



Tesis Doctoral

Programa de Doctorado en Bioingeniería

**Estrategias biomiméticas para el desarrollo de  
andamios cerámicos de tercera generación con  
aplicación en ingeniería de tejido óseo**

---

**Eduardo Francisco Sebastián Beltrá**

*Director de la tesis*

**Dr. D. Pablo Andrés Velásquez Castillo**

*Codirector de la tesis*

**Dr. D. Ángel Murciano Cases**

---

Instituto de Bioingeniería

Universidad Miguel Hernández de Elche

- Elche, 2023 -





## INDICIOS DE CALIDAD

La Tesis Doctoral titulada “*Estrategias biomiméticas para el desarrollo de andamios cerámicos de tercera generación con aplicación en ingeniería de tejido óseo*”, realizada por D. EDUARDO FRANCISCO SEBASTIÁN BELTRÁ, bajo la dirección de los profesores Pablo Andrés Velásquez Castillo y Ángel Murciano Cases, se presenta bajo la modalidad de tesis por compendio de las siguientes publicaciones:

1. **E. Sebastián, A. Murciano, R. Madrigal, P.N. De Aza, P. Velasquez. 3D CaP porous scaffolds with grooved surface topography obtained by the sol-gel method**

Ceramics International. 47, 21466-21475 (2021).

DOI: 10.1016/j.ceramint.2021.04.158

Factor de Impacto (2021): 5.532 (Q1)

N.º de la revista en su área (2021): 3/29 (Materials Science, Ceramics)

2. **E. Sebastián, A. Murciano, P.N. De Aza, P. Velasquez. Synthesis of 3D porous ceramic scaffolds obtained by the sol-gel method with surface morphology modified by hollow spheres for bone tissue engineering applications**

Ceramics International. 49, 4393-4402 (2023).

DOI: 10.1016/j.ceramint.2022.09.326

Factor de Impacto (2021): 5.532 (Q1)

N.º de la revista en su área (2021): 3/29 (Materials Science, Ceramics)





El Dr. D. Pablo Andrés Velásquez Castillo, director y el Dr. D. Ángel Murciano Cases, codirector de la tesis doctoral titulada *“Estrategias biomiméticas para el desarrollo de andamios cerámicos de tercera generación con aplicación en ingeniería de tejido óseo”*.

**INFORMAN:**

Que D. EDUARDO FRANCISCO SEBASTIÁN BELTRÁ, ha realizado bajo nuestra supervisión el trabajo titulado *“Estrategias biomiméticas para el desarrollo de andamios cerámicos de tercera generación con aplicación en ingeniería de tejido óseo”* conforme a los términos y condiciones definidos en su Plan de Investigación y de acuerdo con el Código de Buenas Prácticas de la Universidad Miguel Hernández de Elche, cumpliendo los objetivos previstos de forma satisfactoria para su defensa pública como tesis doctoral.

Y para que así conste, y a los efectos oportunos, firmamos el presente documento en Elche a 28 de abril de 2023.

Dr. D. Pablo Andrés Velásquez Castillo

Director de la tesis

Dr. D. Ángel Murciano Cases

Codirector de la tesis





La Dra. Dña. Piedad N. De Aza Moya, Coordinadora del Programa de Doctorado en Bioingeniería de la Universidad Miguel Hernández de Elche por Resolución Rectoral 3120/19, de 09 de diciembre de 2019.

**INFORMA:**

Que D. EDUARDO FRANCISCO SEBASTIÁN BELTRÁ, ha realizado bajo la supervisión de nuestro Programa de Doctorado el trabajo titulado “*Estrategias biomiméticas para el desarrollo de andamios cerámicos de tercera generación con aplicación en ingeniería de tejido óseo*” conforme a los términos y condiciones definidos en su Plan de Investigación y de acuerdo con el Código de Buenas Prácticas de la Universidad Miguel Hernández de Elche, cumpliendo los objetivos previstos de forma satisfactoria para su defensa pública como tesis doctoral.

Lo que firmo para los efectos oportunos, en Elche a 28 de abril de 2023.

Dra. Dña. Piedad N. De Aza Moya

Coordinadora del Programa de Doctorado en Bioingeniería





Esta Tesis Doctoral es parte del proyecto I+D+i PID2020-116693RB-C21, financiado por la Agencia Estatal de Investigación y el Ministerio de Ciencia e Innovación de España (MCIN/AEI/10.13039/501100011033).

Así mismo, para el desarrollo de la presente Tesis Doctoral se contó con una subvención de la Conselleria de Innovación, Universidades, Ciencia y Sociedad Digital de la Generalitat Valenciana, dentro del programa AICO2022 para grupos de investigación consolidados (CIAICO/2021/157).



# AGRADECIMIENTOS

La realización de este trabajo no hubiera sido posible sin la ayuda de todas las personas que he conocido durante esta etapa doctoral, por ello, me gustaría dedicar unas palabras de agradecimiento a las personas que de un modo u otro han contribuido a que esto fuera posible.

En primer lugar, quisiera agradecer a mi director, el Dr. Pablo Andrés Velásquez Castillo, por su gran apoyo durante la realización de esta Tesis Doctoral, tanto desde el punto de vista académico como personal. Por iniciarme en mi formación investigadora, por hacer más amenas las largas jornadas en el laboratorio con sus interesantes conversaciones y sobre todo por su paciencia, comprensión y por compartir conmigo sus valiosos consejos siempre que los he necesitado. Ha sido un privilegio poder desarrollar este trabajo bajo su supervisión.

Igualmente me gustaría agradecer a mi codirector, el Dr. Ángel Murciano Cases, por transmitirme su pasión por la investigación y sus enseñanzas en el campo del sol-gel, por su gran ayuda a la hora de analizar los resultados obtenidos y también por sus acertados comentarios que han contribuido a mejorar este trabajo.

A la Dra. Piedad Nieves de Aza Moya por permitirme formar parte de su grupo de investigación y por estar siempre disponible para resolver todas las dudas académicas. También agradecer al resto de miembros del departamento, en especial a Nayarit A. Mata Alayón, por compartir sus conocimientos sobre el funcionamiento de los equipos de laboratorio, y a Karina Salazar Llangari por su compañía durante los últimos momentos de esta etapa.

A mi madre, hermano y abuelos por su apoyo incondicional durante todos estos años, tanto en los momentos buenos como en los malos. Sin la educación que me han dado y sin su apoyo no habría podido realizar esta Tesis Doctoral.

Finalmente, me gustaría agradecer a una persona muy especial que me ha acompañado durante todo este tiempo, Laura, gracias por ser como eres, por estar siempre ahí y por tu apoyo incansable durante esta etapa, a tu lado todo siempre es más fácil.



# ÍNDICE

<b>RESUMEN</b> .....	v
<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	1
1.1. La ingeniería de tejido óseo.....	2
1.2. Anatomía y fisiología del tejido óseo.....	3
1.2.1. Las células del tejido óseo.....	5
1.2.2. La remodelación ósea .....	7
1.3. Biomateriales para ingeniería de tejido óseo.....	7
1.3.1. Concepto de bioactividad .....	10
1.4. Andamios para ingeniería de tejido óseo .....	11
1.4.1. Técnicas de obtención de andamios.....	13
1.4.1.1. El proceso sol-gel.....	14
1.4.1.2. Técnica de replicación de esponja polimérica .....	15
1.5. Estrategias biomiméticas en ingeniería de tejido óseo.....	16
1.5.1. El papel de la topografía superficial .....	16
1.5.2. Los sistemas de liberación controlada.....	18
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	21
<b>3. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	23
3.1. Obtención de andamios cerámicos 3D.....	23
3.2. Caracterización de los andamios cerámicos 3D.....	24
3.3. Modificación de la topografía superficial de los andamios.....	24
3.4. Síntesis e incorporación de esferas huecas a la superficie de los andamios .....	25
3.5. Ensayos de bioactividad <i>in vitro</i> de los andamios.....	26
<b>4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b> .....	28
4.1. Obtención y caracterización de los andamios cerámicos 3D.....	28
4.2. Modificación de la topografía superficial de los andamios.....	30
4.3. Bioactividad <i>in vitro</i> de los andamios con topografía superficial modificada.....	31
4.4. Síntesis e incorporación de esferas huecas a los andamios cerámicos.....	32
4.5. Bioactividad <i>in vitro</i> de los andamios con esferas huecas incorporadas.....	36
<b>5. CONCLUSIONES Y PROYECCIONES FUTURAS</b> .....	39
<b>6. BIBLIOGRAFÍA</b> .....	43
<b>ANEXO: COMPENDIO DE ARTÍCULOS</b> .....	53
7.1. Artículo 1 .....	55
7.2. Artículo 2.....	65



# ABREVIATURAS

<b>ALP</b>	Fosfatasa Alcalina
<b>BCP</b>	Fosfato Cálcico Bifásico
<b>BET</b>	Brunauer-Emmet-Teller
<b>BJH</b>	Barret-Joyner-Halenda
<b>BMP</b>	Proteína Morfogenética Ósea
<b>CaP</b>	Fosfato Cálcico
<b>CDHA</b>	Hidroxiapatito Deficiente en Calcio
<b>CPP</b>	Pirofosfato de Calcio ( $\text{Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7$ )
<b>DHM</b>	Microscopía Holográfica Digital
<b>ECM</b>	Matriz Extracelular
<b>EDX</b>	Espectroscopía por Dispersión de Energía de Rayos X
<b>HA</b>	Hidroxiapatito ( $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ )
<b>ICP-OES</b>	Espectrometría de Emisión Óptica de Plasma Acoplado Inductivamente
<b>IGF</b>	Factor de Crecimiento Insulínico
<b>MSCs</b>	Células Madre Mesenquimales
<b>PCL</b>	Policaprolactona
<b>PDGF</b>	Factor de Crecimiento Derivado de Plaquetas
<b>PGA</b>	Ácido Poliglicólico
<b>PLA</b>	Ácido Poliláctico
<b>PLGA</b>	Ácido poli(láctico-co-glicólico)
<b>SBF</b>	Suero Fisiológico Artificial
<b>SEM</b>	Microscopía Electrónica de Barrido
<b>SrP</b>	Fosfato de Estroncio
<b>TCP</b>	Fosfato Tricálcico ( $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ )
<b>TEOS</b>	Ortosilicato de Tetraetilo ( $\text{Si}(\text{OC}_2\text{H}_5)_4$ )
<b>TEP</b>	Fosfato de Trietilo ( $\text{C}_2\text{H}_5)_3\text{PO}_4$ )
<b>TGF-<math>\beta</math></b>	Factor de Crecimiento Transformante $\beta$
<b>XRD</b>	Difracción de Rayos X





# RESUMEN

El desarrollo de biomateriales para regeneración ósea, ha atraído un gran interés a lo largo de las últimas décadas, como alternativa a los métodos tradicionales de reparación de defectos óseos. En particular, los materiales cerámicos como el HA y el  $\beta$ -TCP, han sido extensivamente estudiados para su uso en ingeniería de tejido óseo, gracias a su excelente biocompatibilidad, bioactividad y osteoconductividad, sin embargo, estos materiales poseen una limitada osteoinductividad. Por este motivo, en los últimos años se han desarrollado estrategias biomiméticas basadas en el proceso natural de regeneración ósea, con el fin de mejorar esta propiedad fundamental para su uso como materiales de sustitución.

En base a este objetivo, en la presente Tesis Doctoral, se propone el desarrollo e implementación de diferentes estrategias biomiméticas, con la finalidad de incrementar el potencial osteogénico de andamios cerámicos porosos 3D. En este sentido, se han sintetizado andamios cerámicos multicapa, obtenidos mediante el proceso sol-gel, combinado con la técnica de replicación de esponja polimérica. El núcleo de los andamios fue desarrollado utilizando una composición perteneciente al sistema  $\text{SiO}_2\text{-CaO-P}_2\text{O}_5$  y, posteriormente, fue recubierto con composiciones dopadas con iones de estroncio (1 %) o magnesio (3 %) para las capas externas, con el fin de estimular su bioactividad. Los andamios resultantes presentaban una estructura porosa interconectada, con una porosidad en torno al 37 % y una resistencia a la compresión de 0.46 – 1.98 MPa, valores considerados adecuados para su uso como materiales de sustitución.

La primera de las estrategias biomiméticas investigadas fue la modificación de la topografía superficial de los andamios, ya que numerosos estudios han demostrado que es posible regular el comportamiento celular mediante la implementación de patrones topográficos, con diferentes formas y disposiciones, en la superficie del material. Aplicando la técnica de grabado químico, se logró generar un patrón topográfico en forma de surcos y crestas sobre la superficie de los andamios. Los surcos y las crestas fueron generados a consecuencia de la diferente susceptibilidad al ataque químico de las fases constituyentes (CPP y  $\beta$ -TCP), así como a la distribución lamelar de las mismas. El tamaño de los surcos y las crestas se encontraba en el rango nano-/micrométrico, con unas dimensiones de 900 nm – 1.5  $\mu\text{m}$  de anchura y 200 – 300 nm de profundidad. De acuerdo con estudios previos, estas dimensiones son adecuadas para promover la adhesión, el alineamiento y la diferenciación celular.

La segunda de las estrategias biomiméticas investigadas fue el desarrollo de un sistema de liberación controlada, con aplicación en el transporte de medicamentos osteogénicos, en forma de esferas huecas incorporadas a la superficie de los andamios. Las esferas huecas de SrP fueron sintetizadas utilizando el método hidrotermal, optimizando el proceso de síntesis mediante el ajuste de los principales parámetros de la reacción como la temperatura, el tiempo de reacción y la concentración de los precursores utilizados. Las esferas obtenidas presentaban un tamaño de 600 nm – 1  $\mu$ m, con un área superficial específica de 30.5 m<sup>2</sup>/g y un tamaño medio de poro de 3.8 nm, características adecuadas para el transporte de diferentes sustancias terapéuticas.

Tras su obtención, las esferas fueron exitosamente incorporadas a los andamios cerámicos, quedando distribuidas de manera homogénea por toda la superficie de los mismos. Además, las esferas mostraron una buena estabilidad *in vitro*, permaneciendo adheridas tras 14 días de inmersión en SBF. La combinación de la capacidad de los andamios cerámicos para soportar el crecimiento del nuevo tejido, junto con la liberación local de las sustancias terapéuticas contenidas en el interior de las esferas, representa una estrategia prometedora para su uso como materiales de sustitución en ingeniería de tejido óseo.

Independientemente de la estrategia biomimética aplicada, los andamios mostraron bioactividad a los pocos días de inmersión en SBF. Además, cuando estos fueron dopados con iones con capacidad de estimular la bioactividad, como el estroncio y el magnesio, la duración de la misma se incrementó hasta los 21 días. Por tanto, la modificación de la topografía superficial no afectó a la capacidad de intercambio iónico de los andamios, permitiendo la precipitación de apatito sobre la superficie de los mismos, característica esencial para la adecuada osteointegración de los andamios con el tejido nativo.

En conclusión, en esta investigación se obtuvieron andamios cerámicos con mayor potencial osteoinductivo, mediante la implementación de estrategias biomiméticas, basadas en la modificación de la topografía superficial de los andamios. De esta manera, se han logrado desarrollar andamios multifuncionales, que permitirían no solo actuar como soporte físico para el crecimiento del nuevo tejido, si no también promover activamente su formación mediante la estimulación de la proliferación y la diferenciación celular, mejorando de esta manera el proceso de regeneración ósea.

# ABSTRACT

The development of biomaterials for bone regeneration has attracted great interest over the past decades as an alternative to traditional methods of repairing bone defects. Ceramic materials, such as HA and  $\beta$ -TCP, have been extensively studied for their use in bone tissue engineering due to their excellent biocompatibility, bioactivity and osteoconductivity, however, these materials have limited osteoinductivity. For this reason, in recent years, biomimetic strategies based on the natural process of bone regeneration have been developed to enhance this fundamental property for their use as replacement materials.

With this objective in mind, this PhD Thesis proposes the development and implementation of different biomimetic strategies in order to increase the osteogenic potential of 3D porous ceramic scaffolds. In this regard, multilayer ceramic scaffolds were obtained by the sol-gel process combined with the polymeric sponge replication technique. The core of scaffolds was developed using a composition belonging to the  $\text{SiO}_2$ -CaO- $\text{P}_2\text{O}_5$  system and, subsequently coated with compositions doped with strontium (1 %) or magnesium (3 %) ions for the external layers, in order to increase their bioactivity. The resulting scaffolds presented an interconnected porous structure, with a porosity around 37 % and a compressive strength of 0.46 – 1.98 MPa, values considered appropriate for their use as replacement materials.

The first of the biomimetic strategies investigated was the modification of the surface topography of scaffolds, since numerous studies have shown that it is possible to regulate cell behavior by introducing topographic patterns, with different shapes and arrangements, on the surface of the material. By applying the chemical etching technique, it was possible to produce a topographic pattern in the form of grooves and ridges on the surface of scaffolds. The grooves and ridges were generated due to the different susceptibility of the constituent phases (CPP and  $\beta$ -TCP) to the chemical attack, together with their lamellar distribution. The size of the grooves and ridges were in the nano-/micrometric range, with dimensions of 900 nm – 1.5  $\mu\text{m}$  in width and 200 – 300 nm in depth. According to previous studies, these dimensions are suitable for promoting cell adhesion, alignment, and differentiation.

The second of the biomimetic strategies investigated was the development of a controlled release system, with application in drug delivery, in the form of hollow spheres incorporated into the surface of scaffolds. SrP hollow spheres were synthesized by the

hydrothermal method, optimizing the synthesis process by adjusting the main reaction parameters, such as the temperature, reaction time and the concentration of precursors used. The resulting hollow spheres were 600 nm – 1  $\mu$ m in size, with a specific surface area of 30.5 m<sup>2</sup>/g and an average pore size of 3.8 nm, characteristics considered appropriate for the delivery of different therapeutic substances.

Hollow spheres were successfully incorporated into the ceramic scaffolds and were homogeneously distributed over the entire surface of the scaffolds. Moreover, the spheres showed good *in vitro* stability, being still adhered after 14 days of immersion in SBF. Combining the ability of ceramic scaffolds to support new tissue growth, together with the local release of the therapeutic substances contained within the spheres, represents a promising strategy for their use as substitute materials in bone tissue engineering applications.

Regardless of the biomimetic strategy applied, scaffolds showed bioactivity within a few days of immersion in SBF. Moreover, when they were doped with bioactivity-stimulating ions, such as strontium and magnesium, scaffolds were bioactive for up to 21 days. Therefore, the modification of the surface topography did not affect the ionic exchange capacity of scaffolds, allowing the precipitation of apatite on their surface, which is essential for the proper osseointegration of scaffolds with the native tissue.

In summary, in this research, ceramic scaffolds with greater osteoinductive potential were obtained by implementing biomimetic strategies based on the modification of the surface topography of scaffolds. In this way, it has been possible to develop multifunctional scaffolds, which would not only act as a physical support for the growth of new tissue, but also actively promote its formation by stimulating cell proliferation and differentiation, thus improving the bone regeneration process.



# 1. INTRODUCCIÓN

---

El cuerpo humano está formado por distintos órganos y sistemas, que trabajan de manera coordinada para mantener el adecuado funcionamiento del organismo. Uno de los sistemas más importantes es el sistema musculoesquelético, compuesto por las articulaciones, los músculos y los huesos. Este sistema se encarga de proporcionar soporte y protección al cuerpo, así como permitir el movimiento. Además, funciona como reservorio de minerales, produce las células sanguíneas y ayuda a mantener el equilibrio ácido-base (1).

En la actualidad, debido a determinados factores como el envejecimiento de la población, una menor actividad física o el aumento de la obesidad, se ha producido un incremento de los desórdenes que conciernen a este sistema, los cuales afectan seriamente a la salud y calidad de vida de los pacientes. Se estima que más de 20 millones de personas se ven afectadas anualmente por problemas del sistema musculoesquelético, ocasionados por enfermedades o traumatismos, de las cuales, alrededor de 5 millones requieren de intervenciones ortopédicas (2,3).

El tejido óseo destaca por presentar un comportamiento dinámico, caracterizado por un constante proceso de remodelado, donde los osteoclastos reabsorben el tejido óseo maduro, mientras que los osteoblastos generan nuevo hueso, manteniendo así la homeostasis del tejido (4). Gracias a esta capacidad de remodelación, los defectos y fracturas que afectan a los huesos son fácilmente reparados, sin embargo, en ocasiones se producen defectos óseos de gran tamaño que dificultan el proceso natural de auto-regeneración. Estos defectos de gran tamaño, también llamados defectos de tamaño crítico, pueden ocurrir como resultado de traumatismos, tumores, infecciones, defectos congénitos o enfermedades óseas como la osteoporosis, la osteoartritis y la osteomielitis (5,6).

La reparación de estos defectos requiere del uso de injertos óseos con el fin de reemplazar la zona afectada. Entre los tratamientos más utilizados para la reparación de defectos de tamaño crítico encontramos los autoinjertos (3,6). En este procedimiento, el hueso del propio paciente, generalmente procedente de la cresta ilíaca, es trasplantado a la zona del defecto. La principal ventaja de esta estrategia es que se trata de injertos biocompatibles y no inmunogénicos con propiedades osteoconductoras, osteoinductivas y osteogénicas, gracias a que presentan factores de crecimiento y células osteoprogenitoras, necesarios para la

osteogénesis (7). Sin embargo, el injerto autólogo tiene varias desventajas, principalmente relacionadas con la necesidad de realizar una segunda intervención quirúrgica en la zona donante, lo que conlleva una serie de riesgos asociados como hemorragias, inflamación, posibilidad de infección y dolor crónico, así como alta morbilidad e hipersensibilidad de la zona donante. Además, la disponibilidad limitada de tejido autólogo trasplantable hace que esta opción pueda no ser adecuada para el tratamiento de defectos de gran tamaño (1,8).

Por otro lado, encontramos los aloinjertos, los cuales se basan en el trasplante de tejido óseo procedente de un donante, generalmente cadáveres (1). Los aloinjertos son el segundo tratamiento más comúnmente utilizado para la reparación de defectos óseos, y entre sus beneficios encontramos su rápida disponibilidad y facilidad de manejo, además de estar disponibles en una gran variedad de formas y tamaños (9,10). Sin embargo, este procedimiento también tiene sus limitaciones, como son la baja disponibilidad de donantes, su elevado coste, la necesidad de esterilización, el riesgo de transmisión de enfermedades y una mayor probabilidad de rechazo inmunológico. Además, en comparación con los autoinjertos, poseen una menor capacidad osteogénica (8,11).

Las limitaciones y desventajas asociadas con el uso de los autoinjertos y aloinjertos han impulsado el desarrollo de estrategias alternativas para la reparación de los defectos óseos. En este contexto, la ingeniería de tejidos ha emergido como una alternativa a los métodos de reparación tradicionales.

## **1.1. La ingeniería de tejido óseo**

La ingeniería de tejidos es un área de estudio multidisciplinar que combina la biología celular, la medicina regenerativa, la ciencia de materiales y la ingeniería para la reconstrucción, sustitución y/o regeneración de tejidos u órganos a través de la implantación de sustitutos biológicos sintéticos (12).

En este sentido, la ingeniería de tejidos aborda la reparación de defectos óseos mediante el uso de matrices tridimensionales (3D) porosas, denominadas andamios (*scaffolds*), las cuales pueden ser utilizadas solas o en conjunto con células y otros compuestos bioactivos como factores de crecimiento, para guiar y promover el proceso natural de regeneración ósea (9,13). Estos andamios deben ser capaces de imitar la estructura del hueso, proporcionando el apoyo estructural necesario durante el proceso de formación del nuevo hueso.

Dada la complejidad de las funciones a desempeñar, el diseño de los andamios es una de las etapas cruciales en ingeniería de tejido óseo. Para su aplicación, los andamios deben cumplir con requisitos esenciales, entre los que destacan la osteoconductividad, la osteoinductividad y la osteogénesis. La osteoconductividad puede definirse como la capacidad de soportar el crecimiento del nuevo tejido. Por su parte, la osteoinductividad, es la capacidad del material para inducir la formación de células óseas, mediante la diferenciación de las células madre mesenquimales localizadas en el tejido adyacente. Por último, la osteogénesis es la capacidad de formar nuevo hueso a partir de las células osteoblásticas diferenciadas (7,12).

Para cumplir estos tres requerimientos, la ingeniería de tejido óseo utiliza estrategias “biomiméticas”, entre las que se incluyen el tipo de biomaterial utilizado para el desarrollo del andamio, el uso de células madre, la incorporación de factores de crecimiento (ej. osteogénicos y angiogénicos), así como la imitación de la estructura jerárquica de la matriz extracelular (ECM) nativa, con el objetivo de proporcionar un ambiente biomimético que estimule la reparación del tejido óseo dañado (14).

Con la finalidad de diseñar andamios que imiten fielmente las características de la matriz ósea, es necesario observar las propiedades químicas, mecánicas y estructurales del hueso. Para este fin, primeramente, es fundamental un profundo conocimiento de la biología, anatomía y fisiología del hueso, que permita el desarrollo de andamios de nueva generación para aplicación en ingeniería de tejido óseo.

## **1.2. Anatomía y fisiología del tejido óseo**

Las propiedades del hueso dependen enormemente de la estructura y organización de la ECM, la cual se extiende desde la macroescala hasta la nanoescala (Figura 1) (3). A nivel macroscópico, el tejido óseo se organiza en dos tipos, el hueso cortical y el hueso trabecular, cada uno con una estructura y función diferente (14,15).

El **hueso cortical o compacto** es un tejido denso y altamente mineralizado, que se encuentra en la región periférica del hueso, representando el 80 % de la masa total de tejido óseo en el cuerpo. Este tipo de hueso está compuesto por unidades llamadas osteonas o sistemas de Havers, las cuales están formadas por células y ECM, organizadas en forma de lamelas concéntricas rodeando los canales de Havers, que contienen nervios y vasos



sanguíneos. Estas osteonas están conectadas por medio de los canales de Volkmann, y contienen unos pequeños canales o canaliculos, que proporcionan oxígeno y nutrientes a las células. Entre las osteonas hay unos espacios huecos o lagunas donde se encuentran alojados los osteocitos, los cuales contribuyen al mantenimiento de la ECM (16,17). El hueso cortical se caracteriza por presentar una estructura lamelar, una baja porosidad (10 – 20 %), un módulo de Young relativamente alto (7 – 30 GPa) y una resistencia a la compresión de 100 – 200 MPa, propiedades que lo hacen adecuado para su labor de protección (9,10).

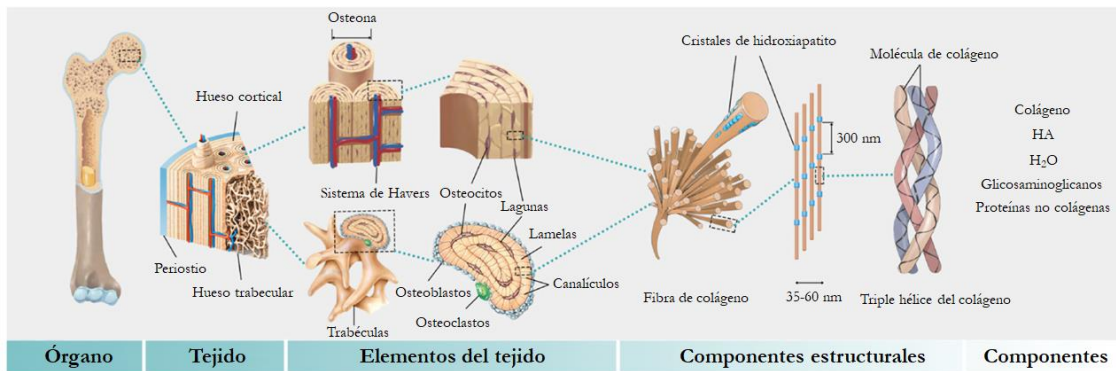


Figura 1: Organización jerárquica del hueso en diferentes escalas de longitud (3).

Por otra parte, el **hueso trabecular o esponjoso** es un tejido menos denso y altamente poroso (50 – 90 %), que posee una mayor elasticidad que el hueso cortical, sin embargo, su resistencia mecánica es notablemente más baja (2 – 12 MPa), así como su módulo de Young (0.1 – 2 GPa) (5). Se encuentra localizado en la parte interior del hueso y está compuesto por una red interconectada de trabéculas, que proporcionan el soporte estructural necesario para la médula ósea contenida en su interior. Estas trabéculas están formadas por fragmentos irregulares de osteonas, y reciben sus nutrientes de los vasos sanguíneos localizados en la médula ósea que se encuentra a su alrededor (9,16). El hueso trabecular representa el 20 % de la masa ósea total, siendo considerado importante para funciones como la homeostasis de calcio, la función hematopoyética y la regulación del equilibrio ácido-base (10).

