature adult osteoblasts, our case seems to fit better with the positive effect of Ca^{2+} release over the ALP activity.

5. Conclusions

Composites of PCL and MBG-PCL have been manufactured as 3D macroporous scaffolds by robocasting, a rapid prototyping method, with potential for bone tissue regeneration purposes. With the aim of evaluating the MBG capability to stimulate the scaffold colonization by preosteoblast cells, the scaffolds have been prepared by stacking three independent strati and the proliferation has been quantified in the different strati as a function of culture time.

The MBG-PCL scaffolds consist of MBG grains coated by a polymeric phase of PCL that mask the textural properties of the mesoporous ceramic. However, the MBG is able to exchange ionic species with the surrounding fluids, thus leading to an excellent *in vitro* bioactive behavior.

The presence of MBG stimulates the scaffolds colonization by increasing the cell proliferation and differentiation. The cells migration from the bottom towards upper strati through the scaffold macropores seems to be mainly dependent on the architectural features.

The cell colonization towards upper strati is favored by the chemical signals produced during the MBG dissolution, the formation of an apatite layer onto the scaffolds struts and the amount contact points between successive layers, which provide the access routes towards the farthest regions respect to the initial cells source.

These experiments put light on the factors that should be taken into account to accelerate the regeneration processes with this kind of scaffolds, which must be corroborated under *in vivo* conditions.

Acknowledgements

This study was supported by research grants from the, Ministerio de Economía y Competitividad (projects MAT2013-43299-R and MAT2015-64831-R) and Ageing Network of Excellence (CSO2010-11384-E). N. Gómez-Cerezo is greatly indebted to Ministerio de Ciencia e Innovación for predoctoral fellowship. The authors also wish to thank the staff of the ICTS Centro Nacional de Microscopía Electrónica (Spain) of the Universidad Complutense de Madrid (Spain) for the assistance in the scanning electron microscopy.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.actbio.2016.08.014>.

References

- [1] M.M. Stevens, Biomaterials for bone tissue engineering, *Mater. Today* 11 (2008) 18–25.
- [2] D.W. Hutmacher, Scaffolds in tissue engineering bone and cartilage, *Biomaterials* 21 (2000) 2529–2543.
- [3] X. Yu, X. Tang, S.V. Gohil, C.T. Laurencin, Biomaterials for bone regenerative engineering, *Adv. Healthc. Mater.* 4 (2015) 1268–1285.
- [4] L. Moroni, A. Nandakumar, F.B. de Groot, C.A. van Blitterswijk, P. Habibovic, Plug and play: combining materials and technologies to improve bone regenerative strategies, *J. Tissue Eng. Regen. Med.* 9 (2015) 745–759.
- [5] Q. Peng, Z. Tang, O. Liu, Z. Peng, Rapid prototyping-assisted maxillofacial reconstruction, *Ann. Med.* 47 (2015) 186–208.
- [6] S.M. Giannelli, D. Accoto, M. Trombetta, A. Rainer, Current trends in the design of scaffolds for computer-aided tissue engineering, *Acta Biomater.* 10 (2014) 580–594.
- [7] V. Karageorgiou, D. Kaplan, Porosity of 3D biomaterial scaffolds and osteogenesis, *Biomaterials* 26 (2005) 5474–5491.
- [8] S.J. Hollister, Porous scaffold design for tissue engineering, *Nat. Mater.* 4 (2005) 518–524.
- [9] H. Yun, S. Kim, Y. Hyeon, Design and preparation of bioactive glasses with hierarchical pore networks, *Chem. Commun.* 2139–2141 (2007).
- [10] H. Yun, S. Kim, Y. Hyun, S. Heo, J. Shin, Three-dimensional mesoporous – giantporous inorganic/organic composite scaffolds for tissue engineering, *Chem. Mater.* 19 (2007) 6363–6366.
- [11] A. García, I. Izquierdo-Barba, M. Colilla, C.L. de Laorden, M. Vallet-Regí, Preparation of 3-D scaffolds in the $\text{SiO}_2\text{-P}_2\text{O}_5$ system with tailored hierarchical meso-macroporosity, *Acta Biomater.* 7 (2011) 1265–1273.
- [12] X. Han, X. Li, H. Lin, J. Ma, X. Chen, C. Bian, X. Wu, F. Qu, Hierarchical meso-macroporous bioglass for bone tissue engineering, *J. Sol-Gel Sci. Technol.* 70 (2014) 33–39.
- [13] H. Lin, J. Ma, X. Li, X. Wu, F. Qu, A co-templated approach to hierarchically mesoporous-macroporous bioactive glasses (MMBG) scaffolds for bone tissue regeneration, *J. Sol-Gel Sci. Technol.* 62 (2012) 170–176.
- [14] S. Shrutti, A.J. Salinas, G. Lusvardi, G. Malavasi, L. Menabue, M. Vallet-Regí, Mesoporous bioactive scaffolds prepared with cerium-, gallium- and zinc-containing glasses, *Acta Biomater.* 9 (2013) 4836–4844.
- [15] G. Wei, X. Yan, J. Yi, L. Zhao, L. Zhou, Y. Wang, C. Yu, Synthesis and *in-vitro* bioactivity of mesoporous bioactive glasses with tunable macropores, *Microporous Mesoporous Mater.* 143 (2011) 157–165.
- [16] C. Wu, Y. Luo, G. Cuniberti, Y. Xiao, M. Gelinsky, Three-dimensional printing of hierarchical and tough mesoporous bioactive glass scaffolds with a controllable pore architecture, excellent mechanical strength and mineralization ability, *Acta Biomater.* 7 (2011) 2644–2650.
- [17] C. Wu, W. Fan, Y. Zhu, M. Gelinsky, J. Chang, G. Cuniberti, V. Albrecht, T. Friis, Y. Xiao, Multifunctional magnetic mesoporous bioactive glass scaffolds with a hierarchical pore structure, *Acta Biomater.* 7 (2011) 3563–3572.
- [18] A. López-Noriega, D. Arcos, M. Vallet-Regí, Functionalizing mesoporous bioglasses for long-term anti-osteoporotic drug delivery, *Chem. Eur. J.* 16 (2010) 10879–10886.
- [19] M.B. Rahmany, M. Van Dyke, Biomimetic approaches to modulate cellular adhesion in biomaterials: a review, *Acta Biomater.* 9 (2013) 5431–5437.
- [20] A.R. Amini, C.T. Laurencin, S.P. Nukvarapu, Bone tissue engineering: recent advances and challenges, *Crit. Rev. Biomed. Eng.* 40 (2012) 363–408.
- [21] J.E. Gough, J.R. Jones, L.L. Hench, Nodule formation and mineralisation of human primary osteoblasts cultured on a porous bioactive glass scaffold, *Biomaterials* 25 (2004) 2039–2046.
- [22] J.R. Jones, O. Tsigkou, E.E. Coates, M.M. Stevens, J.M. Polack, L.L. Hench, Extracellular matrix formation and mineralization on a phosphate-free porous bioactive glass scaffold using primary human osteoblast (HOB) cells, *Biomaterials* 28 (2007) 1653–1663.
- [23] T.J. Lujan, K.M. Wirtz, C.S. Bahney, S.M. Madey, B. Johnstone, M. Bottlang, A novel bioreactor for the dynamic stimulation and mechanical evaluation of multiple tissue-engineered constructs, *Tissue Eng. Part C. Methods* 17 (2011) 367–374.
- [24] H. Mertsching, J. Hansmann, *Bioreactor Technology in Cardiovascular Tissue Engineering*, 2009. pp. 29–37.
- [25] F. Jakob, R. Ebert, A. Ignatius, T. Matsushita, Y. Watanabe, J. Groll, H. Walles, Bone tissue engineering in osteoporosis, *Maturitas* 75 (2013) 118–124.
- [26] H.-M. Lin, Y.-H. Lin, F.-Y. Hsu, Preparation and characterization of mesoporous bioactive glass/polycaprolactone nanofibrous matrix for bone tissues engineering, *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 23 (2012) 2619–2630.
- [27] L. Meseguer-Olmo, V. Vicente-Ortega, M. Alcaraz-Baños, J.L. Calvo-Guirado, M. Vallet-Regí, D. Arcos, A. Baeza, *In-vivo* behavior of Si-hydroxyapatite/polycaprolactone/DMB scaffolds fabricated by 3D printing, *J. Biomed. Mater. Res. Part A*. 101A (2013) 2038–2048.
- [28] J.M. Williams, A. Adewunmi, R.M. Schek, C.L. Flanagan, P.H. Krebsbach, S.E. Feinberg, S.J. Hollister, S. Das, Bone tissue engineering using polycaprolactone scaffolds fabricated via selective laser sintering, *Biomaterials* 26 (2005) 4817–4827.
- [29] R.L. Prabhakar, S. Brocchini, J.C. Knowles, Effect of glass composition on the degradation properties and ion release characteristics of phosphate glass-polycaprolactone composites, *Biomaterials* 26 (2005) 2209–2218.
- [30] D.W. Hutmacher, T. Schantz, I. Zein, K.W. Ng, S.H. Teoh, K.C. Tan, Mechanical properties and cell cultural response of polycaprolactone scaffolds designed

