



**FACULTAD DE FARMACIA
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE**

**TRABAJO FIN DE GRADO:
SOPORTES BASADOS EN CERAMICAS
BIOACTIVAS PARA INGENIERIA DE TEJIDOS
DE HUESO**

Autor: Ania Canseco Rodríguez

Tutor: Antonio J. Salinas Sánchez

Convocatoria: Junio 2018

INDICE

	<u>Página:</u>
1. RESUMEN	3
2. INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES	3
A. Ingeniería de tejidos	3
B. Soportes	4
C. Antecedentes: vidrios bioactivos para injertos óseos	5
3. OBJETIVOS	7
4. METODOLOGIA	8
5. RESULTADOS Y DISCUSION	8
A. Caracterización de soportes de vidrios bioactivos mesoporosos	8
B. Biocompatibilidad de los productos de degradación	10
C. Biocompatibilidad de soportes MBG	11
D. Propiedades antibacterianas de los soportes MBG	13
6. CONCLUSIONES	14
A. Conclusiones del trabajo	14
B. Conclusiones generales de este trabajo	14
C. Retos futuros	15
7. BIBLIOGRAFIA	17

1. RESUMEN

La ingeniería de tejidos tiene como objetivo el desarrollo de compuestos biológicos y biomateriales para implantar en el organismo con el propósito de reparar, mantener o mejorar la función de tejidos u órganos. Las células, las señales y los soportes actúan de manera conjunta para conseguir el objetivo de la reconstrucción de determinados tejidos u órganos.

En la actualidad hay una gran cantidad de materiales sintéticos para la sustitución de hueso, con sistemas que cargan en su interior fármacos o biomoléculas, con iones terapéuticos añadidos para mejorar diferentes funciones o incluso sistemas de liberación estímulo-respuesta.

Palabras clave: Ingeniería de tejidos, biocerámicas, soportes, iones Zn^{2+} , antibacteriano.

2. INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES

A. Ingeniería de tejidos

“La ingeniería de tejidos (TE) es un campo interdisciplinar que aplica los principios de la ingeniería y de las ciencias de la salud para el desarrollo de sustitutos biológicos que restauren, mantengan o mejoren las funciones de tejidos u órganos”. Definición aportada por Langer y Vacanti en 1993¹, aunque se hablara de este tema por primera vez en 1984. Desde entonces han ido surgiendo ligeras modificaciones sobre esta definición, como la que aportó Williams en 1998: “la ingeniería de tejidos es una persuasión del propio cuerpo para curarse a sí mismo, a través de liberación en sitios apropiados de señales moleculares, células y estructuras de soporte”².

La ingeniería de tejidos surgió con fuerza en la última década del siglo pasado relacionando dos disciplinas que hasta entonces se veían de forma independiente. Por un lado, estaban los dispositivos médicos implantables tradicionales, basados en principios de ingeniería de materiales³, los cuales tenían que cumplir una serie de requerimientos mecánicos, pero no explotaban la gran fuerza que tiene el cuerpo para regenerar⁴. Las propiedades de éstos se han ido mejorando con los nuevos biomateriales, que presentan una reactividad controlada, como la degradación o bioactividad⁵. Por otro lado, estaba el trasplante de tejidos y órganos, por parte de las ciencias de la salud⁶. Podemos considerar que la ingeniería de tejidos es un puente entre ambas opciones, ya que usa los

biomateriales junto con componentes celulares responsables del crecimiento y reparación de tejidos, ayudando a regenerar un nuevo tejido funcional⁷.

Los biomateriales están enmarcados dentro del campo de la ingeniería biomédica, pero incluyen diferentes áreas como son ingenierías, biología, ciencias... En los últimos años se ha producido un gran avance, pasando de realizar injertos con tejidos inertes a realizarlos con materiales bioactivos o biodegradables para la reparación del hueso, los cuales suponen la tercera generación de biomateriales cuyo objetivo es ayudar a regenerar los tejidos en vez de sustituirlos⁸.

B. Soportes

Un “scaffold” es una estructura temporal de soporte para el crecimiento de células y de tejidos, donde tiene lugar el proceso de curación⁹. Un soporte ideal sería aquel que cumpla con una serie de características como son: dar un soporte mecánico biocompatible, evitar respuestas adversas por parte de los tejidos y mantener las cargas mecánicas del tejido en el que se inserta de forma temporal, además de tener una velocidad de degradación apropiada, equivalente con el proceso de regeneración del tejido. Los soportes tridimensionales deben mostrar además una interconectividad entre poros, lugar en el que van a adherirse, crecer y proliferar las células. Un tamaño de poro adecuado, va a favorecer el crecimiento interno de tejidos, vasos sanguíneos y células y a mayor superficie, mejor anclaje de las células. Otro aspecto de gran importancia es la superficie funcional, para facilitar la regeneración del hueso y en términos de carga y liberación de fármacos. Además, los soportes 3D deben facilitar el reconocimiento biológico, para favorecer y promover la adhesión, migración, proliferación y diferenciación celular.

Para el tratamiento de defectos óseos, la propuesta más sencilla de adoptar es implantar un soporte que cumpla, como se ha dicho, con los requerimientos de ser biocompatible, poroso, biodegradable y osteoconductor.

En este trabajo nos vamos a centrar en los soportes basados en cerámicas bioactivas, dentro de las cuales encontramos los vidrios bioactivos, los fosfatos de calcio, que incluyen a su vez a la hidroxiapatita (**HA**), Fosfato tricálcico (**β -TCP**), Fosfato de calcio bifásico (**BCP**) constituido por HA y β -TCP, Fosfato octacálcico (**OCP**) y otros.

Los vidrios bioactivos (**BGs**) son capaces de unirse con tejidos vivos y por ello se ha planteado su utilización como biomateriales en ingeniería de tejidos. A lo largo de su

evolución se han obtenido por tres vías sintéticas. Los primeros se obtuvieron por un método tradicional como es la fusión con enfriamiento rápido, por Hench y colaboradores en 1969¹⁰ y recibieron el nombre de vidrios preparados por fusión (**MPGs**). Investigaciones en MPGs usando soluciones in vitro, resaltaron el importante papel del grupo Si-OH (silanol), formado cuando el vidrio entraba en contacto con fluidos fisiológicos o fluidos simulados (**SBFs**)¹¹.