A nivel micro-/nanoscópico, la ECM está formada por componente orgánicos (~22 %), componentes inorgánicos (~69 %) y agua (~9 %) (5,18). La fase orgánica asegura la elasticidad del hueso, lo cual es fundamental para la capacidad del esqueleto de soportar impactos, y está compuesta principalmente por colágeno tipo I (~95 %) en forma de fibras, así como numerosas proteínas no colágenas (~5 %), entre las que se incluyen glicoproteínas

como la osteocalcina, la osteonectina y la fosfatasa alcalina, responsables de la mineralización de la ECM, sialoproteínas como la osteopontina y proteoglicanos (ej. hialuronano, biglicano y decorina) (3,10). Además, también se encuentran presentes factores de crecimiento tales como el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), los factores de crecimiento insulínico (IGFs) y las proteínas morfogenéticas óseas (BMPs), que pertenecen a la familia de los factores de crecimiento transformantes  $\beta$  (TGF- $\beta$ ). Estos factores desempeñan un papel destacado en los procesos de proliferación y diferenciación de los osteoblastos, influyendo por tanto de manera notable en la de formación del hueso (9).

En cuanto a la fase inorgánica, la cual confiere fuerza y dureza, ésta se encuentra representada por el hidroxiapatito (HA;  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ ), un tipo de fosfato cálcico (CaP), en forma de nanocristales (5 – 20 nm de anchura y 60 nm de longitud) intercalados entre las fibras de colágeno (12,18). Este apatito biológico se encuentra sustituido parcialmente por carbonato ( $\text{CO}_3^{2-}$ ), aunque también presenta pequeñas cantidades de diferentes iones entre los que destacan el sodio ( $\text{Na}^+$ ), potasio ( $\text{K}^+$ ), magnesio ( $\text{Mg}^{2+}$ ), fluoruro ( $\text{F}^-$ ), cloruro ( $\text{Cl}^-$ ) y elementos traza como estroncio ( $\text{Sr}^{2+}$ ), zinc ( $\text{Zn}^{2+}$ ), manganeso ( $\text{Mn}^{2+}$ ), bario ( $\text{Ba}^{2+}$ ) y silicio ( $\text{Si}^{4+}$ ) (5,9).

A parte de estos componentes orgánicos e inorgánicos, también se encuentran presentes en el tejido óseo diferentes tipos celulares, entre los que se incluyen las células madre mesenquimales, los osteoblastos, los osteocitos y los osteoclastos.

### 1.2.1. Las células del tejido óseo

Las **células madre mesenquimales** (MSCs) son células madre estromales multipotentes, capaces de diferenciarse en numerosos linajes celulares, incluyendo adipocitos, condrocitos y osteocitos, siendo por tanto su papel contribuir a la regeneración de los tejidos mesenquimales como el tejido adiposo, cartilaginoso, óseo, etc. (19). Gracias a esta habilidad, las MSCs han sido ampliamente utilizadas en ingeniería de tejido óseo y medicina regenerativa para el tratamiento de fracturas, tumores y enfermedades como la osteoporosis y la osteonecrosis (10). Estas células son aisladas principalmente de la médula ósea, y gracias a que pueden ser extraídas directamente del paciente mediante procedimientos mínimamente invasivos, las posibilidades de reacción autoinmune son muy reducidas (12,19).

Los **osteoblastos** se originan a partir de las MSCs y son las células responsables de la formación del hueso mediante la producción y mineralización de la matriz ósea (5,10). La diferenciación de las MSCs a osteoblastos ocurre por medio de señales bioquímicas producidas por factores de crecimiento, así como mediante interacciones entre las células y la ECM. Los osteoblastos presentan una morfología cuboidal (10 – 50  $\mu\text{m}$ ), y se encuentran localizados en la superficie del tejido óseo en desarrollo, donde secretan matriz osteoide no mineralizada compuesta principalmente por colágeno tipo I, así como ciertas proteínas no colágenas, siendo las más destacadas la osteocalcina, la osteopontina y la osteonectina, las cuales juegan un papel esencial en el proceso de mineralización de la ECM (20). Además de estas proteínas, los osteoblastos también secretan la enzima fosfatasa alcalina (ALP), la cual también contribuye a la mineralización de la matriz osteoide mediante el incremento de la concentración local de calcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) y fosfato ( $\text{PO}_4^{3-}$ ) (9). A medida que los osteoblastos van secretando y mineralizando la matriz ósea, estos quedan atrapados en las lagunas lenticulares, convirtiéndose en osteocitos o sufriendo apoptosis (8).

Los **osteocitos** son las células más abundantes del tejido óseo, originándose a partir de osteoblastos maduros que quedan atrapados en la ECM ósea mineralizada. Los osteocitos crean una extensa red uniéndose a otros osteocitos por medio de unas prolongaciones citoplasmáticas, formando el sistema lacuno-canalicular, el cual es utilizado para el transporte de nutrientes y oxígeno, así como productos de desecho (8,10). Estas células contribuyen al mantenimiento de la ECM, siendo las principales responsables de la mecanotransducción de estímulos mecánicos que activan el proceso de remodelado óseo llevado a cabo de manera conjunta por los osteoblastos y los osteoclastos (16).

Los **osteoclastos** son células multinucleadas derivadas de las células madre hematopoyéticas, y son los responsables de la resorción del tejido óseo (9). Para llevar a cabo este proceso, los osteoclastos provocan una acidificación del medio a través de la formación de una zona de sellado, que resulta en la disolución de la fase mineral del hueso. Posteriormente, la fase orgánica es también degradada mediante la acción de enzimas proteolíticas (8). Los osteoclastos se encuentran localizados en unas depresiones o áreas de resorción denominadas lagunas de Howship, que se forman como resultado de su propia actividad resorptiva (10). Como responsables de la resorción ósea, los osteoclastos también juegan un papel destacado en la remodelación ósea que ocurre durante la reparación de defectos óseos (9).

### **1.2.2. La remodelación ósea**

Como se ha comentado anteriormente, el tejido óseo experimenta un constante proceso de remodelación, el cual permite que la estructura y composición del mismo se adapte a diferentes factores de estrés como el crecimiento, la realización de actividad física y la presencia de lesiones (10). Se estima que entre el 5 – 10 % del hueso es remodelado anualmente, siendo la tasa de remodelado del ~25 % para el hueso trabecular y del ~3 % para el hueso cortical (21). Este proceso es fundamental para la reparación de defectos, como los resultantes de fracturas o enfermedades que afectan al tejido óseo, e implica un delicado equilibrio entre los procesos de formación y resorción ósea llevados a cabo por los osteoblastos y los osteoclastos, respectivamente.

Tras la aparición de un defecto óseo, el proceso de regeneración comienza con el reclutamiento de células madre osteoprogenitoras, principalmente de la médula ósea, y su diferenciación en osteoblastos, los cuales forman nuevo hueso mediante la secreción y posterior mineralización de la nueva ECM. Paralelamente, se forman nuevos vasos sanguíneos a partir de otros existentes en los tejidos adyacentes, creando una red vascular que proporciona oxígeno y nutrientes a las células y el tejido en desarrollo (3,6). Finalmente, una vez formado el nuevo tejido, éste es remodelado para restaurar su estructura y función biológica mediante la acción de los osteoclastos, cuya actividad es a su vez regulada por los osteoblastos y los osteocitos (9,21).

A pesar del mecanismo biológico de auto-regeneración, existen situaciones en las que las fracturas no pueden repararse por sí mismas, siendo por tanto necesaria la intervención clínica para restaurar la función normal del hueso.

### **1.3. Biomateriales para ingeniería de tejido óseo**

Un biomaterial puede ser definido como un material destinado a interactuar con los sistemas biológicos para evaluar, tratar, mejorar o reemplazar cualquier tejido, órgano o función del cuerpo. Idealmente, el material deber ser biocompatible, biodegradable y poseer unas propiedades mecánicas adecuadas para soportar la regeneración del nuevo tejido (9). Diversos materiales, principalmente metales, cerámicas y polímeros, cada uno con sus

propiedades biológicas, mecánicas y degradativas particulares, han sido utilizados de manera exitosa a lo largo de las últimas décadas para la fabricación de andamios para sustitución ósea.

Los **metales**, como el acero inoxidable o el titanio y sus aleaciones, se encuentran entre los materiales más populares para uso en ingeniería de tejido óseo, especialmente para aplicaciones de soporte de carga, gracias a su elevada resistencia mecánica y estabilidad estructural (1). Sin embargo, también presentan una serie de limitaciones como son su no degradabilidad, la liberación de iones metálicos tóxicos y especialmente la posibilidad de ocasionar un desgaste considerable del tejido óseo adyacente, debido al desequilibrio entre las propiedades mecánicas del metal y las del hueso humano (22).

Otro grupo de materiales ampliamente utilizado en ingeniería de tejido óseo son los **polímeros**, los cuales pueden ser de origen natural o sintético (12). Entre los polímeros naturales más comúnmente utilizados encontramos el colágeno, el quitosano, el alginato y el ácido hialurónico. Estos polímeros muestran una excelente biocompatibilidad y biodegradabilidad, sin embargo, sus pobres propiedades mecánicas han limitado su uso como materiales de sustitución (1,3). Por otra parte, los polímeros sintéticos como el ácido poliláctico (PLA), el ácido poliglicólico (PGA), la policaprolactona (PCL) y el ácido poli(láctico-co-glicólico) (PLGA) presentan mejores propiedades mecánicas y ofrecen un mayor control en su tasa de degradación (12). Desafortunadamente, estos también presentan una serie de desventajas, siendo el principal inconveniente la acidificación local del medio que ocurre a consecuencia de su degradación, lo que puede provocar una fuerte inflamación en el tejido (23,24).

Finalmente encontramos el grupo de las **cerámicas**, formado principalmente por los fosfatos cálcicos (CaPs) (Tabla 1) (18). Estos materiales han sido exitosamente utilizados para la reparación de defectos óseos y el tratamiento de enfermedades periodontales en cirugía ortopédica, dental y cráneo-maxilofacial (25,26). Además, también destaca su uso como recubrimiento en implantes metálicos para cirugía de cadera, logrando un aumento significativo del crecimiento óseo, así como una mayor fijación y longevidad del implante (27).

Existen una gran variedad de fosfatos cálcicos, que en función del tipo de anión fosfato, se clasifican en ortofosfatos ( $\text{PO}_4^{3-}$ ), metafosfatos ( $\text{PO}_3^3$ ), pirofosfatos ( $\text{P}_2\text{O}_7^{4-}$ ) y polifosfatos  $[(\text{PO}_3)_n]^{n-}$  (18). Con la excepción del pirofosfato de calcio (CPP;  $\text{Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7$ ), la mayoría de los CaPs utilizados en ingeniería de tejido óseo son los ortofosfatos (28). En concreto, el hidroxiapatito (HA;  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ ) y el fosfato tricálcico (TCP;  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ) se encuentran

entre los materiales cerámicos más comúnmente utilizados para la fabricación de estos andamios, debido a su composición similar a la de la fase mineral del hueso, así como a su excelente biocompatibilidad y a su capacidad para formar fuertes uniones con el tejido óseo nativo (1,5,9).

Compuesto	Abreviatura	Fórmula química	Ca/P	Solubilidad (-log $K_{sp}$ )
Fosfato monocalcico	MCP	$Ca(H_2PO_4)_2$	0.5	1.14
Fosfato dicalcico	DCP	$CaHPO_4$	1.0	6.90
Fosfato octacalcico	OCP	$Ca_8(HPO_4)_2(PO_4)_4 \cdot 5H_2O$	1.33	96.6
Fosfato tricalcico $\alpha$	$\alpha$ -TCP	$\alpha-Ca_3(PO_4)_2$	1.5	25.5
Fosfato tricalcico $\beta$	$\beta$ -TCP	$\beta-Ca_3(PO_4)_2$	1.5	28.9
Hidroxiapatito deficiente en calcio	CDHA	$Ca_{10-x}(HPO_4)_x(PO_4)_{6-x}(OH)_{2-x}$ ( $0 < x < 1$ )	1.5 – 1.67	~85
Hidroxiapatito	HA	$Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$	1.67	116.8
Fluorapatito	FA	$Ca_{10}(PO_4)_6F_2$	1.67	120.0
Fosfato tetracalcico	TTCP	$Ca_4(PO_4)_2O$	2.0	38 – 44

*Tabla 1: Principales características de los CaPs más comúnmente utilizados en ingeniería de tejido óseo (18).*

El TCP se encuentran en dos fases,  $\alpha$  y  $\beta$ , las cuales, aunque comparten la misma composición química, difieren en su estructura cristalina y solubilidad (18). El  $\beta$ -TCP se obtiene durante el sinterizado a temperaturas de entre 900 – 1100 °C, mientras que el  $\alpha$ -TCP se obtiene a temperaturas superiores a 1120 °C (27,29). La principal desventaja para el uso del  $\alpha$ -TCP es su elevada tasa de resorción, mayor a la tasa de formación del hueso, que ha limitado notablemente su aplicación biomédica en favor del  $\beta$ -TCP (18).

Por su parte, el HA es uno de los biomateriales más populares para uso en ingeniería de tejido óseo, habiendo atraído un gran interés gracias a su biocompatibilidad y a su elevado potencial osteogénico. Ha sido bien documentado que el HA puede promover el crecimiento de nuevo tejido gracias a su capacidad osteoconductiva sin causar ningún tipo de toxicidad, inflamación o respuesta autoinmune (13,25). La principal desventaja del HA es su baja tasa de degradación in vivo, ya que se trata del CaP termodinámicamente más estable en fluidos fisiológicos, necesitando un mayor tiempo para ser reabsorbido por el cuerpo, lo que puede prolongar el tiempo de reparación del defecto óseo (12).

Otro grupo de CaPs altamente destacado son los fosfatos cálcicos bifásicos (BCP), los cuales consisten en la mezcla de dos tipos diferentes de CaPs, siendo la combinación de HA y  $\beta$ -TCP la formulación más comúnmente utilizada (9,24). La combinación de dos fases con diferente solubilidad permite un mayor control sobre la tasa de degradación del material, la cual depende del ratio  $\beta$ -TCP/HA, siendo que, a mayor ratio, mayor capacidad de resorción (18,26).

Por último, dentro del grupo de las cerámicas, encontramos los silicatos de calcio como la wollastonita ( $\text{CaSiO}_3$ ) y el silicato dicálcico ( $\text{Ca}_2\text{SiO}_4$ ). Estos materiales también han sido ampliamente estudiados para su uso en ingeniería de tejido óseo gracias a su mayor osteoinductividad en comparación con los CaPs, debido a la presencia de silicio, el cual juega un papel fundamental en la formación y mineralización del tejido óseo, estimulando la diferenciación osteoblástica. Además, son materiales biocompatibles, biodegradables y que presentan una gran bioactividad, tanto *in vitro* como *in vivo* (13,30).

Desafortunadamente, la fragilidad inherente de las cerámicas, así como su baja tenacidad a la fractura, han limitado su uso en aplicaciones de soporte de carga (1,12). Una solución a este problema ha sido el desarrollo de materiales compuestos, combinando la biocompatibilidad y bioactividad de las cerámicas, con la mayor durabilidad de los polímeros, obteniendo de esta manera materiales más similares a la estructura natural del hueso (23).

### **1.3.1. Concepto de bioactividad**

El término bioactividad hace referencia a la capacidad de provocar una respuesta biológica que genere una unión entre el tejido y el material (31). En base a esto, las cerámicas pueden ser clasificadas de acuerdo con su bioactividad, dividiéndose en dos grupos, bioinertes y bioactivas. Las cerámicas bioinertes, como la alúmina ( $\text{Al}_2\text{O}_3$ ) y la zirconia ( $\text{ZrO}_2$ ), fueron especialmente utilizadas durante la década de los 70 y se caracterizan por su elevada resistencia mecánica, resistencia a la corrosión, buena biocompatibilidad y estabilidad en condiciones fisiológicas (32). Sin embargo, debido a la falta de unión con el tejido nativo y a la necesidad de realizar una segunda operación tras su implantación, la aplicación de las cerámicas bioinertes se ha visto limitada en favor de las cerámicas bioactivas, como el HA, el  $\beta$ -TCP y el silicato dicálcico, las cuales son biodegradables, osteoconductoras y poseen una mayor capacidad de osteointegración (13).

Estas cerámicas bioactivas poseen grupos hidroxilo (-OH) disponibles, que, debido a la presencia de dos pares de electrones sin compartir, tienen la capacidad de atraer iones de calcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) con carga positiva, que, a su vez, atraen grupos fosfato ( $\text{PO}_4^{3-}$ ), provocando de esta manera la precipitación de HA sobre su superficie al entrar en contacto con los fluidos fisiológicos tras su implantación (12,13). Esto resulta en una estabilización temprana del implante, así como en una mayor fijación al tejido adyacente (25,27). La interacción biológica que ocurre entre el tejido y la capa de HA no es del todo conocida, pero se cree que implica la adsorción de proteínas y factores de crecimiento, lo que favorece la adhesión y proliferación de las células osteoprogenitoras, así como su consiguiente diferenciación osteogénica (24,33). Los osteoblastos comienzan entonces a producir nueva ECM, seguida de su mineralización, de manera similar al proceso natural de reparación (34).

Con objeto de determinar la bioactividad de un material, y basándose en los estudios llevados a cabo por Hench *et al.* (35), Tadashi Kokubo propuso en el año 1991 que la bioactividad de un material podía ser evaluada *in vitro* examinando la formación de una capa de apatito sobre su superficie cuando éste era sumergido en una solución de suero fisiológico artificial (SBF), con una concentración iónica similar a la del plasma sanguíneo humano (36). El apatito que precipita sobre la superficie material se denomina hidroxiapatito deficiente en calcio (CDHA), tiene un ratio Ca/P de entre 1.50 – 1.67 y es muy similar al apatito presente en el hueso humano, siendo la principal diferencia que este último se encuentra parcialmente sustituido por carbonato ( $\text{CO}_3^{2-}$ ) y ciertos elementos traza ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Sr}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ , etc.) como se ha comentado anteriormente (5,28).

Esta metodología para determinar la bioactividad fue ampliamente aceptada, de tal modo que, en el año 2007, se registró la norma ISO/FDIS 23317:2007: “*Implants for surgery – In vitro evaluation for apatite-forming ability of implant materials*” como estándar para la evaluación de la bioactividad *in vitro* de un material (36). Este método ofrece una forma rápida y económica de predecir el comportamiento de un material una vez sea implantado en el cuerpo.

## 1.4. Andamios para ingeniería de tejido óseo

Una vez se ha seleccionado el material adecuado, los andamios deben ser diseñados teniendo en cuenta las características físicas y químicas del tejido que van a sustituir. Es importante imitar el ambiente nativo del hueso, ya que este influye en el comportamiento de



las células osteoprogenitoras y los osteoblastos, condicionando por tanto el proceso de formación ósea. Idealmente, un andamio debe cumplir con ciertos requerimientos biológicos, mecánicos y estructurales.

Los requerimientos mecánicos de los andamios deben de ser adaptados a los del tejido que van a reemplazar, de manera que sean capaces de soportar cargas mecánicas durante la formación del nuevo hueso, así como de permitir una adecuada transferencia de carga a los tejidos adyacentes, evitando la resorción del tejido nativo (1,24). Como se ha comentado anteriormente, las propiedades mecánicas del hueso varían notablemente entre el hueso cortical y el trabecular, lo que hace difícil el diseño de un andamio ideal. Además, los andamios deben de ser adaptados a las necesidades específicas del paciente, teniendo en cuenta su edad, estado de salud, estilo de vida y especialmente, el lugar de implantación (7). Sin embargo, no es necesario que los andamios presenten una resistencia mecánica igual a la del hueso nativo, ya que es generalmente aceptado que el crecimiento del nuevo tejido sobre los andamios incrementa la fuerza mecánica de los mismos (37). En general, se recomienda que la resistencia mecánica de los andamios para aplicación en ingeniería de tejido óseo sea de entre 1 – 2 MPa, de manera que sean lo suficientemente resistentes para permitir su manipulación durante la implantación quirúrgica, así como durante el proceso de regeneración *in vivo* (7).

A parte de unas propiedades mecánicas adecuadas, en lo que respecta a las características estructurales, los andamios deben presentar una porosidad y tamaño de poro adecuados, así como una buena interconectividad entre los mismo que permita la migración celular, el transporte de nutrientes y la eliminación de productos de desecho (1,19). Una porosidad de ~80 % es considerada óptima para la regeneración del hueso, siendo 50 % el mínimo requerido para permitir el crecimiento del tejido (38). Los poros de mayor tamaño, entre 100 – 300  $\mu\text{m}$ , son adecuados para promover la vascularización y por tanto la formación del nuevo tejido óseo, mientras que los poros de menor tamaño ( $< 10 \mu\text{m}$ ), proporcionan una mayor área superficial, lo que incrementa la adsorción de proteínas y la consiguiente adhesión celular (20,26). Es importante tener en cuenta que, la presencia de poros de gran tamaño puede afectar negativamente a las propiedades mecánicas de los andamios (7,24). Además, la porosidad también juega un papel destacado en el ratio de degradación de los andamios, ya que una mayor porosidad implica mayor penetración de los fluidos fisiológicos, lo que resulta en una mayor degradación (3).

Otra característica estructural fundamental, especialmente en el caso de los andamios de tercera generación, es la topografía superficial de los andamios. En los últimos años, se ha demostrado que la presencia de micro-/nanotopografía tiene un impacto significativo en el comportamiento celular, promoviendo la adhesión, proliferación y diferenciación celular, estimulando por tanto la capacidad osteoinductiva, así como la osteointegración de los andamios (1,32).

Por último, desde el punto de vista biológico, los andamios deben ser biocompatibles, biodegradables y no tóxicos. La biocompatibilidad es definida como la capacidad para estimular una respuesta apropiada del ambiente biológico, sin causar efectos tóxicos, tanto local como sistémicamente, ni provocar una reacción inflamatoria que pueda comprometer el proceso de regeneración o causar rechazo por parte del cuerpo (7,39). Los andamios también deben ser capaces de degradarse *in vivo*, preferiblemente de una manera controlada, creando el espacio necesario para el crecimiento del nuevo tejido (23). Además, los productos resultantes de su degradación no deben ser tóxicos y deben reabsorberse o excretarse fácilmente como parte de la actividad metabólica del cuerpo (38). Es importante destacar que, el ratio de degradación debe ser lo más similar posible al de crecimiento del nuevo tejido. Generalmente se considera que la degradación del andamio debe ocurrir en menos de 6 meses, dependiendo del lugar anatómico de regeneración (40).

#### **1.4.1. Técnicas de obtención de andamios**

El cumplimiento de la mayoría de las características descritas anteriormente representa uno de los principales desafíos en el diseño de los andamios. Por este motivo, es importante seleccionar la técnica de síntesis adecuada, ya que ésta puede influir notablemente en la estructura y porosidad de los andamios resultantes. Entre las diferentes técnicas disponibles para el desarrollo de materiales cerámicos encontramos la síntesis en estado sólido, el proceso sol-gel, la técnica de emulsión, la precipitación química y el método hidrotermal (25). De entre estos, el proceso sol-gel destaca por ser una técnica simple, económica y que prescinde del uso de equipamiento complejo para la síntesis de materiales cerámicos (41).

### 1.4.1.1. El proceso sol-gel

El proceso sol-gel ha sido comúnmente utilizado para la fabricación de materiales cerámicos, gracias a la elevada pureza y homogeneidad química de los materiales obtenidos, y a la baja temperatura de formación necesaria (25,42). Este proceso se basa en la hidrólisis y condensación de precursores alcóxidos metálicos, los cuales son disueltos en agua o en un disolvente orgánico, para crear una suspensión coloidal (sol), compuesta por una fase líquida y una fase dispersa de nanopartículas sólidas. A menudo, la hidrólisis de los precursores requiere de un catalizador como ácido acético o ácido clorhídrico. Tras esta etapa, ocurre la gelificación del sol por condensación de las nanopartículas, seguido por el moldeado, maduración y secado del gel resultante. Finalmente, se lleva a cabo la eliminación de los residuos orgánicos y la estabilización del gel mediante un proceso de sinterizado a elevada temperatura, normalmente entre el 50 – 70 % de la temperatura de fusión, para conseguir una mayor densidad y resistencia mecánica. Es importante destacar que, si el proceso de sinterizado no es realizado a una temperatura adecuada, este puede resultar en una densificación incompleta y por tanto en andamios con bajas propiedades mecánicas (7,39). Un resumen esquemático del proceso sol-gel se muestra en la Figura 2 (43).

Ciertos factores como el tipo de disolvente, el catalizador, la temperatura y el pH empleados pueden influir notablemente en el proceso sol-gel. Estos factores dependen en gran medida de la naturaleza química de los precursores utilizados, los cuales son generalmente alcóxidos metálicos, que son compuestos formados por un ion metálico y grupos alquilo (34). Para la síntesis de materiales cerámicos, el fósforo y el calcio son generalmente incorporados mediante la adición de fosfato de trietilo (TEP;  $(C_2H_5)_3PO_4$ ) y carbonato de calcio ( $CaCO_3$ ), respectivamente. Según la composición final deseada, otros precursores pueden ser añadidos al sol, como el silicio, el cual es típicamente introducido en forma de ortosilicato de tetraetilo (TEOS;  $Si(OC_2H_5)_4$ ) (43).

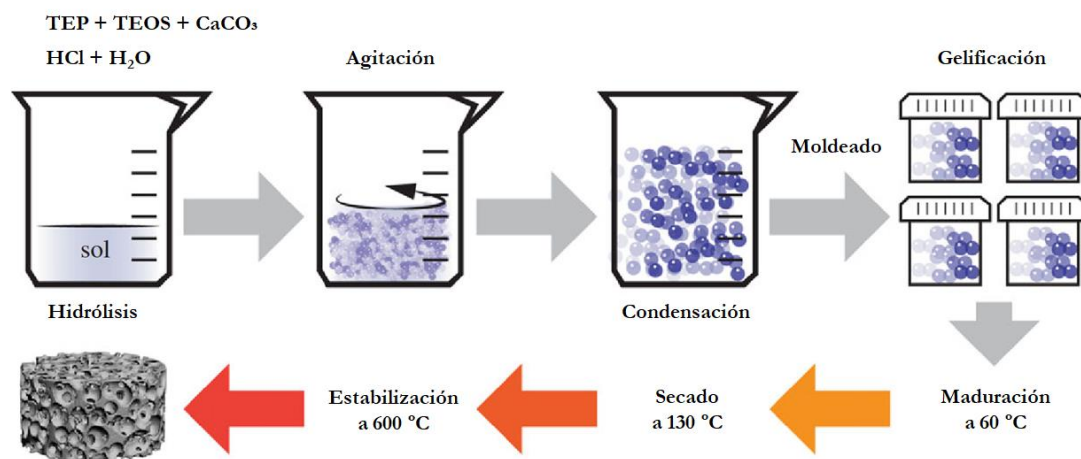


Figura 2: Representación esquemática del proceso sol-gel (43).

### 1.4.1.2. Técnica de replicación de esponja polimérica

Como se ha comentado anteriormente, una de las características más importantes para la adecuada función de los andamios es la porosidad de los mismos. En este sentido, una de las principales limitaciones de los métodos convencionales de desarrollo, es que, para la formación de los poros, se requiere del uso de sustancias potencialmente tóxicas, como disolventes orgánicos y agentes porógenos, que pueden provocar una respuesta inflamatoria no deseada tras la implantación de los andamios (38). En este contexto, la técnica de replicación de esponja polimérica permite prescindir del uso de sustancias tóxicas, lo que, unido a su simplicidad y bajo coste, la convierten en uno de los métodos más efectivos para el desarrollo de andamios cerámicos con una elevada porosidad interconectada, donde la arquitectura del andamio es determinada por la de la esponja que sirve de molde (7).

En este método, una esponja polimérica, generalmente de poliuretano, es sumergida en una solución cerámica hasta obtener un recubrimiento uniforme en la estructura de la esponja. Posteriormente, tras el secado del recubrimiento, el molde polimérico es eliminado mediante un tratamiento térmico a elevada temperatura (38). El primer uso de esta técnica en el campo de la ingeniería de tejido óseo fue llevado a cabo por Chen *et al.* en el año 2006, donde recubrieron esponjas de poliuretano con una suspensión de biovidrio 45S5 (44). Desde entonces, esta técnica ha sido ampliamente utilizada para la fabricación de andamios cerámicos con una estructura similar a la del hueso trabecular humano, con una porosidad de entre el 40 – 90 % (7,32).

## **1.5. Estrategias biomiméticas en ingeniería de tejido óseo**

Durante el proceso de regeneración tisular, la formación del nuevo tejido es altamente influenciada por las señales fisicoquímicas proporcionadas por la ECM que rodea a las células, la cual regula el comportamiento de las células por medio de dos mecanismos, por un lado, proporcionando señales bioquímicas, principalmente en forma de factores de crecimiento y, por otro, mediante señales biofísicas (3). En este sentido, los andamios de tercera generación son aquellos diseñados de tal manera que imiten estas señales, con el objetivo de modular el crecimiento y la diferenciación celular, potencialmente mejorando la formación del nuevo tejido (12).

En la actualidad, la aproximación más comúnmente utilizada para inducir la diferenciación osteogénica de las MSCs consiste en el uso de compuestos osteoinductivos como los factores de crecimiento. Sin embargo, las limitaciones existentes en el uso de estos factores como son su elevado coste, corta vida media, baja biodisponibilidad, dificultad en conseguir una tasa de liberación adecuada y la posibilidad de efectos secundarios tóxicos (19), han hecho necesario investigar nuevas estrategias que permitan dirigir el comportamiento celular y promover la formación del nuevo tejido óseo de una manera más eficiente y segura. A continuación, se presentan posibles estrategias biomiméticas para la fabricación de materiales más avanzados que permitan obtener la respuesta celular deseada y promover el proceso natural de regeneración.