- and fabricated via fused deposition modeling, *J. Biomed. Mater. Res.* 55 (2001) 203–216.
- [31] P.S.P. Poh, D.W. Hutmacher, M.M. Stevens, M.A. Woodruff, Fabrication and in vitro characterization of bioactive glass composite scaffolds for bone regeneration, *Biofabrication* 5 (2013) 12.
- [32] B.A. Allo, A.S. Rizkalla, K. Mequanint, Hydroxyapatite formation on sol-gel derived poly(ϵ -caprolactone)/bioactive glass hybrid biomaterials, *ACS Appl. Mater. Interfaces* 4 (2012) 3148–3156.
- [33] L. Radev, D. Vladov, I. Michailova, E. Cholakova, M.F.V. Fernandes, I.M.M. Salvado, In vitro bioactivity of polycaprolactone/bioglass composites, *Int. J. Mater. Chem.* 3 (2013) 91–98.
- [34] M.E. Hoque, W.Y. San, F. Wei, S. Li, M.-H. Huang, M. Vert, D.W. Hutmacher, Processing of polycaprolactone and polycaprolactone-based copolymers into 3D scaffolds, and their cellular responses, *Tissue Eng. Part A* 15 (2009) 3013–3024.
- [35] B. Chuenjitkuntaworn, W. Inrung, D. Damrongsri, K. Mekaapiruk, P. Supaphol, P. Pavasant, Polycaprolactone/hydroxyapatite composite scaffolds: preparation, characterization, and in vitro and in vivo biological responses of human primary bone cells, *J. Biomed. Mater. Res. A* 94 (2010) 241–251.
- [36] A. Oyane, M. Uchida, C. Choong, J. Triffitt, J. Jones, A. Ito, Simple surface modification of poly(ϵ -caprolactone) for apatite deposition from simulated body fluid, *Biomaterials* 26 (2005) 2407–2413.
- [37] A. El-Fiqi, J.H. Lee, E.-J. Lee, H.-W. Kim, Collagen hydrogels incorporated with surface-aminated mesoporous nanobioactive glass: improvement of physicochemical stability and mechanical properties is effective for hard tissue engineering, *Acta Biomater.* 9 (2013) 9508–9521.
- [38] D. Arcos, M. Vila, A. López-Noriega, F. Rossignol, E. Champion, F.J. Oliveira, M. Vallet-Regí, Mesoporous bioactive glasses: mechanical reinforcement by means of a biomimetic process, *Acta Biomater.* 7 (2011) 2952–2959.
- [39] J. Wei, F. Chen, J.-W. Shin, H. Hong, C. Dai, J. Su, C. Liu, Preparation and characterization of bioactive mesoporous wollastonite – polycaprolactone composite scaffold, *Biomaterials* 30 (2009) 1080–1088.
- [40] J. Zuo, Y. Wang, T.S. Chung, Novel organic-inorganic thin film composite membranes with separation performance surpassing ceramic membranes for isopropanol dehydration, *J. Memb. Sci.* 433 (2013) 60–71.
- [41] S. Yang, J. Wang, L. Tang, H. Ao, H. Tan, T. Tang, C. Liu, Mesoporous bioactive glass doped-poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) composite scaffolds with 3-dimensionally hierarchical pore networks for bone regeneration, *Colloids Surf. B. Biointerfaces* 116 (2014) 72–80.
- [42] X. Yan, C. Yu, X. Zhou, J. Tang, D. Zhao, Highly ordered mesoporous bioactive glasses with superior in vitro bone-forming bioactivities, *Angew. Chem. - Int. Ed.* 43 (2004) 5980–5984.
- [43] A. López-Noriega, D. Arcos, I. Izquierdo-Barba, Y. Sakamoto, O. Terasaki, M. Vallet-Regí, Ordered mesoporous bioactive glasses for bone tissue regeneration, *Chem. Mater.* 18 (2006) 3137–3144.
- [44] I. Izquierdo-Barba, D. Arcos, Y. Sakamoto, O. Terasaki, A. López-Noriega, M. Vallet-Regí, High-performance mesoporous bioceramics mimicking bone mineralization, *Chem. Mater.* 20 (2008) 3191–3198.
- [45] C.J. Brinker, Y. Lu, A. Sellinger, H. Fan, Evaporation-induced self-assembly: nanostructures made easy, *Adv. Mater.* 11 (1999) 579–585.
- [46] S. Brunauer, P.H. Emmett, E. Teller, Adsorption of gases in multimolecular layers, *J. Am. Chem. Soc.* 60 (1938) 309–319.
- [47] E.P. Barret, L.J. Joyner, P.P. Halenda, The determination of pore volume and area distributions in porous substances. I. Computations from nitrogen isotherms, *J. Am. Chem. Soc.* 73 (1951) 373–380.
- [48] T. Kokubo, H. Kushitani, S. Sakka, T. Kitsugi, T. Yamamuro, Solutions able to reproduce in vivo surface-structure changes in bioactive glass-ceramic A-W, *J. Biomed. Mater. Res.* 24 (1990) 721–734.
- [49] N. Gómez-Cerezo, I. Izquierdo-Barba, D. Arcos, M. Vallet-Regí, Tailoring the biological response of mesoporous bioactive materials, *J. Mater. Chem. B.* (2015) 3810–3819.
- [50] A.L.B. Maçon, T.B. Kim, E.M. Valliant, K. Goetschius, R.K. Brow, D.E. Day, A. Hoppe, A.R. Boccaccini, I.Y. Kim, C. Ohtsuki, T. Kokubo, A. Osaka, M. Vallet-Regí, D. Arcos, L. Fraile, A.J. Salinas, A.V. Teixeira, Y. Vueva, R.M. Almeida, M. Miola, C. Vitale-Brovarone, E. Verné, W. Höland, J.R. Jones, A unified in vitro evaluation for apatite-forming ability of bioactive glasses and their variants, *J Mater Sci: Mater Med* 26 (2015) 115–124.
- [51] M.C. Kruyt, S.M. van Gaalen, F.C. Oner, A.J. Verbout, J.D. de Bruijn, W.J.A. Dhert, Bone tissue engineering and spinal fusion: the potential of hybrid constructs by combining osteoprogenitor cells and scaffolds, *Biomaterials* 25 (2004) 1463–1473.
- [52] S. Bose, M. Roy, A. Bandyopadhyay, Recent advances in bone tissue engineering scaffolds, *Trends Biotechnol.* 30 (2012) 546–554.
- [53] M.J. Dalby, S. Childs, M.O. Riehle, H.J.H. Johnstone, S. Affrossman, A.S.G. Curtis, Fibroblast reaction to island topography: changes in cytoskeleton and morphology with time, *Biomaterials* 24 (2003) 927–935.
- [54] M.M. Stevens, J.H. George, Exploring and engineering the cell surface interface, *Science* 310 (2005) 1135–1138.
- [55] L.L. Hench, Bioceramics: from concept to clinic, *J. Am. Ceram. Soc.* 74 (1991) 1487–1510.
- [56] L.L. Hench, J. Wilson, An introduction to bioceramics, World Scientific (1993).
- [57] L.L. Hench, Ö. Andersson, Bioactive glasses, in: *An Introd. to Bioceram.*, World Scientific, 1993, pp. 41–62.
- [58] T. Kokubo, H.M. Kim, M. Kawashita, Novel bioactive materials with different mechanical properties, *Biomaterials* 24 (2003) 2161–2175.
- [59] H.S. Yun, S.H. Kim, D. Khang, J. Choi, H.H. Kim, M. Kang, Biomimetic component coating on 3D scaffolds using high bioactivity of mesoporous bioactive ceramics, *Int. J. Nanomed.* 6 (2011) 2521–2531.
- [60] P.E. Keeting, M.J. Oursler, K.E. Wiegand, S.K. Bonde, T.C. Spelsberg, B.L. Riggs, Zeolite a increases proliferation, differentiation, and transforming growth factor β production in normal adult human osteoblast-like cells in vitro, *J. Bone Miner. Res.* 7 (2009) 1281–1289.
- [61] E.M. Carlisle, Silicon: A requirement in bone formation independent of vitamin D1, *Calcif. Tissue Int.* 33 (1981) 27–34.
- [62] M. Hott, C. de Pollak, D. Modrowski, P.J. Marie, Short-term effects of organic silicon on trabecular bone in mature ovariectomized rats, *Calcif. Tissue Int.* 53 (1993) 174–179.
- [63] I.D. Xynos, A.J. Edgar, L.D.K. Buttery, L.L. Hench, J.M. Polak, Gene-expression profiling of human osteoblasts following treatment with the ionic products of Bioglass® 45S5 dissolution, *J. Biomed. Mater. Res.* 55 (2001) 151–157.
- [64] L.L. Hench, I.D. Xynos, J.M. Polak, Bioactive glasses for in situ tissue regeneration, *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* 15 (2004) 543–562.
- [65] B. Zimmerman, T. Volberg, B. Geiger, Early molecular events in the assembly of the focal adhesion stress fiber complex during fibroblast spreading, *Cell Motil. Cytoskeleton* 58 (2004) 143–159.
- [66] J.T. Parsons, A.R. Horwitz, M.A. Schwartz, Cell adhesion: integrating cytoskeletal dynamics and cellular tension, *Nat Rev Mol Cell Biol.* 11 (2010) 633–643.
- [67] T.D. Pollard, G.G. Borisy, Cellular motility driven by assembly and disassembly of actin filaments, *Cell* 112 (2003) 453–465.
- [68] A.J. Ridley, M.A. Schwartz, K. Burridge, R.A. Firtel, M.H. Ginsberg, G. Borisy, J.T. Parsons, A.R. Horwitz, Cell migration: integration signals from front to back, *Science* 302 (2003) 1704–1709.
- [69] M. Alcaide, M.-C. Serrano, J. Roman, M.-V. Cabañas, J. Peña, E. Sánchez-Zapardiel, M. Vallet-Regí, M.T. Portolés, Suppression of anoikis by collagen coating of interconnected macroporous nanometric carbonated hydroxyapatite/agarose scaffolds, *J. Biomed. Mater. Res. A* 95 (2010) 793–800.
- [70] I.D. Xynos, M.V.J. Hukkanen, J.J. Batten, L.D. Buttery, L.L. Hench, J.M. Polak, Bioglass® 45S5 stimulates osteoblast turnover and enhances bone formation in vitro: implications and applications for bone tissue engineering, *Calcif. Tissue Int.* 67 (2000) 321–329.
- [71] G. Jell, I. Notingher, O. Tsigkou, P. Notingher, J.M. Polak, L.L. Hench, M.M. Stevens, Bioactive glass-induced osteoblast differentiation: a noninvasive spectroscopic study, *J. Biomed. Mater. Res. Part A* 86A (2008) 31–40.
- [72] X. Wang, X. Li, A. Ito, Y. Sogo, Synthesis and characterization of hierarchically macroporous and mesoporous CaO–MO–SiO₂–P₂O₅ (M=Mg, Zn, Sr) bioactive glass scaffolds, *Acta Biomater.* 7 (2011) 3638–3644.
- [73] N. Cheng, Y. Wang, Y. Zhang, B. Shi, The osteogenic potential of mesoporous bioglasses/silk and non-mesoporous bioglasses/silk scaffolds in ovariectomized rats: in vitro and in vivo evaluation, *PLoS ONE* 8 (2013) e81014.
- [74] Y. Luo, C. Wu, A. Lode, M. Gelinsky, Hierarchical mesoporous bioactive glass/alginate composite scaffolds fabricated by three-dimensional plotting for bone tissue engineering, *Biofabrication* 5 (2013) 015005.
- [75] C. Wu, Y. Zhou, C. Lin, J. Chang, Y. Xiao, Strontium-containing mesoporous bioactive glass scaffolds with improved osteogenic/cementogenic differentiation of periodontal ligament cells for periodontal tissue engineering, *Acta Biomater.* 8 (2012) 3805–3815.
- [76] J. Zhang, S. Zhao, Y. Zhu, Y. Huang, M. Zhu, C. Tao, C. Zhang, Three-dimensional printing of strontium-containing mesoporous bioactive glass scaffolds for bone regeneration, *Acta Biomater.* 10 (2014) 2269–2281.
- [77] C. Wu, Y. Zhou, M. Xu, P. Han, L. Chen, J. Chang, Y. Xiao, Copper-containing mesoporous bioactive glass scaffolds with multifunctional properties of angiogenesis capacity, osteostimulation and antibacterial activity, *Biomaterials* 34 (2013) 422–433.

In vitro colonization of stratified bioactive scaffolds by pre-osteoblast cells

N. Gómez-Cerezo^{1,2#}, S. Sánchez-Salcedo^{1,2#}, I. Izquierdo-Barba^{1,2}, D. Arcos^{1,2,*} and M. Vallet-Regí^{1,2,*}

1. Dpto. Química Inorgánica y Bioinorgánica. Universidad Complutense de Madrid. Madrid, Spain. Instituto de Investigación Sanitaria Hospital 12 de Octubre i+12. Plaza Ramón y Cajal s/n, 28040 Madrid, Spain.

2. Networking Research Center on Bioengineering/Biomaterials and Nanomedicine, CIBER-BBN, Spain.

* Corresponding authors e-mail: arcosd@ucm.es, vallet@ucm.es

These authors contributed equally to this manuscript

Supporting information:

1. Characterization:

- Termogravimetric analysis
- N₂ adsorption porosimetry
- Hg intrusion porosimetry

2. Cell proliferation assays

3. Bioactivity assays:

- Variation of pH and Calcium MBG powder
- PCL surface evaluation after soaking in SBF
- Scaffolds bioactivity evaluation in α MEM

Termogravimetric analysis of MBG-PCL scaffolds are shown in figure S1. The thermogram evidence a loss of 46% of mass corresponding to PCL. Thermograms were carried out over several scaffolds and different locations (S1, S2 and S3) obtaining very similar results in all the cases.

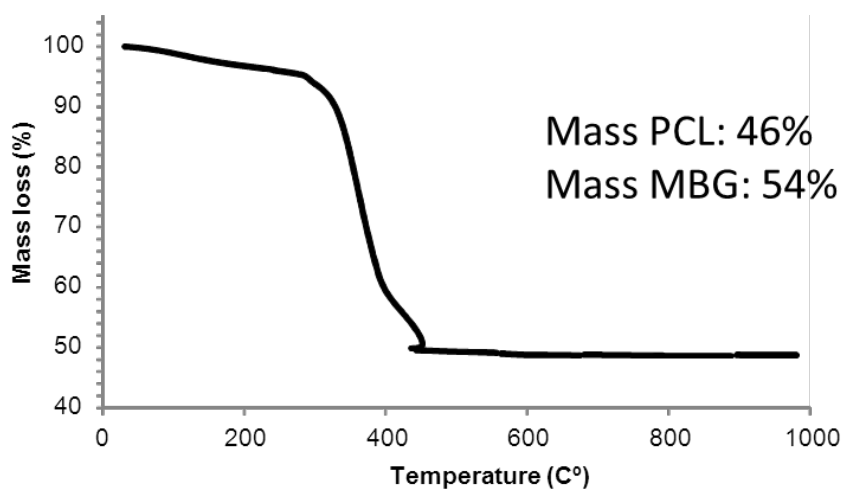


Fig S1. Termogravimetric analysis of the MBG-PCL scaffold

N₂ adsorption porosimetry corresponding to MBG 58SiO₂-36CaO-6P₂O₅ (Fig. S2). The plot shows a type IV isotherm characteristic of porous materials. Hysteresis loop correspond with H1 type. Pore size distribution showed a single-modal distribution between 5 and 10 nm centered at 5.8 nm.

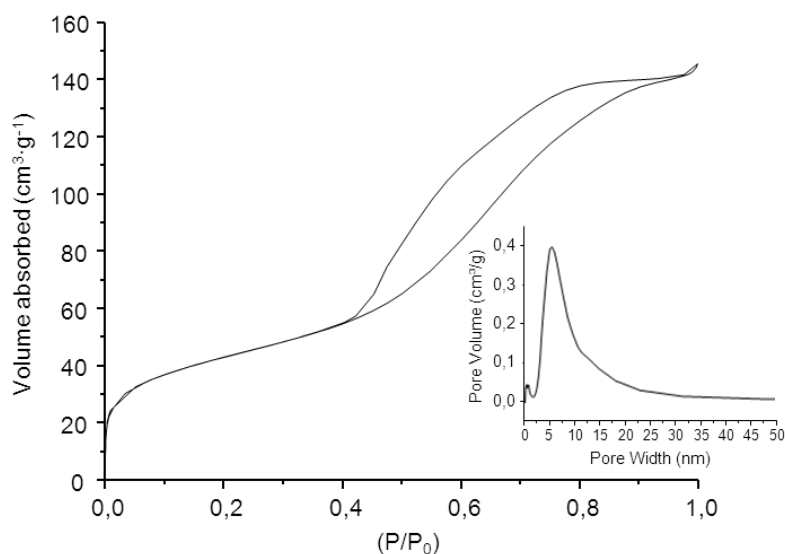


Figure S2. Isotherm and pore size distribution (inset) obtained for 58SiO₂-36CaO-6P₂O₅ MBG powders.

Ionic exchange study of MBG soaked in SBF.