En 1991 Hench, y colaboradores, propusieron la síntesis de BGs por el método sol-gel, un método de química húmeda que cede a la red de vidrio a bajas temperaturas¹². Estos recibieron el nombre de vidrios de gel (**GGs**) o vidrios de sol-gel (**SGGs**), mostrando una superficie repleta de grupos Si-OH incluso antes de entrar en contacto con los fluidos fisiológicos, aunque se formaran nuevos grupos silanol al entrar en contacto con estos. En comparación con los primeros, se demostró que estos últimos tenían mayor área de superficie y volumen de poros, así como una respuesta bioactiva más rápida tras realizar una caracterización in vitro¹³.

En 2004 surgieron los vidrios con plantilla, también llamados vidrios bioactivos mesoporosos (**MBGs**), con poros ordenados y unas propiedades más controladas. El proceso de síntesis de éstos está basado en el sol-gel y principios de química supramolecular. La diferencia con respecto a los SGGs convencionales es que a estos últimos se les añaden surfactantes en la síntesis. Cuando éstos se retiran por medio de calcinación o extracción, obtenemos muy buenas características de textura y estructura¹⁴, mesoporos ordenados y todos del mismo tamaño, además de tener una gran cantidad de grupos silanol en la superficie, favoreciendo la respuesta bioactiva y aportando capacidad de funcionalizar y de adaptar las propiedades a demanda.

C. Antecedentes: vidrios bioactivos para injertos óseos

El primer intento para identificar posibles sustitutos de hueso fue llevado a cabo por un científico alemán, Job van Meckeren, que intentó usar un cráneo canino como material para realizar un injerto óseo en 1668¹⁵. En 1880 Maceven usó por primera vez huesos de un cadáver humano para reemplazar la parte dañada de un hueso¹⁶. El primer material sintético que se usó con estos fines fue CaSO₄, material que ya estaba siendo empleado por Dreesman en 1883 para rellenar cavidades¹⁷.

A continuación se describen algunos hitos importantes en el desarrollo de los vidrios bioactivos:

En 1889 Senn usó un hueso antiséptico decalcificado¹⁸, idea que se desarrolló en 1965; en 1920 Albee introdujo tricalcio fosfato artificial (**TCP**)¹⁹ y en 1971, Urist descubrió las proteínas morfogenéticas del hueso, las cuales representaban un gran avance en esa dirección²⁰; Hench en ese mismo año resaltó el hecho de que 45S5 fue el primer material capaz de unirse al hueso. La hidroxiapatita coralina (**HA**), surgió en 1974 por Roy y Linnehan²¹.

En 1977 se estudiaron las cerámicas bioactivas, por Gross and Strunz²². Kaj Larsson, un profesor finlandés desarrolló una serie de diferentes vidrios, en 1980, de los cuales S53P4 fue el que pareció tener mayor potencial. Andersson realizó una tesis sobre estos vidrios en 1991, la primera que se llevó a cabo sobre este tema, pero se han ido publicando muchas a partir de esta²³. El significativo programa de investigación de nuevos vidrios en Finlandia llevó a la comercialización de S53P4, ahora conocido como BonAlive[®], con uso aprobado en Europa en ortopedia y como injerto de hueso en 2006. Fue en 1981 cuando Hench vio que 45S5 se podía unir no solo al hueso, sino también a tejidos blandos y aportar una característica muy importante como es la osteoestimulación en 1987, cuando se estaba usando como partículas en aplicaciones de regeneración de hueso.

Con respecto a los primeros productos comerciales, el primer dispositivo Bioglass autorizado en Estados Unidos fue llamado “Prótesis de Reconstrucción Oscicular Bioglass” empleado para tratar la pérdida de audición y reemplazar los huesos del oído medio, aunque más adelante se renombró como **MEP**[®], éste fue modificado y mejorado por Mr. Ellis Douek, un cirujano otorrinolaringólogo de Londres, donde probaron la eficacia de éste y lo renombraron como **DOUEK MED**[®] en 1985. El segundo Bioglass que salió al mercado fue **ERMI**[®] (Endosseous Ridge Maintenance Implant) en 1988 para un mejor soporte de labios y lengua en un implante dentario.

En 1991 tuvo lugar el primer intento de usar materiales compuestos, por parte de Mittelmeier y algunos colegas, combinando matriz del hueso con colágeno²⁴. Ese mismo año surgió la HA sintética, por Furling y Osborn, que se usa ahora para el revestimiento de prótesis metálicas y para pasadores de fijación externa²⁵.

En 1992, van Blitterswijk desarrolló los polímeros bioactivos²⁶, mientras que Constanz trabajó ese mismo año, en la formación del carbonato de calcio coralino y se percató de que se podía mimetizar la formación de coral en el laboratorio, lo que le llevó a obtener

una forma inyectable de fosfato cálcico, que se establece en la hidroxiapatita rica en carbonato, totalmente dura²⁷.

En 1993 Perioglass[®] fue aprobado por la FDA como 45S5, patentado para restaurar la pérdida de hueso por enfermedad periodontal en defectos infraóseos, más adelante empleado para injertos en extracción de dientes y aumento de cresta alveolar.

A partir del 2000 el Bioglass original 45S5 fue utilizado en muchos pacientes para reparar defectos del hueso en ortopedia y en la mandíbula²⁸. Biogran[®] es otro producto basado en vidrios bioactivos, que tiene la composición de 45S5, pero con un rango de tamaño de partícula más pequeño. Este mismo año NovaBone[®] salió como el primer material para injertos óseos en ortopedia en sitios que no soportan carga.

En 2004, se describió el uso de 45S5 en el tratamiento de hipersensibilidad dental y en 2006 surgió BonAlive[®] basado en la composición de S53P4, con uso en ortopedia en injerto de sustitución del hueso.

Los últimos avances científicos destacados por Hench fueron los efectos de los productos de la disolución iónica de 45S5, capaces de controlar los ciclos celulares de los osteoblastos y la expresión de los genes para favorecer la osteogénesis, así como el desarrollo del procesamiento sol-gel para la obtención de geles de mayor bioactividad.