### **1.5.1. El papel de la topografía superficial**

En condiciones naturales, las células responden y se adaptan a los estímulos físicos proporcionados por la ECM, los cuales afectan a las funciones celulares. En particular, las características topográficas de la matriz pueden influenciar procesos tales como la adhesión, migración, orientación, proliferación y diferenciación celular.

Para imitar la organización jerárquica de la ECM nativa, una posible estrategia consiste en la incorporación de características topográficas a escala nano-/micrométrica en el diseño de los andamios. En 1911, Ross Harrison demostró por primera vez el efecto de la topografía en la morfología, orientación y migración celular utilizando fibras de seda de araña como sustrato (45). Posteriormente, el término “guía por contacto” fue acuñado por Paul Weiss

para describir el efecto de la topografía en la orientación y migración celular (46). En base a estos estudios, las técnicas de nano-/microfabricación, inicialmente desarrolladas para la industria electrónica, comenzaron a ser aplicadas para el estudio del comportamiento celular en superficies nano-/microestructuradas preparadas utilizando diferentes materiales y arquitecturas (19,47). Por ejemplo, Lamers *et al.* (48) observaron una mayor expresión de genes relacionados con la osteogénesis en osteoblastos cultivados en superficies con surcos (75 nm de anchura y 33 nm de profundidad), en comparación con aquellos cultivados en superficies planas. De manera similar, Abagnale *et al.* (49) estudiaron la diferenciación de MSCs en superficies con crestas, observando que las crestas de mayor tamaño (15  $\mu\text{m}$ ) promovían la diferenciación adipogénica, mientras que las de menor tamaño (2  $\mu\text{m}$ ) promovían la diferenciación osteogénica.

Aunque el mecanismo exacto mediante el cual la topografía superficial es capaz de influir en la diferenciación celular no es del todo comprendido, hoy en día, es ampliamente aceptado que las integrinas de la superficie celular juegan un papel crucial en el reconocimiento de la topografía superficial. Estas integrinas son proteínas transmembrana, que interactúan con secuencias específicas de aminoácidos que se encuentran presentes en proteínas que forman parte de la ECM, como la fibronectina y la vitronectina, siendo las principales responsables de la transducción de señales mecánicas externas (9,50). Los patrones topográficos superficiales a escala nano-/micrométrica tales como canales, pilares, rejillas, pozos, surcos y crestas, proporcionan una mayor área superficial que incrementa la adsorción de estas proteínas presentes en los fluidos fisiológicos, lo que, a su vez, media en la interacción entre las células y la superficie del material, promoviendo la adhesión celular inicial, fundamental para eventos posteriores como la migración, proliferación y diferenciación celular (14). La unión de las integrinas es esencial para la formación de los denominados complejos de adhesión focal, los cuales regulan una serie de cascadas de señalización intracelular, que resultan en la conversión de las señales mecánicas en señales bioquímicas que regulan el comportamiento celular (19).

A parte de la acción de las integrinas, tras la adhesión inicial, las células generan unas proyecciones nanométricas denominadas filopodios y lamelipodios, que les permiten reconocer la superficie. De esta forma, las células experimentan una guía por contacto en respuesta a los diferentes tipos de patrones topográficos, adaptando su morfología de acuerdo con la topografía superficial del material (6). Esta adaptación provoca cambios en la organización del citoesqueleto, lo cual puede afectar a la morfología del núcleo y alterar la expresión de determinados genes implicados en muchos eventos celulares, entre los que se

incluye la diferenciación celular (47,50). Estudios previos han demostrado que, aquellos materiales que poseen propiedades superficiales favorables para las células, pueden estimular más eficientemente el crecimiento de nuevo hueso en comparación con los materiales convencionales (25).

### **1.5.2. Los sistemas de liberación controlada**

Otra de las estrategias para el desarrollo de andamios biomiméticos, consiste en la incorporación de sustancias terapéuticas osteoinductivas. Las terapias de regeneración basadas en el uso de factores de crecimiento (BMP, PDGF, TGF- $\beta$ , etc.) han tenido cierto grado de éxito, sin embargo, el modo tradicional de administración basado en la inyección del factor en la zona afectada, ha demostrado ser ineficiente debido a la rápida difusión de las sustancias a otras áreas del cuerpo, lo que puede causar efectos secundarios no deseados, debido a la necesidad de usar concentraciones suprafisiológicas para obtener el efecto osteogénico deseado (9). En contraposición, el uso de sistemas de transporte para la liberación local de estos compuestos permite obtener una mayor concentración del compuesto en el sitio de interés, mientras que, al mismo tiempo, se reducen los posibles efectos secundarios adversos (5). Además, esta estrategia ofrece un mayor control en la liberación de las sustancias transportadas, así como la posibilidad de conseguir una liberación sostenida durante largos períodos de tiempo, ya que para que las sustancias terapéuticas puedan cumplir su función de manera efectiva, éstas deben alcanzar el lugar de la lesión sin perder su bioactividad y permanecer en esa localización durante el tiempo necesario para desempeñar su acción terapéutica (1).

Para su uso como transportadores, estos sistemas deben ser capaces de almacenar y retener las sustancias hasta alcanzar el sitio de interés, así como de liberar las sustancias transportadas de manera controlada y sostenida durante un periodo de tiempo determinado (51). Diferentes tipos de estructuras tales como varillas, tubos, esferas, y agujas han sido estudiadas para su uso como sistemas de transporte. En particular, las esferas huecas han atraído un gran interés en los últimos años como transportadores gracias a sus propiedades únicas, como su morfología bien definida, su elevada área superficial, su baja densidad y, especialmente, su mayor capacidad de almacenamiento, gracias a su cavidad interior hueca, que les permite transportar una mayor cantidad de compuestos en comparación con otro tipo de estructuras (52,53).

Numerosos métodos han sido utilizados para fabricar estas esferas huecas, tales como el método hidrotermal, el proceso sol-gel, la liofilización, emulsiones, métodos basados en el uso de moldes y la síntesis asistida por microondas (54,55). De entre estos, los métodos que se basan en el uso de moldes han sido los más comúnmente utilizados. Estos moldes, que pueden ser duros (polímeros, sílica y carbono) o suaves (gotas de emulsiones, micelas y burbujas de gas) son recubiertos con el material de interés y posteriormente eliminados mediante un tratamiento térmico o químico. Esta etapa de eliminación es la principal desventaja de este método, ya que se trata de un proceso complejo, que puede afectar tanto a la morfología como a la integridad de las estructuras resultantes, limitando su aplicación clínica. Además, este método normalmente implica el uso de sustancias tóxicas como surfactantes, que pueden afectar a la función de los compuestos transportados (56,57).

Por esta razón, en los últimos años, se han desarrollado nuevos métodos que prescinden del uso de moldes para la síntesis de estructuras huecas. Entre estos métodos destacan aquellos basados en procesos como el efecto Kirkendall, el reemplazo galvánico y especialmente, el fenómeno de maduración de Ostwald, el cual ha sido el más utilizado para la síntesis de estas estructuras, gracias a que permite obtener partículas con una morfología y tamaño uniformes de una manera sencilla y económica (52). En general, estos métodos se basan en la formación de partículas sólidas, que a su vez sirven de molde para la formación de las estructuras huecas y ofrecen una serie de ventajas como son su mayor reproducibilidad, bajo coste, uniformidad de los productos resultantes y especialmente, su mayor escalabilidad, fundamental para la aplicación práctica de estos sistemas de transporte (57,58).

A parte de la técnica utilizada, también es importante tener en cuenta el ratio de degradación del material seleccionado para su fabricación, ya que este afectará a la liberación de las sustancias contenidas en su interior (4). Mediante el uso de materiales biodegradables, como los polímeros y las cerámicas, es posible conseguir una liberación más eficiente y completa de los compuestos transportados. Por ejemplo, los polímeros sintéticos han sido comúnmente utilizados para este propósito debido a que poseen una tasa de degradación controlable, sin embargo, la principal desventaja de estos materiales es que los productos de su degradación pueden causar reacciones inmunológicas, además de alterar la actividad de las sustancias terapéuticas (4,22). Por otro lado, los materiales cerámicos como el HA también han sido estudiados para su uso como transportadores, gracias a su excelente capacidad de adsorción y a su biocompatibilidad. Además, los productos resultantes de degradación no son tóxicos, ni provocan reacciones inmunológicas, sin embargo, su aplicación también ha sido limitada debido a su baja tasa de degradación (5).





## 2. OBJETIVOS

---

Las limitaciones existentes en los materiales actualmente utilizados para regeneración ósea, especialmente en términos de osteoinducción, hacen necesario el desarrollo de nuevos tipos de materiales, capaces de cumplir múltiples funciones, más allá de servir únicamente como soporte para la formación del nuevo tejido. En base a esto, el objetivo principal de esta Tesis Doctoral es sintetizar andamios cerámicos 3D, sobre los que implementar diferentes estrategias biomiméticas, basadas en la modificación de las propiedades superficiales, con el fin de generar estructuras capaces de modificar el comportamiento celular. Para desarrollar este objetivo principal, se establecen los siguientes objetivos específicos:

1. Sintetizar andamios cerámicos 3D con una composición perteneciente al sistema  $\text{SiO}_2\text{-CaO-P}_2\text{O}_5$ , mediante el método de replicación de esponja polimérica combinado con el proceso sol-gel.
2. Optimizar el proceso de síntesis, desarrollando estructuras multicapa dopadas con iones bioactivos, como estroncio y magnesio, y caracterizar física, química y mineralógicamente los andamios obtenidos.
3. Modificar la topografía superficial de los andamios, utilizando la técnica de grabado químico y caracterizar estructuralmente los andamios resultantes.
4. Desarrollar, empleando el método hidrotermal, un sistema de transporte en forma de esferas huecas, optimizando el proceso de síntesis mediante el estudio de los principales parámetros de la reacción hidrotermal.
5. Caracterizar física, química y mineralógicamente las esferas obtenidas e incorporarlas a la superficie de los andamios cerámicos 3D.
6. Evaluar la bioactividad *in vitro* de los andamios modificados mediante inmersión en SBF, de acuerdo con la norma ISO/FDIS 23317.



## 3. MATERIALES Y MÉTODOS

---

En la presente Tesis Doctoral, se fabricaron andamios cerámicos 3D mediante la combinación de las técnicas de sol-gel y replicación de esponja polimérica. En este apartado se describirá brevemente el proceso de síntesis de los andamios, seguido de su caracterización física, química y mineralógica. También se describirá la modificación de su topografía superficial, así como los ensayos realizados para evaluar la bioactividad *in vitro* de los mismos. Por último, se describirá el proceso de síntesis de esferas huecas, empleando el método hidrotérmico, así como su caracterización e incorporación a la superficie de los andamios previamente obtenidos.

### 3.1. Obtención de andamios cerámicos 3D

Los andamios cerámicos empleados en esta Tesis Doctoral fueron andamios multicapa, donde las capas internas y externas de los mismos, son preparadas utilizando distintas composiciones, con el fin de obtener diferentes propiedades de resistencia y bioactividad. Para las capas internas o núcleo de los andamios, se utilizó la composición  $2\text{SiO}_2\text{-}50\text{CaO-}48\text{P}_2\text{O}_5$  (mol %), la cual fue preparada mediante el proceso sol-gel, utilizando fosfato de trietilo (TEP,  $\geq 99.8\%$  - Sigma Aldrich) como fuente de fósforo, ortosilicato de tetraetilo (TEOS,  $98\%$  - Sigma Aldrich) como fuente de silicio y carbonato de calcio ( $\text{CaCO}_3$ ,  $\geq 99.8\%$  - Sigma Aldrich) como fuente de calcio.

Una vez preparada la disolución sol-gel con la composición de interés, los andamios fueron obtenidos mediante la técnica de replicación de esponja polimérica. Para ello, esponjas de poliuretano (20 ppi, 12.7 mm de diámetro y 10 mm de alto) fueron utilizadas como molde sobre el que impregnar la disolución cerámica. Tras sumergir las esponjas en la disolución el número adecuado de veces, hasta que estas quedaran bien recubiertas, los andamios fueron sinterizados a  $950\text{ }^\circ\text{C}$ , con el fin de lograr la densificación del material, al mismo tiempo que se eliminaba la esponja de poliuretano utilizada como molde. De esta manera, se obtuvo el núcleo de los andamios multicapa, el cual fue posteriormente recubierto con una nueva disolución sol-gel dopada con estroncio/magnesio, para obtener las capas externas con mejores propiedades bioactivas.

Las condiciones de preparación de la disolución sol-gel, así como una descripción más detallada del proceso de obtención de los andamios cerámicos, se presentan en las secciones: “2.1. *Materials preparation*” del Artículo 1 (pg. 55) y “2.2. *Scaffold synthesis and incorporation of hollow spheres*” del Artículo 2 (pg. 65).

### **3.2. Caracterización de los andamios cerámicos 3D**

Una vez obtenidos los andamios multicapa, estos fueron caracterizados física, química y mineralógicamente. La determinación de la macro-/microestructura, así como de la composición química de los andamios, se llevó a cabo mediante microscopía electrónica de barrido y espectroscopía por dispersión de energía de rayos X (SEM-EDX, Hitachi S – 3500 N). En lo que respecta a la caracterización mineralógica, ésta se realizó mediante la técnica de difracción de rayos X (XRD, Bruker, AXR D8 Advance). En cuanto a la estructura porosa de los andamios, la porosidad total y el tamaño de los poros fueron determinados mediante porosimetría de mercurio (Poremaster 60 GT, Quantachrome Instruments). Por último, la resistencia mecánica de los andamios fue analizada mediante la técnica de compresión simple (SVL – 100N, IMADA).

Las condiciones empleadas para la caracterización de los andamios se encuentran descritas en las secciones: “2.2. *Scaffolds characterisation*” del Artículo 1 (pg. 55) y “2.2. *Scaffold synthesis and incorporation of hollow spheres*” del Artículo 2 (pg. 65).

### **3.3. Modificación de la topografía superficial de los andamios**

Tras la obtención y caracterización de los andamios cerámicos multicapa, se realizó la modificación de la topografía superficial mediante la técnica de grabado químico. Para ello, los andamios fueron sumergidos en una disolución química, preparada con diferentes concentraciones de ácido acético (3 %, 5 % y 10 %), durante diferentes tiempo de ataque (30, 60, 90 y 120 s), con el fin de determinar las mejores condiciones para la modificación superficial de los andamios.

La caracterización de la microestructura de los andamios modificados fue llevada a cabo mediante SEM-EDX, mientras que la caracterización mineralógica se realizó por XRD. La determinación de las dimensiones (anchura y profundidad) del patrón topográfico obtenido se realizó mediante microscopía holográfica digital (DHM-R2100, Lyncée Tec). Las condiciones detalladas del proceso de grabado químico, así como de las técnicas empleadas para la caracterización de los andamios modificados se describen en la sección “2.3. *Surface topography patterning and characterisation*” del Artículo 1 (pg. 55).

### **3.4. Síntesis e incorporación de esferas huecas a la superficie de los andamios**

Esferas huecas de fosfato de estroncio fueron obtenidas mediante el método hidrotérmal, empleando nitrato de estroncio ( $\text{Sr}(\text{NO}_3)_2$ , Sigma Aldrich) como fuente de estroncio, cloruro de magnesio ( $\text{MgCl}_2$ , Sigma Aldrich) como fuente de magnesio y fosfato disódico ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , Sigma Aldrich) como fuente de fósforo. Una vez preparada la disolución, la reacción hidrotérmal se llevó a cabo en un autoclave en condiciones variables de presión y temperatura, durante diferentes periodos de tiempo.

Los precipitados de esferas huecas obtenidos fueron caracterizados física y químicamente mediante SEM-EDX, mientras que su caracterización mineralógica se llevó a cabo por XRD. La porosidad, distribución de tamaño de poro y área superficial específica de las esferas, fueron determinadas mediante la técnica de adsorción/desorción de  $\text{N}_2$ , aplicando los métodos de Brunauer-Emmet-Teller (BET) y Barret-Joyner-Halenda (BJH). Los detalles de la síntesis, así como de las técnicas empleadas en la caracterización de las esferas huecas se presentan en la sección “2.1. *Synthesis and characterization of SrP hollow spheres*” del Artículo 2 (pg. 65).

Una vez sintetizadas y caracterizadas, las esferas huecas fueron incorporadas a los andamios cerámicos 3D previamente obtenidos. Para ello, los andamios fueron sumergidos en una disolución de etanol conteniendo las esferas huecas dispersadas, y tras un determinado periodo de inmersión, se analizó su adhesión superficial mediante SEM-EDX. Las condiciones específicas del proceso de incorporación se encuentran detalladas en la sección “2.2. *Scaffold synthesis and incorporation of hollow spheres*” del Artículo 2 (pg. 65).

### 3.5. Ensayos de bioactividad *in vitro* de los andamios

La determinación de la bioactividad *in vitro* de los andamios se realizó siguiendo el protocolo establecido en la norma ISO/FDIS 23317: 2017, basada en los estudios de Kokubo y Takadama (36). Para ello, los andamios fueron sumergidos en una disolución de SBF durante diferentes periodos de tiempo, tras los cuales se analizó la formación de apatito sobre la superficie de estos mediante SEM-EDX. Además, mediante espectrometría de emisión óptica de plasma acoplado inductivamente (ICP-OES, PerkinElmer Optima 200TM), se estudiaron los cambios en las concentraciones iónicas del SBF tras los diferentes periodos de inmersión. Los detalles de los ensayos de bioactividad se encuentran descritos en las secciones: “2.4. *Scaffolds’ in vitro bioactivity*” del Artículo 1 (pg. 56) y “2.3. *In vitro bioactivity of scaffolds with incorporated spheres*” del Artículo 2 (pg. 66).





## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

---

En la presente Tesis Doctoral se desarrollaron e implementaron diferentes estrategias biomiméticas para la obtención de andamios de tercera generación. Por un lado, se investigó la modificación de la topografía superficial de andamios cerámicos, con el fin de generar un patrón topográfico sobre su superficie, que permita mejorar sus propiedades osteoinductivas. Por otro lado, se estudió el desarrollo de un sistema de liberación controlada con forma de esferas huecas, así como su incorporación a la superficie de los andamios previamente obtenidos, con el fin de mejorar la administración de sustancias terapéuticas de interés y, por tanto, acelerar el proceso de regeneración del tejido. A continuación, se expondrán y discutirán los principales resultados obtenidos durante la realización de esta Tesis Doctoral.

### 4.1. Obtención y caracterización de los andamios cerámicos 3D

Para la obtención de andamios multicapa, se estudiaron diferentes composiciones químicas dentro del sistema  $\text{SiO}_2\text{-CaO-P}_2\text{O}_5$ . A diferencia de los andamios monocomposicionales, tradicionalmente utilizados, los andamios multicapa, son obtenidos empleando distintas composiciones para las capas internas y externas, con la finalidad de obtener diferentes propiedades mecánicas y bioactivas entre las distintas capas, que permitan incrementar la durabilidad y la osteointegración de los andamios (59,60).

Los andamios cerámicos fueron obtenidos mediante la combinación del proceso sol-gel junto con la técnica de replicación de esponja polimérica. La combinación de estas técnicas nos permite obtener materiales con una elevada porosidad interconectada, similares al hueso trabecular humano, de una manera simple, económica y sin la necesidad de utilizar equipamiento complejo. Además, esta estrategia ha sido previamente utilizada de manera exitosa en la fabricación de andamios cerámicos para aplicación en ingeniería de tejido óseo (44,61,62).

En primer lugar, se obtuvieron las capas internas o núcleo de los andamios, cuya composición fue  $2\text{SiO}_2\text{-50CaO-48P}_2\text{O}_5$  (mol %). Los andamios presentaban una estructura 3D con una porosidad interconectada (Figura 1A del Artículo 1 (pg. 56) y Figura 9A del Artículo 2 (pg. 69)), la cual es fundamental para un adecuado transporte de nutrientes y

productos de desecho (63,64). Los andamios estaban compuestos por Ca, P y una pequeña cantidad de Si, con un ratio Ca/P de  $\sim 1.0$ , el cual se corresponde con el del pirofosfato de calcio (CPP,  $\text{Ca}_2\text{O}_7\text{P}_2$ ). El análisis de XRD confirmó que el núcleo estaba formado por una fase principal de CPP, con una elevada cristalinidad (Figura 1B del Artículo 2 (pg. 66)). El CPP es un tipo de CaP formado por el anión pirofosfato ( $\text{P}_2\text{O}_7^{4-}$ ), que se caracteriza por poseer una elevada resistencia mecánica, además de por ser un inhibidor de la mineralización de apatito en condiciones naturales, por lo que presenta una bioactividad muy reducida (65).

Una vez obtenido el núcleo, este fue recubierto con una nueva composición para las capas externas de los andamios multicapa. Para la modificación de la topografía superficial, se utilizó la composición 50CaO-50P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> (mol %), que resultó en la formación de dos fases principales, una de fosfato tricálcico  $\beta$  ( $\beta$ -TCP,  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ) y otra de CPP, igual a la del núcleo (Figura 2A del Artículo 1 (pg. 56)). El  $\beta$ -TCP, a diferencia del CPP, presenta una elevada solubilidad, lo que resulta en una mayor bioactividad, sin embargo, posee una menor resistencia mecánica (18). Los andamios multicapa resultantes presentaron una estructura porosa interconectada, sin embargo, a diferencia del núcleo, su topografía superficial era plana y uniforme (Figura 1B del Artículo 1 (pg. 56)), estando compuestos por Ca, P y Si, con un ratio Ca/P de 1.24 en las capas externas.

Tras su caracterización composicional, se estudió en más detalle la estructura porosa de los andamios obtenidos. La porosidad total de estos se encontraba en torno al 37 %, siendo por tanto inferior al valor óptimo para aplicación en ingeniería de tejido óseo, el cual se recomienda que se encuentre en el rango del hueso trabecular (50 – 90 %) (66). Esto pudo ser debido a que se realizó un número excesivo de recubrimientos, lo que resultó en el bloqueo de parte de la estructura porosa. En cuanto a la distribución de tamaño de los poros, estos se encontraban en el rango de 173.60 – 0.01  $\mu\text{m}$ , siendo entre el 23 – 32 % microporosidad interparticular ( $< 300 \mu\text{m}$ ) y entre el 4 – 14 % microporosidad intraparticular ( $< 1 \mu\text{m}$ ) (Figura 3 del Artículo 1 (pg. 57) y Figura 2 del Artículo 2 (pg. 66)). En general, se recomienda que el tamaño de poro de los andamios sea de entre 50 – 100  $\mu\text{m}$ , para asegurar el adecuado crecimiento del nuevo tejido óseo (13,67).

Además de la porosidad, otro de los factores más importantes para aplicación en ingeniería de tejido óseo es la resistencia a la compresión de los andamios, la cual se encontraba en el rango de 0.46 – 1.98 MPa. Estos valores se encuentran entre los más altos obtenidos para andamios cerámicos porosos, siendo similares a los observados en otros estudios, donde valores de 0.2 – 0.4 MPa y 1.0 – 1.7 MPa han sido registrados (61,68).

Aunque la resistencia mecánica de los andamios era inferior a la del hueso trabecular humano, la cual se encuentra en el rango de 2 – 12 MPa (1), estos eran lo suficientemente resistentes como para ser manipulados y, además, es ampliamente aceptado que la resistencia de los andamios aumenta tras su implantación a medida que crece el nuevo hueso (69).

## **4.2. Modificación de la topografía superficial de los andamios**

Una vez caracterizados los andamios desde el punto de vista composicional y estructural, se implementó la primera de las estrategias biomiméticas investigadas. Esta estrategia se basó en la modificación de la topografía superficial de los andamios, con la finalidad de introducir un patrón topográfico que permitiera incrementar el potencial osteoinductivo de los mismos. El uso de este tipo de patrones ha demostrado ser una estrategia exitosa para controlar la diferenciación osteogénica de las MSCs (3,15), siendo por tanto de gran interés para su aplicación en ingeniería de tejido óseo.

Para llevar a cabo esta modificación, los andamios cerámicos fueron tratados con la técnica de grabado químico, consistente en la inmersión del material en una disolución ácida durante un tiempo determinado. Con el fin de establecer las mejores condiciones de ataque, se estudiaron diferentes concentraciones de ácido acético (3 %, 5 % y 10 %) y diferentes tiempos de ataque (30, 60, 90 y 120 s). Cuando los andamios eran tratados con concentraciones de ácido superiores al 3 %, los surcos y crestas que se formaban eran muy poco definidos y su número era muy reducido. Sin embargo, cuando estos fueron atacados con una disolución de ácido acético al 3 % durante 90 – 120 segundos, la cantidad de surcos y crestas que se formaron sobre la superficie de los andamios aumentó considerablemente, como se puede ver en las imágenes de SEM de la Figura 4 del Artículo 1 (pg. 58).

Al comparar los diferentes tiempos de ataque se observó que, a medida que aumentaba el tiempo de inmersión, los surcos y crestas se volvían más estrechos y profundos (Figuras 5 y 6 del Artículo 1 (pg. 59)). Cuando los andamios eran atacados durante 60 segundos, los surcos y las crestas tenían una anchura de  $\sim 1 \mu\text{m}$  y una profundidad de surco de en torno a 250 nm, mientras que cuando estos eran atacados durante 120 segundos la anchura de los surcos y las crestas era menor, de entre 850 – 950  $\mu\text{m}$ , y la profundidad de los surcos aumentaba, siendo de alrededor de 270 nm. En general, la anchura de los surcos y las crestas era similar y se encontraba en el rango de 900 nm – 1.5  $\mu\text{m}$ , mientras que la profundidad de los surcos era de alrededor de 200 nm – 300 nm. En este sentido, unas dimensiones

adecuadas de los surcos y las crestas son fundamentales para promover efectivamente la guía por contacto de las células. De acuerdo con la literatura previa, las dimensiones de anchura y profundidad obtenidas en este estudio serían adecuadas para promover la adhesión, el alineamiento y la elongación de los osteoblastos, potencialmente estimulando la diferenciación osteogénica de los mismos (15,70,71).

A pesar de los avances en el desarrollo de nuevas técnicas de nano-/microfabricación, todavía es complicado preparar andamios 3D biodegradables con topografía superficial biomimética. En este estudio, la modificación de la topografía superficial ocurrió a consecuencia de la diferente susceptibilidad al ataque químico de las fases constituyentes del material, la cual está directamente relacionada con la concentración de ácido y el tiempo de ataque. Al analizar los andamios mediante XRD después del ataque, se observó que la fase de CPP había sido parcialmente eliminada, mientras que la de  $\beta$ -TCP se mantenía estable (Figura 2B del Artículo 1 (pg. 56)). Además, el ratio Ca/P de los andamios había pasado de 1.24 en los andamios sin tratar, a 1.3 en los andamios modificados, con un ratio cercano a 1.5, correspondiente al del  $\beta$ -TCP, en las áreas con surcos, lo que indicaba que parte del CPP había sido eliminado. La eliminación selectiva del CPP localizado en el recubrimiento externo debido a su mayor sensibilidad al ataque químico, junto con la distribución lamelar de las fases de CPP y  $\beta$ -TCP, tuvo como consecuencia la formación de surcos y crestas en la superficie de los andamios.

### **4.3. Bioactividad *in vitro* de los andamios con topografía superficial modificada**

Tras la modificación de la topografía superficial, se estudió la bioactividad *in vitro* de los andamios modificados. Para ello, los andamios fueron sumergidos en una disolución de SBF, con una composición similar a la del plasma sanguíneo humano, siguiendo el protocolo establecido por Kokubo y Takadama (36), consistente en analizar la formación de una capa de apatito, similar al de la fase mineral del hueso humano, sobre la superficie del material (5). Al analizar mediante SEM-EDX los andamios tras los diferentes periodos de inmersión (Figura 7 del Artículo 1 (pg. 60)), se observó que estos eran bioactivos tras solo 12 horas, cuando los primeros precipitados de apatito comenzaron a formarse en la superficie. Estos precipitados estaban compuestos por Ca, P y Cl, con un ratio Ca/P de  $\sim$ 1.5, tratándose de cloroapatito ( $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{Cl}$ ), un tipo de apatito donde predomina el anión cloruro (Cl<sup>-</sup>) (27).

Aunque los precipitados de apatito comenzaron a formar una capa más densa tras 1 día de inmersión, estos desaparecieron tras 7 – 14 días en SBF, probablemente debido a la disolución del  $\beta$ -TCP restante en los surcos de la capa externa formados tras el ataque químico. Esto provocó que el núcleo, formado principalmente por CPP, quedara expuesto, lo que impidió la precipitación de apatito debido al efecto inhibitor del pirofosfato (65). Por este motivo, con la finalidad de incrementar la duración de la bioactividad, los andamios fueron recubiertos nuevamente con la composición utilizada para el recubrimiento externo, pero dopada con Sr (1 %), el cual se ha demostrado que promueve la bioactividad del material (60,72). A diferencia de los andamios sin dopar, los andamios dopados mostraron bioactividad tras 14 días, llegando a ser bioactivos incluso tras 21 días, cuando numerosos precipitados de apatito (Ca/P de 1.69) formaron una densa capa sobre la superficie de los andamios (Figura 8 del Artículo 1 (pg. 60)).