The MBG exhibits a fast Ca^{2+} release associated to a pH increase in the SBF, followed by a calcium concentration decrease after 10 hours. After 12 h, the maximum Ca^{2+} concentration (10.7 mM) is reached in the SBF and thereafter decreases. This evolution of the Ca^{2+} concentration and pH correspond to the $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$ exchange and subsequent calcium phosphate precipitation onto the surface of bioactive glasses described by Hench [see reference 41]

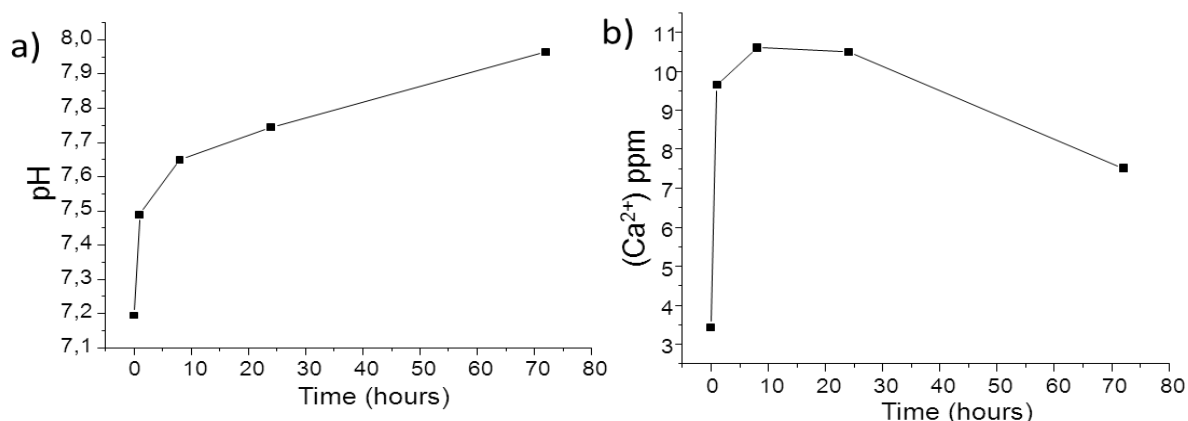


Figure S3. a) pH and b) calcium content in the SBF as a function of time after soaking the MBG powder

SEM study of PCL scaffolds after 24 hour in SBF.

The SEM micrographs indicate that no significant changes occurred when PCL scaffolds were soaked in SBF for 24 hours.

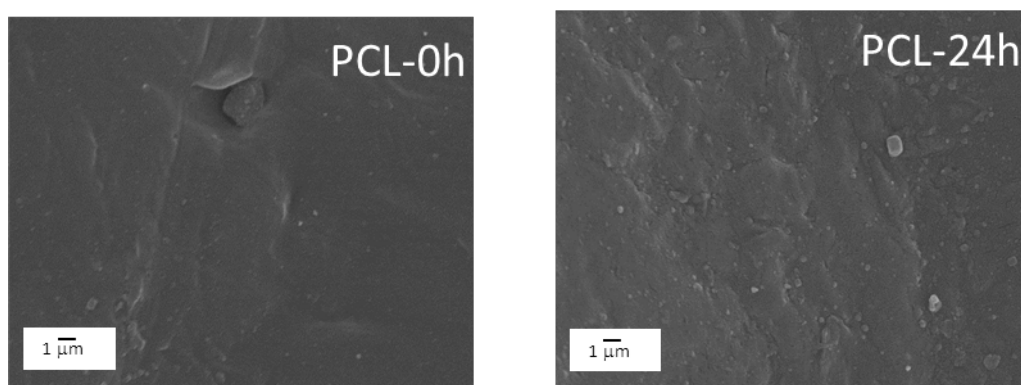


Figure S4. SEM micrographs of PCL scaffolds before and after soaking in SBF for 24 h (magnification x 5000).

Figure S5 shows **cell proliferation** over the different scaffolds strati measured by Alamarblue® method.

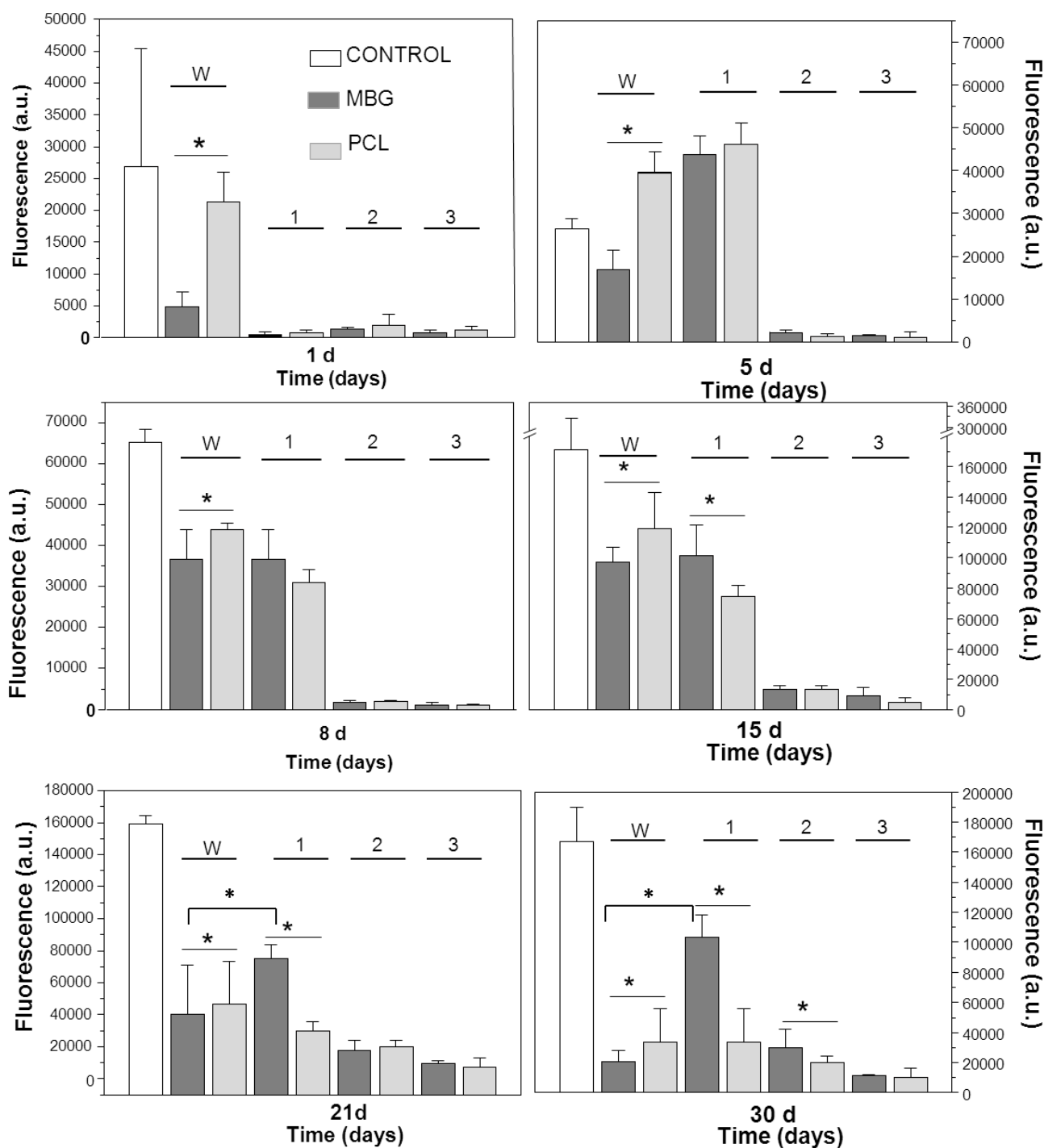


Figure S5. Cell proliferation of MC3T3-E1 evaluated by Alamarblue® method at 1, 5, 8, 15, 21 and 30 days. Proliferation was measured in control, wells and strati 1, 2 and 3. Statistical significance: * $p < 0.05$.

Figure S6 shows **Hg intrusion porosimetry** results for MBG-PCL scaffolds. A multimodal macroporous size distribution can be observed. The distributions centered at 0.02 μm and 10 μm correspond to the porosity within the scaffolds struts. Macroporous larger than 300 μm are associated to the macro-architectural features of the scaffolds (both lateral and frontal).

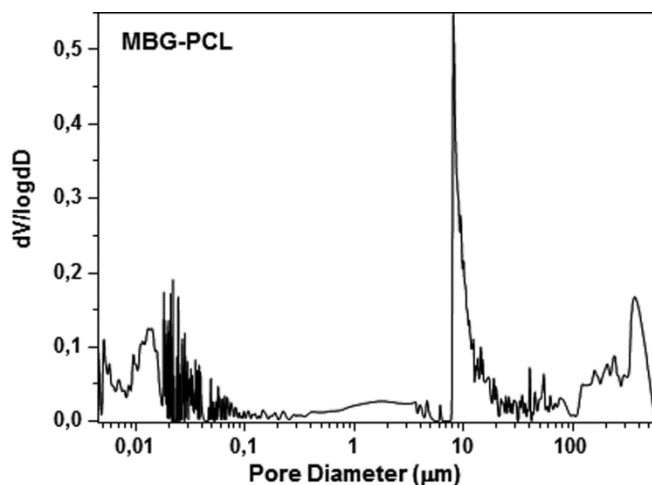


Fig S6. Pore size distribution obtained by Hg intrusion porosimetry for MBG-PCL scaffold

In vitro bioactive behavior

The in vitro bioactive behavior of the scaffolds was also evaluated in α -MEM in the presence of MC3T3-E1 cells. Calcium and silicon concentrations in α -MEM as a function of soaking time were determined and the scaffold surfaces were studied by SEM (Fig. S7). Calcium concentration in α -MEM follows a similar trend than that observed in SBF, but with a slower kinetic release. In the case of MBG-PCL scaffolds, the silicon concentration increased up to $2.0 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ after one day in α -MEM, remaining constant until the end of the study (8 days). No calcium or silicon release was observed in α -MEM in contact with the PCL scaffolds. Figure S7.c shows the surface of MBG-PCL scaffolds after 15 days of immersion in α -MEM. We can identify the appearance of a new phase formed by needle-like crystals, which can be identified as apatite phase.

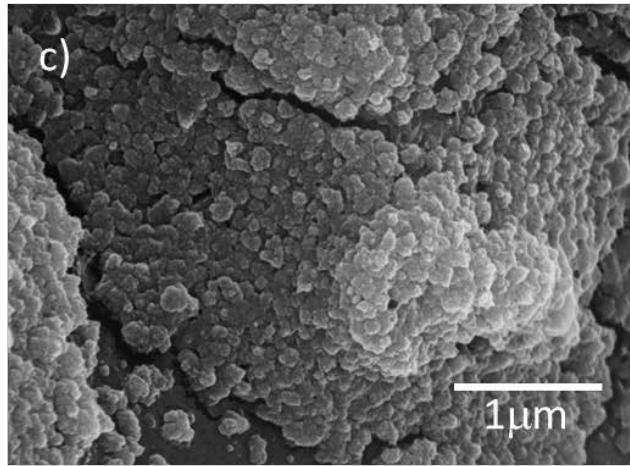
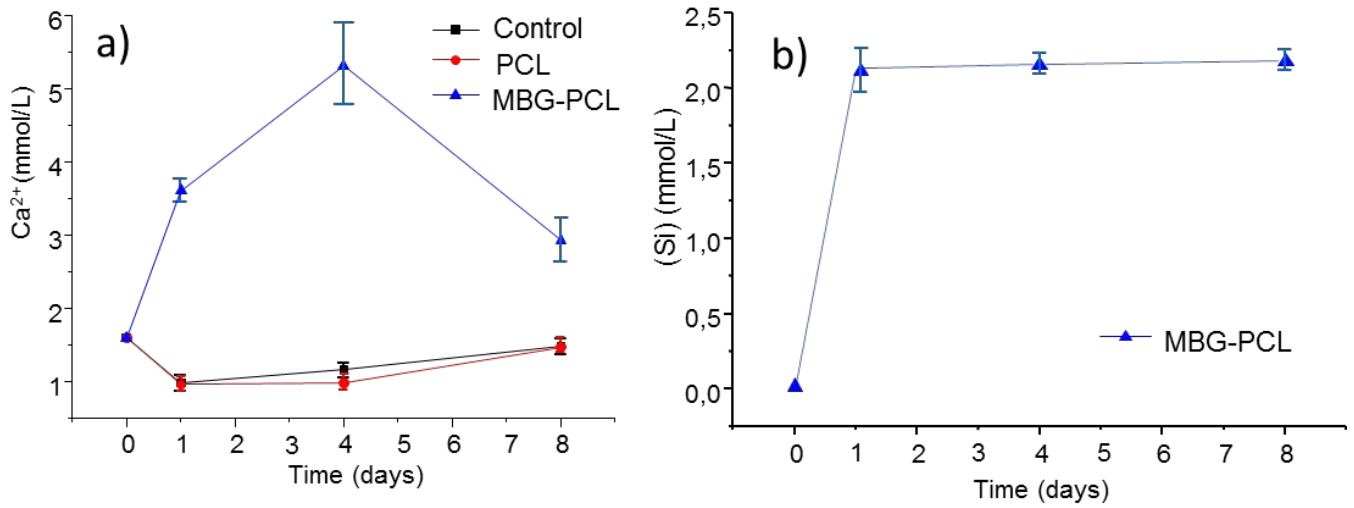


Figure S7. Bioactivity evaluation in α -MEM. (a) variation of calcium concentration as a function of soaking time for PCL and MBG-PCL scaffolds; (b) variation of soluble silicon content as a function of soaking time for MBG-PCL scaffolds; (c) SEM micrograph of the MBG-PCL scaffold surface after 15 days of soaking in α -MEM (magnification x 15000).