Hay que destacar otros avances más recientes, como el desarrollo de vidrios bioactivos mesoporosos²⁹, con mayor velocidad de la respuesta bioactiva y capacidades adicionales como consecuencia de una mayor área de superficie y volumen de los poros; elevada actividad hemostática por partículas de BGs esféricas³⁰; la capacidad de microsferas mesoporosas para liberación de fármacos³¹; la importancia de la liberación de los iones añadidos en la composición de los BGs³² o la síntesis de esferas huecas mesoporosas³³.

3. OBJETIVOS

El objetivo de este trabajo es realizar una revisión bibliográfica en el campo de los vidrios bioactivos. Éstos se unen directamente al tejido óseo, por lo que son muy investigados en el campo de la ingeniería de tejidos del hueso. Realizar la implantación del biomaterial en el hueso puede causar complicaciones como la infección en esa zona. Para evitar que se produzca o combatirla se emplean estrategias muy diversas como incluir antibióticos, péptidos antimicrobianos o modificar la superficie para dificultar la unión de bacterias sin

intervenir en la unión de las células que actúan en los procesos de curación. Otra estrategia es incluir iones con propiedades bactericidas, tema sobre el cual voy a desarrollar el trabajo. Basándome en un artículo muy completo sobre la inclusión de iones Zn^{2+} a los vidrios mesoporosos bioactivos, aportando así a los vidrios una actividad bactericida que ha sido demostrada mediante ensayos y que representa una gran trascendencia.

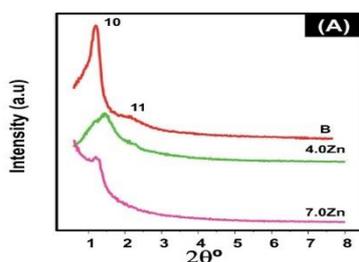
4. METODOLOGIA

Al tratarse de una revisión bibliográfica, este trabajo ha sido elaborado, en su primera parte, a partir de diferentes capítulos obtenidos de libros que trataban el tema, ya fuera de una manera más general o concreta y se ha empleado un artículo de investigación publicado en el *Journal of Materials Chemistry B* sobre la capacidad antibacteriana de estos vidrios³⁴. Mostrando la reducción de la incidencia de las infecciones por *Staphylococcus aureus* (bacteria de referencia), tras añadir Zn a los soportes de MBG. Este hecho se ha confirmado usando muestras de soportes sin Zn (B), con un 4% Zn (4.0 Zn) y con un 7% Zn (7.0 Zn) y comprobando la biocompatibilidad de estos, así como la toxicidad de los productos de la degradación de los mismos.

5. RESULTADOS Y DISCUSION

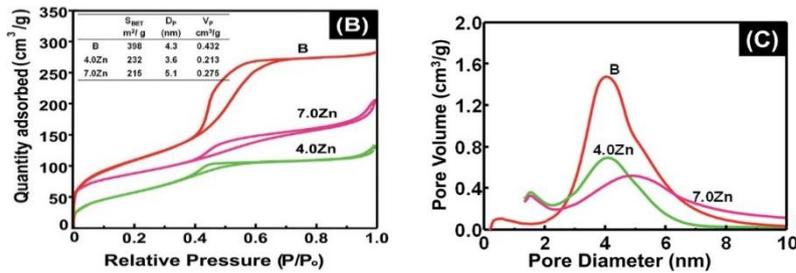
En el artículo de investigación se describe el uso de tres muestras para comprobar la actividad de estos vidrios como antibacterianos. Para ello se empleó una muestra sin Zn a la que se le denominó muestra B (80% SiO_2 , 15% CaO y 5% P_2O_5), otra a la que se le añadió un 4% de ZnO (4.0 Zn) y otra con una cantidad de ZnO del 7% (7.0 Zn).

A. Caracterización de soportes MBG sustituidos y no sustituidos con Zn



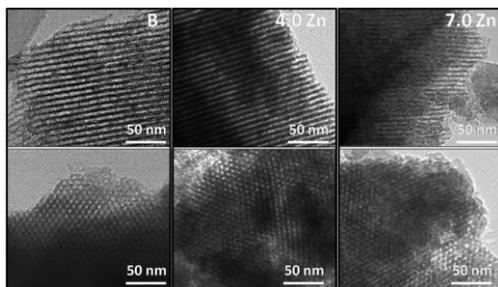
La intensidad de los máximos recogidos del difractómetro de rayos X de bajo ángulo (XRD) se reduce cuando se produce un aumento del contenido de ZnO , lo que indica un deterioro parcial del orden mesoporoso³⁵.

Con respecto a la muestra B, podemos ver que tiene un diagrama XRD mesoporoso que concuerda con los diagramas de TEM que se verán más adelante. Sin embargo, las muestras con ZnO presentan un valor menor de intensidad, debido a que se pierde ligeramente el orden mesoporoso.

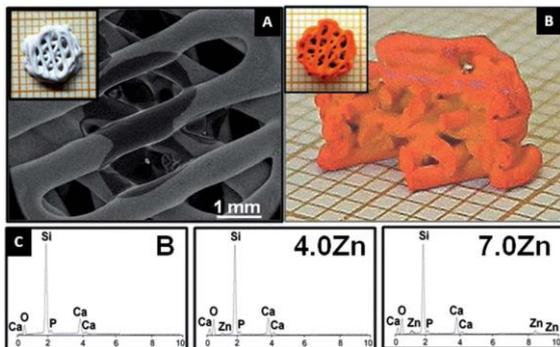


Las **Fig. B y C** muestran las **isotermas de absorción y desorción de nitrógeno**, así como los tamaños de poros. Todas las muestras presentan una distribución de poros relativamente ancha, común en este tipo de vidrios obtenidos por el método **EISA**³⁶.

El área de superficie y el volumen de poros de los soportes sustituidos con Zn, son menores en comparación con los no sustituidos. Sin embargo, se ve un aumento del tamaño de poros en aquellos soportes que presentaban una sustitución de 7.0 Zn.³⁶



Todos muestran un orden mesoporoso típico 2D-hexagonal y las imágenes obtenidas por **TEM** (microscopio electrónico de transmisión), muestran cómo se pierde el orden a medida que el contenido de ZnO aumenta dentro de los poros, confirmando los datos obtenidos en XRD.