Es bien sabido que, en materiales bioactivos, esta precipitación de apatito ocurre a consecuencia del intercambio iónico entre el material cerámico y el SBF (73). Por tanto, para estudiar más detalladamente el mecanismo de bioactividad de los andamios dopados, se analizaron los cambios en las concentraciones iónicas de Ca, P y Si tras los diferentes periodos de inmersión (Figura 9 del Artículo 1 (pg. 60)). Aunque la concentración de Ca disminuyó durante los primeros 7 días, cuando se formaron los primeros precipitados de apatito, ésta aumentó durante el resto del ensayo, probablemente debido a la disolución parcial del nuevo recubrimiento externo. De igual manera, la concentración de Si aumentó durante todo el ensayo, confirmando que los andamios comenzaron a degradarse tras 7 días en SBF. En cuanto a la concentración de P, ésta disminuyó de manera constante durante los 21 días de ensayo, especialmente tras 7 días, cuando la precipitación de apatito aumentó considerablemente. Este descenso en la concentración iónica de Ca y P en el SBF se correlaciona con la precipitación de apatito sobre la superficie de los andamios (74).

#### **4.4. Síntesis e incorporación de esferas huecas a los andamios cerámicos**

La segunda de las estrategias biomiméticas investigadas en la presente Tesis Doctoral, fue el desarrollo de un sistema de transporte en forma de esferas huecas, y su incorporación a los andamios cerámico previamente obtenidos. Estos sistemas de transporte han atraído un gran interés en los últimos años gracias a su aplicación en la liberación local y sostenida

de sustancias terapéuticas, por lo que su uso en conjunto con andamios de sustitución permitiría incrementar el potencial osteogénico de los mismos, confiriéndoles propiedades osteoinductivas, antibacterianas o antiinflamatorias en función del tipo de sustancia transportada.

Las esferas huecas sintetizadas en este estudio fueron obtenidas empleando el método hidrotermal en ausencia de moldes (58,75). Este método de síntesis se basa en la reacción de los precursores de interés en una disolución acuosa en condiciones de elevada presión y temperatura y, gracias a su simplicidad, versatilidad y bajo coste, permite obtener materiales con una gran variedad de morfologías y tamaños (55,72). Por este motivo, el método hidrotermal ha sido habitualmente utilizado durante los últimos años para la obtención de este tipo de esferas (54).

Con la finalidad de optimizar el proceso de síntesis, se estudió la influencia de los principales parámetros de la reacción hidrotermal (tiempo, temperatura y concentración de los precursores) en la formación de las partículas esféricas. Estos parámetros juegan un papel fundamental en la síntesis de las esferas, influyendo notablemente en la morfología y el tamaño de los productos resultantes (25,76).

En primer lugar, se investigó la influencia del tiempo de reacción en el crecimiento de las esferas (Figura 5 del Artículo 2 (pg. 68)). Aunque se observó la formación de algunas esferas tras 6 horas de tratamiento, estas eran poco definidas y se encontraban muy agregadas entre ellas, mientras que, cuando se amplió el tiempo de reacción a 12 – 24 horas, se obtuvieron partículas esféricas más definidas y con un tamaño ligeramente mayor. Debido a que el proceso de formación de la cavidad hueca de las esferas depende en gran medida del tiempo de maduración (76,77), se estableció un tiempo de reacción de 24 horas para la síntesis de las esferas huecas.

Otro de los factores más destacados en la formación de las esferas es la concentración de los precursores utilizados. En concreto, el Mg resultó ser el más importante, ya que en su ausencia no se obtuvieron partículas esféricas, presentando los precipitados resultantes una morfología en forma de flores (*flower-like*) (Figura 6A del Artículo 2 (pg. 68)). Esto es debido a que el Mg causa una distorsión en la estructura cristalina de los precipitados, impidiendo el crecimiento normal de los cristales, los cuales se reordenan de manera alternativa formando partículas esféricas (75,78). Además, la cantidad de esferas obtenidas varió en función de la concentración de Mg, de tal modo que, a mayor concentración (0.9 mM), mayor cantidad de

esferas se formaban. Por su parte, los cambios en las concentraciones de Sr y P no tuvieron un efecto destacado en la formación de las esferas.

Por último, se estudió la influencia de la temperatura de síntesis en la formación de las esferas. En este sentido, se observó que, cuando la temperatura de síntesis era inferior a 60 °C, no se obtenían esferas, mientras que cuando ésta era superior a 100 °C, la cantidad de esferas que se formaban era notablemente mayor (Figura 7 del Artículo 2 (pg. 68)). Además, altas temperaturas son esenciales para la formación de estructuras huecas, ya que promueven la disolución de las partículas internas (67,79). Por esta razón, se estableció una temperatura de 120 °C para la síntesis de las esferas huecas.

Una vez determinadas las mejores condiciones de síntesis, se caracterizaron estructural y composicionalmente los precipitados obtenidos. Estos presentaban una morfología esférica con un tamaño medio de ~850 nm, mostrando además una gran tendencia a unirse entre ellos. En general, el tamaño de las esferas varió en función de las condiciones de síntesis, encontrándose en el rango de 600 nm – 1 µm. Esferas huecas de tamaños similares, entre 300 nm – 2 µm, han sido exitosamente utilizadas para transportar sustancias terapéuticas como antibióticos, anticancerígenos y antiosteoporóticos (54,76,80). Por tanto, el tamaño de las esferas obtenidas en este estudio sería adecuado para su uso como sistemas de transporte.

La observación de algunas esferas rotas o parcialmente formadas confirmó la naturaleza hueca de las mismas, siendo la cavidad interna de ~350 nm de tamaño (Figura 3 del Artículo 2 (pg. 67)). Es probable que la formación de esta cavidad hueca ocurriera como consecuencia de un proceso de disolución-recristalización, también conocido como maduración de Ostwald, en el que las partículas internas más pequeñas, con mayor solubilidad, se disolvieron y migraron a la parte exterior, donde las partículas de mayor tamaño sirvieron como puntos de nucleación para su posterior recristalización (81,82). Con el suficiente tiempo de maduración, la cavidad interna de las esferas quedó completamente vaciada, formándose de esta manera las esferas huecas.

El área superficial específica de las esferas, así como el volumen de porosidad y la distribución de tamaño de poro fueron determinados mediante el estudio de las isotermas de adsorción/desorción de N<sub>2</sub> (Figura 4 del Artículo 2 (pg. 67)). Las esferas presentaban una estructura mesoporosa (2 – 50 nm), con un volumen de poro de 0.14 cm<sup>3</sup>/g y un tamaño medio de poro de 3.8 nm, el cual es considerado adecuado para el transporte de diferentes tipos de sustancias terapéuticas (83). Además, las esferas presentaban un área superficial específica de 30.5 m<sup>2</sup>/g, que junto con su estructura mesoporosa y, especialmente, su interior

hueco, les confiere una mayor capacidad de transporte en comparación con otro tipo de materiales, en los que las sustancias transportadas simplemente quedan adheridas a la superficie del material (84,85). Estas características les convierten en candidatos ideales para su uso como sistemas de liberación controlada.

En cuanto a su caracterización composicional, de acuerdo con el análisis de EDX, los precipitados estaban compuestos por Sr, P, O y Mg, con un ratio Sr/P de 1.0. El análisis por XRD confirmó que se trataba de esferas de fosfato de estroncio (SrP), ya que estaban compuestas por una fase mayoritaria de SrP, con el Sr estando parcialmente sustituido por Mg ( $(\text{Sr}_{0.86}\text{Mg}_{0.14})_3(\text{PO}_4)_2$ ), junto con algunas fases menores como pirofosfato de magnesio ( $\text{Mg}_2\text{O}_7\text{P}_2$ ), fosfato de estroncio ( $\text{Sr}_3(\text{PO}_4)_2$ ) y ultrafosfato de estroncio ( $\text{Sr}_2(\text{P}_6\text{O}_{17})$ ) (Figura 1A del Artículo 2 (pg. 66)). Los SrPs son químicamente similares a los CaPs y representan una alternativa prometedora para su uso como sistemas de transporte gracias a que tienen una capacidad de adsorción similar, son biocompatibles, osteoinductivos y, sobre todo, poseen una mayor biodegradabilidad, lo cual es fundamental para una adecuada liberación de las sustancias transportadas (86–88).

Por último, también se estudió el efecto de un segundo tratamiento hidrotérmal en la morfología de las partículas esféricas sintetizadas. Cuando éstas fueron tratadas nuevamente a 120 °C durante 24 horas, se observó un mayor número de esferas huecas abiertas, sin embargo, estas presentaban una morfología más irregular que las esferas sin tratar (Figura 8 del Artículo 2 (pg. 68)). Esta apertura permitiría facilitar la incorporación de las sustancias terapéuticas al interior de las esferas, incrementando la capacidad de transporte de las mismas. Posteriormente, las esferas podrían ser recubiertas con un polímero biodegradable, limitando de esta manera el ratio de liberación de las sustancias transportadas (85).

Tras la caracterización de las esferas huecas, éstas fueron incorporadas a la superficie de los andamios cerámicos, mediante inmersión de los mismos en una disolución de etanol que contenía esferas huecas dispersadas. Tras unas horas de inmersión, las esferas quedaron adheridas a la superficie de los andamios, como se muestra en las imágenes de SEM de la Figura 9 del Artículo 2 (pg. 69). Aunque algunas zonas de los andamios presentaban una mayor concentración de esferas, éstas se encontraban distribuidas de manera uniforme por toda la superficie. Las esferas mantuvieron tanto su morfología como su integridad estructural tras la incorporación y, gracias a su pequeño tamaño, la porosidad de los andamios no se vio afectada. Las esferas quedaron probablemente adheridas a la superficie por medio de interacciones electrostáticas entre el  $\text{Sr}^{2+}$  de estas y el  $\text{PO}_4^{3-}$  de los andamios.



Estudios previos, como los desarrollados por Son *et al.* (89) y Yao *et al.* (90), han demostrado que es posible liberar localmente sustancias terapéuticas transportadas por medio de partículas esféricas unidas a la superficie de andamios sintéticos, con el fin de promover la regeneración de defectos óseos. En este estudio, se explora por primera vez la incorporación de esferas huecas de SrP a andamios cerámicos, las cuales, gracias a su estructura hueca, serían capaces de almacenar mayores concentraciones de sustancias terapéuticas, presentando además una mayor capacidad degradativa en comparación con las esferas de HA habitualmente utilizadas.

#### **4.5. Bioactividad *in vitro* de los andamios con esferas huecas incorporadas**

Tras la incorporación de las esferas huecas, se estudió la bioactividad *in vitro* de los andamios resultantes (Figura 10 del Artículo 2 (pg. 69)). De manera previa y con la finalidad de incrementar la bioactividad de los andamios, estos fueron recubiertos con la composición utilizada para las capas externas dopada con Mg (3 %), el cual se sabe que promueve la precipitación de apatito (68). Los andamios fueron bioactivos tras 7 días de inmersión en SBF, cuando se formaron los primeros precipitados de apatito sobre la superficie de los mismos. Estos precipitados estaban compuestos por Ca, P y O, con un ratio Ca/P de  $\sim 1.5$ , indicando la formación de hidroxiapatito deficiente en calcio (CDHA), característico de materiales bioactivos (5). Aunque los precipitados de apatito se disolvieron parcialmente tras 14 días, estos volvieron a precipitar a los 21 días, cuando formaron una densa capa sobre la superficie de los andamios. Esta disolución parcial del CDHA permitió comprobar que las esferas continuaban adheridas a la superficie de los andamios tras 14 días, revelando la buena estabilidad *in vitro* de las mismas.

Al analizar mediante ICP-OES los cambios en las concentraciones iónicas de Ca, Si y P en el SBF (Figura 11 del Artículo 2 (pg. 70)), se confirmó que las concentraciones de Ca y P disminuían a medida que estos iones reaccionaban entre ellos, para formar los precipitados de apatito, especialmente durante los primeros 7 días de inmersión. Por el contrario, la concentración de Si aumentó durante los 21 días de ensayo, indicando la disolución de los andamios, lo cual es necesario para su aplicación en ingeniería de tejido óseo (24).

Por último, para estudiar la degradación de las esferas incorporadas a los andamios, también se analizaron los cambios en las concentraciones iónicas de Sr y Mg. Ambos iones fueron liberados al SBF tras 7 días de inmersión, indicando, por tanto, que las esferas eran degradables, lo cual es fundamental para su uso como transportadores (5). Además, es bien sabido que estos iones juegan un papel esencial en el proceso de formación ósea, estimulando la diferenciación osteogénica al mismo tiempo que inhiben la actividad osteoclástica, por lo que su liberación favorecería el proceso de regeneración de los defectos óseos (83,91).



## 5. CONCLUSIONES Y PROYECCIONES FUTURAS

---

A continuación, se expondrán las principales conclusiones alcanzadas, así como las posibles proyecciones futuras de los materiales obtenidos durante la realización de la presente Tesis Doctoral.

### 6.1. Conclusiones

- Se han desarrollado, mediante la combinación del proceso sol-gel y la técnica de replicación de esponja polimérica, andamios cerámicos 3D con composición perteneciente al sistema  $\text{SiO}_2\text{-CaO-P}_2\text{O}_5$ . Las estructuras presentaban una porosidad interconectada similar a la del hueso trabecular humano, así como una elevada resistencia mecánica (0.46 – 1.98 MPa).
- Se ha modificado, mediante la técnica de grabado químico, la topografía superficial de los andamios, aprovechando la diferente susceptibilidad al ataque químico de las fases cristalográficas constituyentes (CPP y  $\beta$ -TCP), así como a su distribución lamelar en la capa externa de los andamios. De esta manera, se ha obtenido un patrón de superficie en forma de surcos y crestas que, en función de las condiciones de ataque, presentaron una anchura de 900 nm – 1.5  $\mu\text{m}$  y una profundidad de 200 – 300 nm.
- Se han obtenido, mediante el método hidrotermal y prescindiendo del uso de moldes, esferas huecas de SrP, con un tamaño de 600 nm – 1  $\mu\text{m}$ , un área superficial específica de 30.5  $\text{m}^2/\text{g}$  y una estructura mesoporosa, con un tamaño medio de poro de 3.8 nm. Además, con el fin de incrementar su capacidad de transporte, se ha desarrollado una metodología para controlar la apertura de las esferas huecas, consistente en realizar un segundo tratamiento hidrotermal.

- Se ha optimizado el proceso de obtención de esferas, estudiando las principales variables de la reacción hidrotérmal (tiempo, temperatura y concentración de los precursores), y se ha establecido el protocolo para la incorporación de las esferas huecas a la superficie de los andamios. Las esferas se distribuyeron de manera uniforme por la superficie de los andamios y mostraron una buena estabilidad *in vitro*, comenzando a degradarse tras 7 días de inmersión en SBF.
- Se ha conseguido, mediante el recubrimiento del núcleo con formulaciones dopadas con iones de Sr (1 %) y Mg (3 %), incrementar la duración de la bioactividad. Los andamios dopados fueron bioactivos tras 7 – 14 días en SBF, llegando a ser bioactivos hasta 21 días, cuando los precipitados de apatito formaron una densa capa sobre la superficie de los andamios.

## 6.2. Proyecciones Futuras

- En primer lugar, sería fundamental realizar ensayos de biocompatibilidad *in vitro* con diferentes tipos celulares, así como analizar la expresión de marcadores genéticos implicados en la diferenciación celular, para determinar el grado de mejora en la capacidad osteoinductiva de los andamios modificados.
- También sería necesario determinar la capacidad de carga y descarga de las esferas sintetizadas, utilizando diferentes tipos de sustancias terapéuticas como factores de crecimiento, antibióticos o antiinflamatorios. Además, sería de interés estudiar la velocidad de degradación de las esferas, con el fin de determinar su impacto en la cinética de liberación de las sustancias transportadas.
- Finalmente, sería necesario realizar ensayos de biocompatibilidad *in vivo*, implantando los andamios obtenidos en diferentes modelos animales, para confirmar si los materiales desarrollados son trasladables a la práctica clínica.



## 6. BIBLIOGRAFÍA

---

1. De Witte TM, Fratila-Apachitei LE, Zadpoor AA, Peppas NA. Bone tissue engineering via growth factor delivery: From scaffolds to complex matrices. *Regen Biomater*. 2018;5(4):197-211.
2. Ribas RG, Schatkoski VM, Montanheiro TL do A, de Menezes BRC, Stegemann C, Leite DMG, et al. Current advances in bone tissue engineering concerning ceramic and bioglass scaffolds: A review. *Ceram Int*. 2019;45(17):21051-61.
3. Zhu G, Zhang T, Chen M, Yao K, Huang X, Zhang B, et al. Bone physiological microenvironment and healing mechanism: Basis for future bone-tissue engineering scaffolds. *Bioact Mater*. 2021;6(11):4110-40.
4. Kowalczewski CJ, Saul JM. Biomaterials for the delivery of growth factors and other therapeutic agents in tissue engineering approaches to bone regeneration. *Front Pharmacol*. 2018;9:513.
5. Bose S, Tarafder S. Calcium phosphate ceramic systems in growth factor and drug delivery for bone tissue engineering: A review. *Acta Biomater*. 2012;8(4):1401-21.
6. Bobbert FSL, Zadpoor AA. Effects of bone substitute architecture and surface properties on cell response, angiogenesis, and structure of new bone. *J Mater Chem B*. 2017;5(31):6175-92.
7. Baino F, Fiume E, Barberi J, Kargozar S, Marchi J, Massera J, et al. Processing methods for making porous bioactive glass-based scaffolds-A state-of-the-art review. *Int J Appl Ceram Technol*. 2019;16(5):1762-96.
8. Brown JL, Laurencin CT. Bone Tissue Engineering. En: *Applications of Biomaterials in Functional Tissue Engineering*. Elsevier; 2011. p. 1373-88.
9. Porter JR, Ruckh TT, Popat KC. Bone tissue engineering: A review in bone biomimetics and drug delivery strategies. *Biotechnol Prog*. 2009;25(6):1539-60.
10. Jayakumar P, Di Silvio L. Osteoblasts in bone tissue engineering. *Proc Inst Mech Eng H*. 2010;224(12):1415-40.



11. Bi L, Jung S, Day D, Neidig K, Dusevich V, Eick D, et al. Evaluation of bone regeneration, angiogenesis, and hydroxyapatite conversion in critical-sized rat calvarial defects implanted with bioactive glass scaffolds. *J Biomed Mater Res A*. 2012;100(12):3267-75.
12. Chocholata P, Kulda V, Babuska V. Fabrication of scaffolds for bone-tissue regeneration. *Materials*. 2019;12(4):568.
13. Du Y, Guo JL, Wang J, Mikos AG, Zhang S. Hierarchically designed bone scaffolds: From internal cues to external stimuli. *Biomaterials*. 2019;218:119334.
14. McMahon RE, Wang L, Skoracki R, Mathur AB. Development of nanomaterials for bone repair and regeneration. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2013;101(2):387-97.
15. Gui N, Xu W, Myers DE, Shukla R, Tang HP, Qian M. The effect of ordered and partially ordered surface topography on bone cell responses: A review. *Biomater Sci*. 2018;6(2):250-64.
16. Meng Bao C Le, Y.L. E, S.K. M, Liu Y, Choolani M, K.Y. J. Advances in bone tissue engineering. En: *Regenerative Medicine and Tissue Engineering*. InTech; 2013. p. 599-614.
17. Velasco MA, Narváez-Tovar CA, Garzón-Alvarado DA. Design, materials, and mechanobiology of biodegradable scaffolds for bone tissue engineering. *Biomed Res Int*. 2015;2015:729076.
18. Dorozhkin S V. Calcium orthophosphates: occurrence, properties, biomineralization, pathological calcification and biomimetic applications. *Biomater*. 2011;1(2):121-64.
19. Cun X, Hosta-Rigau L. Topography: A biophysical approach to direct the fate of mesenchymal stem cells in tissue engineering applications. *Nanomaterials*. 2020;10(10):2070.
20. Abbasi N, Hamlet S, Love RM, Nguyen NT. Porous scaffolds for bone regeneration. *Journal of Science: Advanced Materials and Devices*. 2020;5(1):1-9.
21. Hadjidakis DJ, Androulakis II. Bone remodeling. *Ann N Y Acad Sci*. 2006;1092:385-96.

22. Lichte P, Pape HC, Pufe T, Kobbe P, Fischer H. Scaffolds for bone healing: Concepts, materials and evidence. *Injury*. 2011;42(6):569-73.
23. Haugen HJ, Lyngstadaas SP, Rossi F, Perale G. Bone grafts: which is the ideal biomaterial? *J Clin Periodontol*. 2019;46(21):92-102.
24. Bose S, Roy M, Bandyopadhyay A. Recent advances in bone tissue engineering scaffolds. *Trends Biotechnol*. 2012;30(10):546-54.
25. Sadat-Shojai M, Khorasani MT, Dinpanah-Khoshdargi E, Jamshidi A. Synthesis methods for nanosized hydroxyapatite with diverse structures. *Acta Biomater*. 2013;9(8):7591-621.
26. Bouler JM, Pilet P, Gauthier O, Verron E. Biphasic calcium phosphate ceramics for bone reconstruction: A review of biological response. *Acta Biomater*. 2017;53:1-12.
27. Ivanova EP, Bazaka K, Crawford RJ. Advanced bioactive and biodegradable ceramic biomaterials. En: *New Functional Biomaterials for Medicine and Healthcare*. Woodhead Publishing; 2014. p. 187-219.
28. Bohner M. Calcium orthophosphates in medicine: from ceramics to calcium phosphate cements. *Injury*. 2000;4:37-47.
29. Champion E. Sintering of calcium phosphate bioceramics. *Acta Biomater*. 2013;9(4):5855-75.
30. Goudouri OM, Balasubramanian P, Boccaccini AR. Characterizing the degradation behavior of bioceramic scaffolds. En: *Characterisation and Design of Tissue Scaffolds*. Woodhead Publishing; 2016. p. 127-47.
31. El-Rashidy AA, Roether JA, Harhaus L, Kneser U, Boccaccini AR. Regenerating bone with bioactive glass scaffolds: A review of in vivo studies in bone defect models. *Acta Biomater*. 2017;62:1-28.
32. Deisinger U. Generating porous ceramic scaffolds: Processing and properties. *Key Eng Mater*. 2010;441:155-79.
33. Chai YC, Carlier A, Bolander J, Roberts SJ, Geris L, Schrooten J, et al. Current views on calcium phosphate osteogenicity and the translation into effective bone regeneration strategies. *Acta Biomater*. 2012;8(11):3876-87.

34. Jones JR. New trends in bioactive scaffolds: The importance of nanostructure. *J Eur Ceram Soc.* 2009;29(7):1275-81.
35. Hench LL, Splinter RJ, Allen WC, Greenlee TK. Bonding mechanisms at the interface of ceramic prosthetic material. *J Biomed Mater Res.* 1971;2:117-41.
36. Kokubo T, Takadama H. Simulated Body Fluid (SBF) as a Standard Tool to Test the Bioactivity of Implants. En: *Handbook of Biomineralization.* 2007. p. 97-108.
37. Chen W, Tian B, Lei Y, Ke QF, Zhu ZA, Guo YP. Hydroxyapatite coatings with oriented nanoplate and nanorod arrays: Fabrication, morphology, cytocompatibility and osteogenic differentiation. *Mater Sci Eng C.* 2016;67:395-408.
38. Fu Q. Bioactive glass scaffolds for bone tissue engineering. En: *Biomedical, Therapeutic and Clinical Applications of Bioactive Glasses.* Woodhead Publishing; 2019. p. 417-42.
39. Chatzistavrou X, Newby P, Boccaccini AR. Bioactive glass and glass-ceramic scaffolds for bone tissue engineering. En: *Bioactive Glasses: Materials, Properties and Applications.* Woodhead Publishing; 2011. p. 107-28.
40. Collins MN, Ren G, Young K, Pina S, Reis RL, Oliveira JM. Scaffold fabrication technologies and structure/function properties in bone tissue engineering. *Adv Funct Mater.* 2021;31:2010609.
41. Chen J, Wang Y, Chen X, Ren L, Lai C, He W, et al. A simple sol-gel technique for synthesis of nanostructured hydroxyapatite, tricalcium phosphate and biphasic powders. *Mater Lett.* 2011;65(12):1923-6.
42. Garg T, Singh O, Arora S, Murthy R. Scaffold: A novel carrier for cell and drug delivery. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst.* 2012;29(1):1-63.
43. Martin RA, Yue S, Hanna J V, Lee PD, Newport RJ, Smith ME, et al. Characterizing the hierarchical structures of bioactive sol-gel silicate glass and hybrid scaffolds for bone regeneration. *Phil Trans R Soc A.* 2012;370:1422-43.
44. Chen QZ, Thompson ID, Boccaccini AR. 45S5 Bioglass®-derived glass-ceramic scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials.* 2006;27(11):2414-25.
45. Harrison RG. On the stereotropism of embryonic cells. *Science.* 1911;34:279-81.

46. Weiss P. In vitro experiments on the factors determining the course of the outgrowing nerve fibre. *J Exp Zool.* 1934;68:393-448.
47. Ermis M, Antmen E, Hasirci V. Micro and Nanofabrication methods to control cell-substrate interactions and cell behavior: A review from the tissue engineering perspective. *Bioact Mater.* 2018;3(3):355-69.
48. Lamers E, Walboomers X, Domanski M, te Riet J, van Delft FC, Luttge R, et al. The influence of nanoscale grooved substrates on osteoblast behavior and extracellular matrix deposition. *Biomaterials.* 2010;31(12):3307-16.
49. Abagnale G, Steger M, Nguyen VH, Hersch N, Sechi A, Jousen S, et al. Surface topography enhances differentiation of mesenchymal stem cells towards osteogenic and adipogenic lineages. *Biomaterials.* 2015;61:316-26.
50. Huang J, Chen Y, Tang C, Fei Y, Wu H, Ruan D, et al. The relationship between substrate topography and stem cell differentiation in the musculoskeletal system. *Cell Mol Life Sci.* 2019;76(3):505-21.
51. Mondal S, Dorozhkin S V, Pal U. Recent progress on fabrication and drug delivery applications of nanostructured hydroxyapatite. *WIREs Nanomed Nanobiotechnol.* 2018;10(4):1504.
52. Hu J, Chen M, Fang X, Wu L. Fabrication and application of inorganic hollow spheres. *Chem Soc Rev.* 2011;40(11):5472-91.
53. Jun Y, Oh H, Karpoomath R, Jha A, Patel R. Role of microsphere as drug carrier for osteogenic differentiation. *Int J Polym Mater Polym Biomater.* 2020;70(5):318-27.
54. Lai W, Chen C, Ren X, Lee IS, Jiang G, Kong X. Hydrothermal fabrication of porous hollow hydroxyapatite microspheres for a drug delivery system. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl.* 2016;62:166-72.
55. Guo YJ, Wang YY, Chen T, Wei YT, Chu LF, Guo YP. Hollow carbonated hydroxyapatite microspheres with mesoporous structure: Hydrothermal fabrication and drug delivery property. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl.* 2013;33(6):3166-72.
56. Soares SF, Fernandes T, Daniel-da-Silva AL, Trindade T. The controlled synthesis of complex hollow nanostructures and prospective applications. *Proc R Soc A.* 2019;475:20180677.

57. Liu B, Hu X. Hollow micro- and nanomaterials: Synthesis and applications. En: *Advanced Nanomaterials for Pollutant Sensing and Environmental Catalysis*. Elsevier; 2020. p. 1-38.
58. Wang WS, Zhen L, Xu CY, Yang L, Shao WZ. Controlled synthesis of calcium tungstate hollow microspheres via ostwald ripening and their photoluminescence property. *J Phys Chem C*. 2008;112(49):19390-8.
59. Ros-Tárraga P, Mata NA, Murciano Á, Velasquez P, De Aza PN. Multilayer ceramic materials: A method to link bioactivity and durability. *Ceram Int*. 2019;45(17):23611-8.
60. Mata NA, Ros-Tárraga P, Velasquez P, Murciano A, De Aza PN. New iron-doped multilayer ceramic scaffold with noncontinuous bioactive behavior. *Ceram Int*. 2020;46(10):16388-96.
61. Ros-Tárraga P, Murciano A, Mazón P, Gehrke SA, De Aza PN. New 3D stratified Si-Ca-P porous scaffolds obtained by sol-gel and polymer replica method: Microstructural, mineralogical and chemical characterization. *Ceram Int*. 2017;43(8):6548-53.
62. Ramlee SNL, Sharifulden NSAN, Mohamad H, Noor SNFM. Sol-gel derived bioactive glass scaffolds incorporated with polyvinyl-alcohol and pluronic P123 polymers using sponge replication technique. *Mater Today Proc*. 2019;17:966-75.
63. Tarafder S, Davies NM, Bandyopadhyay A, Bose S. 3D printed tricalcium phosphate bone tissue engineering scaffolds: Effect of SrO and MgO doping on in vivo osteogenesis in a rat distal femoral defect model. *Biomater Sci*. 2013;1(12):1250-9.
64. Bose S, Tarafder S, Bandyopadhyay A. Effect of chemistry on osteogenesis and angiogenesis towards bone tissue engineering using 3D printed scaffolds. *Ann Biomed Eng*. 2017;45(1):261-72.
65. Fleisch H, Bisaz S. Mechanism of calcification : Inhibitory role of pyrophosphate. *Nature*. 1962;195:911.
66. Kucharska M, Walenko K, Lewandowska-Szumiel M, Brynk T, Jaroszewicz J, Ciach T. Chitosan and composite microsphere-based scaffold for bone tissue engineering: evaluation of tricalcium phosphate content influence on physical and biological properties. *J Mater Sci Mater Med*. 2015;26(3):143.