3.3.3 Estudios *in vivo*

La finalidad del estudio *in vivo* ha sido la evaluación de la capacidad de los andamios MBG-PCL para regenerar el hueso en un escenario de osteoporosis. Estudios previos han propuesto la liberación local de agentes antiosteoporóticos asociados a injertos utilizados en relleno óseo de fracturas osteoporóticas [33–40]. Dentro de los fármacos utilizados para el tratamiento de la osteoporosis destacan los bifosfonatos, pues son potentes inhibidores de la actividad osteoclástica y se utilizan como agentes antiosteoporóticos por vía intravenosa u oral para inhibir la resorción ósea [41–43]. Esto ha planteado la posibilidad de administrar los bifosfonatos desde sistemas de liberación de fármacos directamente sobre el tejido óseo [44–46]. Se han descrito diversos sistemas *in vitro* pero de forma muy escasa en condiciones *in vivo* [47].

En la presente tesis doctoral se ha evaluado la capacidad regenerativa del MBG de composición $58\text{SiO}_2\text{-}37\text{CaO-}5\text{P}_2\text{O}_5$ (% en mol) en forma de andamios tridimensionales asociado con ϵ -PCL en un modelo ovino que simula las condiciones de osteoporosis en humanos. Para ello se ha utilizado un modelo de defecto cavitario donde no se produce la regeneración ósea durante las 12 semanas que duró el estudio. Con la finalidad de evaluar el papel que produce la liberación local de un inhibidor osteoclástico se ha implantado una segunda serie de andamios que contenían ácido zoledrónico disperso en la matriz polimérica.

Este estudio fue realizado en colaboración con el Centro de Cirugía de Mínima Invasión Jesús Usón y con el equipo del Dr. Luis Ortega del Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Clínico San Carlos.

Diseño y preparación de andamios

1) Diseño de andamios

Los andamios fueron diseñados para adaptarse a un defecto cavitario cilíndrico de 10 mm de diámetro. Para ello, las dimensiones introducidas en el fichero CAD fueron radio= 7 mm y altura = 14 mm según se muestra en la figura 1, puesto que durante la polimerización del andamio sus dimensiones se reducen alrededor de un 20%. El grosor de las paredes del andamio viene determinado por el diámetro de la aguja cilíndrica (en este caso = 460 μm), al caudal volumétrico y a la velocidad a la que se desplaza a lo

largo de x-y. La macroporosidad del andamio se diseñó en forma poros tetragonales con dimensiones 1 x 1 mm.

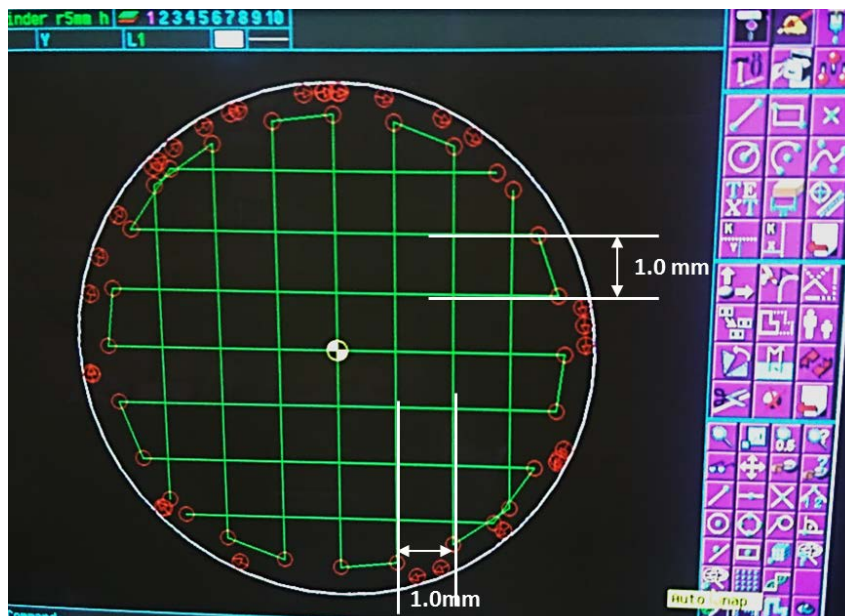


Figura 1. Diseño de los andamios macroporosos utilizados como implante *in vivo*.

2) Preparación de andamios.

Para obtener los andamios MBG-PCL que posteriormente fueron implantados *in vivo*, se disolvieron 3g de ϵ -PCL en 40 mL de diclorometano. A esta disolución se le incorporaron 4,5 g de MBG-58S suspendidos en 37,5 ml de diclorometano y se mezclaron por agitación magnética y ultrasonido hasta obtener una suspensión homogénea. El disolvente se evaporó parcialmente a temperatura ambiente durante 2 h. Después de este período, la mezcla presenta condiciones de viscosidad apropiadas para ser inyectada a través de la aguja elegida. Con fines comparativos, se prepararon andamios con ácido zoledrónico incorporado (MBG-PCL-Zol). Todos los andamios cilíndricos (MBG-PCL y MBG-PCL-zol) se prepararon con un aparato de *robocasting* (EnvisionTEC GmbH Prefactory VR 3-D Bioplotter™). Tras su fabricación, los andamios se mantuvieron a 40 °C durante la noche para eliminar el resto del diclorometano restante.

Cirugía y cuidado de los animales

El proceso quirúrgico se llevó a cabo en colaboración con investigadores del Centro de Cirugía de Mínima Invasión Jesús Usón. Este estudio fue aprobado por el Comité Ético

siguiendo las directrices de la normativa actual (Directiva 2010/63 / UE del Parlamento Europeo y del Consejo de 22 de septiembre de 2010, sobre la protección de los animales utilizados con fines científicos).

Los sujetos de estudio fueron seis ovejas merinas hembras de 4 años (peso preoperatorio medio de 43.78 ± 5.9 Kg). Para reproducir condiciones similares a la osteoporosis en humanos, todas las ovejas se sometieron a una ovariectomía bilateral laparoscópica seis meses antes de la implantación, bajo condiciones estériles y anestesia general inducida por propofol (4 mg / kg) y mantenida por isoflurano (1.5%). La analgesia intraoperatoria se logró con ketorolaco (1 mg / kg) y buprenorfina (0,01 mg / kg). Como analgésico posoperatorio, se utilizó meloxicam (0,4 mg / kg / 24 h) durante tres días. La ovariectomía laparoscópica se realizó colocando un trocar de 10 mm y dos de 5 mm, uno en el ombligo para el telescopio y uno en cada fosa ilíaca, siendo el trocar de 10 mm ubicado en el lado derecho. Los ovarios se extirparon después de sellar el pedículo ovárico con LigaSure™ (Medtronic) y se exteriorizaron retirando el trocar de 10 mm. Al mismo tiempo, se implementaron una dieta baja en calcio (0.5%) y la administración de corticosteroides (500 mg de metilprednisolona vía inyección intramuscular cada 3 semanas) hasta el final del estudio.

Seis meses después de la ovariectomía, los andamios se implantaron en las ovejas en condiciones asépticas y con el mismo protocolo anestésico previamente descrito. Seis defectos cilíndricos de tamaño crítico (10 x 13 mm) se crearon en cada oveja mediante la perforación del hueso esponjoso de la epífisis proximal de la tibia, el epicóndilo medial del fémur y la epífisis del húmero, bajo riego continuo con solución salina estéril fría. Una vez implantados los biomateriales, el tejido muscular y subcutáneo se aproximó con sutura de monofilamento absorbible y la piel con sutura trenzada absorbible (figura 2). La analgesia posoperatoria se mantuvo con buprenorfina (0,01 mg / kg / 8 h / 3 días) y meloxicam (0,4 mg / kg / 24 h / 7 días). Cefotiofur (1 mg / kg / 24 h) se administró durante 7 días como antibioterapia profiláctica. Las condiciones de salud de todos los animales fueron revisadas diariamente a lo largo de todo el estudio por veterinarios acreditados. Al cabo de 12 semanas los animales fueron sacrificados y se realizó la extracción de las muestras para realizar su estudio histológico.

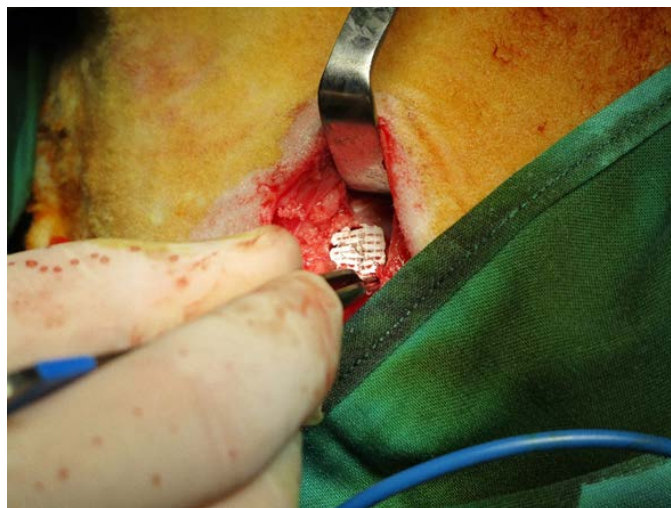


Figura 2. Imagen de un andamio MBG-PCL implantado en la extremidad de una oveja.

Preparación de las muestras histológicas

El estudio histológico se realizó en colaboración con el equipo del Dr. Luis Ortega del Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Clínico San Carlos. La fijación de los andamios se llevó a cabo en alcohol (96°) durante 1 mes. Tras ese tiempo, se realizaron dos secciones transversales cada 2-3 mm de varias micras de espesor en cada andamio. El procesado de los cortes histológicos se realizó fijando las muestras en formol tamponado al 12 % en volumen durante 24 horas. Posteriormente las muestras fueron tratadas con solución decalcificante Leica Decalcifier II durante 24 y se repitió el tratamiento de las muestras en formol. Las muestras fueron tratadas con parafina y sobre ellas se realizaron cortes que se tiñeron con hemaxotilina Eosina.

Tras el tratamiento de las muestras, se tomaron imágenes en un microscopio Olympus Bx20 para evaluar la superficie y para la evaluación morfométrica se tomaron imágenes con un fotomicroscopio Leica DMD 108. Se midieron la superficie total del andamio y la superficie total de hueso neoformado a partir de las cuales se calculó el porcentaje de neoformación ósea. En cada caso se realizaron 2-3 micrografías con objetivo x20 en las que se identificaron un mínimo de diez trabéculas de hueso neoformado para los casos MBG-PCL y MBG-PCL-zol y de cinco trabéculas para los controles, cuyo espesor fue medido para cada una de ellas y se calculó un promedio de las mismas.

Resultados y discusión

Inmediatamente después del procedimiento quirúrgico y antes de la extracción de la muestra, se realizaron tomografías computarizadas para evaluar la correcta colocación de los andamios, así como para evaluar el agujero control realizado en el fémur izquierdo de todos los animales. Como muestra la figura 3, los andamios quedaron fijados al defecto sin que protruiera ninguno de ellos durante las doce semanas de estudio. Por otra parte las imágenes evidencian que el defecto control permanece sin regenerarse durante este tiempo.