Un análisis por **SEM** (microscopio electrónico de barrido) de los soportes 4.0 Zn muestra los poros entre dos barras adyacentes realizadas mediante una impresora 3D (imagen A). La imagen B nos enseña cómo quedaría el soporte en caso de ser teñida con un colorante rojo. Los resultados del análisis **EDX** (espectroscopia de rayos X de energía dispersiva) como se puede ver en la imagen C, indican la presencia de elementos como Si, Ca, P y Zn en el soporte. Al igual que se vio que los óxidos de éstos se encontraban de acuerdo con el porcentaje usado durante la síntesis.

Por otra parte se llevó a cabo un estudio por espectroscopia **²⁹Si-MAS-NMR**³⁷ para evaluar la conectividad de la red de MBG. En los resultados obtenidos de la conectividad de la red, se vio que estos vidrios tenían un valor menor al de los vidrios sol-gel, posiblemente por la especificidad del área de superficie. Sin embargo al introducir 4.0 Zn

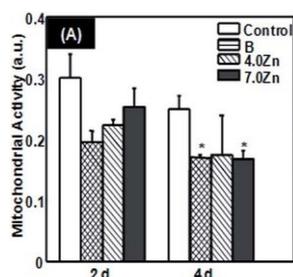
en los soportes, se eleva de forma ligera el valor de la conectividad relativa, en comparación a los soportes MBG que no están sustituidos con Zn (B). Cuando se añade una pequeña cantidad de ZnO, el Zn actúa como formador de red dando una coordinación tetraédrica (ZnO_4), la cual muestra una carga negativa, atrayendo a los cationes Ca^{2+} que van a actuar como un compensador de carga para la red, reduciéndose la cantidad de oxígenos que no están unidos y aumentando la conectividad.

No obstante, si añadimos una cantidad mayor de ZnO, como sería el caso de la muestra con 7.0 Zn, se reduce de forma drástica la conectividad de la red. Hecho debido a que la cantidad de Ca^{2+} necesaria para compensar la carga es mucho mayor que en el caso anterior y no hay suficientes iones para mantener el equilibrio en la red. De esta manera los iones de Zn^{2+} no pueden actuar como formadores de red, sino que lo hacen como iones modificadores de red, produciéndose una despolimerización de la red de sílice.

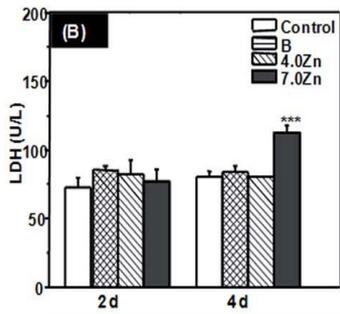
Tras evaluar la conectividad se ven valores que representan los átomos de fósforo, presentes en especies PO_4^{3-} tras realizar el espectro de ^{31}P -MAS-NMR, así como se ve que se reduce la conectividad del tetraedro, posiblemente por entornos con P-O-Si. La introducción de Zn produce un ligero descenso del porcentaje de este valor y se produce un desplazamiento químico (5.2 ppm para B a 8.6 ppm para 7.0 Zn), mostrando una conversión parcial de P-O-Si en P-O-Zn; hecho descubierto por Linati³⁸.

B. Biocompatibilidad de los productos de degradación de soportes MBG

Se evaluaron los posibles efectos negativos que podían llegar a tener los productos de degradación de los soportes tras 2 y 4 días en contacto con las células similares a osteoblastos (**proteoblastos MC3T3-E1**). En ambos casos, los controles empleados son únicamente osteoblastos en ausencia de productos de degradación.

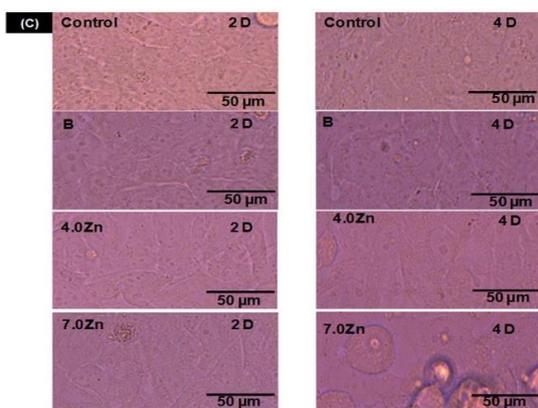


En la **figura A**, se puede observar que no hay cambios significativos en las diferentes muestras, en cuanto a una tasa de proliferación celular adecuada (en presencia de productos de degradación). Excepto para las muestras B y 7.0 Zn, para las cuales se puede ver un descenso de la proliferación en comparación con la muestra control a los 4 días.



En la **figura B** a los dos días no se observa liberación de productos citotóxicos por degradación, dado que se observan concentraciones similares de **LDH** (lactato deshidrogenasa). Sin embargo a los cuatro días, se ve un aumento en concentración de LDH para la muestra 7.0 Zn, lo cual indica que los osteoblastos en contacto con productos de degradación de los soportes B (sin Zn), experimentaron un efecto citostático.

No se puede confirmar que la baja proliferación en comparación con el control sea debida a un efecto citotóxico tras los cuatro días.

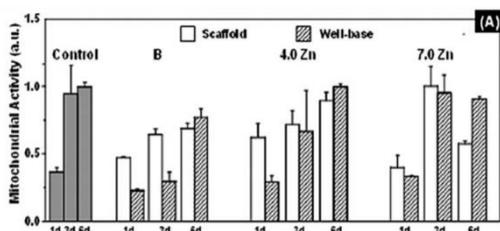


En la **figura C**, se puede ver como los osteoblastos mantienen su morfología en presencia de los productos de degradación. Sin embargo la muestra 7.0 Zn muestra la formación de unos agrupamientos que no se disuelven tras estos cuatro días.

Tras estas pruebas podemos decir que la muestra 7.0 Zn, indica que algún agente citotóxico ha sido liberado, produciendo la muerte celular.