67. Zhu L, Luo D, Liu Y. Effect of the nano/microscale structure of biomaterial scaffolds on bone regeneration. *Int J Oral Sci.* 2020;12(1):6.
68. Mata NA, Ros-Tárraga P, Velasquez P, Murciano A, De Aza PN. 3D multiphase porous scaffolds of calcium phosphates doping with silicon and magnesium. *Bol Soc Esp Cerám Vidr.* 2022;61(5):384-96.
69. Wu SC, Hsu HC, Hsu SK, Lin FW, Ho WF. Preparation and characterization of porous calcium-phosphate microspheres. *Ceram Int.* 2015;41(6):7596-604.
70. Azeem A, English A, Kumar P, Satyam A, Biggs M, Jones E, et al. The influence of anisotropic nano- to micro-topography on in vitro and in vivo osteogenesis. *Nanomedicine.* 2015;10(5):693-711.
71. Du X, Fu S, Zhu Y. 3D printing of ceramic-based scaffolds for bone tissue engineering: An overview. *J Mater Chem B.* 2018;6(27):4397-412.
72. Singh G, Singh RP, Jolly SS. Customized hydroxyapatites for bone-tissue engineering and drug delivery applications: A review. *J Sol-Gel Sci Technol.* 2020;94(3):505-30.
73. Hong MH, Kim KM, Choi SH, Oh DS, Lee YK. Fabrication of hollow hydroxyapatite spherical granules for hard tissue regeneration and alternative method for drug release test. *Micro Nano Lett.* 2012;7(7):634-6.
74. Rubio V, Mazón P, de la Casa-Lillo MA, De Aza PN. Preparation, characterization and in vitro behavior of a new eutectoid bioceramic. *J Eur Ceram Soc.* 2015;35(1):317-28.
75. Berg C, Engqvist H, Xia W. Ion substitution induced formation of spherical ceramic particles. *Ceram Int.* 2019;45(8):10385-93.
76. Duan H, Diao J, Zhao N, Ma Y. Synthesis of hollow mesoporous bioactive glass microspheres with tunable shell thickness by hydrothermal-assisted self-transformation method. *Mater Lett.* 2016;167:201-4.
77. Wang WS, Zhen L, Xu CY, Chen JZ, Shao WZ. Aqueous solution synthesis of CaF<sub>2</sub> hollow microspheres via the ostwald ripening process at room temperature. *ACS Appl Mater Interfaces.* 2009;1(4):780-8.

78. Qin T, Ma M, Qin W, Xiao X, Zhang P, Nikolajeff F, et al. Rapid precipitation of Mg-doped fluoride-based submicron spheres and evolution study. *J Solid State Chem.* 2018;260:142-6.
79. Zhang C, Cheng Z, Yang P, Xu Z, Peng C, Li G, et al. Architectures of strontium hydroxyapatite microspheres: Solvothermal synthesis and luminescence properties. *Langmuir.* 2009;25(23):13591-8.
80. Qin T, López A, Öhman C, Engqvist H, Persson C, Xia W. Enhanced drug delivery of antibiotic-loaded acrylic bone cements using calcium phosphate spheres. *J Appl Biomater Funct Mater.* 2015;13(3):241-7.
81. Huo J, Wang L, Irran E, Yu H, Gao J, Fan D, et al. Hollow ferrocenyl coordination polymer microspheres with micropores in shells prepared by ostwald ripening. *Angew Chem.* 2010;122(48):9423-7.
82. Jiang SD, Yao QZ, Zhou GT, Fu SQ. Fabrication of hydroxyapatite hierarchical hollow microspheres and potential application in water treatment. *J Phys Chem C.* 2012;116(7):4484-92.
83. Pouroutzidou GK, Liverani L, Theocharidou A, Tsamesidis I, Lazaridou M, Christodoulou E, et al. Synthesis and characterization of mesoporous Mg-and Sr-doped nanoparticles for moxifloxacin drug delivery in promising tissue engineering applications. *Int J Mol Sci.* 2021;22(2):577.
84. Fu H, Rahaman MN, Brown RF, Day DE. Evaluation of bone regeneration in implants composed of hollow HA microspheres loaded with transforming growth factor  $\beta$ 1 in a rat calvarial defect model. *Acta Biomater.* 2013;9(3):5718-27.
85. Loca D, Locs J, Dubnika A, Zalite V, Berzina-Cimdina L. Porous hydroxyapatite for drug delivery. En: *Hydroxyapatite (Hap) for Biomedical Applications.* Elsevier; 2015. p. 189-209.
86. Schumacher M, Gelinsky M. Strontium modified calcium phosphate cements - Approaches towards targeted stimulation of bone turnover. *J Mater Chem B.* 2015;3(23):4626-40.
87. Shi H, Wu T, Zhang J, Ye X, Zeng S, Liu X, et al. Biocompatible  $\beta$ -SrHPO<sub>4</sub> clusters with dandelion-like structure as an alternative drug carrier. *Mater Sci Eng C.* 2017;81:8-12.

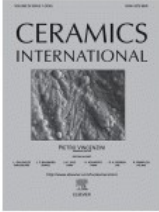
88. Feng S, He F, Fang X, Deng X, Lu T, Ye J. Enhancement of mechanical strength and osteogenesis, and inhibition of osteoclastic activity for  $\beta$ -tricalcium phosphate bioceramics by incorporating calcium silicate and magnesium-strontium phosphate. *Ceram Int.* 2021;47(17):24191-7.
89. Son JS, Appleford M, Ong JL, Wenke JC, Kim JM, Choi SH, et al. Porous hydroxyapatite scaffold with three-dimensional localized drug delivery system using biodegradable microspheres. *J Control Release.* 2011;153(2):133-40.
90. Yao AH, Li XD, Xiong L, Zeng JH, Xu J, Wang DP. Hollow hydroxyapatite microspheres/chitosan composite as a sustained delivery vehicle for rhBMP-2 in the treatment of bone defects. *J Mater Sci Mater Med.* 2015;26:25.
91. Du Z, Leng H, Guo L, Huang Y, Zheng T, Zhao Z, et al. Calcium silicate scaffolds promoting bone regeneration via the doping of  $Mg^{2+}$  or  $Mn^{2+}$  ion. *Compos B Eng.* 2020;190:107937.





## **ANEXO: COMPENDIO DE ARTÍCULOS**

---



### 3D CaP porous scaffolds with grooved surface topography obtained by the sol-gel method

**Author:** E. Sebastián,A. Murciano,R. Madrigal,P.N. De Aza,P. Velasquez

**Publication:** Ceramics International

**Publisher:** Elsevier

**Date:** 1 August 2021

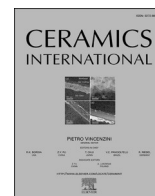
*© 2021 Elsevier Ltd and Techna Group S.r.l. All rights reserved.*

#### Journal Author Rights

Please note that, as the author of this Elsevier article, you retain the right to include it in a thesis or dissertation, provided it is not published commercially. Permission is not required, but please ensure that you reference the journal as the original source. For more information on this and on your other retained rights, please visit: <https://www.elsevier.com/about/our-business/policies/copyright#Author-rights>

BACK

CLOSE WINDOW



# 3D CaP porous scaffolds with grooved surface topography obtained by the sol-gel method

E. Sebastián<sup>a,\*</sup>, A. Murciano<sup>b</sup>, R. Madrigal<sup>b</sup>, P.N. De Aza<sup>a</sup>, P. Velasquez<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Instituto de Bioingeniería, Universidad Miguel Hernández, Avda. Universidad S/n, Elche, Alicante, 03202, Spain

<sup>b</sup> Departamento de Materiales, Óptica y Tecnología Electrónica, Universidad Miguel Hernández, Avda. Universidad S/n, Elche, Alicante, 03202, Spain

## ARTICLE INFO

### Keywords:

Sol-gel processes

Surfaces

Biomedical applications

Chemical etching

## ABSTRACT

The influence of surface topography on cellular behaviour and its importance for the development of three-dimensional scaffolds for bone tissue engineering are a topic of growing interest. To date, the introduction of topographical patterns into the surface of 3D porous ceramic scaffolds has proven difficult, due partly to the brittle nature of ceramic materials as well as the currently available fabrication technologies. In this study, a grooved pattern was introduced into the surface of 3D multilayer porous ceramic scaffolds by the chemical etching technique. The patterned scaffolds were characterised by X-Ray Diffraction (XRD), Scanning Electron Microscopy with Energy Dispersive X-Ray Spectroscopy (SEM-EDX) and Digital Holographic Microscopy (DHM). Their bioactivity was also evaluated *in vitro* by immersion in simulated body fluid (SBF) for 12 h, 1, 7, 14 and 21 days. Scaffolds were constituted mainly with a mixture of the calcium pyrophosphate ( $\text{Ca}_2\text{O}_7\text{P}_2$ ) and  $\beta$ -tricalcium phosphate ( $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ) phases. The pyrophosphate on the external layer was dissolved as a result of the etching process, leaving grooves on the surface. Ridges and grooves were nano-/micrometric, with dimensions of around 900 nm–1.5  $\mu\text{m}$  in width and 200 nm–300 nm in depth. Moreover, the mechanical properties and bioactive capacity of the patterned scaffolds were not affected by chemical etching, making them suitable to be used in bone tissue engineering.

## 1. Introduction

Tissue engineering has attracted plenty of research interest in recent years thanks to the development of more complex biomaterials. Particularly, in the bone tissue engineering field, three-dimensional (3D) calcium phosphate (CaP) porous scaffolds are a promising alternative to treating damaged bone tissue [1].

When developing these porous scaffolds, we need to consider their capacity to support new bone tissue formation in bioactivity and biocompatibility terms. This capacity is determined by the scaffolds' physicochemical parameters, including pore size and structure, chemical composition, surface topography, degradability rate and mechanical strength [2,3]. These properties determine the cell-material interaction and are, therefore, essential for the scaffolds' successful osseointegration.

Pore structure is one of the most important aspects of 3D scaffolds because it affects cell migration, attachment and spreading as well as the transport of nutrients and metabolic waste. Previous studies have revealed that having an interconnected porosity to promote cell

ingrowth and support ingrown tissue vascularisation is highly desirable [4,5]. A porosity of around 80–90% and a pore diameter of at least 100  $\mu\text{m}$  are required because they allow cell penetration and proper vascularisation of the new tissue [6]. Macropores (>100  $\mu\text{m}$ ) are required for cell migration and nutrient transport, while micropores (<10  $\mu\text{m}$ ) increase ion exchange, protein adsorption and mineralised tissue formation [3,5].

When designing bone substitute scaffolds, we need to consider not only the pore structure but also the effect of the surface characteristics on the cell behaviour. It has been well established that cellular behaviour depends on the physical and chemical characteristics of the materials surface, such as topography, particle size, crystallinity, and chemical composition [7,8].

Many works have focused on the effect of well-defined topographical patterns on the nano-/microscale with a range of cell types, including fibroblast [9], osteoblasts [10], epithelial cells [11] and endothelial cells [12].

In particular, topography effects on osteoblasts have been well documented, and include changes in adhesion [13], proliferation [8],

\* Corresponding author.

E-mail address: [eduardo.sebastian@goumh.umh.es](mailto:eduardo.sebastian@goumh.umh.es) (E. Sebastián).

<https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2021.04.158>

Received 27 January 2021; Received in revised form 30 March 2021; Accepted 16 April 2021

Available online 20 April 2021

0272-8842/© 2021 Elsevier Ltd and Techna Group S.r.l. All rights reserved.

and differentiation [14–16], which influence bone formation. Understanding the role that surface topography plays in regulating cell behaviour is essential for designing osteoinductive 3D porous scaffolds.

Different types of nano- and microscale topographical patterns like pits, wells, pillars, pores, grooves and ridges, have been studied [17,18]. Of these surface patterns, ridges and grooves are very interesting because, this type of topographical patterns can be used to mimic the biophysical cues provided by the collagen fibres that form the bone extracellular matrix (ECM). *In vivo*, cells interact with the ECM, and this interaction is essential for regulating cell behaviour, which is why is important to develop new biomaterials that better resemble natural ECM features.

Many studies have been conducted using polymeric substrates to determine the effect of groove-like topography on human mesenchymal stem cells (hMSCs) and osteoblasts. According to Kirmizidis et al. [14], when cultured on grooved surfaces, osteoblasts tend to align in the direction of grooves, adhering to and spreading across the top and along the base of the grooves. Lenhart et al. [10] also concluded that when cultured on grooved topographies, osteoblasts align, elongate, and migrate in parallel to grooves. This phenomenon is known as “contact guidance” and has long since been observed [19]. Watari et al. [20] demonstrated that anisotropically ordered ridges and grooves can promote the osteogenic differentiation of hMSCs *in vitro*, and even in the absence of osteogenic supplements in some cases [21]. It would generally appear that grooved topography provides the most effective structural cues for regulating cell alignment, orientation, adhesion, and morphology compared to those cells cultured on smooth surfaces [17, 22].

Our ability to modify the surface topography and to produce nano-/microstructures has increased over the years thanks to the development of new fabrication technologies. Several fabrication methods have been applied to produce highly controlled, reproducible, and well-defined topographical patterns. Currently used nano-/microfabrication technologies include photolithography, electron beam lithography, colloidal lithography, electrospinning, polymer demixing, among others [4]. The main downside of these techniques is that they are able to generally introduce only structured patterns into flat surfaces, they require expensive equipment, are generally time-consuming processes and are also difficult to scale up.

Both the complexity of the aforementioned fabrication techniques and the fact that ceramic materials are more fragile than polymers or metals make introducing these topographical patterns into 3D CaP scaffolds difficult [17,23]. In an effort to overcome this problem, in this study we applied the chemical etching technique to introduce uniformly distributed ridges and grooves on the surface of 3D CaP porous scaffolds to be used in bone tissue engineering.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Materials preparation

The calcium phosphate ceramics herein used were prepared by the sol-gel method in combination with the polymeric sponge replication method [24]. The core of the scaffolds, whose composition was  $2\text{SiO}_2\text{-}50\text{CaO-}48\text{P}_2\text{O}_5$  (mol%), was prepared with 10.5 mL of  $(\text{C}_2\text{H}_5)_3\text{PO}_4$  (TEP, Aldrich-Triethyl Phosphate), 0.2 mL of  $\text{Si}(\text{OC}_2\text{H}_5)_4$  (TEOS, Aldrich-Tetraethyl Orthosilicate), 9.5 g of calcium carbonate ( $\text{CaCO}_3$ , Sigma), 5 mL of ethanol 97°, 20 mL of distilled water and 10 mL of hydrochloric acid (HCl 37%, Ensure), employed as reactants of the initial sol-gel solution.

In the initial step, all the reactants except calcium carbonate were mixed together and the solution was stirred for 30 min to allow the hydrolysis of precursors. Afterwards, calcium carbonate was added to the solution and pH was adjusted between 2 and 3 by adding HCl drop by drop. Polyurethane sponges (20 ppi, 12.7 mm diameter, 10 mm high) were submerged in the solution and dried in a furnace for 10 min at

180 °C. Several immersions were performed, adding new layers after each immersion, and removing any excess by centrifugation to avoid blocking the porous structure. Next, the sponges were sintered in a furnace (Naberthen, Lilienthal/Bremen, Germany) at 950 °C at heating rate of 19 °C/h for 50 h. This temperature was maintained for 8 h.

Finally, the core was coated with the external layers, whose composition was  $50\text{CaO-}50\text{P}_2\text{O}_5$  (mol%), to obtain the multilayer scaffolds. A new sol-gel solution was prepared by mixing 10.8 mL of  $(\text{C}_2\text{H}_5)_3\text{PO}_4$  (TEP, Aldrich-Triethyl Phosphate), 5 mL of ethanol 97°, 20 mL of distilled water, 10 mL of hydrochloric acid (HCl 37%, Ensure) and 8.32 g of calcium carbonate ( $\text{CaCO}_3$ , Sigma). The core was coated with the new solution for the appropriate number of times following the procedure described above. Scaffolds were sintered again at 950 °C at a heating rate of 119 °C/h for 8 h. This temperature was maintained for 3 h.

### 2.2. Scaffolds characterisation

The multilayer ceramic scaffolds were characterised by Scanning Electron Microscopy with Energy Dispersive X-Ray Spectroscopy (SEM-EDX) using a Hitachi S – 3500 N with INCA system by Oxford Instruments Analytical. All the samples were palladium-coated before being analysed.

The mineralogical composition of the material was determined by X-Ray Diffraction (XRD) in a Bruker- AXR D8 Advance automated diffractometer using  $\text{Cu-K}\alpha$  radiation (1.54056 Å). Data was collected in the Bragg-Brentano theta-2theta ( $\theta/2\theta$ ) geometry between 20° and 46° ( $2\theta$ ) at 0.02 steps, counting 8 s per step. The X-ray tube was operated at 40 kV and 30 mA. The obtained diffractograms were analysed with the Match! 3 software (v. 3.10.2.173) by the Rietveld method and were compared with the Crystallography Open Database (COD).

Scaffolds' mechanical strength was determined by a compression test using a Simple Manual Test Stand (SVL-1000 N, IMADA). Load was manually applied to scaffolds (8.5 mm diameter, 10.0 mm high) until their structure collapsed. The results of 10 valid tests were used to calculate the ceramic scaffolds' compressive strength.

The porosity and pore size distribution of scaffolds was determined by the Mercury Porosimetry Technique (Poremaster 60 GT, Quantachrome instruments) at a pressure range between 72.9 bar and 4063.71 bar.

### 2.3. Surface topography patterning and characterisation

Ceramic scaffolds' surface was modified to introduce a topographic pattern in the form of ridges and grooves by a chemical etching process. An etching solution was prepared by dissolving acetic acid glacial ( $\text{CH}_3\text{COOH}$ , PanReac) in distilled water under stirring conditions to ensure complete chemical dissolution. Scaffolds were submerged in the etching solution under stirring to ensure that the whole surface was etched. Finally, scaffolds were rinsed with distilled water to remove any residual etching solution and dried at 75 °C for 1 h. Different concentrations (3%, 5%, 10%) and etching times (30 s, 60 s, 90 s, 120 s) were tested following the same described procedure. The whole process was conducted at room temperature.

The modified scaffolds were characterised by SEM-EDX and XRD. The dimensions, width and depth, of the ridges and grooves produced by the etching process were determined using a Digital Holographic Microscope (DHM-R2100, Lyncée Tec, Lausanne, Switzerland) with the Koala software. Measurements were taken with a 20× lens at wavelength of  $\lambda = 684.9$  nm. This setup provided a horizontal resolution of 0.45  $\mu\text{m}$  and a field area of  $51.3 \times 51.3 \mu\text{m}^2$  with a height precision of 5 nm in the centre of the image and one of 20 nm on the edges. Holograms were analysed with the ParaView (ver. 5.8.0) and ImageJ (ver. 1.53) programmes.

## 2.4. Scaffolds' *in vitro* bioactivity

In order to evaluate the effect of chemical etching on the patterned scaffolds' *in vitro* bioactive capacity, bioactivity tests were conducted by immersion in simulated body fluid (SBF) following the procedure established by Kokubo et al. [25]. The samples in SBF were incubated at 37 °C in a water bath for 12 h, 1, 7, 14 and 21 days. After each time period, scaffolds were dried at 75 °C for 24 h and analysed by SEM-EDX. Changes in the calcium (Ca), silicon (Si) and phosphorus (P) ion concentrations were determined by Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry (ICP-OES PerkinElmer Optima 2000™).

## 3. Results

### 3.1. Scaffolds characterisation

Fig. 1A shows the microstructure of the multilayer scaffolds' core analysed by SEM-EDX. The core presented an interconnected porosity, it was composed of hexagonal and triangular grains of Ca and P and had a Ca/P ratio of about 1.0, which is the stoichiometric value of calcium pyrophosphate ( $\text{Ca}_2\text{O}_7\text{P}_2$ ). This type of microstructure is characteristic of materials with a high pyrophosphate content. Furthermore, the XRD analysis of the core confirmed that it was composed mainly of a calcium pyrophosphate phase (COD-96-151-7239).

Once the core was characterised, it was coated with a more bioactive composition to obtain the external layers of the multilayer ceramic scaffold. The multilayer scaffolds' surface was smooth with some hexagonal grains of calcium pyrophosphate and  $\beta$ -tricalcium phosphate ( $\beta$ -TCP) ( $\beta\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ) (Fig. 1B). The EDX results showed that scaffolds were composed of Ca, P, and a small amount of Si. Their Ca/P ratio was 1.24. Fig. 2A shows the mineralogical composition of the multilayer scaffolds determined by XRD. According to the XRD patterns, the main constituent phases were calcium pyrophosphate (COD-96-151-7239) and  $\beta$ -tricalcium phosphate (COD-96-151-7239), although other minor silica phases like  $\text{CaO}_5\text{Si}_2$  (COD-96-900-6569) were observed.

Fig. 3 depicts the scaffolds' pore size distribution measured by the Mercury Porosimetry Technique. The multilayer scaffolds had a total porosity of 36.95%, 32.34% of which corresponded to interparticle spaces ( $<300\ \mu\text{m}$ ) with a pore size between 173.6  $\mu\text{m}$  and 7.01  $\mu\text{m}$ . The remaining 4.60% corresponded to intraparticle spaces ( $<1\ \mu\text{m}$ ), with a pore size between 0.07  $\mu\text{m}$  and 0.05  $\mu\text{m}$ .

### 3.2. Scaffolds surface topography characterisation

The multilayer ceramic scaffolds were chemically etched to introduce a topographical pattern in the form of ridges and grooves into the scaffolds' surface. Fig. 4 shows the scaffolds' surface structure at several concentrations (3%, 5%, 10%) and etching times (30 s, 60 s, 90 s, 120 s). A 3% acetic acid concentration and a 120 s etching time gave the best results to consistently obtain a large amount of well-defined nano-/

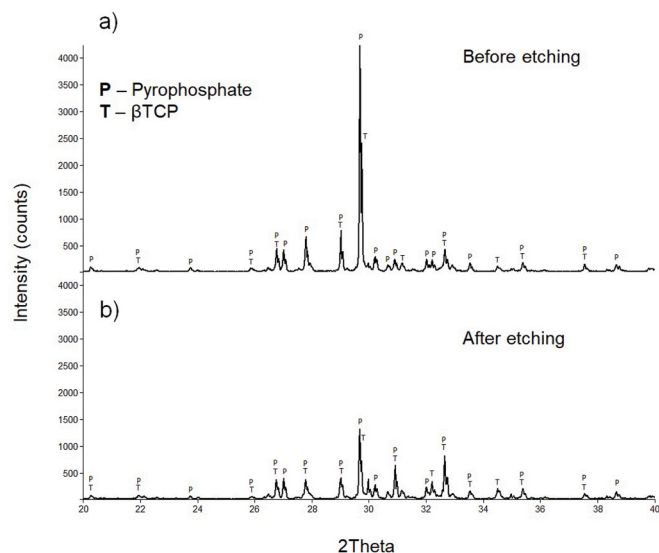


Fig. 2. XRD patterns of the multilayer scaffolds (a) before and (b) after chemical etching.

micrometric ridges and grooves that were uniformly distributed along the scaffolds' surface.

The mineralogical composition determined by XRD after etching is shown in Fig. 2B. The peaks corresponding to calcium pyrophosphate (COD-96-151-7239) and  $\beta$ -tricalcium phosphate (COD-96-151-7239) were slightly different compared to the diffractogram of the untreated scaffolds. The peaks corresponding to pyrophosphate were diminished, while the peaks for  $\beta$ -TCP were more prominent after etching. According to the EDX results, the Ca/P ratio on the surface after etching was about 1.3, with a Ca/P ratio close to 1.5 on the grooved areas.

Fig. 5 shows the three-dimensional surface profiles of the etched scaffolds analysed by Digital Holographic Microscopy (DHM) with their corresponding height profiles. High magnification SEM images were also used to determine the width of ridges (Fig. 6). The 3D surface profiles, together with the SEM images, further confirmed that ridges and grooves were uniformly distributed on scaffolds' surface. Their dimensions (width and depth) were nano-/micrometric and varied with etching time. After 60s (Fig. 5A), the ridges had a width of  $\sim 1\ \mu\text{m}$  and the grooves had a depth of about 250 nm. Both ridges and grooves had similar widths. In the scaffolds etched for 120s (Fig. 5B), the width of ridges and grooves was around 850–950  $\mu\text{m}$  in both cases, and the depth of grooves was of 277 nm, as seen in detail in the height profiles. Overall, their width decreased with etching time and was around 900 nm–1.5  $\mu\text{m}$ , while their depth was 200–300 nm and increased with etching time.

Scaffolds' compressive strength was measured with a Manual Test Stand before and after chemical etching treatment. The untreated scaffolds' mechanical strength was 0.46–0.67 MPa, while their resistance

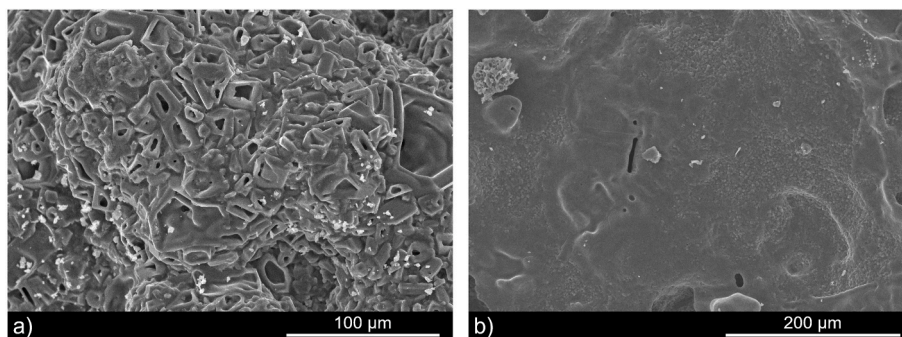


Fig. 1. SEM micrographs of the initial multilayer scaffolds microstructure: (a) core and (b) core coated with the external layers.

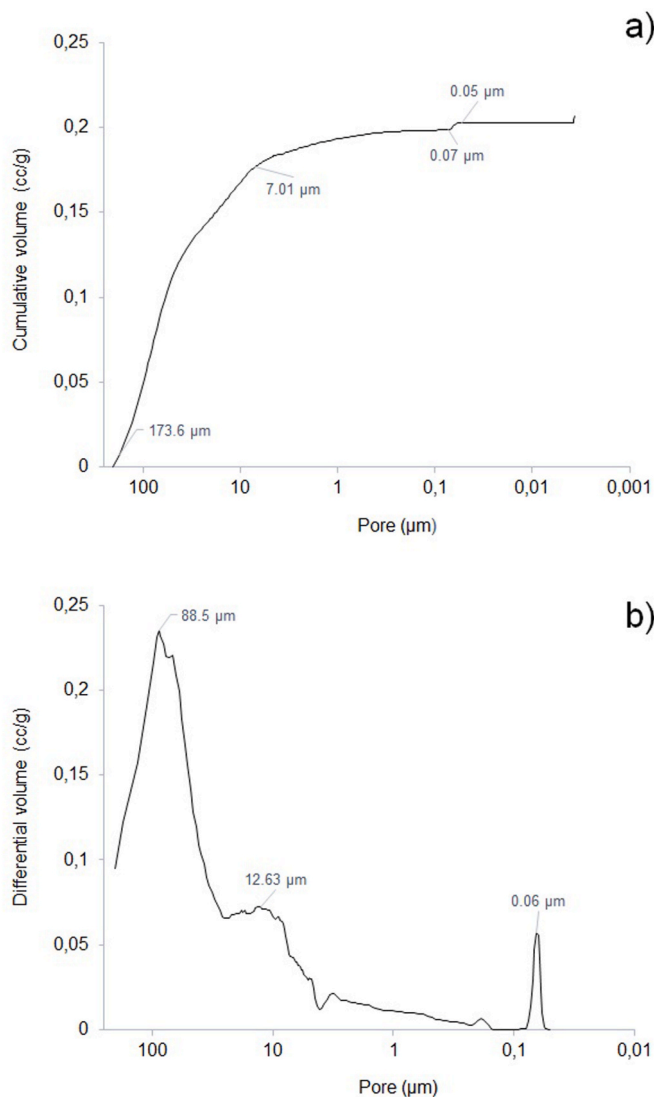


Fig. 3. Mercury porosimetry curves: (a) cumulative and (b) differential intruded volume vs. pore diameter.

was around 0.56–0.67 MPa after treatment. The etching process did not alter the scaffolds' mechanical properties.