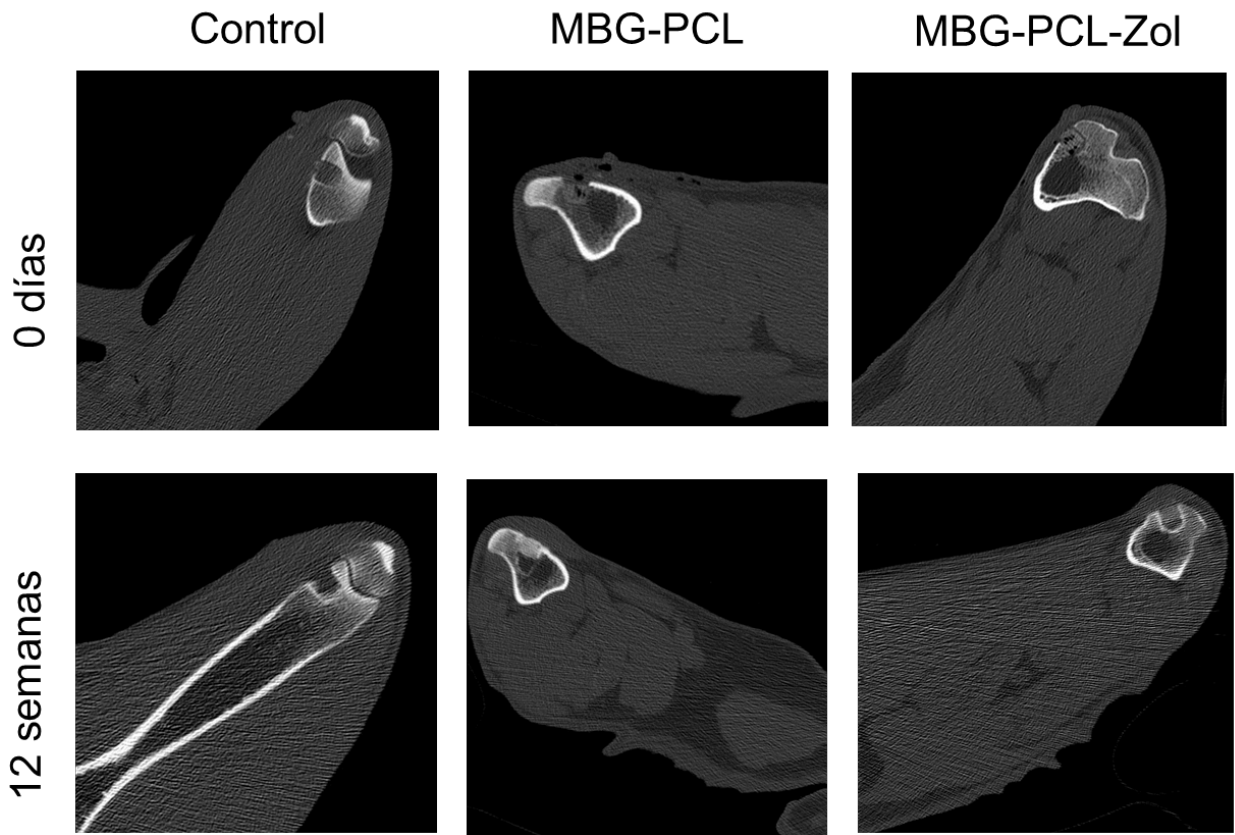


Figura 3. TC a tiempo inicial y final de los experimentos.

Las imágenes de histología del agujero control (figura 4) tras 12 semanas no muestran crecimiento óseo. Este resultado confirma el TAC y evidencian que el defecto creado en este modelo no puede regenerarse por sí solo en las condiciones y período experimental de este estudio.

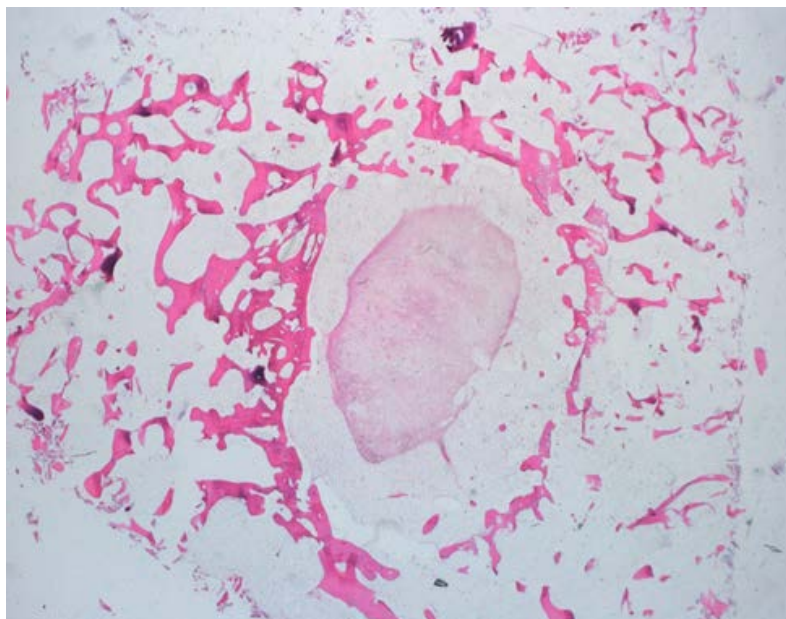


Figura 4. Corte histológico del defecto inducido en la extremidad de una oveja osteopénica.

Los cortes histológicos de los andamios se muestran en la figura 5. Para los implantes MBG-PCL se observa crecimiento de tejido óseo sobre el andamio, tanto desde el hueso periférico como en el interior del andamio. Los cortes muestran trabéculas gruesas y desarrollo de médula ósea con presencia de vasos sanguíneos. Se observa asimismo la presencia de ribete osteoblástico y de osteoclastos, indicando que el proceso de remodelado óseo en el defecto está activo.

Los cortes histológicos de los MBG-PCL-zol muestran la presencia de tejido óseo y fibroso alrededor del implante. En el interior solo se pudo observar hueso neoformado de forma muy aislada, con trabéculas muy delgadas. No se observó ribete osteoblástico ni presencia de osteoclastos, pero si una elevada cantidad de componente inflamatorio alrededor de los implantes.

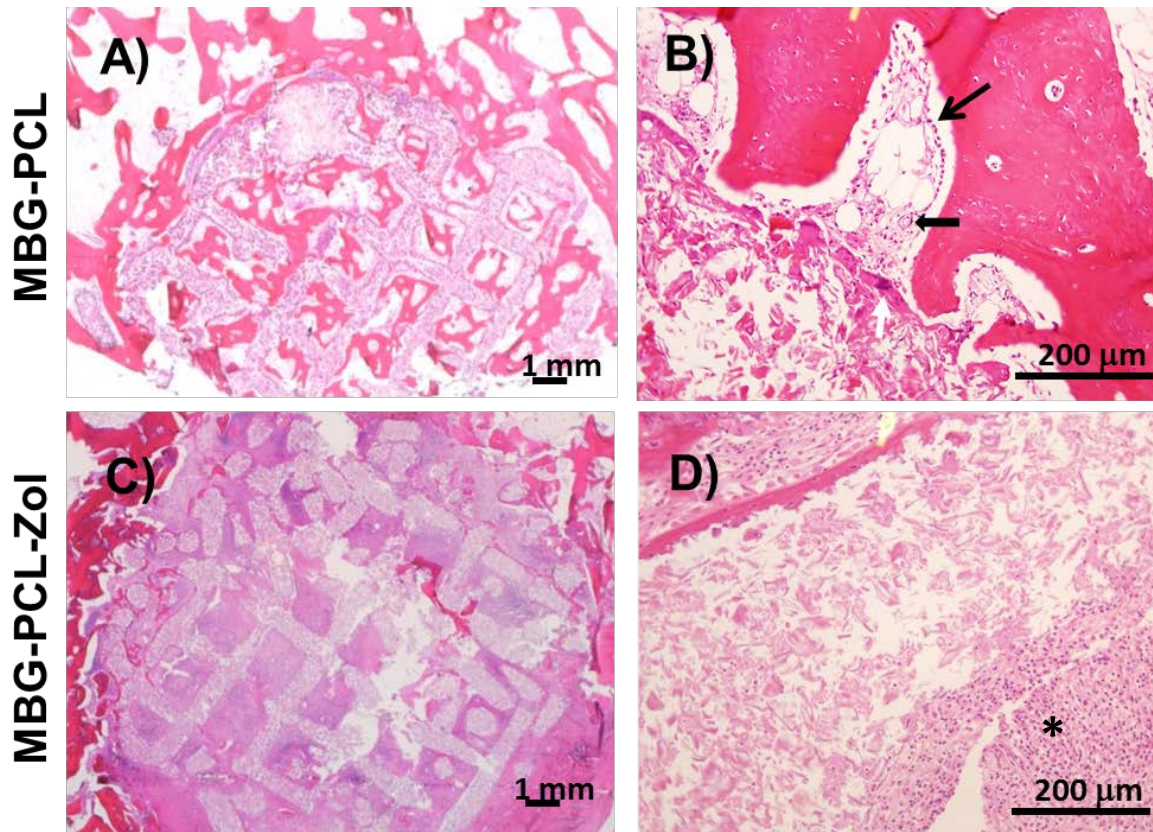


Figura 5. Cortes histológicos representativos de las muestras A) y B) MBG-PCL y C) y D) MBG-PCL-zol (flecha negra estrecha) Ribete osteoblástico, (flecha negra ancha) Vasos sanguíneos, (flecha blanca) Osteoclasto y (asterisco) Componente inflamatorio.

La cuantificación de la osificación y el grosor de las trabéculas en el interior del defecto (figura 6) muestra que los andamios MBG-PCL promueve la osteointegración de forma significativamente mayor que en el defecto o en el andamio MBG-PCL-zol. El grosor de trabécula muestra que el hueso formado en presencia MBG-PCL no es solo mayor en cantidad sino también de mayor calidad que el caso del andamios con ácido zoledrónico.

Estos estudios ponen de manifiesto que los andamios MBG-PCL promueven la regeneración del tejido óseo en las regiones internas del andamio. Por otra parte, no promueven la formación de tejido fibroso ni una respuesta inflamatoria tras 12 semanas. El hueso neoformado aparece vascularizado y presenta los elementos celulares característicos de un hueso en proceso de regeneración. Por otra parte podemos afirmar que la incorporación de ácido zoledrónico en este sistema inhibe la regeneración del hueso. Tras 12 semanas la región esta colonizada por tejido fibroso y se observa una fuerte infiltración de componente inflamatorio. El escaso hueso neoformado es de baja calidad pues las pocas trabéculas observadas en el interior son de tamaño muy inferior a

las desarrollas en el interior de los andamios sin fármaco. El ácido zoledrónico en este sistema no solo no contribuye a desplazar el remodelado hacia la formación de nuevo tejido óseo, sino que la inhibición de la osteoclastogénesis inhibe también el remodelado óseo (y por tanto la formación de hueso) generando una fuerte respuesta fibrótica e inflamatoria.

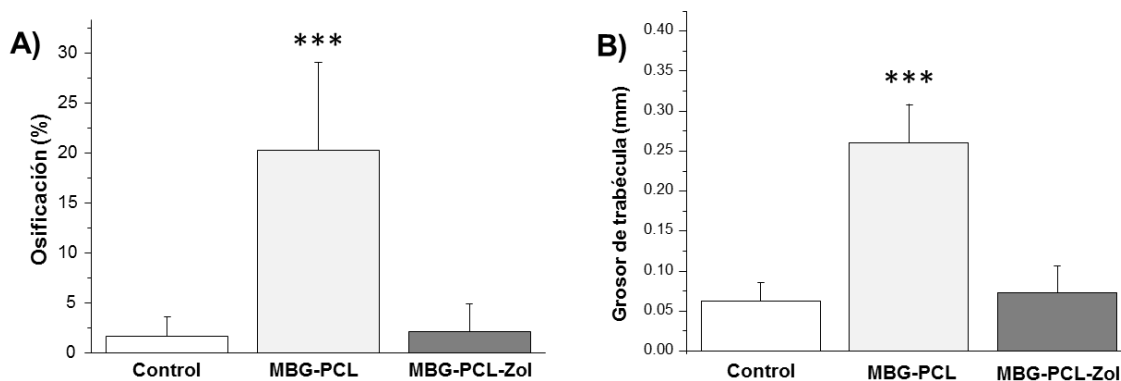


Figura 6. A) % de osificación de los implantes en el las ovejas y B) grosor de las trabéculas formadas durante el experimento.

Conclusiones

Se han diseñado y fabricados andamios tridimensionales macroporosos MBG-PCL con y sin ácido zoledrónico y se ha estudiado su comportamiento *in vivo* en hueso osteoporótico.

El estudio *in vivo* ha demostrado la capacidad regenerativa del sistema MBG-PCL en condiciones osteoporóticas por lo que este sistema presenta interesantes propiedades para ser utilizado como injerto óseo para regeneración de hueso de pacientes osteoporóticos.

La incorporación de ácido zoledrónico al sistema para liberación local de fármacos no favorece la regeneración de tejido óseo. La liberación del fármaco desde el sistema MBG-PCL inhibe la remodelación ósea, impidiendo la regeneración del tejido y produciendo una fuerte respuesta inflamatoria.

Referencias

- [1] C. Wu, Y. Zhou, W. Fan, P. Han, J. Chang, J. Yuen, M. Zhang, Y. Xiao, Hypoxia-mimicking mesoporous bioactive glass scaffolds with controllable cobalt ion release for bone tissue engineering., *Biomaterials*. 33 (2012) 2076.
- [2] J. Zhang, S. Zhao, Y. Zhu, Y. Huang, M. Zhu, C. Tao, C. Zhang, Three-dimensional printing of strontium-containing mesoporous bioactive glass scaffolds for bone regeneration, *Acta Biomater*. 10 (2014) 2269.
- [3] I. Izquierdo-Barba, M. Vallet-Regí, Mesoporous bioactive glasses: Relevance of their porous structure compared to that of classical bioglasses, *Biomed. Glas*. 1 (2015) 140.
- [4] H. Yun, S. Kim, Y. Hyun, S. Heo, J. Shin, Three-Dimensional Mesoporous–Giantporous Inorganic/Organic Composite Scaffolds for Tissue Engineering, *Chem. Mater*. 19 (2007) 6363.
- [5] Y. Zhu, C. Wu, Y. Ramaswamy, E. Kockrick, P. Simon, S. Kaskel, H. Zreiqat, Preparation, characterization and in vitro bioactivity of mesoporous bioactive glasses (MBGs) scaffolds for bone tissue engineering, *Microporous Mesoporous Mater*. 112 (2008) 494.
- [6] A. García, I. Izquierdo-Barba, M. Colilla, C.L. de Laorden, M. Vallet-Regí, Preparation of 3-D scaffolds in the SiO₂-P₂O₅ system with tailored hierarchical meso-macroporosity. *Acta Biomater*. 7 (2011) 1265.
- [7] H. Yun, S. Kim, Y. Hyeon, M. Hartmann, W. Xia, J. Chang, Design and preparation of bioactive glasses with hierarchical pore networks, *Chem. Commun*. 17 (2007) 2139.
- [8] D. Arcos, M. Vila, A. López-Noriega, F. Rossignol, E. Champion, F.J. Oliveira, M. Vallet-Regí, Mesoporous bioactive glasses: Mechanical reinforcement by means of a biomimetic process, *Acta Biomater*. 7 (2011) 2952.
- [9] S. Utech, A.R. Boccaccini, A review of hydrogel-based composites for biomedical applications: enhancement of hydrogel properties by addition of rigid inorganic fillers, *J. Mater. Sci*. 51 (2016) 271.