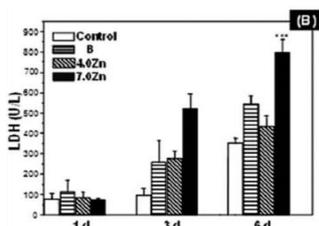
C. Biocompatibilidad de soportes MBG

La proliferación celular fue medida en términos de actividad mitocondrial en muestras de soportes B, 4.0 Zn y 7.0 Zn, tras 1, 3 y 6 días y se utilizó un plato de cultivo de plástico como control.



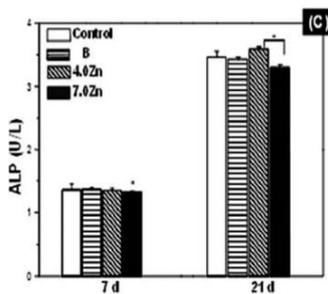
La proliferación en los soportes 4.0 Zn fue mayor a la presentada por soportes B, tras 6 días. Mientras que los soportes 7.0 Zn, solo mostraron una proliferación adecuada los primeros 3 días.

Para evaluar el efecto citotóxico de diferentes materiales, se realizó mediante la medida de las cantidades de LDH liberadas a las células cultivadas, tras 1, 3 y 6 días.



Para los soportes B y 4.0 Zn no se observó liberación de agente tóxico, sin embargo para los soportes 7.0 Zn se vio un aumento

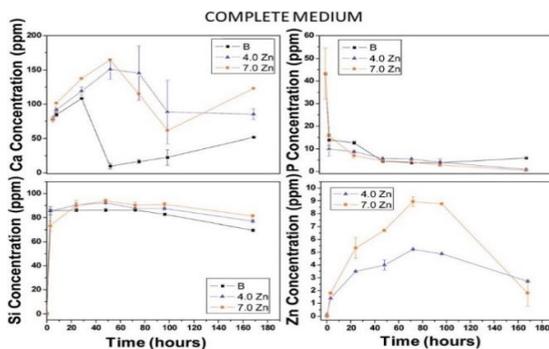
considerado de los niveles **LDH** en comparación con el control. Esto unido a su baja proliferación, indica que se produce un efecto citotóxico tras 6 días.



Tras 21 días, la actividad **ALP** (fosfatasa alcalina) es mayor en soportes 4.0 Zn, indicando un comportamiento adecuado para ser biocompatible. **ALP** es el marcador temprano del fenotipo de los osteoblastos y está regulado hasta el inicio de diferenciación de osteoblastos³⁹.

Todas las muestras de soportes de introdujeron en un **medio completo** y se incubaron durante 7 días a 37°C, tras los cuales se pudo observar en un análisis de espectroscopia infrarroja (**FTIR**) la aparición de una nueva banda correspondiente al PO_4^{3-} . La diferencia observada recae en que el soporte B obtuvo la banda correspondiente al fosfato amorfo tras 2 días y fosfato cristalino tras 4 días⁴⁰, mientras que los soportes con Zn lo hicieron el séptimo día. Esto indica que la presencia de Zn retardó el proceso bioactivo in vitro. (Este tipo de medio no suele ser el más adecuado para comprobar la respuesta bioactiva, ya que se suele realizar en fluidos corporales simulados).

Para entender la citocompatibilidad de las muestras se midieron variaciones de concentración de iones, como se puede ver en la siguiente imagen.



En la muestra B, el Ca sigue un perfil que se ajusta bien a la formación del fosfato amorfo, indicando una menor proliferación y un efecto citostático en los productos de degradación si lo comparamos con los soportes 4.0 Zn. La concentración de Ca es mayor en los soportes con Zn que en B, y lejos de la toxicidad⁴¹.

La concentración de fósforo se redujo de forma drástica en 3 horas y a los días casi había desaparecido por completo, lo cual puede ser atribuido a la formación de una capa de HA en B y una deposición de fosfatos de Ca y Zn en caso de los soportes con Zn. La cantidad de Si aumenta en las tres muestras y la cantidad de Zn, aumenta en ambas muestras (4.0 y 7.0 Zn) a las 72 horas, pero en mayor medida en 7.0 Zn⁴². En el caso del Si se observó algo similar, ya que a las 72 h se redujo, probablemente por la formación de una capa rica en gel de sílice en la superficie⁴³.

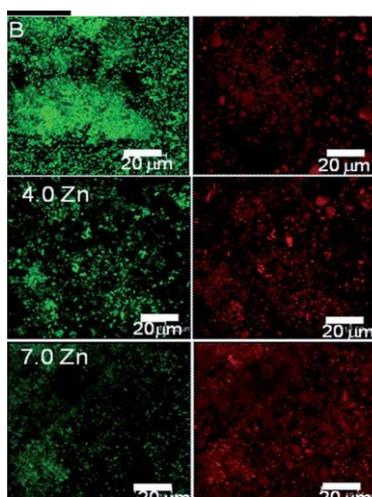
La biocompatibilidad de los soportes MBG está muy influenciada por su composición⁴⁴. Se ha visto que cambiando la cantidad de Zn en los vidrios cambia el comportamiento de las células similares a osteoblastos⁴⁵. Estas células muestran una adhesión a la superficie del soporte 4.0 Zn, aumentando la diferenciación y proliferación sin efecto citotóxico, el cual aparece en el caso de una mayor sustitución de Zn.

Se vio que un 5% de ZnO es la cantidad máxima que se puede incorporar sin obtener un efecto negativo. Una liberación de Zn de 5.89 ppm produce una inhibición de la función de los osteoblastos, efecto que se puede observar en soportes 7.0 Zn⁴⁶. La mayor liberación de Zn al medio que se observa con este soporte es debida a una despolimerización de la red de sílice.

D. Propiedades antibacterianas de los soportes MBG

Mediante un **test de viabilidad bacteriana** (fluorescencia vivo/muerto), se pudo confirmar que el Zn²⁺ dificulta la formación de biofilms a *S. aureus*, aumentando esta capacidad a medida que se aumenta la cantidad de Zn.

Cuando sumergimos las diferentes muestras en un medio **THB**, en lugar de un medio completo, se vieron diferentes variaciones en las concentraciones de los iones. Mediante un análisis FTIR se demostró que los vidrios MBG sumergidos en THB confirmaban la formación de una capa de HA.