### 3.3. Scaffolds' *in vitro* bioactivity

The acid-etched scaffolds' *in vitro* bioactivity was tested by soaking them in SBF solution for 12 h, and 1, 7 and 14 days. After 12 h (Fig. 7A), many precipitates were distributed on scaffolds' surface, especially in the grooved areas. The EDX analysis of precipitates revealed that they were composed of Ca, P, and chlorine (Cl), and their Ca/P ratio was of about 1.5, which indicates the presence of chlorapatite precipitates. After 1 day (Fig. 7B), apatite precipitates started to form a layer on top of the grooved areas, with a Ca/P ratio of 1.5–1.6 depending on the area. After 7 days (Fig. 7C) and 14 days (Fig. 7D), no bioactivity was observed on scaffolds, probably due to the dissolution of the external layer along with the newly formed apatite precipitates and, consequently, hexagonal grains of pyrophosphate from the core, with a Ca/P ratio of 1.0, were then visible.

To enhance the bioactivity of the etched scaffolds, they were coated again with a new composition doped with strontium ( $\text{Sr}^{2+}$ ) ions to improve their bioactive capacity. Fig. 8 (A–C) shows the SEM images of the scaffolds obtained after immersion in SBF for 7, 14 and 21 days. After

7 days, no bioactivity was observed on scaffolds, but after 14, and especially after 21 days (Fig. 8C), spherical precipitates were deposited on the scaffolds' surface. The EDX analysis revealed that precipitates were composed of Ca and P and their Ca/P ratio was of 1.69, which corresponds to the stoichiometric value of hydroxyapatite (HA) ( $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ ), modified by the presence of Sr, confirming that the scaffolds' bioactive capacity was enhanced after 7 days thanks to the incorporation of strontium.

The changes in the Ca, Si and P ion concentrations in SBF after the different immersion times were measured by ICP-OES (Fig. 9). In scaffolds doped with Sr, for the first 7 days, the calcium concentration in SBF slightly lowered. After this time, however, its concentration in the medium started increasing because Ca ions were released from the scaffolds and went from a concentration of 45.08 mg/L on day 7, to a maximum concentration of 87.13 mg/L on the last assay day. The Si and P ions displayed the exact opposite behaviour, while the silicon concentration in SBF continuously rose throughout the experiment and went from an initial concentration of only 0.09 mg/L to one of 36.31 mg/L as Si ions were released to the medium, the phosphorus concentration went from 22.89 mg/L to 1.02 mg/L as it was adsorbed in the scaffolds. These changes are related to the formation of apatite precipitates on scaffolds' surface, especially after 14 and 21 days.

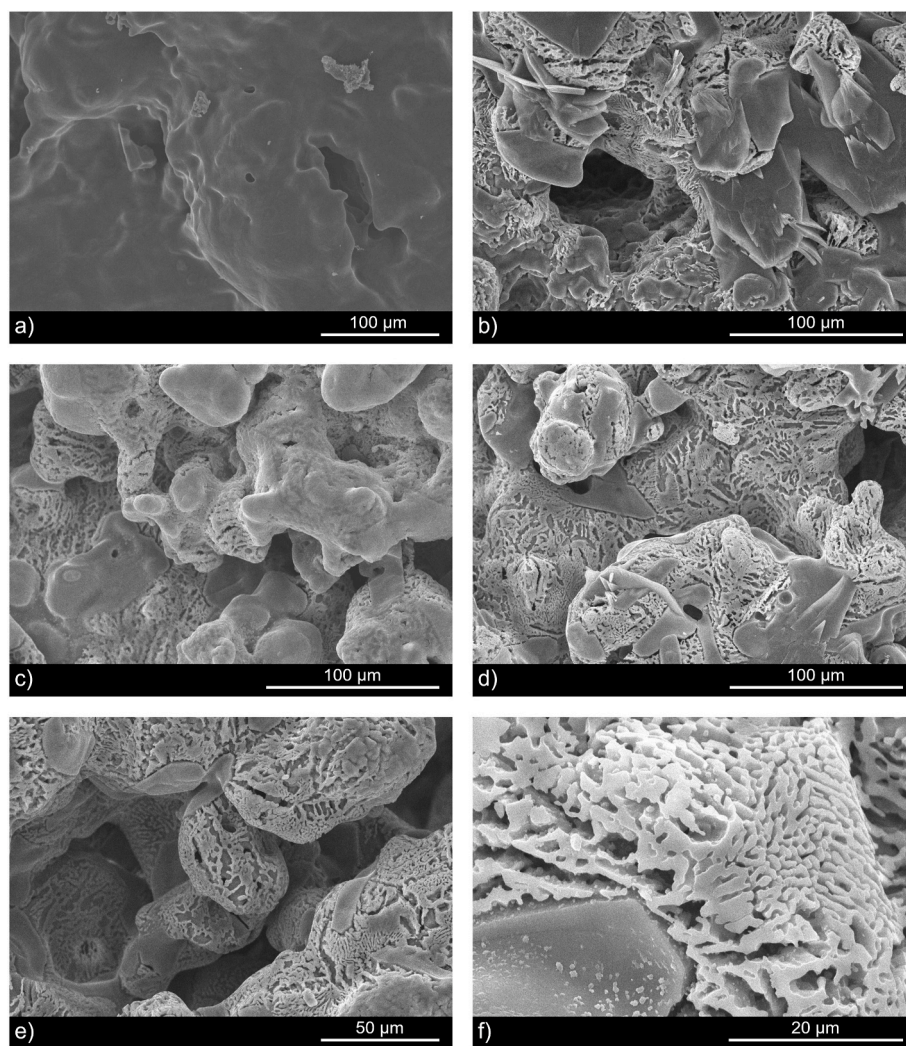
## 4. Discussion

In the present study, 3D porous ceramic scaffolds were fabricated by the sol-gel method in combination with the polymeric sponge replication method following the procedure previously described in the literature [24]. This methodology allows us to obtain ceramic scaffolds with interconnected porosity by a simple low-cost fabrication process. Striking a balance between the material's mechanical resistance and its bioactive capacity is very important, which is why we developed multilayer scaffolds, as it is well-known that CaP materials with high mechanical properties like calcium pyrophosphate are barely bioactive, whereas bioactive materials like tricalcium phosphate (TCP) are very soluble and offer poor mechanical resistance [26,27].

Firstly, the inner layers of the scaffolds, known as "core", were fabricated and characterised. The multilayer scaffolds' core had interconnected porosity and, according to the XRD pattern, it was mainly composed of calcium pyrophosphate. Having obtained the core, it was coated with a new composition in which sol-gel reactants were mixed at a Ca/P atomic ratio of 1.3 to obtain a mixture of the calcium pyrophosphate and TCP phases and, therefore, greater bioactive capacity. Fig. 1B shows the final multilayer scaffolds' microstructure. Compared to the core alone, the final multilayer scaffolds had a smoother surface with some hexagonal pyrophosphate grains, probably due to a higher presence of TCP on the external layers.

The scaffolds' chemical and mineralogical composition analysed by SEM-EDX and XRD showed that, as expected, scaffolds were composed mainly of two phases: a larger calcium pyrophosphate ( $\text{Ca}_2\text{O}_7\text{P}_2$ ) phase and a smaller  $\beta$ -tricalcium phosphate ( $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ) one (Fig. 2A). The EDX results revealed a Ca/P ratio of about 1.24, which comes close to 1.3, the intermediate Ca/P ratio between TCP and pyrophosphate, further confirming that the scaffolds' surface presented a mixture of both phases.

The final multilayer scaffolds presented interconnected porosity with a total porosity value of 36.95% as determined by the Mercury Porosimetry Technique (Fig. 3). A high volume of mercury intrusion was observed in pores whose size was between 173.6  $\mu\text{m}$  and 7.01  $\mu\text{m}$ , followed by minor mercury intrusion, which corresponded to a pore size between 0.07  $\mu\text{m}$  and 0.05  $\mu\text{m}$  (Fig. 3A). More specifically, the largest intrusion volume corresponded to interparticle spaces (32.34%), with a pore size of about 88.5  $\mu\text{m}$  and a few pores of around 12.63  $\mu\text{m}$ . The small mercury intrusion volume corresponded to intraparticle spaces (4.60%), with a pore size of 0.06  $\mu\text{m}$  (Fig. 3B). The importance of porosity in bone scaffolds has been widely studied, with authors reporting that 90% porosity and a pore size from 50 to 100  $\mu\text{m}$  are



**Fig. 4.** SEM micrographs of the scaffolds' surface after different etching times and concentrations: (a) Control; (b) 10% for 90 s; (c) 5% for 90 s; (d, e) 3% for 90 s and 120 s respectively and (f) detail of the ridges and grooves at high magnification.

necessary to ensure a proper bone tissue ingrowth in porous scaffolds [5, 6]. Microporosity ( $<10\ \mu\text{m}$ ) is also essential to ensure a good ionic exchange and protein adsorption [3]. Our scaffolds presented an adequate pore size between  $88.5\ \mu\text{m}$  and  $0.06\ \mu\text{m}$ , although their total porosity of 36.95% was lower than the optimal value of 80–90% stated in the literature.

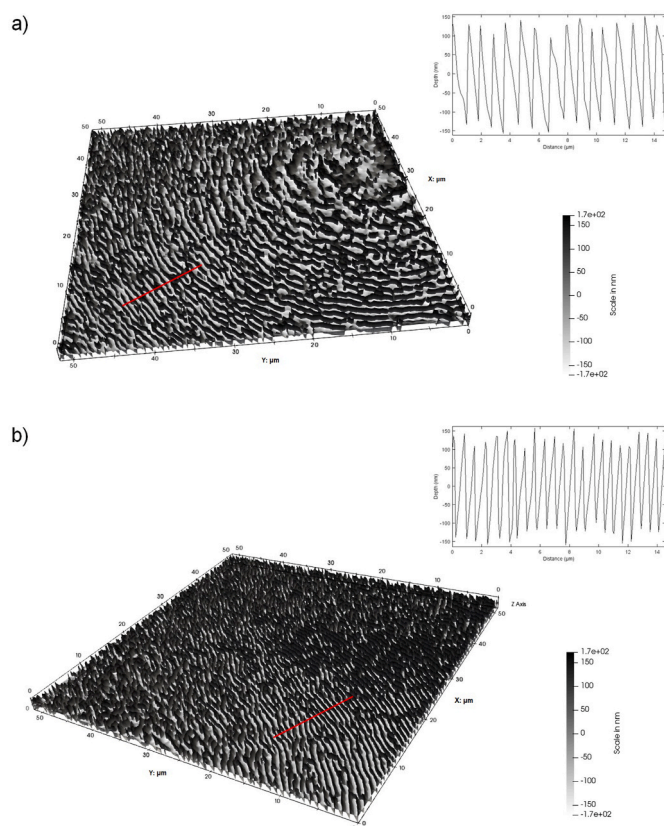
The multilayer CaP scaffolds were chemically etched to modify their surface topography in order to introduce a topographical pattern in the form of ridges and grooves. Traditionally, ceramic materials like, HA and TCP, have been used as coatings on materials with greater mechanical strength, such as titanium and its alloys, or synthetic polymers like poly lactic-co-glycolic acid (PLGA), on which the modification of their surface morphology has been previously exerted to increase their bioactivity, while maintaining these material's desired mechanical properties. For instance, Akasaka et al. [28] produced grooves on a polydimethylsiloxane (PDMS) mold and coated them with  $\alpha$ -TCP to study the effect of different patterns on the adhesion of SaOS-2 cells. Similarly, Lu et al. [29] fabricated microgrooved surfaces by photolithography and coated them with HA to study their effect on osteoblast behaviour. There have been a few studies reporting the modification of the surface topography of ceramic materials [7,8], but in general, currently available nano-/microfabrication techniques can only introduce topographic patterns into planar surfaces, which makes it extremely difficult to modify the surface of three-dimensional porous

materials, and especially, to create well-defined topographic patterns directly on the surface of ceramics.

Chemical etching has already been used to increase ceramic scaffolds' surface roughness, porosity, and interconnectivity [27,30,31]. However, as ceramic materials are more fragile than polymers or metals given their brittleness, it is more challenging to produce patterned surfaces on CaP scaffolds. Doi et al. [27] employed chemical etching to increase the surface roughness of porous HA, observing higher bone formation after *in vivo* implantation in a rabbit femur. The topographical modification is made as a result of the difference in susceptibility of the crystallographic phases composing the scaffolds and is directly related to the etchant concentration and etching time. The advantage of chemical etching over other nano-/microfabrication techniques is that it can be used in ceramic materials and is a simple cost-effective method with good scalability. To the best of our knowledge, chemical etching has not been previously used to introduce a grooved pattern into 3D porous CaP scaffolds.

This technique needs to be carefully standardised to etch multiphase ceramic materials as their individual phases have different chemical susceptibilities, which is why different acetic acid ( $\text{CH}_3\text{COOH}$ ) concentrations were tested before finding the optimal conditions to introduce ridges and grooves that were uniformly distributed on scaffolds' surface, avoiding the over-etching of the material at the same time. Initially a 10% acetic acid concentration was used for 90 s (Fig. 4B), but only a





**Fig. 5.** Three-dimensional surface profiles and height profiles of the chemically etched scaffolds by DHM at different times: (a) 60s and (b) 120s.

small amount of not very well-defined ridges and grooves was observed on the surface. A concentration of 5% acetic acid was also tested, but after 90 s (Fig. 4C) only a few ridges and grooves were visible on the scaffolds' surface. We prolonged the etching time to 120 s at the same concentration, but no ridges and grooves were observed. Finally, when scaffolds were etched with 3% acetic acid for 90 s (Fig. 4D), and especially 120 s (Fig. 4E), a large number of well-defined ridges and grooves were uniformly distributed along scaffolds' surface. Other etching times, 30 and 60 s, were also tested for the 3% acetic acid concentration, but the ridges and grooves obtained were not distributed as uniformly as those obtained after 90 and 120 s.

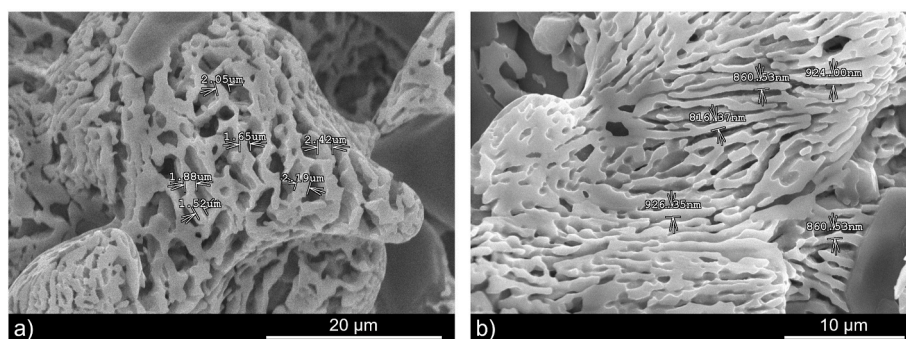
When comparing the scaffolds' mineralogical composition before and after chemical etching (Fig. 2), the diffractograms slightly differed. The peaks corresponding to the calcium pyrophosphate phase were smaller after etching, especially the main peak at 30 2theta, while the peaks for the  $\beta$ -TCP phase were more prominent. The Ca/P ratio was altered as well and went from 1.24 on the untreated scaffolds to a

slightly higher value of 1.31 on the etched scaffolds. The Ca/P ratio in the grooved areas came close to 1.5; that is, the stoichiometric value for  $\beta$ -tricalcium phosphate. Taking this together, we hypothesised that the calcium pyrophosphate phase (Ca/P ratio of 1.0) located on the external layer was selectively etched off the scaffolds' surface by the etching process, which resulted in grooves forming on the surface where it was originally present. We believe that both calcium pyrophosphate and  $\beta$ -tricalcium phosphate are distributed on the surface as alternating lamellae, forming a lamellar structure which, together with their different susceptibility to chemical etching, are responsible for the formation of ridges and grooves on the scaffolds' surface.

The ridges and grooves produced by the chemical etching treatment were characterised by Digital Holographic Microscopy (Fig. 5) and SEM (Fig. 6) to determine their main dimensions, width and depth. Fig. 5 depicts the 3D surface profiles of the etched scaffolds after 60 s (Fig. 5A) and 120 s (Fig. 5B). The produced ridges and grooves were on the nano-/micrometric scale and had slightly different dimensions between etching times. When comparing the height profiles for each time, we found how ridges and grooves became narrower and deeper with longer etching times. Altogether, the width of ridges and grooves was between 900 nm–1.5  $\mu$ m, and the depth of grooves was around 200 nm–300 nm. The width of our ridges and grooves was very similar to those obtained by Akasaka et al. [28], who reported that more human osteoblast-like cells SaOS-2 were attached to 2  $\mu$ m wide ridges and grooves compared to planar surfaces. Moreover, SaOS-2 cells exhibited an elongated morphology on the grooved surfaces. The depth of our grooves was also similar to that reported by Azeem et al. [32]. In their work, a groove depth of 306 nm was shown to influence the morphology and alignment of osteoblasts better than the 35 nm deep grooves, and also on the planar surfaces. These studies support the notion that the dimensions of the ridges and grooves herein obtained could positively promote osteoblast adhesion, alignment, and elongation.

Scaffolds' compressive strength before chemical etching was about 0.46–0.67 MPa, while their resistance was 0.56–0.67 MPa after treatment. Even if the calcium pyrophosphate from the external layer was dissolved, the etching process did not compromise the scaffolds' mechanical properties. These results are similar to other studies performed with ceramic scaffolds with similar compressive strength values of 0.18–0.40 MPa [24] and 0.3–0.4 MPa [33]. The mechanical strength of human sponge bone ranges from 0.2 to 4 MPa and even after chemical etching our scaffolds' compressive strength fell within these values. Furthermore, this mechanical resistance is expected to increase over time as new bone grows into scaffolds [27,33].

The *in vitro* bioactivity of the etched scaffolds was tested by soaking them in SBF as established by Kokubo et al. [25] for 12 h, and 1, 7 and 14 days (Fig. 7) to determine if the etching process affected their bioactive capacity. This *in vitro* bioactivity is determined by an apatite layer forming on the material's surface when it comes into contact with SBF [34]. After 1 day, ridges and grooves were still observed on scaffolds' surface and in some areas, were covered by a layer of apatite precipitates



**Fig. 6.** SEM micrograph of the ridges width at different times: (a) 60s and (b) 120s.

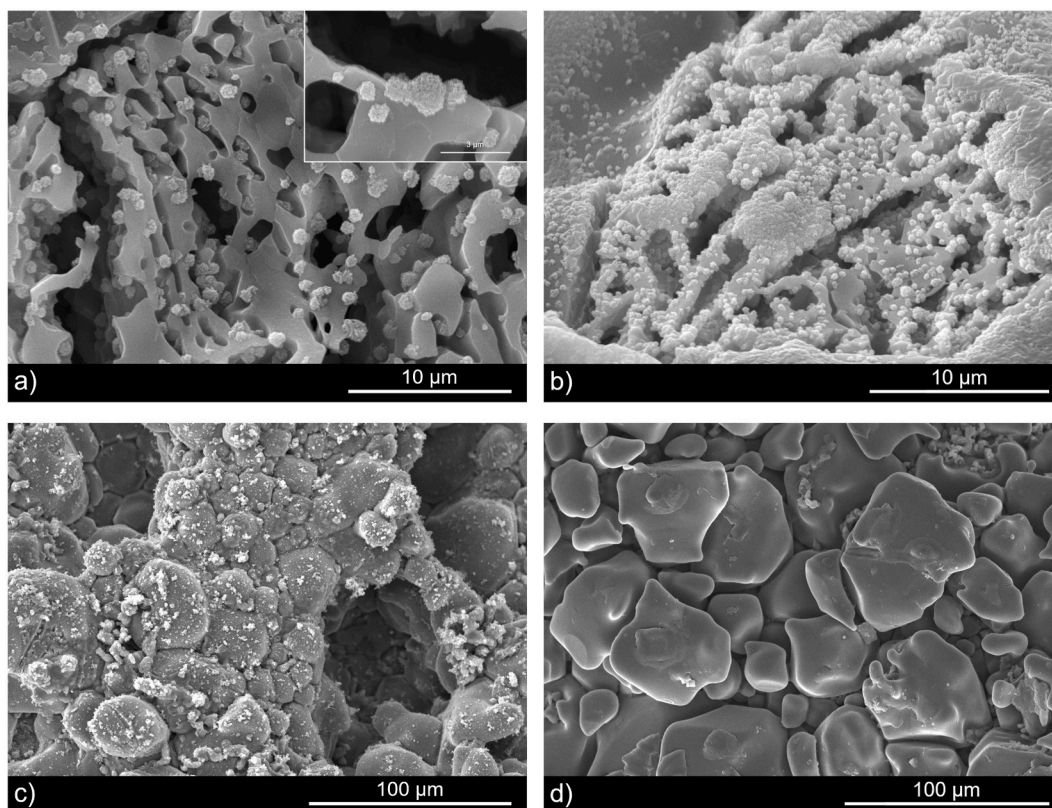


Fig. 7. SEM micrographs of chemically etched scaffolds soaked in SBF for: (a) 12 h; (b) 1 day; (c) 7 days and (d) 14 days.

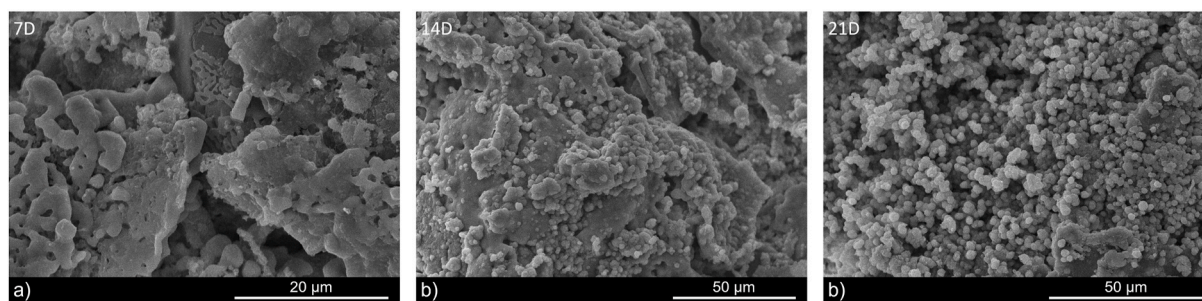


Fig. 8. SEM micrographs of strontium-doped scaffolds soaked in SBF for: (a) 7 days; (b) 14 days and (c) 21 days.

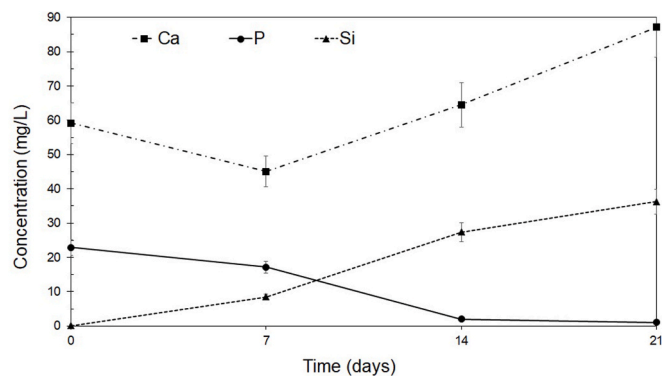


Fig. 9. Changes in calcium (Ca), silicon (Si) and phosphorus (P) ion concentration after immersion in SBF for 7, 14 and 21 days.

(Fig. 7B). The EDX analysis of precipitates showed that they were composed of Ca, P and Cl with a Ca/P ratio of 1.5–1.6 depending on the area. These precipitates could be chlorapatite ( $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{Cl}$ ); Ca/P ratio of 1.67), which is a type of apatite with chloride as the dominant anion. Their Ca/P ratio was lower than that of stoichiometric chlorapatite, probably modified by the presence of  $\beta$ -TCP in the grooved areas. After 7 days in SBF (Fig. 7C), only a few ridges and grooves were still observed on scaffolds' surface, likely due to the dissolution of the remaining  $\beta$ -TCP on the external layer. Only the calcium pyrophosphate from the core, in the form of hexagonal grains, remained. Therefore, no bioactivity was observed due to the inhibitory effect of pyrophosphate in the apatite precipitation process [35]. Some precipitates were present on the surface and, according to the EDX analysis, they were composed of magnesium (Mg), sodium (Na) and chlorine, and were probably salt deposits that originated from the SBF solution. Similarly, after 14 days (Fig. 7D), no bioactivity was observed as the external layer had been completely dissolved and the surface was entirely covered by hexagonal grains of calcium pyrophosphate, with a Ca/P ratio of 1.0.

We believe that after 1 day, the remaining  $\beta$ -TCP on the external

layer of etched scaffolds, which formed the ridges, started to dissolve along with the chlorapatite precipitates. For this reason, after 7 days only a few ridges and grooves were still present on scaffolds' surface, and none were found after 14 days. Due to the dissolution of calcium pyrophosphate after etching,  $\beta$ -TCP could have been more exposed to SBF and dissolved more rapidly than on the non-etched scaffolds. We tested scaffolds' bioactivity for only 12 h, as it could be possible that apatite precipitation occurred mainly during these first few hours before  $\beta$ -TCP started to dissolve. After 12 h (Fig. 7A), many chlorapatite precipitates, with a Ca/P ratio of about 1.5, were visible mainly on top of the grooved areas. It would seem that at some point between 12 and 24 h, the dissolution of the external layer started, especially in the grooved areas, as they were mostly composed of  $\beta$ -TCP, having as a consequence the dissolution of the newly formed apatite precipitates. Therefore, no bioactivity was observed after 7 and 14 days as only the calcium pyrophosphate from the core remained, which inhibited new apatite precipitation.

For this reason, scaffolds were coated again with the same composition used for the external layers but doped with Sr ions, as it has been previously described that its incorporation into ceramic scaffolds can increase their osteogenic and bioactive capacity [3,36]. Strontium-doped scaffolds were then soaked in SBF for 7, 14 and 21 days (Fig. 8). After 7 days (Fig. 8A), no bioactivity was observed on scaffolds' surface, and some ridges and grooves were still observed on the surface below the new layer doped with Sr. At 14 days (Fig. 8B), many spherical precipitates were noted on scaffolds' surface, as was the case especially at 21 days (Fig. 8C), when the number of spherical particles significantly rose and covered the whole surface. The SEM-EDX analysis of scaffolds showed that precipitates were composed of Ca and P and their Ca/P ratio was 1.69, which was slightly higher than the stoichiometric value of hydroxyapatite, with a Ca/P ratio of 1.67, probably due to the presence of Sr ions [36]. In any case, the strontium-doped scaffolds displayed better bioactive capacity and their bioactivity increased with immersion time.

Hydroxyapatite precipitation is directly related to the ionic exchange between scaffolds and SBF and, for this reason, changes in the Ca, Si and P ion concentrations after the different immersion times in SBF were determined by Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry (ICP-OES) (Fig. 9). For scaffolds doped with Sr, at the beginning of the assay, the concentration of the Ca ions slightly lowered for the first 7 days. After this time, it continuously increased until the end of the experiment, and went from a minimum of 45.08 mg/L to a maximum of 87.13 mg/L. This was probably due to Ca ions from the scaffold being released, and also to the dissolution of the new unstable apatite layer, which precipitated after 7 days in SBF, especially between 14 and 21 days and, therefore, increased the Ca concentration. This increased HA precipitation after 7 days also correlated with a lower P ion concentration in the medium. Phosphorous in SBF constantly lowered throughout the experiment from 22.89 mg/L to a minimum value of 1.02 mg/L as it was adsorbed in scaffolds and the new apatite layer formed. As the assay progressed, Si ions were constantly released from the scaffolds, from an initial concentration of 0.09 mg/L to a maximum one of 36.31 mg/L in SBF, which likely indicates the scaffolds' dissolution. The dissolution of the calcium pyrophosphate from the external layer could greatly improve our scaffolds' bioactivity, not only by the formation of ridges and grooves that positively promote cell behaviour, but also by the dissolution of pyrophosphate itself as its inhibitory role in the apatite precipitation process has been well established [35]. In future works, it would be of interest to obtain more stable ridges and grooves that could last longer before starting to dissolve after immersion in SBF.

The effect of surface topographies like ridges and grooves on the cellular behaviour of osteoblasts and hMSCs has been extensively studied in the last few decades [29,37]. Topographic patterns in the form of ridges and grooves have attracted considerable attention owing to their similarity to the collagen fibres composing the bone ECM. According to the literature, the dimensions (width and depth) of ridges and

grooves are a critical factor for inducing contact guidance; that is, to promote adhesion, alignment, elongation, and migration along the pattern [38,39]. It is known that cells in an ordered alignment are more likely to differentiate into an osteogenic phenotype [5,6] and, therefore, an optimal ridge/groove dimension that promotes this alignment as well as a good cellular response, both *in vitro* and *in vivo*, needs to be determined.

According to other authors, the pattern needs to have similar dimensions to that of the cell to effectively guide their alignment [39–41]. Furthermore, this contact guidance effect is not only size-dependent, but also cell-type dependent as different cellular types are known to have varying sensitivities [29,38], which must be considered when designing patterned surfaces.