- [10] L.-C. Gerhardt, A.R. Boccaccini, Bioactive Glass and Glass-Ceramic Scaffolds for Bone Tissue Engineering, *Materials (Basel)*. 3 (2010) 3867.
- [11] C. Wu, Y. Zhou, M. Xu, P. Han, L. Chen, J. Chang, Y. Xiao, Copper-containing mesoporous bioactive glass scaffolds with multifunctional properties of angiogenesis capacity, osteostimulation and antibacterial activity, *Biomaterials*. 34 (2013) 422.
- [12] Y. Luo, C. Wu, A. Lode, M. Gelinsky, Hierarchical mesoporous bioactive glass/alginate composite scaffolds fabricated by three-dimensional plotting for bone tissue engineering, *Biofabrication*. 5 (2013) 015005.
- [13] H. Yun, Kim, D. Khang, Choi, Kim, Biomimetic component coating on 3D scaffolds using high bioactivity of mesoporous bioactive ceramics, *Int. J. Nanomedicine*. (2011) 2521.
- [14] S. Samavedi, A.R. Whittington, A.S. Goldstein, Calcium phosphate ceramics in bone tissue engineering: A review of properties and their influence on cell behavior, *Acta Biomater*. 9 (2013) 8037.
- [15] A.R. Amini, C.T. Laurencin, S.P. Nukavarapu, Bone tissue engineering: recent advances and challenges., *Crit. Rev. Biomed. Eng.* 40 (2012) 363.
- [16] J.R. Jones, Reprint of: Review of bioactive glass: From Hench to hybrids, *Acta Biomater*. 23 (2015) S53–S82.
- [17] D.W. Hutmacher, T. Schantz, I. Zein, K.W. Ng, S.H. Teoh, K.C. Tan, Mechanical properties and cell cultural response of polycaprolactone scaffolds designed and fabricated via fused deposition modeling., *J. Biomed. Mater. Res.* 55 (2001) 203.
- [18] L. Diaz-Gomez, A. Concheiro, C. Alvarez-Lorenzo, C.A. García-González, Growth factors delivery from hybrid PCL-starch scaffolds processed using supercritical fluid technology, *Carbohydr. Polym.* 142 (2016) 282.
- [19] A. Gloria, F. Causa, T. Russo, E. Battista, R. Della Moglie, S. Zeppetelli, R. De Santis, P.A. Netti, L. Ambrosio, Three-Dimensional Poly(ϵ -caprolactone) Bioactive Scaffolds with Controlled Structural and Surface Properties, *Biomacromolecules*, 13 (2012) 3510.

- [20] H. Yun, S. Kim, E.K. Park, Bioactive glass–poly (ϵ -caprolactone) composite scaffolds with 3 dimensionally hierarchical pore networks, *Mater. Sci. Eng. C*. 31 (2011) 198.
- [21] M.E. Hoque, W.Y. San, F. Wei, S. Li, M.-H. Huang, M. Vert, D.W. Hutmacher, Processing of Polycaprolactone and Polycaprolactone-Based Copolymers into 3D Scaffolds, and Their Cellular Responses, *Tissue Eng. Part A*. 15 (2009) 3013.
- [22] P.S.P. Poh, D.W. Hutmacher, B.M. Holzapfel, A.K. Solanki, M.M. Stevens, M.A. Woodruff, In vitro and in vivo bone formation potential of surface calcium phosphate-coated polycaprolactone and polycaprolactone/bioactive glass composite scaffolds, *Acta Biomater.* 30 (2016) 319.
- [23] B. Chuenjitkuntaworn, W. Inrung, D. Damrongsri, K. Mekaapiruk, P. Supaphol, P. Pavasant, Polycaprolactone/hydroxyapatite composite scaffolds: preparation, characterization, and in vitro and in vivo biological responses of human primary bone cells., *J. Biomed. Mater. Res. A*. 94 (2010) 241.
- [24] J.M. Williams, A. Adewunmi, R.M. Schek, C.L. Flanagan, P.H. Krebsbach, S.E. Feinberg, S.J. Hollister, S. Das, Bone tissue engineering using polycaprolactone scaffolds fabricated via selective laser sintering., *Biomaterials*. 26 (2005) 4817.
- [25] S. Ali, A. Ghavimi, M.H. Ebrahimzadeh, M. Solati-Hashjin, N. Azuan, A. Osman, Polycaprolactone/starch composite: Fabrication, structure, properties, and applications, *J Biomed Mater Res Part A J Biomed Mater Res Part A*. 103103 (2015).
- [26] C. Vaquette, S. Ivanovski, S.M. Hamlet, D.W. Hutmacher, Effect of culture conditions and calcium phosphate coating on ectopic bone formation, *Biomaterials*. 34 (2013) 5538.
- [27] M. Vallet-Regí, E. Ruiz-Hernández, Bioceramics: From bone regeneration to cancer nanomedicine, *Adv. Mater.* 23 (2011) 5177.
- [28] M. Cicuéndez, P. Portolés, M. Montes-Casado, I. Izquierdo-Barba, M. Vallet-Regí, M.T. Portolés, Effects of 3D nanocomposite bioceramic scaffolds on the immune response, *J. Mater. Chem. B*. 2 (2014) 3469.

- [29] A. El-Fiqi, J.-H. Kim, H.-W. Kim, Osteoinductive Fibrous Scaffolds of Biopolymer/Mesoporous Bioactive Glass Nanocarriers with Excellent Bioactivity and Long-Term Delivery of Osteogenic Drug, *ACS Appl. Mater. Interfaces*. 7 (2015) 1140.
- [30] N.Q. Balaban, U.S. Schwarz, D. Rivelino, P. Goichberg, G. Tzur, I. Sabanay, D. Mahalu, S. Safran, A. Bershadsky, L. Addadi, B. Geiger, Force and focal adhesion assembly: a close relationship studied using elastic micropatterned substrates, *Nat. Cell Biol.* 3 (2001) 466.
- [31] F.M. Watt, W.T.S. Huck, Role of the extracellular matrix in regulating stem cell fate, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 14 (2013) 467.
- [32] R. McBeath, D.M. Pirone, C.M. Nelson, K. Bhadriraju, C.S. Chen, Cell shape, cytoskeletal tension, and RhoA regulate stem cell lineage commitment., *Dev. Cell.* 6 (2004) 483.
- [33] L. Kyllönen, M. D'Este, M. Alini, D. Eglin, Local drug delivery for enhancing fracture healing in osteoporotic bone, *Acta Biomater.* 11 (2015) 412.
- [34] G. Li, L. Zhang, L. Wang, G. Yuan, K. Dai, J. Pei, Y. Hao, Dual modulation of bone formation and resorption with zoledronic acid-loaded biodegradable magnesium alloy implants improves osteoporotic fracture healing: An in vitro and in vivo study, *Acta Biomater.* 65 (2018) 486.
- [35] D.B. Raina, D. Larsson, F. Mrkonjic, H. Isaksson, A. Kumar, L. Lidgren, M. Tägil, Gelatin- hydroxyapatite- calcium sulphate based biomaterial for long term sustained delivery of bone morphogenic protein-2 and zoledronic acid for increased bone formation: In-vitro and in-vivo carrier properties, *J. Control. Release.* 272 (2018) 83.
- [36] A. Nieto, F. Balas, M. Colilla, M. Manzano, M. Vallet-Regí, Functionalization degree of SBA-15 as key factor to modulate sodium alendronate dosage, *Microporous Mesoporous Mater.* 116 (2008) 4.
- [37] E. Boanini, S. Panseri, F. Arroyo, M. Montesi, K. Rubini, A. Tampieri, C. Covarrubias, A. Bigi, Alendronate functionalized mesoporous bioactive glass nanospheres, *Materials (Basel)*. 9 (2016) 135.

- [38] M. Manzano, G. Lamberti, I. Galdi, M. Vallet-Regí, Anti-Osteoporotic Drug Release from Ordered Mesoporous Bioceramics: Experiments and Modeling, *AAPS PharmSciTech* 12 (2011) 1193.
- [39] M. Vila, M. Cicuéndez, J. Sánchez-Marcos, V. Fal-Miyar, M. Manzano, C. Prieto, M. Vallet-Regí, Electrical stimuli to increase cell proliferation on carbon nanotubes/mesoporous silica composites for drug delivery, *J. Biomed. Mater. Res. Part A*. 101A (2013) 213.
- [40] C. Faucheux, E. Verron, A. Soueidan, S. Josse, M.D. Arshad, P. Janvier, P. Pilet, J.M. Bouler, B. Bujoli, J. Guicheux, Controlled release of bisphosphonate from a calcium phosphate biomaterial inhibits osteoclastic resorption in vitro, 89 (2009) 46.
- [41] H. Fleisch, Bisphosphonates in osteoporosis., *Eur. Spine J.* 12 Suppl 2 (2003) 142.
- [42] E. V Giger, B. Castagner, J. Leroux, Biomedical applications of bisphosphonates, *J. Control. Release*. 167 (2013) 175.
- [43] A.J. Roelofs, K. Thompson, S. Gordon, M.J. Rogers, Molecular mechanisms of action of bisphosphonates: current status., *Clin. Cancer Res.* 12 (2006) 6222.
- [44] J.L. Paris, J. Román, M. Manzano, M. V. Cabañas, M. Vallet-Regí, Tuning dual-drug release from composite scaffolds for bone regeneration, *Int. J. Pharm.* 486 (2015) 30.
- [45] F. Balas, M. Manzano, P. Horcajada, M. Vallet-Regí, Confinement and Controlled Release of Bisphosphonates on Ordered Mesoporous Silica-Based Materials, *J. Am. Chem. Soc.* 128 (2006) 8116.
- [46] M. Fazil, S. Baboota, J.K. Sahni, Aameeduzzafar, J. Ali, Bisphosphonates: therapeutics potential and recent advances in drug delivery, *Drug Deliv.* 22 (2015) 1.
- [47] E. Verron, O. Gauthier, P. Janvier, P. Pilet, J. Lesoeur, B. Bujoli, J. Guicheux, J.-M. Bouler, In vivo bone augmentation in an osteoporotic environment using bisphosphonate-loaded calcium deficient apatite, *Biomaterials*. 31 (2010) 7776.

4. Conclusiones

“La vida es crecimiento, y cuanto más viajamos, más verdad podemos comprender. Comprender las cosas que nos rodean es la mejor preparación para comprender las cosas que hay más allá.”

-Hipatía de Alejandría.

4. Conclusiones

- 1) Se han preparados vidrios mesoporosos bioactivos (MBGs) en el sistema $\text{SiO}_2\text{-CaO-P}_2\text{O}_5$ para el tratamiento regenerativo de defectos óseos derivados de algunas patologías óseas. Su bioactividad y respuesta celular han sido optimizadas a través del control de su composición y estructura porosa.
- 2) Utilizado diferentes agentes directores de estructura se han obtenido MBGs con diferentes estructuras. El tamaño de poro resulta determinante en la bioactividad y la respuesta celular *in vitro*. Valores de mesoporo por debajo del tamaño de poro crítico para la cristalización de una fase apatita favorecen la diferenciación celular de células preosteoblásticas hacia fenotipo osteoblástico y potencia la formación de una fase similar al componente mineral del hueso.
- 3) El control sobre las propiedades texturales y la composición química ha permitido obtener materiales con estructuras ordenadas y alto contenido en CaO, optimizando así el comportamiento bioactivo. Los materiales en el sistema $\text{SiO}_2\text{-CaO-P}_2\text{O}_5$ intercambian especies solubles de calcio y sílice que favorecen la proliferación y diferenciación en contacto con células osteoblásticas, la disminución de la actividad resorptiva y la inhibición de la polarización de los macrófagos hacia fenotipo inflamatorio M1. Estos hechos ponen de manifiesto el interés de usar estos materiales como sustitutos óseos en pacientes con osteoporosis.
- 4) Con la finalidad de evaluar los potenciales efectos terapéuticos de determinados iones metálicos, se han preparado diferentes series de MBGs que incorporan especies Cu^{2+} , Co^{2+} y Sr^{2+} en la estructura de los MBGs por el método de co-condensación. Se pudo demostrar que, si bien otras especies deforman la red de sílice, la presencia del P_2O_5 minimiza el efecto de dicha distorsión mediante la formación de ortofosfatos con estos cationes.
- 5) Para mantener la propiedades estructura ordenada de los MBGs se ha realizado la incorporación de galio por impregnación post-síntesis. Los resultados evidencian que el Ga^{3+} se incorpora en los MBGs formando sistemas $\text{SiO}_2\text{-CaO-P}_2\text{O}_5\text{-Ga}_2\text{O}_3$ siguiendo

dos mecanismos: (I) incorporándose a la red de sílice como $[\text{GaO}_4]$ y (II) como deformador de red en coordinación $[\text{GaO}_6]$ sustituyendo al CaO parcialmente.