Este ensayo demostró también la capacidad de estos vidrios para reducir la cantidad de bacterias viables. Como se puede ver en esta imagen hay una correlación entre el porcentaje de Zn que posee el soporte y la cantidad de bacterias que inhibe, aunque el Zn inhibe la actividad bacteriana incluso a bajas concentraciones. A mayor porcentaje de Zn, mayor es el número de bacterias inhibidas (rojo) y menor el de bacterias viables (verde).

La muestra de vidrio que no está sustituido muestra también una cierta actividad antimicrobiana frente a *S. Aureus*, que queda justificada por los iones de silicio y de calcio que incluye en su composición. Aunque al pasar a la siguiente muestra, ya con un 4% de Zn es cuando se ve realmente el aumento de bacterias muertas.

La incorporación de elementos bioinorgánicos en biocerámicas con uso en odontología y ortopedia, puede permitir que los propios implantes se defiendan de posibles infecciones bacterianas.

6. CONCLUSIONES

A. Conclusiones del artículo descrito

Como se ha podido ver en este trabajo las muestras B y 4.0 Zn tienen condiciones favorables de proliferación, diferenciación, adhesión de osteoblastos y ausencia de productos de degradación citotóxicos. Además los soportes de 4.0 Zn y 7.0 Zn, en condiciones in vitro y con una infección simulada, fueron capaces de inhibir *S. Aureus* en mayor medida que el soporte B. Esta capacidad antibacteriana, permite la reducción de infecciones tras un implante.

Además de la investigación descrita en este artículo, se realizaron pruebas para ver si otros iones podían tener esta misma propiedad que el Zn^{2+} . Se vio que los iones Ga^{3+} mostraban actividad antimicrobiana, pero esta únicamente estaba presente con concentraciones tan elevadas que llegaban a no ser biocompatibles y tóxicos para los osteoblastos. Así como no se liberaban y en su mayoría se quedaban en el interior de la red, no mostrando efecto.

B. Conclusiones generales de este trabajo

- Los MBGs, parecen ser la familia de los vidrios bioactivos más prometedores, por las buenas características en cuanto a superficie y volumen de poros que presentan, siendo más del doble que los vidrios de gel⁴⁷. Además tienen una superficie rica en grupos silanol, lo cual facilita la adhesión de moléculas y células y mejora el comportamiento cuando se implantan en el cuerpo⁴⁸. Estos grupos permiten la mayor respuesta bioactiva in vitro que se puede observar en MBGs, para un material sintético⁴⁹.

- Los vidrios MBG presentan unas características que les convierten en candidatos óptimos para la fabricación de soportes mesoporosos tridimensionales, ya que permiten la incorporación de fármacos o iones metálicos, añadiendo beneficios como acción antibacteriana, anti-cancerígena o la capacidad de liberar los fármacos o iones, de forma que se favorezca la regeneración del tejido⁵⁰. De esta manera los soportes MBG tridimensionales, permiten una liberación controlada de Zn^{2+} que influye mucho en el desarrollo de osteoblastos. Aunque en algunas ocasiones los iones se unen tan

fuertemente a la red del vidrio que se quedan en éste en lugar de liberarse. En otras ocasiones, las concentraciones necesarias del elemento para alcanzar la acción que se desea son tan elevadas que el MBG deja de ser biocompatible.

- Se ha visto que hay numerosas técnicas para modificar la superficie de los soportes para inmunomodulación y para proteger al material de ser absorbido por proteínas. Hay que tener en cuenta que en algunas ocasiones los iones añadidos pueden interactuar con fármacos incluidos en **DDSs** (sistemas de liberación de fármacos), dando lugar a una modificación de la cinética de liberación.

- Tras varios estudios sobre los sistemas de liberación de fármacos, se vio que concentraciones de óxidos de hasta un 2% para Ga y Ce y de un 4% para Zn se podían usar para obtener sistemas para ser usados como DDSs. En un estudio se usó curcumina como modelo de fármaco, ya que al ser una base fuerte de Lewis tiene elevada afinidad por ácidos de Lewis como el Ga^{3+} o el Ce^{3+} , facilitando la carga del fármaco al máximo. Sin embargo se vio que se producían interacciones, con un impacto negativo sobre la liberación del fármaco.

- La estructura de los MBGs permite que se diseñen sistemas estímulo-respuesta, los cuales poseen unas compuertas que se van a abrir frente a un estímulo específico ya sea luz, calor u otros factores físicos o químicos.⁵¹.

- El uso de BGs como nanopartículas para la liberación de fármacos y terapia génica. Se han visto mejoras en las propiedades mecánicas, llegando a asimilarse a las del hueso natural y también proporcionando una adhesión celular.

- Otro método que se investigó fue el uso de células madre embrionarias (ESCs) como recubrimiento de soportes y se vio que se podrían usar para regenerar órganos deteriorados, pero por problemas de ética no se siguió investigando. Por este motivo se están centrando en células madre pluripotentes inducidas, células madre del tejido adiposo o de otros orígenes. Otras vías de investigación son por un lado un concentrado de aspirado de médula ósea, y por otro el uso de osteoblastos⁵².

C. Retos futuros

Los mayores desafíos a los que se enfrentan los avances en este campo son reducir sus limitaciones. Como son la selección de células, soportes y señales adecuadas en cuestiones de biocompatibilidad, porosidad adecuada o ser compatible mecánicamente.

Con respecto a las señales es necesario establecer las concentraciones terapéuticas, a partir de las cuales se obtienen efectos tóxicos, reduciendo de esta manera posibles efectos adversos. Otra limitación son los efectos adversos debido a las células del hospedador frente a las del donante o agentes inmunomoduladores apropiados y la elección de los modelos animales más apropiados.

Todas las características que se ha visto que tienen los vidrios MBG, hace que nos planteemos el gran potencial que tienen para regenerar pérdidas de tejido óseo. Por ello futuras investigaciones se centrarán en obtener combinaciones eficientes de materiales osteoconductores, osteoinductores y células osteogénicas. Con el objetivo de obtener un reemplazo funcional de un tejido duro dañado, evitando los injertos en éstos, que son el patrón oro.