Regarding the effect of topography on osteoblast behaviour, many studies have been conducted using different pattern sizes within the micrometric range. Kirmizidis et al. [14] studied the effect of micrometric grooved patterns (10–30  $\mu\text{m}$  in width; 7  $\mu\text{m}$  in depth) on osteoblast behaviour. They found that osteoblasts not only adhere and align according to grooves, but also a marker of osteoblasts differentiation, alkaline phosphatase activity (ALP), was observed. Lu et al. [40] also investigated the groove guidance effect on SaOS-2 cells using micrometric dimensions (4–38  $\mu\text{m}$  in width; 2–10  $\mu\text{m}$  in depth). They found that the guidance effect gradually weakened as groove width increased. It would appear that narrow grooves are better at controlling cellular behaviour than wide ones [28,29].

Although no consensus has been reached between different studies about the optimal dimensions needed to induce a proper osteoblasts response, some authors believe that cells may respond better to topographies within the nanometric range, probably because the ECM is comprised of nanosized collagen fibrils of 50–30 nm [42], and also because cell filopodia (250–400 nm), which are responsible for the initial cell attachment to the surface, better perceives smaller dimensions [38]. Nanometric ridges and grooves could, therefore, better resemble the “*in vivo*” interaction of cells with the ECM. For instance, Lamers et al. [37] observed that nanometric ridges/grooves within the natural bone ECM range were able to induce osteoblast alignment down to a width of 75 nm and a depth of 33 nm. These authors also found that osteogenic markers like ALP and osteocalcin (OCN) were up-regulated on nanometric grooved surfaces. Watari et al. [20] also observed the enhanced osteogenic differentiation of hMSCs when cultured on nanoscale (100–400 nm) ridges and grooves. Nanoscale features appear to produce more efficient adhesion, alignment and elongation than microscale patterns [13,43]. Although many studies have focused on the effect of pattern width on cellular behaviour, groove depth has also been found to influence cell alignment, with 150 nm grooves inducing a statistically higher degree of alignment than 50 nm grooves [44].

Several studies have been conducted to elucidate how cells respond to topography but, the mechanism by which topographical cues modulate cell behaviour is still not fully understood. Grooved patterns can promote the adsorption of adhesion proteins like fibronectin and vitronectin and enhance integrin activation, which are transmembrane receptors that together with these proteins mediate the cell-ECM adhesion process through the formation of focal adhesions (FAs) [42,45]. This enhancement of the adhesion process can, in turn, influence other cellular functions like cell proliferation and differentiation, which can lead to increased osteogenesis [46]. Moreover, it has also been reported that changes in cell morphology can regulate the cellular differentiation process [39]. Grooved topography can induce cell elongation, which can subsequently induce changes in the cytoskeleton and nucleus through cytoskeletal tensions. These alterations in the nucleus can lead to changes in gene expression and might, therefore, influence cell osteogenic differentiation [20,32].

When designing biomaterials to be used in bone tissue engineering, it is desirable to make attempts to mimic the original bone tissue conditions. Most tissues possess features ranging from the macro-to the nanoscale which, in turn, affect cell-tissue interactions. The

incorporation of surface topographical patterns into ceramic materials is a topic of interest because, as we have previously discussed, it is known that they can positively promote cellular behaviour, further increasing the porous CaP scaffolds' osteoinductive capacity. To date, researchers have fabricated patterned surface mainly on polymers and metals, thanks to technologies like photolithography, electrospinning, electron beam lithography and colloidal lithography [38]. Better fabrication techniques are still required to produce complex surface patterns, especially on other materials like ceramics. Chemical etching is a low-cost process that has allowed us to obtain highly reproducible topographic surface patterns in the form of ridges and grooves and, more importantly, it can be used in three-dimensional porous ceramic scaffolds.

The ridges and grooves herein fabricated were nano-/micrometric-sized (900–1.5 µm in width; 200–300 nm in depth) and, according to the previous literature, we believe that our patterned scaffolds could better resemble the ECM *in vivo* architecture, improving cell-material interactions [47] and promoting osteoblasts and hMSC adhesion, alignment, elongation, and differentiation [20,28,39], better enhancing their osteogenic capacity than conventional scaffolds.

## 5. Conclusion

Considering the surface topography effect on cell behaviour, this study focused on manufacturing a grooved structure on 3D ceramic porous scaffolds' surface. By means of a simple low-cost chemical etching treatment, a topographical pattern in the form of ridges and grooves was introduced in scaffolds' surface without affecting their structural integrity.

Our patterned scaffolds were composed mainly of a mixture of two different phases: a calcium pyrophosphate one and a β-tricalcium phosphate phase. Both the difference in the constituent crystallographic phases' susceptibility to etching, together with their lamellar structure, were responsible for the formation of the grooved pattern as the calcium pyrophosphate on the external layer was etched off the surface.

The dimensions of ridges and grooves were around 900 nm–1.5 µm in width and 200–300 nm in depth, and they slightly varied with the concentration and etching time. The best results were obtained with 3% acetic acid for 120 s. Furthermore, scaffolds doped with Sr were highly bioactive after 14 and 21 days in SBF and the etching process did not affect their mechanical resistance.

Ceramic scaffolds' surface topography modification represents a promising strategy to improve their *in vivo* osteogenic capacity compared to conventional scaffolds used in bone tissue engineering.

## Funding source

This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

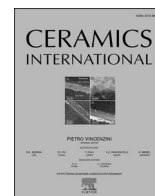
## Declaration of competing interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

## References

- [1] I. Denry, L.T. Kuhn, Design and characterization of calcium phosphate ceramic scaffolds for bone tissue engineering, *Dent. Mater.* 32 (2016) 43–53, <https://doi.org/10.1016/j.dental.2015.09.008>.
- [2] S.I. Roohani-Esfahani, S. Nouri-Khorasani, Z. Lu, R. Appleyard, H. Zreiqat, The influence hydroxyapatite nanoparticle shape and size on the properties of biphasic calcium phosphate scaffolds coated with hydroxyapatite-PCL composites, *Biomaterials* 31 (2010) 5498–5509, <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2010.03.058>.
- [3] D. Xiao, J. Zhang, C. Zhang, D. Barbieri, H. Yuan, L. Moroni, G. Feng, The role of calcium phosphate surface structure in osteogenesis and the mechanisms involved, *Acta Biomater.* 106 (2020) 22–33, <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2019.12.034>.
- [4] N. Robin, R. Zang, K.K. Yang, N. Liu, S.T. Yang, Three-dimensional fibrous scaffolds with microstructures and nanotextures for tissue engineering, *RSC Adv.* 2 (2012) 10110–10124, <https://doi.org/10.1039/c2ra21085a>.
- [5] L. Zhu, D. Luo, Y. Liu, Effect of the nano/microscale structure of biomaterial scaffolds on bone regeneration, *Int. J. Oral Sci.* 12 (2020), <https://doi.org/10.1038/s41368-020-0073-y>.
- [6] Y. Du, J.L. Guo, J. Wang, A.G. Mikos, S. Zhang, Hierarchically designed bone scaffolds: from internal cues to external stimuli, *Biomaterials* 218 (2019), <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2019.119334>.
- [7] D.D. Deligianni, N.D. Katsala, P.G. Koutsoukos, Y.F. Missirlis, Effect of surface roughness of hydroxyapatite on human bone marrow cell adhesion, proliferation, differentiation and detachment strength, *Biomaterials* 22 (2000) 87–96, [https://doi.org/10.1016/S0142-9612\(00\)00174-5](https://doi.org/10.1016/S0142-9612(00)00174-5).
- [8] E.A. dos Santos, M. Farina, G.A. Soares, K. Anselme, Chemical and topographical influence of hydroxyapatite and β-tricalcium phosphate surfaces on human osteoblastic cell behavior, *J. Biomed. Mater. Res.* 89 (2009) 510–520, <https://doi.org/10.1002/jbm.a.31991>.
- [9] M.J. Dalby, M.O. Riehle, S.J. Yarwood, C.D.W. Wilkinson, A.S.G. Curtis, Nucleus alignment and cell signaling in fibroblasts: response to a micro-grooved topography, *Exp. Cell Res.* 284 (2003) 272–280, [https://doi.org/10.1016/S0014-4827\(02\)00053-8](https://doi.org/10.1016/S0014-4827(02)00053-8).
- [10] S. Lenhart, M.B. Meier, U. Meyer, L. Chi, H.P. Wiesmann, Osteoblast alignment, elongation and migration on grooved polystyrene surfaces patterned by Langmuir-Blodgett lithography, *Biomaterials* 26 (2005) 563–570, <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2004.02.068>.
- [11] A.I. Teixeira, G.A. Abrams, P.J. Bertics, C.J. Murphy, P.F. Nealey, Epithelial contact guidance on well-defined micro- and nanostructured substrates, *J. Cell Sci.* 116 (2003) 1881–1892, <https://doi.org/10.1242/jcs.00383>.
- [12] S. Koo, R. Muhammad, G.S.L. Peh, J.S. Mehta, E.K.F. Yim, Micro- and nanotopography with extracellular matrix coating modulate human corneal endothelial cell behavior, *Acta Biomater.* 10 (2014) 1975–1984, <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2014.01.015>.
- [13] M.J.P. Biggs, R.G. Richards, S. McFarlane, C.D.W. Wilkinson, R.O.C. Oreffo, M. J. Dalby, Adhesion formation of primary human osteoblasts and the functional response of mesenchymal stem cells to 330 nm deep microgrooves, *J. R. Soc. Interface* 5 (2008) 1231–1242, <https://doi.org/10.1098/rsif.2008.0035>.
- [14] G. Kirmizidis, M.A. Birch, Microfabricated grooved substrates influence cell–cell communication and osteoblast differentiation *in vitro*, *Tissue Eng.* 15 (2009) 1427–1436, <https://doi.org/10.1089/ten.tea.2008.0137>.
- [15] D. Khang, J. Choi, Y.M. Im, Y.J. Kim, J.H. Jang, S.S. Kang, T.H. Nam, J. Song, J. W. Park, Role of subnano-, nano- and submicron-surface features on osteoblast differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells, *Biomaterials* 33 (2012) 5997–6007, <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2012.05.005>.
- [16] A.E. Loisel, L. Wei, M. Faryad, E.M. Paul, G.S. Lewis, J. Gao, A. Lakhtakia, H. J. Donahue, Specific biomimetic hydroxyapatite nanotopographies enhance osteoblastic differentiation and bone graft osteointegration, *Tissue Eng.* 19 (2013) 1704–1712, <https://doi.org/10.1089/ten.tea.2012.0560>.
- [17] P. Wang, L. Zhao, J. Liu, M.D. Weir, X. Zhou, H.H.K. Xu, Bone tissue engineering via nanostructured calcium phosphate biomaterials and stem cells, *Bone Res.* 2 (2014), <https://doi.org/10.1038/boneres.2014.17>.
- [18] M. Irving, M.F. Murphy, F. Lilley, P.W. French, D.R. Burton, S. Dixon, M.C. Sharp, The use of abrasive polishing and laser processing for developing polyurethane surfaces for controlling fibroblast cell behaviour, *Mater. Sci. Eng. C* 71 (2017) 690–697, <https://doi.org/10.1016/j.msec.2016.10.067>.
- [19] Y.L. Jung, H.J. Donahue, Cell sensing and response to micro- and nanostructured surfaces produced by chemical and topographic patterning, *Tissue Eng.* 13 (2007) 1879–1891, <https://doi.org/10.1089/ten.2006.0154>.
- [20] S. Watari, K. Hayashi, J.A. Wood, P. Russell, P.F. Nealey, C.J. Murphy, D. C. Genetos, Modulation of osteogenic differentiation in hMSCs cells by submicron topographically-patterned ridges and grooves, *Biomaterials* 33 (2012) 128–136, <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2011.09.058>.
- [21] M.M. McCafferty, G.A. Burke, B.J. Meenan, Calcium phosphate thin films enhance the response of human mesenchymal stem cells to nanostructured titanium surfaces, *J. Tissue Eng.* (2014) 5, <https://doi.org/10.1177/2041731414537513>.
- [22] B. Zhu, Q. Lu, J. Yin, J. Hu, Z. Wang, Alignment of osteoblast-like cells and cell-collagen matrix induced by nanogrooves, *Tissue Eng.* 11 (2005) 825–834, <https://doi.org/10.1089/ten.2005.11.825>.
- [23] D. Nadeem, C.A. Smith, M.J. Dalby, R.M. Dominic Meek, S. Lin, G. Li, B. Su, Three-dimensional CaP/gelatin lattice scaffolds with integrated osteoinductive surface topographies for bone tissue engineering, *Biofabrication* 7 (2015), <https://doi.org/10.1088/1758-5090/7/1/015005>.
- [24] P. Ros-Tárraga, A. Murciano, P. Mazón, S.A. Gehrke, P.N. de Aza, New 3D stratified Si-Ca-P porous scaffolds obtained by sol-gel and polymer replica method: microstructural, mineralogical and chemical characterization, *Ceram. Int.* 43 (2017) 6548–6553, <https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2017.02.081>.
- [25] T. Kokubo, H. Takadama, How useful is SBF in predicting *in vivo* bone bioactivity? *Biomaterials* 27 (2006) 2907–2915, <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2006.01.017>.
- [26] S. Samavedi, A.R. Whittington, A.S. Goldstein, Calcium phosphate ceramics in bone tissue engineering: a review of properties and their influence on cell behavior, *Acta Biomater.* 9 (2013) 8037–8045, <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2013.06.014>.

- [27] K. Doi, Y. Abe, R. Kobatake, Y. Okazaki, Y. Oki, Y. Naito, W. Prananingrum, K. Tsuga, Novel development of phosphate treated porous hydroxyapatite, *Materials* 10 (2017), <https://doi.org/10.3390/ma10121405>.
- [28] T. Akasaka, H. Miyaji, K. Naoyuki, A. Yokoyama, Y. Yoshida, Adhesion of osteoblast-like cells (Saos-2) on micro-/submicro-patterned apatite scaffolds fabricated with apatite cement paste by micro-molding, *Nano Biomed.* 8 (2016) 112–122, <https://doi.org/10.11344/nano.8.112>.
- [29] X. Lu, Y. Leng, Comparison of the osteoblast and myoblast behavior on hydroxyapatite microgrooves, *J. Biomed. Mater. Res. B Appl. Biomater.* 90 B (2009) 438–445, <https://doi.org/10.1002/jbm.b.31304>.
- [30] S. Lee, S. Yang, I. Bajpai, I.K. Kang, S. Kim, Enhancement of the pore interconnectivity and porosity of calcium phosphate scaffolds by acid-etching method, *Acta Metall. Sin. (English Lett.)* 28 (2015) 1109–1116, <https://doi.org/10.1007/s40195-015-0301-1>.
- [31] C. Gao, J. Zhuang, P. Li, C. Shuai, S. Peng, Preparation of micro/nanometer-sized porous surface structure of calcium phosphate scaffolds and the influence on biocompatibility, *J. Mater. Res.* 29 (2014) 1144–1152, <https://doi.org/10.1557/jmr.2014.100>.
- [32] A. Azeem, A. English, P. Kumar, A. Satyam, M. Biggs, E. Jones, B. Tripathi, N. Basu, J. Henkel, C. Vaquette, N. Rooney, G. Riley, A. O'Riordan, G. Cross, S. Ivanovski, D. Huttmacher, A. Pandit, D. Zeugolis, The influence of anisotropic nano- to micro-topography on in vitro and in vivo osteogenesis, *Nanomedicine* 10 (2015) 693–711, <https://doi.org/10.2217/nnm.14.218>.
- [33] W. Chen, B. Tian, Y. Lei, Q.F. Ke, Z.A. Zhu, Y.P. Guo, Hydroxyapatite coatings with oriented nanoplate and nanorod arrays: fabrication, morphology, cytocompatibility and osteogenic differentiation, *Mater. Sci. Eng. C* 67 (2016) 395–408, <https://doi.org/10.1016/j.msec.2016.04.106>.
- [34] S. Ramezani, R. Emadi, M. Kharaziha, F. Tavangarian, Synthesis, characterization and in vitro behavior of nanostructured diopside/biphase calcium phosphate scaffolds, *Mater. Chem. Phys.* 186 (2017) 415–425, <https://doi.org/10.1016/j.matchemphys.2016.11.013>.
- [35] H. Fleisch, S. Bisaz, Mechanism of calcification: inhibitory role of pyrophosphate, *Nature* 195 (1962), <https://doi.org/10.1038/195911a0> undefined.
- [36] N.A. Mata, P. Ros-Tárraga, P. Velasquez, A. Murciano, P.N. de Aza, Synthesis and characterization of 3D multilayer porous Si–Ca–P scaffolds doped with Sr ions to modulate in vitro bioactivity, *Ceram. Int.* 46 (2020) 968–977, <https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2019.09.058>.
- [37] E. Lamers, X. Frank Walboomers, M. Domanski, J. te Riet, F.C.M.J.M. van Delft, R. Luttge, L.A.J.A. Winnubst, H.J.G.E. Gardeniers, J.A. Jansen, The influence of nanoscale grooved substrates on osteoblast behavior and extracellular matrix deposition, *Biomaterials* 31 (2010) 3307–3316, <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2010.01.034>.
- [38] K. Anselme, P. Davidson, A.M. Popa, M. Giazon, M. Liley, L. Ploux, The interaction of cells and bacteria with surfaces structured at the nanometre scale, *Acta Biomater.* 6 (2010) 3824–3846, <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2010.04.001>.
- [39] J.Y. Yang, Y.C. Ting, J.Y. Lai, H.L. Liu, H.W. Fang, W.B. Tsai, Quantitative analysis of osteoblast-like cells (MG63) morphology on nanogrooved substrata with various groove and ridge dimensions, *J. Biomed. Mater. Res.* 90 (2009) 629–640, <https://doi.org/10.1002/jbm.a.32130>.
- [40] X. Lu, Y. Leng, Quantitative analysis of osteoblast behavior on microgrooved hydroxyapatite and titanium substrata, *J. Biomed. Mater. Res.* 66 (2003) 677–687, <https://doi.org/10.1002/jbm.a.10022>.
- [41] S. Ber, G. Torun Köse, V. Hasirci, Bone tissue engineering on patterned collagen films: an in vitro study, *Biomaterials* 26 (2005) 1977–1986, <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2004.07.007>.
- [42] W.B. Tsai, Y.C. Ting, J.Y. Yang, J.Y. Lai, H.L. Liu, Fibronectin modulates the morphology of osteoblast-like cells (MG-63) on nano-grooved substrates, *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 20 (2009) 1367–1378, <https://doi.org/10.1007/s10856-008-3687-8>.
- [43] M. Vandrovová, L. Bačáková, Adhesion, growth and differentiation of osteoblasts on surface-modified materials developed for bone implants, *Physiol. Res.* 60 (2011) 403–417, <https://doi.org/10.33549/physiolres.932045>.
- [44] C. Chai, K.W. Leong, Biomaterials approach to expand and direct differentiation of stem cells, *Mol. Ther.* 15 (2007) 467–480, <https://doi.org/10.1038/sj.mt.6300084>.
- [45] C. Zhao, X. Wang, L. Gao, L. Jing, Q. Zhou, J. Chang, The role of the micro-pattern and nano-topography of hydroxyapatite bioceramics on stimulating osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells, *Acta Biomater.* 73 (2018) 509–521, <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2018.04.030>.
- [46] H.N. Kim, A. Jiao, N.S. Hwang, M.S. Kim, D.H. Kang, D.H. Kim, K.Y. Suh, Nanotopography-guided tissue engineering and regenerative medicine, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 65 (2013) 536–558, <https://doi.org/10.1016/j.addr.2012.07.014>.
- [47] E. Tamjid, A. Simchi, J.W.C. Dunlop, P. Fratzl, R. Bagheri, M. Vossoughi, Tissue growth into three-dimensional composite scaffolds with controlled micro-features and nanotopographical surfaces, *J. Biomed. Mater. Res. A* 101 (2013) 2796–2807, <https://doi.org/10.1002/jbm.a.34584>.



# Synthesis of 3D porous ceramic scaffolds obtained by the sol-gel method with surface morphology modified by hollow spheres for bone tissue engineering applications

E. Sebastián<sup>a</sup>, A. Murciano<sup>b</sup>, P.N. De Aza<sup>a</sup>, P. Velasquez<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Instituto de Bioingeniería, Universidad Miguel Hernández, Avda. Universidad s/n, Elche, Alicante, 03202, Spain

<sup>b</sup> Departamento de Materiales, Óptica y Tecnología Electrónica, Universidad Miguel Hernández, Avda. Universidad s/n, Elche, Alicante, 03202, Spain

## ARTICLE INFO

### Keywords:

Sol-gel processes  
Surfaces  
Biomedical applications  
Delivery systems

## ABSTRACT

In the present work, we modified the surface morphology of 3D porous ceramic scaffolds by incorporating strontium phosphate (SrP) hollow nano-/microspheres with potential application as delivery system for the local release of therapeutic substances. SrP hollow spheres were synthesized by a template-free hydrothermal method. The influence of the reaction temperature, time and concentration of reactants on precipitates' morphology and size were investigated. To obtain a larger number of open hollow spheres, a new methodology was developed consisting of applying a second hydrothermal treatment to spheres by heating them at 120 °C for 24 h. The X-ray diffraction (XRD) analysis indicated that spheres consisted of a main magnesium-substituted strontium phosphate phase ((Sr<sub>0.86</sub>Mg<sub>0.14</sub>)<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>). The scanning electron microscopy (SEM) micrographs confirmed that spheres had hollow interiors (~350 nm size) and an average diameter of 850 nm. Spheres had a specific surface area of 30.5 m<sup>2</sup>/g, a mesoporous shell with an average pore size of 3.8 nm, and a pore volume of 0.14 cm<sup>3</sup>/g. These characteristics make them promising candidates for drug, cell and protein delivery. For the attachment of spheres to scaffolds' surface, ceramic structures were immersed in an ethanol solution containing 0.1 g of hollow spheres and kept at 37 °C for 4 h. The scaffolds with incorporated spheres were bioactive after being immersed in simulated body fluid (SBF) for 7 days and spheres were still adhered to their surface after 14 days.

## 1. Introduction

In recent years, many studies have focused on developing local delivery systems for biomedical applications. Different structures like rods, fibers, tubes, needles and spheres have been studied as drug carriers [1, 2]. These structures have different loading and releasing efficiencies. Of them, hollow structures, especially hollow spheres on the nano-/microscale, have shown great potential as controlled delivery systems for biomedical applications thanks to their unique characteristics, such as high surface area, large pore volume, low density, and morphology with hollow interiors [3,4]. The hollow cavity confers them much higher loading capacity compared to other types of structures, allowing them to locally deliver a variety of compounds like proteins, cells, genes and especially drugs [5,6].

Several methods have been used to fabricate hollow spherical structures, including spray-drying, sol-gel, the template method, microemulsions, microwave synthesis and the hydrothermal method

[6–10]. The template method has been the most widely used technique to prepare hollow spheres. These templates can be either hard, mainly polymers, silica and carbon-based templates, or soft, emulsion droplets, vesicles, micelles, and gas bubbles [3,11]. Their main drawback is the need to remove the template once the synthesis process finishes. Template removal is not only a complicated time-consuming process, but it can also affect the morphology and structural integrity of the final products, limiting their practical applications. As an alternative, template-free strategies, such as the Ostwald ripening process in combination with the hydrothermal method have been studied [12,13]. This approach does not require any kind of templating, which simplifies the synthesis of hollow spheres and, is therefore, the method that was herein followed.

Considering the biocompatibility, biodegradability and toxicity of carriers, hollow spheres can be prepared from different materials like natural or synthetic polymers, such as collagen, chitosan, alginate and poly(lactic-co-glycolic acid) (PLGA), or ceramics like calcium

\* Corresponding author. Instituto de Bioingeniería, Universidad Miguel Hernández, Avda. Universidad s/n, Elche, Alicante, 03202, Spain.

E-mail address: [pavelasquez@umh.es](mailto:pavelasquez@umh.es) (P. Velasquez).

<https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2022.09.326>

Received 21 July 2022; Received in revised form 9 September 2022; Accepted 25 September 2022

Available online 28 September 2022

0272-8842/© 2022 The Authors. Published by Elsevier Ltd. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

phosphates (CaPs) [14]. CaP ceramics have been extensively studied for their use in bone tissue engineering (BTE) and drug delivery given their similarity to the mineral phase of bone. Among CaPs, synthetic hydroxyapatite (HA,  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ ) has been widely researched as a drug carrier thanks to its great adsorption capacity [15]. However, synthetic HA is extremely stable under physiological conditions with very low *in vivo* biodegradation, which limits its clinical application as a delivery system. As not only HA, but most CaPs are relatively insoluble, it is necessary to investigate more soluble materials that can be used to fabricate hollow spheres.

The incorporation of certain trace elements into synthetic materials like HA can help improve their dissolution rate under physiological conditions [2]. Of them, strontium (Sr) is known to play an important role in the bone regeneration process by stimulating bone formation and inhibiting bone resorption.  $\text{Sr}^{2+}$  ions (1.18 Å) have the same physiological and chemical behavior as  $\text{Ca}^{2+}$  ions (1.00 Å) and can replace Ca in the HA structure up to a full substitution [2]. The incorporation of  $\text{Sr}^{2+}$  ions into HA can increase its solubility by destabilizing the crystal structure of HA [16–18]. Strontium phosphate (SrP) ceramics, such as tribasic strontium phosphate ( $\text{Sr}_3(\text{PO}_4)_2$ ), strontium hydroxyapatite ( $\text{Sr}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$ ) and strontium hydrogen phosphate ( $\text{SrHPO}_4$ ) with greater biodegradability, can be used as an alternative to more insoluble CaPs for drug delivery [19–21].

Although these carriers have excellent delivery capacity, their mechanical properties do not allow them to be shaped into more complex structures that can support the bone regeneration process. For this reason, three-dimensional (3D) porous scaffolds with better mechanical properties have been used in combination with therapeutic agents to reconstruct bone defects [22]. However, these molecules are normally adsorbed on the scaffold's surface and show a significant burst release once scaffolds have been implanted in the body [23]. Therefore, it is necessary to achieve a more controlled release to improve the therapeutic effect of the administered drugs. By combining both structure types, it is possible to locally release therapeutic agents at the injured site and at the same time, support new bone tissue formation. To date, only a few studies have reported the incorporation of nano-/micro-spheres into 3D scaffolds to achieve sustained drug release. For instance, Son et al. [24] fabricated HA scaffolds containing PLGA microspheres loaded with the anti-inflammatory drug dexamethasone (DEX) and studied their bone regeneration capacity. After 10 weeks of *in vivo* implantation in femur defects of beagle dogs, they observed significant new cortical bone formation in the implanted regions. Conversely, traumatized regions that were either unfilled or filled with DEX-free HA scaffolds presented less bone formation.

In the present work, in order to develop 3D porous scaffolds with controlled delivery capacity, SrP hollow nano-/micro-spheres synthesized by a template-free hydrothermal method were incorporated into ceramic scaffolds. The reaction conditions influencing the synthesis of spheres, such as the hydrothermal temperature, reaction time and concentration of reactants were studied. Moreover, the mechanical properties and *in vitro* bioactive capacity of the scaffolds with incorporated spheres were also investigated.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Synthesis and characterization of SrP hollow spheres

Hollow spheres were synthesized by the hydrothermal method without any surfactant or template [13]. First, two solutions were prepared: one containing 0.9 mM of strontium nitrate ( $\text{Sr}(\text{NO}_3)_2$ , Sigma-Aldrich) and 0.9 mM of magnesium chloride ( $\text{MgCl}_2$ , Sigma-Aldrich), and another solution containing 10 mM of disodium hydrogen phosphate ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , Sigma-Aldrich), dissolved in 100 mL of deionized water, respectively. Both solutions were mixed under continuous stirring at room temperature and transferred to a teflon-lined stainless-steel autoclave where the hydrothermal reaction was

conducted at 120 °C for 24 h, followed by cooling to room temperature naturally. The resulting precipitates were collected by centrifugation (4500 rpm, 5 min) (Hermle Z 206 A, Germany), washed with ethanol and deionized water several times, and dried at 60 °C for 24 h.

The morphology, microstructure, size distribution and elemental composition of the synthesized products were investigated by scanning electron microscopy with energy dispersive X-ray spectroscopy (SEM-EDX, Hitachi S – 3500 N, Japan). Samples were palladium-coated before observation.

The phase composition of the prepared spheres was characterized by X-ray diffraction (XRD, Bruker, AXR D8 Advance, Germany) using Cu-K $\alpha$  radiation (1.54056 Å). The X-ray tube was operated at 40 kV and 30 mA. Data was collected in the Bragg-Brentano theta-2theta ( $\theta/2\theta$ ) geometry between 20° and 46° ( $2\theta$ ) at 0.02 steps, counting 8 s per step. Diffractograms were analyzed with the Match! 3 software (v. 3.13.0.220) and compared with the Crystallography Open Database (COD) and the International Centre for Diffraction Data (ICDD).

The specific surface area, pore size distribution and pore volume of the spheres were evaluated by the Brunauer-Emmett-Teller (BET) and Barrett-Joyner-Halenda (BJH) methods, applied to the  $\text{N}_2$  adsorption/desorption isotherms. Isotherms were measured with a surface area and porosity analyzer (Autosorb-6, Quantachrome Instruments, USA) at 77 K.