- 6) La presencia de Ga(III) en los MBGs estimula la diferenciación de células preosteoblásticas hacia fenotipo osteoblástico e inhibe la diferenciación de macrófagos hacia fenotipo osteoclástico, lo que hace de estos materiales candidatos muy interesantes para ser utilizados en regeneración de hueso en pacientes osteoporóticos.
- 7) Se han preparado sistemas estímulo-respuesta de liberación de fármacos desde MBGs mediante compuertas sensibles a estímulos enzimáticos. Estos sistemas pueden actuar como injertos óseos tras la pérdida de masa ósea por extirpación de tumores tipo osteosarcoma o infección ósea.
- 8) Se ha funcionalizado la superficie de los MBGs con compuertas moleculares sensibles a fosfatasa alcalina. Se ha demostrado que esta compuerta sensible es capaz de liberar doxorubicina de forma controlada, reduciendo la viabilidad celular de células de osteosarcoma humano *in vitro*.
- 9) Se ha funcionalizado la superficie de vidrios mesoporosos bioactivos con compuertas moleculares sensibles a enzimas tipo proteasas. Esta compuerta es capaz de liberar levofloxacino de forma controlada en presencia de bacterias, reduciendo el número de unidades formadoras de colonias de *E. coli in vitro*.
- 10) Se han preparado andamios tridimensionales macroporosos por el método de *Robocasting* formados por MBGs y ϵ -policaprolactona. Estos sistemas pueden actuar como injertos óseos en el tratamiento de fracturas osteoporóticas.
- 11) La composición y estructura porosa de los andamios favorecen la migración y colonización celular de los mismos. Estos hechos se han confirmado *in vivo* a través de la formación de tejido óseo neoformado en el interior de los andamios implantados, en un modelo ovino que simula las condiciones de osteoporosis en humanos.
- 12) La incorporación de ácido zoledrónico como agente antirresortivo en la matriz de los andamios inhibe la formación de hueso, poniendo de manifiesto que la administración

de este fármaco localmente sobre el defecto, no solo no estimula la formación de nuevo tejido sino que induce una fuerte respuesta inflamatoria.

- 13) El conjunto de resultados de esta tesis doctoral permite concluir que los MBGs presentan un elevado potencial para el tratamiento de defectos óseos derivados de diferentes patologías. El control de su composición y estructura, la funcionalización de su superficie y su diseño como andamios 3D permite abordar este problema desde una estrategia regenerativa.

4. Conclusions

- 1) Mesoporous bioactive glasses (MBGs) were prepared in the $\text{SiO}_2\text{-CaO-P}_2\text{O}_5$ system for the regenerative treatment of bone defects derived from some bone pathologies. Its bioactivity and cellular response were optimized through the control of its composition and porous structure.
- 2) Using different structure management agents, MBGs with different structures were obtained. Pore size is a determining factor in bioactivity and cell response *in vitro*. Mesopore values below the critical pore size for the crystallization of an apatite phase favour the cellular differentiation of preosteoblastic cells towards osteoblastic phenotype and promote the formation of a phase similar to the mineral component of bone.
- 3) The control over textural properties and chemical composition allowed us to obtain materials with ordered structures and high CaO content, thus optimizing bioactive behavior. The materials in the $\text{SiO}_2\text{-CaO-P}_2\text{O}_5$ system exchange soluble calcium and silica species that promote proliferation and differentiation in contact with osteoblastic cells, decrease resorptive activity and inhibit polarization of macrophages towards inflammatory phenotype M1. These facts demonstrate the interest in using these materials as bone substitutes in patients with osteoporosis.
- 4) In order to evaluate the potential therapeutic effects of certain metallic ions, different series of MBGs were prepared that incorporate Cu^{2+} , Co^{2+} and Sr^{2+} species into the structure of MBGs by the co-condensation method. Although other species deform the silica network, we demonstrated that the presence of P_2O_5 minimizes the effect of this distortion by the formation of orthophosphates with these cations.
- 5) In order to maintain the MBGs structural order, gallium were incorporated by post-synthesis impregnation. The results show that Ga^{3+} is incorporated in the MBGs forming $\text{SiO}_2\text{-CaO-P}_2\text{O}_5\text{-Ga}_2\text{O}_3$ systems following two mechanisms: (I)

joining the silica network as $[\text{GaO}_4]$ and (II) as a network deformer in coordination $[\text{GaO}_6]$ replacing the CaO partially.

- 6) The presence of Ga(III) in MBGs stimulates the differentiation of preosteoblast cells towards osteoblast phenotype and inhibits the differentiation of macrophages towards osteoclast phenotype, which makes these materials very interesting candidates for their use in bone regeneration in osteoporotic patients.
- 7) Stimulus-response systems for drug release from MBGs were prepared using sluices sensitive to enzymatic stimuli. These systems can act as bone grafts after bone loss due to removal of tumors such as osteosarcoma or bone infection.
- 8) The surface of the MBGs were functionalized with molecular gates sensitive to alkaline phosphatase. This sensitive gate has been shown to release doxorubicin in a controlled manner, reducing the cellular viability of human osteosarcoma cells *in vitro*.
- 9) The surface of bioactive mesoporous glasses with molecular gates sensitive to protease-type enzymes has been functionalized. This gate is able to release levofloxacin in a controlled manner in the presence of bacteria, reducing the number of *E. coli* colony forming units *in vitro*.
- 10) Macroporous three-dimensional scaffolds were prepared by the *Robocasting* method using MBGs and ϵ -polycaprolactone. These systems can act as bone grafts in the treatment of osteoporotic fractures.
- 11) The composition and porous structure of the scaffolds favour their migration and cellular colonization. These facts have been confirmed *in vivo* by the formation of neoformed bone tissue inside the implanted scaffolds, in a sheep model that simulates the conditions of osteoporosis in humans.
- 12) The incorporation of zoledronic acid as an antiresorant agent in the scaffold matrix inhibits bone formation, showing that the administration of this drug

locally on the defect not only does not stimulate the formation of new tissue but induces a strong inflammatory response.

- 13) The results of this doctoral thesis allow us to conclude that MBGs have a high potential for the treatment of bone defects derived from different pathologies. The control of its composition and structure, the functionalization of its surface and its design as 3D scaffolding allows approaching this problem from a regenerative strategy.

Anexo I. Técnicas de Caracterización

Anexo I. técnicas de caracterización empleadas

Este anexo tiene como finalidad resumir las técnicas de caracterización utilizadas durante la tesis para facilitar la lectura de la misma.

Espectroscopia infrarroja de transformada de Fourier (FT-IR)

Esta técnica consiste en hacer incidir un haz de radiación infrarroja sobre la muestra y posteriormente determinar la radiación incidente absorbida. Las bandas que presentan los espectros obtenidos vienen determinadas por las frecuencias de vibración de los enlaces que forman las estructuras moleculares. De este modo es posible detectar multitud de grupos funcionales presentes en los materiales.

La fortaleza de los enlaces, la masa de los átomos implicados, la simetría de la molécula y sus modos normales de vibración son factores que definen las absorciones activas, por lo que el espectro IR es característico de cada compuesto analizado.

Durante la tesis doctoral esta técnica ha permitido evaluar la presencia de enlaces químicos tanto del esqueleto inorgánico de los vidrios mesoporosos bioactivos como de los grupos orgánicos incorporados a la superficie, así como su evolución en contacto con fluidos biológicos para determinar la presencia de nuevas fases en superficie.

Termogravimetría y análisis térmico diferencia (TG, DTA)

Esta técnica de análisis térmico se utiliza en la medición de cambios en las propiedades físicas y químicas de los materiales, normalmente en función de un incremento de temperatura constante.

Dentro de esta tesis doctoral se aplicó para evaluar la funcionalización de los vidrios mesoporosos pues se puede cuantificar la pérdida de masa en función de la temperatura lo que determinaría la cantidad de materia orgánica presente en el material. Así pues, se puede determinar la efectividad de la funcionalización de un material si se observa un aumento en la pérdida de masa a las mismas condiciones de la muestra en relación con el material de partida. Para realizar estos experimentos se monitorizó la masa de las muestras y se aplicó una rampa de temperatura de 10°C/min desde 25 a 600 °C. La diferencia de masa entre 150 °C y 550 °C es la asociada a la cantidad de materia orgánica en el material.

Otra de las aplicaciones posibles para evaluar los vidrios mesoporosos bioactivos es la determinación la cantidad de silanoles en superficie. En este caso el experimento se realiza aplicando una rampa de temperatura de 10°C/min desde 25 a 1000°C. A partir de 550 °C la pérdida de masa se asocia a la condensación de silanoles.

La presencia del DTA permite determinar la presencia de procesos exotérmicos o endotérmicos durante el calentamiento de la muestra. Con este detector fue posible determinar la temperatura de transición vítrea a partir del estudio de cambios detectados por el DTA a partir de 600 °C de temperatura.

Microscopía electrónica de barrido (SEM) y energía dispersiva de rayos X (EDS)

Esta técnica de microscopía electrónica es capaz de producir imágenes de alta resolución de la superficie de una muestra basándose en las interacciones electrón-materia. Consiste en hacer incidir un haz de electrones sobre una muestra opaca a los mismos mientras se realiza un barrido de la misma en una trayectoria de líneas paralelas para formar una imagen. Los electrones secundarios y retrodispersados son recogidos por un detector para formar la imagen final. Además estos poseen una gran profundidad de campo que permite enfocar a la vez gran parte de la muestra.

La preparación de las muestras para ser evaluadas por esta técnica requiere que estas sean conductoras, esto se consigue recubriéndolas con una capa muy fina de materiales conductores como son el grafito o el oro. En esta tesis doctoral ha sido empleado para la caracterización de la morfología de los vidrios mesoporosos bioactivos y para evaluar la evolución de su superficie en contacto con fluidos biológicos simulados con el tiempo.

Por otra parte es posible adquirir una señal de rayos X producida por la muestra hacer un análisis elemental semicuantitativo de la composición de la muestra, lo cual ha presentado utilidad para evaluar la composición de las fases presentes en la superficie de los materiales tras tratarlos en fluidos biológicos simulados.

La microscopía electrónica de barrido se ha realizado en un microscopio electrónico JEOL JSM-6335F (Tokio, Japón) con un voltaje de aceleración de 15-20 kV. Este microscopio está instalado en el Centro Nacional de Microscopía Electrónica de la UCM. Los análisis de EDS se realizaron en un sistema Oxford acoplado al microscopio Pentafet 6335F.

Difracción de rayos X (XRD)

La técnica de difracción de rayos X permite estudiar la periodicidad en un material. Los rayos X son un tipo de radiación electromagnética cuyo espectro de longitudes de onda se sitúa en el rango de 1–100 Å.

La difracción sólo se da en determinados ángulos de acuerdo con la Ley de Bragg definida por la ecuación:

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

Donde n es un número entero, λ es la longitud de onda de la radiación, d es la distancia interplanar y θ es el ángulo de incidencia. La posición de los máximos de difracción correspondientes a cada familia de planos (hkl) permite conocer la estructura cristalina de las muestras.

En esta tesis doctoral se ha utilizado principalmente la difracción de rayos X a bajo ángulo que ha permitido estudiar la estructura mesoporosa de los materiales. La muestra se expone a un haz de rayos X monocromático (en este caso se empleó un cátodo de cobre utilizándose la radiación de la línea Cu α ($\lambda=1.5418$ Å)). A partir de la difracción a bajo ángulo ($2\theta = 0.6^\circ - 10^\circ$) con un tamaño de paso de 0.02° (2θ) con un tiempo de conteo de 5 segundos y es posible obtener información sobre la estructura mesoporosa de los materiales. En el caso de los vidrios mesoporosos bioactivos, el material es amorfo a escala atómica, sin embargo su mesoestructura porosa produce reflexiones que dan lugar a máximos de difracción a bajo ángulo cuando los poros están ordenados.

Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM)

Esta técnica permite obtener imágenes a escala atómica de los materiales. La microscopía de transmisión electrónica se basa en la interacción que se produce cuando un haz de electrones de elevada energía obtenido mediante lentes magnéticas se hace incidir sobre la muestra y pasa a través de ella. Se obtiene una imagen que contiene información estructural y morfológica. Esta técnica hace uso de las propiedades ondulatorias de los electrones para obtener las imágenes y los diagramas de difracción. Permite, obtener imágenes de defectos planares, contraste de fases e imágenes con

resolución atómica (Microscopía electrónica de alta resolución, HRTEM). La imagen está asociada a la intensidad del haz de electrones que son transmitidos a través de la muestra, por lo que el espesor de la muestra debe ser suficientemente pequeño para permitir el paso de electrones. Por otro lado, el contraste electrónico está asociado a los mecanismos de interacción de los electrones con el material de la muestra.