Mientras que los vidrios presentan una gran ventaja por la formación de hidroxiapatita en el cuerpo, tienen como desventaja el largo periodo de tiempo que tardan en reabsorberse (puede durar varios años en casos de grandes defectos óseos) y las propiedades mecánicas. Por ello los vidrios bioactivos no son adecuados en situaciones en las que se debe llevar a cabo una operación en la zona que haya sido rellenada por éstos. Cualquier intento de perforar o cortar el área implantada muy pronto puede llevar a que se aplaste el nuevo hueso formado o incluso que se divida por los fragmentos más duros de hueso no reabsorbido produciendo un daño mayor.

De acuerdo a consideraciones económicas se está llevando a cabo un aumento del uso de materiales sustitutos de hueso con respecto al hueso autólogo. En la actualidad hay una gran cantidad de materiales sustitutos de hueso, siendo el aloinjerto de hueso el más empleado. Pero la realidad es que hay varios materiales en competición, por lo que es de esperar que algunos materiales se empleen únicamente en algunas aplicaciones, o que no se pueda emplear un único material para todas las aplicaciones.

Las investigaciones en este campo se centrarán en combinaciones eficientes de materiales osteoconductores, factores de crecimiento osteoinductores y células osteogénicas en un mismo equivalente tisular. La meta es obtener un reemplazo funcional de la zona dañada del hueso mediante un proceso que evite tener que realizar recolección de injertos óseos.

7. BIBLIOGRAFÍA

1. Langer, R. and Vacanti, J.P. (1993). Tissue engineering. *Science*, 260, 920-926.
2. Williams, D.F. (ed.) (1998) *The Williams Dictionary of Biomaterials*, Liverpool University Press, Liverpool, p.318.
3. Ratner, B.D., Hoffman, A.S. Schoen, F.J., and Lemons, J.E., (2013) *Biomaterials Science: An Evolving, Multidisciplinary Endeavor*, Elsevier Academic Press.
4. Williams, D.F. (2000) *Bone Engineering* (ed. J.E. Davies), Em squared, Toronto
5. L.L. Hench, (1991) Bioceramics: from concept to clinic. *J.Am. Ceram. Soc.*, 74, 1487-1510.
6. Russel, P.S. (1985) Selective transplantation. An emerging concept. *Ann. Surg.*, 201, 255-262.
7. Williams, D.F. (2004) Benefit and risk in tissue engineering. *Mater. Today*, 7, 24-29.
8. Lysaght, M.J., Nguy, N.A., Sullivan, K. (1998) An economic survey of the emerging tissue engineering industry. *Tissue Eng.*, 4, 231-238.
9. Murungan, R. and Ramakrishna, S. (2007) Design strategies of tissue engineering scaffolds with controlled fiber orientation. *Tissue Eng.*, 13, 1845-1866.
10. L.L. Hench, R. J. Splinter, W.C. Allen, T.K. Greenlee, J. *Bonding mechanisms at the interface of ceramic prosthetic materials*. *Biomed. Mater.* 1971, 2, 117-41.
11. L.L. Hench. *Four Eras of Discovery and Development*. *Biomed. Glasses* 2015; 1, 1-11.
12. R. Li, A. E. Clark, L. L. Hench. *J. Ap, pl. An investigation of bioactive glass powders by sol-gel processing*. *Biomater.* 1991, 2, 231-239.
13. M. Vallet-Regí, C. V. Ragel, A. J. Salinas. *Eur. J. Inorg. Chem.* 2003: 1029-1042. J.R. Jones, *Acta Biomater.* 2013, 9, 4457-4486.
14. DE, Arcos, M. Vallet-Regí, *Acta Biomaterialia* 2010, 6, 2874-2888.
I. Izquierdo- Barba, A. Salinas, M. Vallet-Regí, *Int. J. Appl. Glass Sci.*, 2013, 4, 149-161.
A. Salinas M. Vallet-Regí, *J. Non-Cryst Solids*, 2016, 432, 9-14.
15. Van Meekeren, J., 1668. *Heel a geneeskonstige aanmerikingen*. Commelijjn, Amsterdam.
16. Macewen, W., 1881. *Observations concerning transplantation on bone*. *Proc. R. Soe. Lond*, 32, 232-247.

17. Dreesman, H., 1893. *Read before the Surgical Section*. New York Academy of Medicine, New York, March 13.
18. Senn, N., 1889. *On the healing of aseptic bone cavities by implantation of antiseptic decalcified bone*, J. Med. Sci. (Am.) 98 (3), 219-243.
19. Albee, F., 1920. H. Studies in bone growth. *Triple calcium phosphate as a stimulus to osteogenesis*, Ann. Surg, 71, 32-36.
20. Urist M. R., Strates B. S. *Bone morphogenetic protein*. J Dent Res 1971; 50:1392–406.
21. Roy, D. M., Linnehan, S. K., 1974. *Hydroxiapatite formed from coral skeleton carbonate by hydrothermal Exchange*. Nature 247, 220-222.
22. Gross, U. M., Strunz, V., 1977. *Surface staining of sawed sections of undecalcified bone containing alloplastic implants*. Stain. Technol. 52 (4), 217-219.
23. Andersson, Ö. H., 1920. *The bioactivity of silicate glass*. Thesis Åbo Akademi University Turku, Finland.
24. Mittelmeier, H., Mittelmeier, W., 1991. *Moderne Entwicklung von Knochenersatzmaterialen*. Heft zur Unfallheilkunde. In: Huggler, A. H., Kunner, H. (Eds.), *Aktueller Stand beim Knochenersatz*, vol, 216. Springer-Verlag. Berlin, pp. 69-84.
25. Furlong, R. J., Osborn, J.-F., 1991. *Fixation of hip prothesis by hydroxyapatite ceramic coatings*, J. Bone Joint Surg. 73B, 741-745.
26. Van Bitterswijk, C.A., Bakker, D., Leeders, H., Brink, J.V.D., Hesselings, S.C., Bovell, Y.P., Radder, A.M., Sackers, R. J., Gaillard, M.L., Heinze, P.H., Beumer, G. J., 1992. *Interfacial reactions leading to bone-bonding with PEO/PBT copolymers (polyactive ®)*. In: Ducheyne, P., Kokubo, T., van Bitterswijk, C.A. (Eds.). *Bone-bonding Biomaterials*. Reed Healthcare Communications, Holland, pp. 13-30.
27. Constanz, B.R., Ison, I.C., Fulmer, M.T., Poser, R.D., Smith, S.T., Van-Wagoner, M., Ross, J., Goldstein, S.A., Jupiter, J.B. Rosenthal, D.I., 1995. *Skeletal repair by in situ formation of the mineral phase of bone*. Science 267, 1796-1799.
28. Jones, J.R., 2013. *Review of bioactive glass: from Hench to hybrids*. Acta Biomater 9, 4457-4486.
29. Yan, X., Yu, C., Zhou, X., Tang, J., Zhao, D., 2004. *Highly ordered mesoporous bioactive glasses with superior in vitro bone forming bioactivities*. Angew. Chem. Int. Ed. 43, 5980-5984.

30. Ostomel, T.A., Shi, Q., Tsung, C.-K., Liang, H., Stucky, G.D., 2006. *Spherical bioactive glass with enhanced rates of hydroxyapatite deposition and hemostatic activity*. *Small* 2, 1261-1265.
31. Arcos, D., López-Noriega, A., Ruiz-Hernández, E., Terasaki, O., Vallet-Regi, M., 2009. *Ordered mesoporous microspheres for bone grafting and drug delivery*. *Chem. Mater.* 21, 1000-1009.
32. Hoppe, A., Güldal, N.S., Boccaccini, A.R., 2011. *A review of the biological response to ionic dissolution products from bioactive glasses and glass-ceramics*. *Biomaterials* 2011. 32 (11), 2757–74.
33. Li, Y., Bastakoti, B.P., Yamauchi, Y., 2015. *Smart soft-templating synthesis of hollow mesoporous bioactive glass spheres*. *Chem. Eur. J.* 21, 8038-8042.
34. Sanchez-Salcedo, S.; Shruti, S.; Salinas, A.J.; Malavasi, G.; Menabue, L.; Vallet-Regí, M. J. *In vitro antibacterial capacity and cytocompatibility of SiO₂-CaO-P₂O₅ meso-macroporous glass scaffolds enriched with ZnO*. *Mater. Chem. B* 2014, 2, 4836–4847.
35. A. J. Salinas, S. Shruti, G. Malavasi, L. Menabue and M. Vallet-Regi, *Substitutions of cerium, gallium and zinc in ordered mesoporous bioactive glasses*. *Acta Biomater.*, 2011, 7, 3452–3458.
36. 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. Mater.*, 2006, 18, 3137– 3144.
37. S. Shruti, A. J. Salinas, G. Lusvardi, G. Malavasi, L. Menabue and M. Vallet-Regí, *Acta Biomater.*, 2013, 9, 4836–4844.
38. L. Linati, G. Lusvardi, G. Malavasi, L. Menabue, M. C. Menziani, P. Mustarell and U. Segre, *J. Phys. Chem. B*, 2005, 109, 4989–4998.
39. A. Hoppe, S. G. Nusret and A. R. Boccaccini, *Biomaterials*, 2011, 32, 2757–2774.
40. A. J. Salinas and M. Vallet-Regí, *In Surface Tailoring of Inorganic Materials for Biomedical Applications*, ed. L. Raimondi, C. Bianchi and E. Verné, Bentham Science Publishers, 2012, pp. 359–375.
41. Hoppe, V. Mouriño and A. R. Boccaccini, *Biomater. Sci.*, 2013, 1, 254–256.
42. S. Shruti, A. J. Salinas, G. Lusvardi, G. Malavasi, L. Menabue and M. Vallet-Regí, *Acta Biomater.*, 2013, 9, 4836–4844.
43. L. L. Hench, *J. Am. Ceram. Bioceramics: From Concept to Clinic*. *Soc.*, 1991, 74, 1487–1510.

44. P. Valerio, M. M. Pereira, A. M. Goes and M. F. Leite, *Biomaterials*, 2004, **25**, 2941–2948.
- A. El-Ghannam, P. Ducheyne and I. M. Shapiro, *Biomaterials*, 1997, **18**, 295–303.
45. M. N. Rahaman, D. E. Day, B. S. Bal, Q. Fu, S. B. Jung, L. F. Bonewald and A. P. Tomsia, *Acta Biomater.*, 2011, **7**, 2355–2373.
46. A. Yamamoto, R. Honma and M. Sumita, *J. Biomed. Mater. Res.*, 1998, **39**, 331–340.
47. Wu C, Chang J. Multifunctional mesoporous bioactive glasses for effective delivery of therapeutic ions and drug/growth factors. *J Control Release*. 2014, **193**, 282–95.
- Shruti S., Salinas A J., Ferrari E., Malavasi G., Lusvardi G., Doadrio A. L. Menabue L, Vallet-Regí M. Curcumin release from cerium, gallium and zinc containing mesoporous bioactive glasses *Micropor. Mesopor. Mat.* 2013 **180**, 92–101.
48. Izquierdo-Barba I., Salinas A. J., Vallet-Regí M. *Bioactive glasses: from macro to nano*. *Int. J. Appl. Glass Sci.* 2013, **4**, 149–61.
49. Izquierdo-Barba I., Vallet-Regí M., *Mesoporous Bioactive Glasses: Relevance of Their Porous Structure Compared to That of Classical Bioglasses, Biomed Glasses* 2015, **1**, 140-150.
- Salinas A. J., Vallet-Regí M. Glasses in bone regeneration: a multiscale issue. *J. Non-Cryst. Solids*. 2016, **432**, 9-14.
50. Izquierdo-Barba I, Arcos D, Sakamoto Y, Terasaki O, López-Noriega A, Vallet-Regí M. *High performance mesoporous bioceramics mimicking bone mineralization*. *Chem Mater* 2008, **20**:3191–8.
51. Polo L., Gómez-Cerezo N., Aznar E., Vivancos J. L., Sancenón F., Arcos D., Vallet-Regí M., Martínez-Mañez R. *Molecular gates in mesoporous bioactive glasses for the treatment of bone tumors and infection*. *Acta Biomaterialia* 2017, **50**, 1146–26.
52. Lozano, D., Manzano, M., Doadrio, J.C., Salinas, A. J., Vallet-Regí, M., Gómez-Barrena, E., and Esbrit, P., (2010). *Osteostatin loaded bioceramics stimulate osteoblastic growth and differentiation*. *Acta Biomater*, **6**, 797-803.