En el estudio de materiales mesoporosos es una herramienta que permite analizar el tamaño y la morfología de los poros de los vidrios mesoporosos bioactivos.

Resonancia Magnética Nuclear de ^{29}Si , ^{31}P y ^{13}C (RMN)

Esta técnica se utiliza para determinar la estructura molecular de los vidrios mesoporosos bioactivos. La resonancia magnética nuclear es un fenómeno físico que se basa en la interacción de los momentos magnéticos de los núcleos atómicos con un campo magnético externo. Los núcleos con momento magnético distinto de cero absorben la radiación electromagnética en el rango de la radiofrecuencia. La frecuencia a la que tiene lugar la absorción depende del entorno químico (o apantallamiento electrónico) de los núcleos irradiados, con lo que es posible determinar la estructura de las moléculas dependiendo del desplazamiento químico al que aparecen las señales.

La aplicación de la caracterización por RMN en materiales mesoporosos ha sido posible gracias al desarrollo de las técnicas RMN de sólidos, rotación de ángulo mágico (MAS-RMN) y polarización cruzada (CP-RMN). MAS-RMN permite reducir al mínimo la anchura de las bandas del espectro debida a las interacciones dipolares y cuadrupolares y a las anisotropías asociadas al desplazamiento químico. La técnica CP-RMN mejora la relación señal/ruido del espectro de núcleos con abundancia natural baja sin afectar a la resolución del espectro.

Los experimentos de resonancia magnética nuclear de los núcleos ^{29}Si y ^{31}P tanto para polarización cruzada (CP) como para rotación de ángulo mágico (MAS) se realizaron en un espectrómetro Bruker AV-400-WB a 79.49 y 161.97 MHz para ^{29}Si y ^{31}P . La velocidad de giro fue de 10 kHz para el ^{29}Si y de 6 kHz para el ^{31}P . Como estándar para las medidas se utilizaron tetrametilsilano (TMS) y 85% de H_3PO_4 de ^{29}Si y ^{31}P , respectivamente. Los espectros se registraron con tiempo de contacto de 1 ms. El período de tiempo entre las sucesivas acumulaciones fue de 5 y 4 s para las medidas ^{29}Si y ^{31}P .

Los experimentos de resonancia magnética nuclear de ^{13}C para determinar la presencia de materia orgánica en la superficie de los materiales se realizaron en un espectrómetro Bruker 200 RMN a 75.45 MHz. La velocidad de giro fue de 12 kHz y el período de tiempo entre las sucesivas acumulaciones fue de 3 ms.

Con esta técnica ha sido posible determinar la conectividad de red de los diferentes vidrios sintetizados durante la tesis. Además los estudios de RMN han permitido determinar la cantidad de materia orgánica anclada covalentemente a la superficie de los materiales.

Adsorción de nitrógeno

La adsorción física de nitrógeno es una técnica que permite analizar las propiedades texturales de los sólidos (superficie específica, volumen y tamaño de poro). Se basa en la interacción que tiene lugar entre el adsorbato en este caso nitrógeno gas y el sólido que se quiere caracterizar (adsorbente). Los resultados del análisis de fisisorción de gases se expresan en forma de isothermas adsorción desorción que relaciona el volumen de gas retenido por la superficie del sólido en función de las condiciones de presión. Existen seis tipos de isothermas de adsorción clasificadas por la IUPAC, siendo la de tipo IV la característica de sólidos mesoporosos. La isoterma de adsorción de tipo IV, presenta un incremento importante de la cantidad de nitrógeno adsorbida a presiones relativas intermedias, que ocurre mediante un mecanismo de llenado en multicapas. En nuestro caso concreto se han utilizado los siguientes modelos matemáticos para determinar superficie específica, volumen y tamaño de poro:

- Superficie específica: se refiere a la superficie del sólido por unidad de masa. Para determinar el área específica de los sólidos es el método B.E.T. (Brunauer-Emmett-Teller).
- Volumen total de poro: es el volumen ocupado por el adsorbato dentro del adsorbente, a una presión determinada. Esta medida es directa, por lo que no requiere de modelización matemática y se expresa como cm^3/g .
- Distribución de tamaño de poro: se obtiene aplicando el modelo Barret-Joyner-Halenda (BJH) que permite obtener estas medidas en el rango de los mesoporos (2-50 nm).

En esta tesis doctoral, ha permitido confirmar la superficie específica de los vidrios mesoporosos y su tamaño de poro, que resultan factores imprescindibles en el proceso bioactivo de los materiales.

Medidas de potencial zeta (ζ Potential)

El potencial ζ es una medida que determina la diferencia de potencial existente entre el medio de dispersión y la capa de fluido estacionaria sobre la superficie de los materiales en dispersión. Su valor indica el alcance de las repulsiones electrostáticas entre partículas cargadas en una dispersión.

La realización de medidas de potencial en función del pH (curvas de potencial) son comunes para el estudio de la estabilidad coloidal de la suspensión. Es una técnica de fácil manejo y rápida. Durante la tesis doctoral ha resultado útil para determinar la eficacia de funcionalizaciones mediante la observación de cambios en el potencial antes y después de la modificación de la superficie y para evaluar cómo afecta el uso del surfactante a la carga superficial de los vidrios mesoporosos.

Espectroscopia de fluorescencia de Rayos-X (FRX)

Esta técnica consiste en la emisión de radiación x secundaria (o fluorescente) característica para cada elemento de un material que ha sido excitado previamente con rayos gamma. Este fenómeno se utiliza para análisis elemental de materiales. Los análisis espectroscópicos de fluorescencia de rayos-X se han llevado a cabo en un espectrofotómetro Philips PANalytical Axios, que emplea como fuente de rayos X un cátodo de rodio, utilizándose la radiación de la línea Rh $k\alpha$ ($\lambda = 0.6139 \text{ \AA}$). Este equipo emplea dos cristales monocromadores, uno de LiF y otro de wolframio, que discriminan la señal de rayos X emitida por la muestra en función de su energía. Durante la tesis, esta técnica se ha utilizado para determinar la composición de los vidrios mesoporosos bioactivos.

Espectrometría de emisión atómica de plasma acoplado inductivamente (ICP-OES)

La espectrometría de emisión atómica de plasma acoplado inductivamente (ICP-OES) utiliza plasma acoplado inductivamente para producir electrones excitados e iones que emiten radiación electromagnética en longitudes de onda característica de un elemento

particular. Algunas de las principales ventajas de esta técnica es que posee límites de detección muy bajos y capacidad de cuantificar diferentes elementos en el mismo análisis.

Esta técnica se utiliza habitualmente para cuantificar iones en disolución. Durante la tesis doctoral se ha utilizado para evaluar las cinéticas de bioactividad de los vidrios en diferentes medios a través de la cuantificación de las especies químicas liberadas al medio.

Espectroscopia ultravioleta-visible (UV-Vis)

La espectroscopia UV-Vis permite obtener espectros a partir de medidas de la diferencia intensidad entre el haz de luz emitido sobre una muestra en disolución y el haz incidente, en el detector en un rango de radiación de entre 200 y 700 nm.

Las bandas de adsorción en las regiones ultravioleta y visible corresponden a transiciones electrónicas en la capa de valencia. Con esta técnica se ha podido realizar la detección de fármacos liberados desde los vidrios mesoporosos o medidas de proteínas liberadas desde las células en contacto con ellos.

Espectroscopia de fluorescencia

Esta técnica consiste en excitar las muestras con un haz de luz desde su de estado electrónico fundamental (mediante la absorción de un fotón de una determinada longitud de onda) a uno de sus estados electrónicos excitados. A continuación, la molécula fluorescente vuela a su estado fundamental perdiendo parte de la energía absorbida mediante la emisión de un fotón de una longitud de onda distinta a la de excitación. En esta tesis doctoral, se ha aplicado principalmente para evaluar la liberación al medio de fármacos fluorescentes desde los vidrios mesoporosos. Por otra parte esta técnica ha permitido estudiar diferentes parámetros celulares de preosteoblastos en contacto con los vidrios mesoporosos.

Citometría de flujo

La citometría de flujo es una técnica que permite obtener información sobre poblaciones celulares de entre 5000 y 10000. Las células suspendidas en una solución salina, atraviesan un fino tubo transparente una a una sobre el que incide un haz de luz láser. La dispersión y reflexión de dicho haz de luz se analizan en duración, intensidad y

espectro, detectando como las células interactúan con el láser. Dependiendo de cómo la célula desvía la luz incidente (parámetros FSC y SSC) o emite fluorescencia (parámetros FL1, FL2 y FL3) es posible contar y clasificar las células en función de parámetros como morfología, la presencia de biomarcadores, tamaño y complejidad celulares.

Es posible marcar las células con moléculas fluorescentes que permiten determinar el momento del ciclo celular en el que se encuentran cada una de las células pudiéndose cuantificar la cantidad de células apoptóticas con marcadores específicos.

Microscopía confocal de fluorescencia

Esta técnica óptica de imagen se basa en el uso de un colimador (apertura localizada delante del fotomultiplicador) para eliminar la luz desenfocada mediante, lo que permite adquirir imágenes sólo del plano focal. Con esta técnica es posible reconstruir imágenes tridimensionales mediante el apilamiento de sucesivas capas. Su uso está generalizado en investigación biomédica, ya que permite el seguimiento procesos biológicos mediante el marcaje fluorescente de biomoléculas.

En la presente tesis doctoral, la técnica permitió evaluar la respuesta celular de diferentes tipos de células en contacto con los vidrios mesoporosos bioactivos. Para ello es necesario marcar las células con moléculas fluorescentes. En este caso concreto se ha utilizado DAPI para marcar los núcleos celulares en el azul y faloidina para marcar los filamentos de actina, que forman el citoesqueleto, celular en el rojo.

Anexo II. Artículos producidos durante la tesis doctoral

Artículos publicados

- 1) N. Gómez-Cerezo, I. Izquierdo-Barba, D. Arcos, M. Vallet-Regí, Tailoring the biological response of mesoporous bioactive materials, *J. Mater. Chem. B.* (2015) 3810–3819.
- 2) N. Gómez-Cerezo, S. Sánchez-Salcedo, I. Izquierdo-Barba, D. Arcos, M. Vallet-Regí, In vitro colonization of stratified bioactive scaffolds by pre-osteoblast cells, *Acta Biomater.* 44 (2016) 73–84.
- 3) A. Philippart, N. Gómez-Cerezo, D. Arcos, A.J. Salinas, E. Boccardi, M. Vallet-Regí, A.R. Boccaccini, Novel ion-doped mesoporous glasses for bone tissue engineering: Study of their structural characteristics influenced by the presence of phosphorous oxide, *J. Non. Cryst. Solids.* 455 (2017) 90–97.
- 4) L. Polo, N. Gómez-Cerezo, E. Aznar, J. Vivancos, F. Sancenón, D. Arcos, M. Vallet-Regí, R. Martínez-Máñez, Molecular gates in mesoporous bioactive glasses for the treatment of bone tumors and infection, *Acta Biomater.* 50 (2017) 114–126.
- 5) N. Gómez-Cerezo, L. Casarrubios, I. Morales, M.J. Feito, M. Vallet-Regí, D. Arcos, M.T. Portolés, Effects of a mesoporous bioactive glass on osteoblasts, osteoclasts and macrophages, *J. Colloid Interface Sci.* 528 (2018) 309-320.

Artículos enviados

- 1) L. Casarrubios, N. Gómez-Cerezo, M. J. Feito, M. Vallet-Regí, D. Arcos, M. T. Portolé, Incorporation and effects of mesoporous SiO₂-CaO nanospheres loaded with ipriflavone on osteoblast/osteoclast cocultures, *enviada a: European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics.*
- 2) L. Polo, N. Gómez-Cerezo, A. García-Fernández, E. Aznar, J.L. Vivancos, D.Arcos, M. Vallet-Regí, R. Martínez-Máñez, Mesoporous bioactive glasses equipped with stimuli-responsive molecular gates for the controlled delivery of levofloxacin against bacteria, *enviada a: Journal of Material Chemistry B.*

3) N. Gómez-Cerezo, E. Verron, V. Montouillout, F. Fayon, P. Lagadec, J.-M. Bouler; B. Bujoli; D. Arcos, M. Vallet-Regí: The response of osteoblasts and osteoclasts to gallium containing mesoporous bioactive glasses, *enviada a: Acta Biomaterialia*.

4) N. Gómez-Cerezo, D. Arcos, M. Vallet-Regí, Mesoporous bioactive glasses for biomedical composites *enviado a: Composites in Biomedical Engineering (multi volume SET I-IX)*

La presente tesis doctoral se centra en el estudio de los vidrios mesoporosos bioactivos para su aplicación como injertos óseos tras la pérdida o el daño en el hueso por acción de patologías como osteoporosis, infección u osteosarcoma. Para ello se ha estudiado la influencia de las propiedades estructurales, texturales y de la composición química en el comportamiento bioactivo y la respuesta celular que generan los materiales. Por otra parte se han incorporado compuertas moleculares para obtener sistemas estímulo-respuesta. Finalmente se han preparado andamios tridimensionales que favorezcan la migración y colonización celular para ser utilizados como injertos óseos.