### 2.2. Scaffold synthesis and incorporation of hollow spheres

Multilayer porous scaffolds were prepared by the sol-gel method in combination with the polymeric sponge replication method [25]. First, a sol-gel solution with a composition of  $2\text{SiO}_2$ – $50\text{CaO}$ – $48\text{P}_2\text{O}_5$  (mol%) was prepared for the scaffolds' core. In the initial step, 0.2 mL of tetraethyl orthosilicate (TEOS,  $\text{Si}(\text{OC}_2\text{H}_5)_4$ , Aldrich 98%), 10.5 mL of triethyl phosphate (TEP,  $(\text{C}_2\text{H}_5)_3\text{PO}_4$ , Aldrich  $\geq 99.8\%$ ), 5 mL of ethanol 97°, 20 mL of distilled water and 10 mL of hydrochloric acid (HCl 37%, Ensure) were mixed together under continuous stirring at room temperature for 30 min to allow the hydrolysis of precursors. After this time, 9.5 g of calcium carbonate ( $\text{CaCO}_3$ , Sigma  $\geq 99\%$ ) were added to the solution and the pH was adjusted between 2 and 3 by adding HCl drop by drop. Polyurethane sponges (20 ppi, 12.7 mm diameter, 10 mm high) were immersed in the resulting solution for the appropriate number of times and dried in a furnace (Naberthen, Lilienthal/Bremen, Germany) for 10 min at 180 °C after each immersion. Finally, the coated sponges were sintered at 950 °C at a heating rate of 19 °C/h for 50 h and then maintained at this temperature for 8 h.

Second, another sol-gel solution with composition  $29\text{SiO}_2$ – $66\text{CaO}$ – $3\text{P}_2\text{O}_5$ – $2\text{MgO}$  (mol%) was prepared for the external/bioactive layers of scaffolds. For this purpose, 10.9 mL of TEOS, 1.6 mL of TEP, 5 mL of ethanol 97°, 20 mL of distilled water, 10 mL of HCl, 11 g of calcium carbonate and 0.3 g of magnesium carbonate ( $\text{MgCO}_3$ , Sigma-Aldrich) were mixed following the same procedure described above. The previously obtained scaffolds' core was coated with the new solution and dried at 180 °C for 5 min. After the appropriate number of immersions, multilayer scaffolds were sintered again at 950 °C at a heating rate of 119 °C/h for 8 h and maintained at this temperature for 3 h. The obtained scaffolds were physically, chemically and mineralogically characterized by SEM-EDX and XRD.

Incorporation of spheres was conducted by immersing scaffolds in 50 mL of an ethanol solution containing 0.1 g of the previously synthesized spheres, followed by shaking in a water bath at 37 °C for 4 h. After this time, scaffolds were washed several times with deionized water to remove non-incorporated spheres and dried at 60 °C before analyzing them by SEM-EDX.

Scaffolds' mechanical properties were determined before and after the incorporation of spheres by a simple compression test using a simple manual test stand (SVL-1000 N, IMADA). Tests were carried out by manually applying load to scaffolds (9.1 mm diameter, 7.6 mm high) until their structure collapsed.

Scaffolds' porosity and pore size distribution were examined by the mercury porosimetry technique (Poremaster 60 GT, Quantachrome Instruments, USA) at a pressure between 78.4 bar and 4049.21 bar.

### 2.3. *In vitro* bioactivity of scaffolds with incorporated spheres

The bioactivity of scaffolds with incorporated hollow spheres was tested by immersion in simulated body fluid (SBF) solution prepared according to the procedure established by Kokubo and Takadama [26]. Scaffolds were immersed in 50 mL of SBF (pH 7.4) at 37 °C in a water bath for 3, 7, 14 and 21 days. After each time period, scaffolds were dried at 60 °C for 24 h and their bioactivity was determined by SEM-EDX, assessing apatite formation on scaffolds' surface. Changes in the concentration of Ca, P, Si, Sr and Mg ions released from scaffolds were analyzed by inductively coupled plasma optical emission spectrometry (ICP-OES PerkinElmer Optima 2000™).

## 3. Results

### 3.1. Synthesis and characterization of the CaP scaffolds

The scaffolds obtained by the sol-gel and polymer sponge replication methods were physically and chemically characterized. The microstructure and elemental composition of scaffolds' core were analyzed by SEM-EDX. Scaffolds had an interconnected porosity and were formed by hexagonal grains of Ca, O and P with a Ca/P ratio of ~1.0, which corresponds to the stoichiometric value of calcium pyrophosphate (CPP,  $\text{Ca}_2\text{O}_7\text{P}_2$ ). Scaffolds' XRD pattern confirmed that they were composed of a main CPP phase (COD-96-100-1557). Diffraction peaks were sharp and narrow, which indicate the material's high crystallinity. No other phases were observed in the XRD pattern (Fig. 1b).

Fig. 2 shows scaffolds' pore size distribution, which was determined by the mercury porosimetry technique. Scaffolds had a porosity value of 37.79%, 23.73% of which corresponded to interparticle spaces (<300  $\mu\text{m}$ ), with a pore size between 169.80 and 11.54  $\mu\text{m}$ . The other 14.05% corresponded to intraparticle spaces (<1  $\mu\text{m}$ ), with a pore size between 0.8 and 0.01  $\mu\text{m}$ .

Scaffolds' compressive strength was tested before and after the incorporation of hollow spheres. The scaffolds without spheres had a compressive strength of around 1.27–1.93 MPa, while their mechanical strength after incorporating spheres was 1.56–1.98 MPa. The attachment of spheres had no significant effect on scaffolds' mechanical properties.

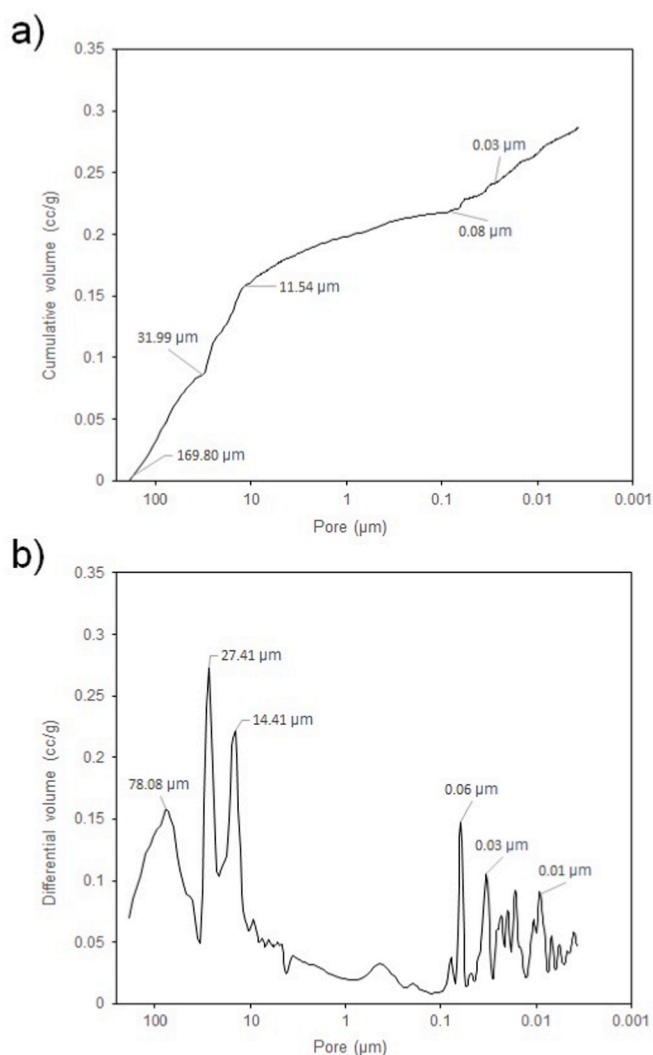


Fig. 2. Mercury porosimetry curves: (a) cumulative and (b) differential intruded volume vs. pore diameter.

### 3.2. Synthesis and characterization of the SrP hollow spheres

The morphology, microstructure, size and elemental composition of the synthesized spheres were studied by SEM-EDX. Fig. 3 shows SEM

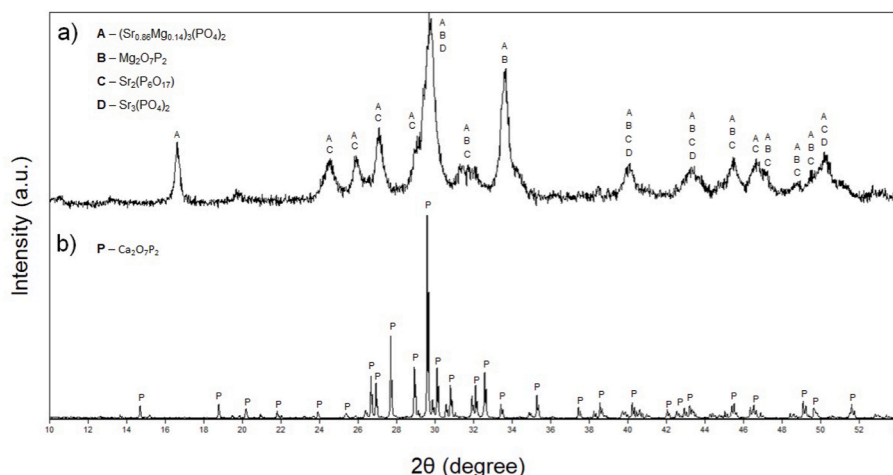


Fig. 1. XRD patterns of the: (a) SrP hollow spheres synthesized at 120 °C for 24 h and (b) 3D CaP porous scaffolds.



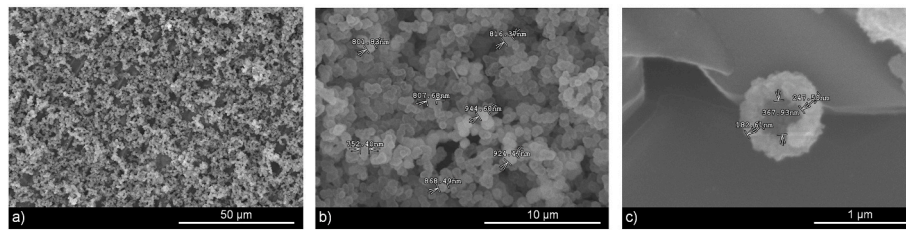


Fig. 3. SEM images of the SrP hollow spheres: (a) low-magnification; (b) size distribution of spheres and (c) broken hollow sphere with details of its dimensions.

images of the spheres prepared by the hydrothermal method at 120 °C for 24 h. A large quantity of spherical precipitates was obtained (Fig. 3a) with an average size of around 850 nm (Fig. 3b). Fig. 3c shows a high-magnification image of a broken sphere, which confirms their hollow structure. EDX analysis was used to determine the elemental composition of precipitates. Hollow spheres were composed of Sr, P, O and Mg, and their Sr/P ratio was about 1.0.

Fig. 1a depicts the phase composition of the hollow spheres determined by XRD. The XRD pattern of these spheres revealed that they were composed of a main Mg-substituted strontium phosphate phase ( $\text{Sr}_{0.86}\text{Mg}_{0.14}\text{P}_3(\text{PO}_4)_2$  (ICDD-00-047-1895), along with some minor phases like magnesium pyrophosphate ( $\text{Mg}_2\text{O}_7\text{P}_2$ ) (COD-96-201-7953), tribasic strontium phosphate ( $\text{Sr}_3(\text{PO}_4)_2$ ) (COD-96-154-4728) and strontium ultraphosphate  $\text{Sr}_2(\text{P}_6\text{O}_{17})$  (COD-96-152-7089).

Fig. 4 shows the  $\text{N}_2$  adsorption/desorption isotherms and the corresponding pore size distribution curve of the hollow spheres. Samples presented a type IV isotherm with an H3 hysteresis loop, which is characteristic of mesoporous materials according to the IUPAC classification [27]. The specific surface area, pore size distribution and pore volume of the shell of spheres were measured by applying the BET and BJH methods to the  $\text{N}_2$  adsorption/desorption isotherms. The BET specific surface area ( $S_{\text{BET}}$ ) of spheres was  $30.5 \text{ m}^2/\text{g}$ , while the average pore size and volume were 3.8 nm and  $0.14 \text{ cm}^3/\text{g}$ , respectively.

Different synthesis parameters were tested to study the formation process and to determine the best conditions to obtain a large quantity of well-defined hollow spheres. The SEM images of the spherical particles obtained after 6, 12 and 24 h of hydrothermal treatment are shown in Fig. 5. After only 6 h, particles with a spherical morphology were observed (Fig. 5a). After 12 h, precipitates were more defined and slightly larger (Fig. 5b). When prolonging the reaction time to 24 h, the

obtained particles were more spherical and less aggregated (Fig. 5c). Their size also increased and was in the range of 750–950 nm.

The effect of the Mg concentration and reaction temperature on the synthesis of spheres was also investigated. When Mg was absent, no spheres were obtained, and flower-like particles were observed instead (Fig. 6a). With 0.45 mM of Mg, the spherical particles precipitated (Fig. 6b), but in a smaller amount compared to 0.9 mM (Fig. 6c). Mg appears to be essential for the formation of spherical particles.

Regarding the synthesis temperature, different conditions (30, 60 and 120 °C) were tested (Fig. 7). No precipitate was obtained at 30 °C of reaction temperature. At 60 °C, some spherical precipitates formed, but the number of precipitates was small (Fig. 7a). A large quantity of spherical precipitates formed as a result of increasing the reaction temperature to 120 °C (Fig. 7b).

After studying the synthesis process, the obtained precipitates were hydrothermally treated again to observe the effect of a second reaction on the synthesized spheres' morphology. Fig. 8 shows the SEM images of the spheres obtained after 24 h of a second hydrothermal treatment at 120 °C. Afterwards, the precipitates' morphology became more irregular (Fig. 8a), and even more open hollow spheres were observed (Fig. 8b).

### 3.3. Incorporation of the SrP hollow spheres into CaP scaffolds

In order to incorporate the previously synthesized hollow spheres, the CaP porous scaffolds were immersed in an ethanol solution with 0.1 g of dispersed spheres and kept at 37 °C for 4 h. Fig. 9 shows the SEM images of scaffolds' surface with the incorporated spheres. Fig. 9a depicts the scaffolds' surface prior to the incorporation of spheres. After the immersion period, the SrP hollow spheres were homogeneously distributed all over the surface (Fig. 9b). Their morphology and size remained the same after their incorporation (Fig. 9c). Some areas presented larger quantities of aggregated spheres than others, which was probably due to the scaffolds' microstructure (Fig. 9d). The EDX analysis was consistent with those obtained for scaffolds and spheres alone. Hollow spheres were composed of Sr, P, O and Mg, with an Sr/P ratio of 1.0, while the areas without spheres consisted of Ca, O and P, with a Ca/P ratio of 1.0.

### 3.4. In vitro bioactivity of the scaffolds with incorporated spheres

After the incorporation of spheres, scaffolds' *in vitro* bioactivity was determined by immersion in SBF for 3, 7, 14 and 21 days. After soaking for 3 days, the hollow spheres were still attached to scaffolds' surface and no changes were observed in their morphology (Fig. 10a). After 7 days, small precipitates with a globular morphology started to cover scaffolds' surface (Fig. 10b). According to the EDX analysis, precipitates were composed of Ca, P and O, with a Ca/P ratio of about 1.5, which comes close to that of stoichiometric HA (Ca/P ratio of 1.67). After 14 days of immersion in SBF, apatite precipitates were partially dissolved, and many hollow spheres were still observed on the surface (Fig. 10c). Finally, after 21 days, apatite precipitated again and formed a dense layer that covered scaffolds' surface (Fig. 10d).

Fig. 11 shows the changes in the  $\text{Sr}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Si}^{4+}$  and  $\text{PO}_4^{3-}$  ion concentrations of the scaffolds with spheres, analyzed by ICP-OES after

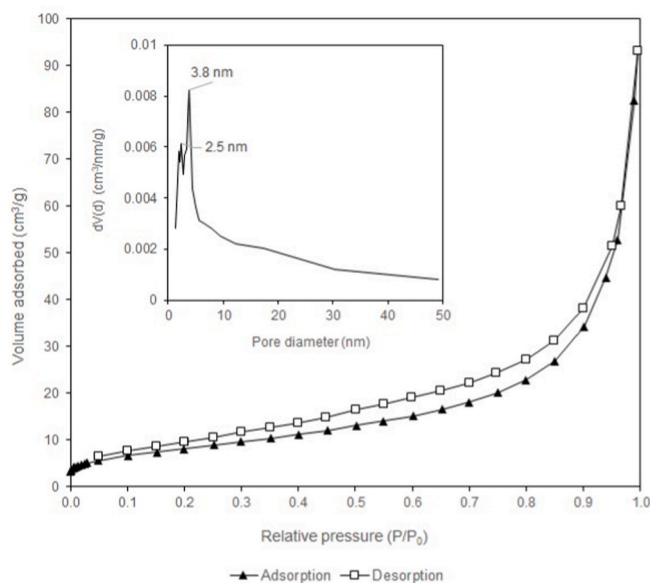


Fig. 4.  $\text{N}_2$  adsorption/desorption isotherms and BJH pore size distribution (inset) of the SrP hollow spheres.

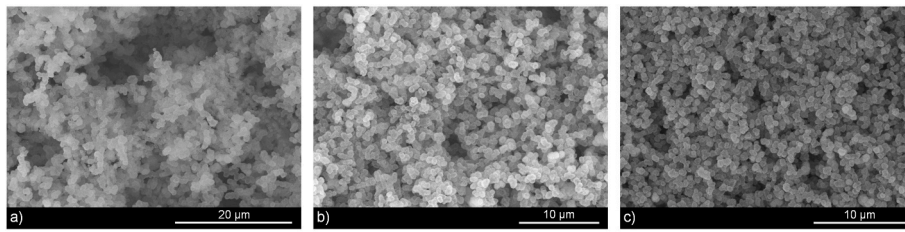


Fig. 5. SEM images of the SrP hollow spheres after different synthesis times at 120 °C: (a) 6 h; (b) 12 h and (c) 24 h.

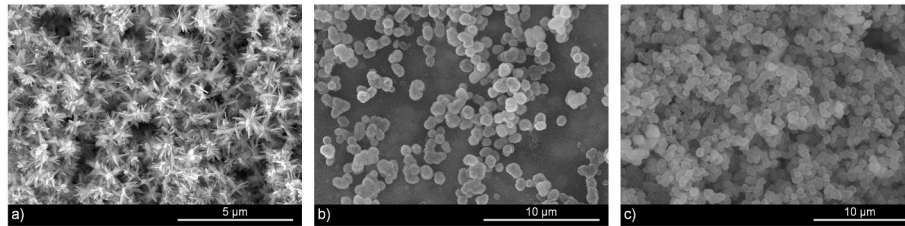


Fig. 6. SEM images of the SrP hollow spheres prepared with different Mg concentrations at 120 °C for 24 h: (a) without Mg; (b) 0.45 mM and (c) 0.9 mM of Mg.

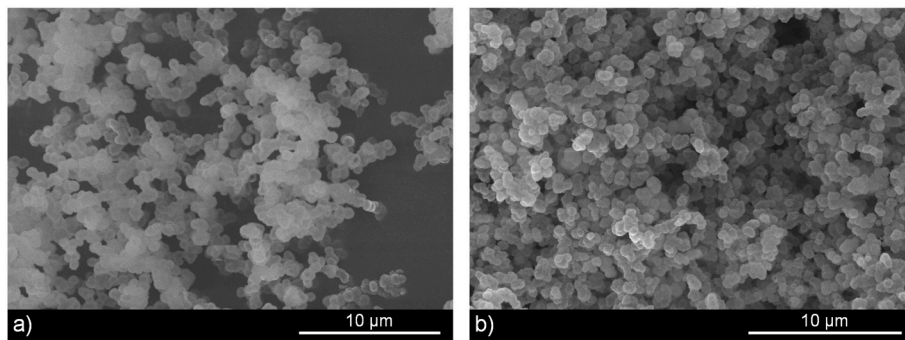


Fig. 7. SEM images of the SrP hollow spheres synthesized at different reaction temperatures for 24 h: (a) 60 °C and (b) 120 °C.

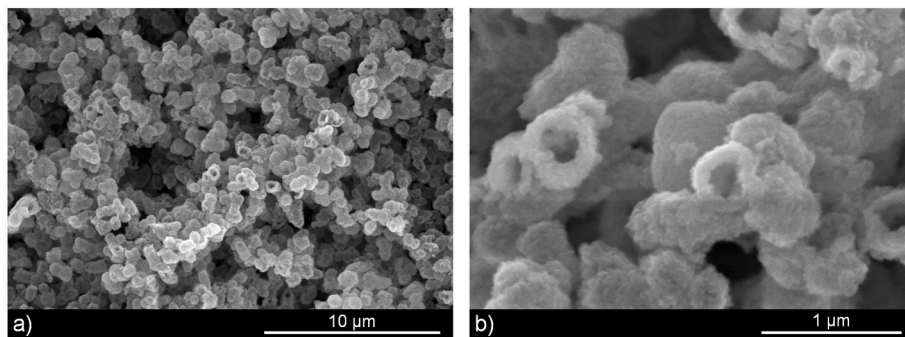


Fig. 8. SEM images of the SrP hollow spheres after a second hydrothermal treatment at 120 °C for 24 h.

the different immersion periods. The  $\text{Ca}^{2+}$  concentration considerably lowered on the first 7 days, after which it slightly rose until day 14, to once again decrease to a final concentration of 47.55 mg/L on the last day. The  $\text{Si}^{4+}$  concentration increased significantly during the experiment, and went from 0.05 mg/L to 14.22 mg/L. On the contrary, the  $\text{PO}_4^{3-}$  concentration dropped throughout the assay and went from an initial value of 28.28 mg/L to a concentration of 11.28 mg/L on day 21.  $\text{Sr}^{2+}$  and  $\text{Mg}^{2+}$  ions were also released to the SBF solution, up to a final concentration of 0.57 mg/L and 31.67 mg/L, respectively.

#### 4. Discussion

The objective of this research was to develop bone substitute materials with increase delivery capacity for bone tissue engineering applications. In this context, the incorporation of a delivery system like hollow spheres directly onto scaffolds, for the local release of therapeutic substances offers the possibility of controlled release at the implant site, improving the bioavailability of substances, while minimizing the possible toxic side effects normally associated with fast burst releases.

Ceramic scaffolds were synthesized by the sol-gel and polymeric

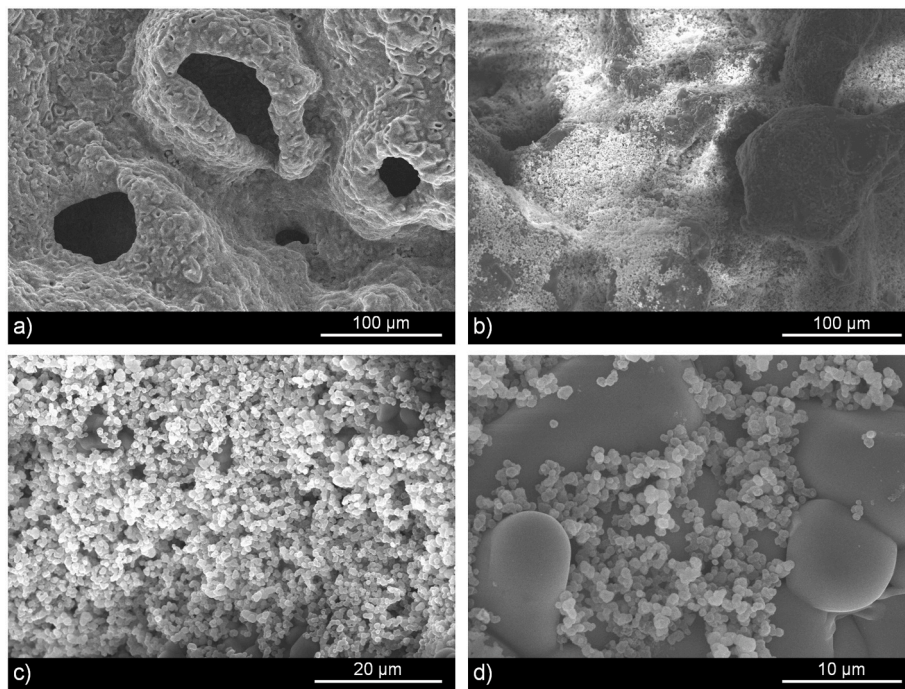


Fig. 9. SEM images of the CaP scaffolds with incorporated SrP hollow spheres: (a) control without spheres; (b) low-magnification and (c, d) high-magnification.

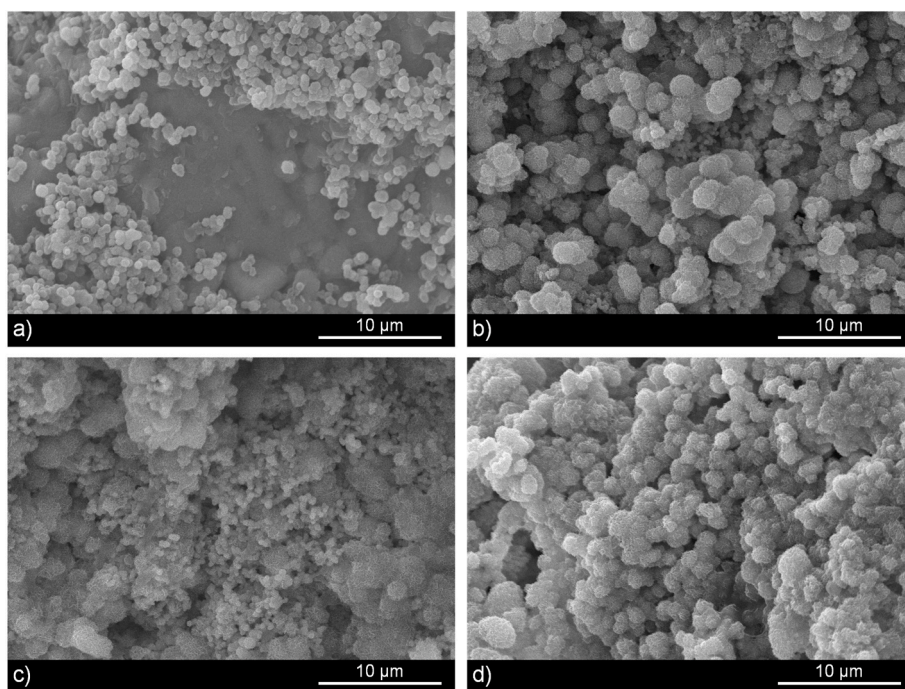


Fig. 10. SEM images of the CaP scaffolds with incorporated spheres soaked in SBF at 37 °C for: (a) 3 days; (b) 7 days; (c) 14 days and (d) 21 days.

sponge replication methods. The combination of these techniques allows us to obtain materials with high interconnected porosity resembling that of trabecular bone in a simple and cost-effective manner and has been commonly employed for the synthesis of 3D porous scaffolds for BTE applications [25,28]. According to SEM observations, scaffolds presented interconnected porosity, which is essential for new bone tissue ingrowth, as it allows the cell migration and proliferation, as well as the vascularization of newly formed tissue [29,30]. Moreover, an interconnected porosity is also necessary for nutrient and metabolic waste transport [22]. Scaffolds' core was composed of Ca, P and O, with a Ca/P

ratio of about 1.0, which corresponds to that of CPP ( $\text{Ca}_2\text{O}_7\text{P}_2$ ), a type of CaP formed by the pyrophosphate anion ( $\text{P}_2\text{O}_7^{4-}$ ). As confirmed by the XRD analysis, scaffolds consisted of a main CPP phase (COD-96-100-1557), which indicates the materials' high purity (Fig. 1b).

Scaffolds had a total porosity value of 37.79% and a pore size distribution within the 169.80–0.01  $\mu\text{m}$  range (Fig. 2). The largest mercury intrusion volume corresponded to interparticle spaces (23.73%), with pores of around 78.08  $\mu\text{m}$ , 27.41  $\mu\text{m}$  and 14.41  $\mu\text{m}$ . The rest of the intruded volume corresponded to intraparticle spaces (14.05%) with an

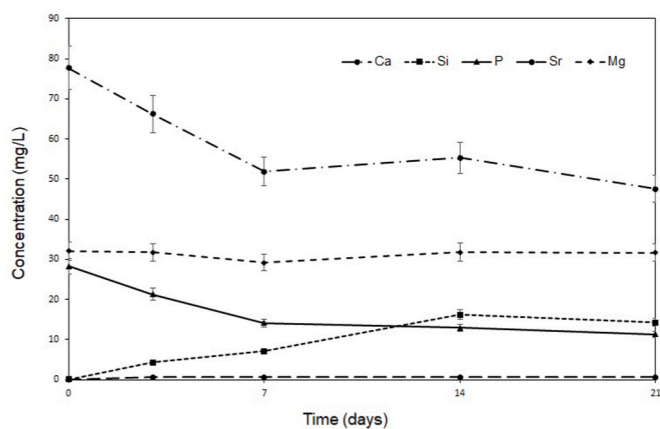


Fig. 11. Changes in the  $\text{Sr}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Si}^{4+}$  and  $\text{PO}_4^{3-}$  concentrations after immersion in SBF for 3, 7, 14 and 21 days.

average pore size of 0.06  $\mu\text{m}$ . Scaffolds' porosity is one of the key aspects that needs to be considered when designing these structures, because an adequate porosity is necessary for effective bone regeneration. According to pore size, porosity can be classified into two categories: macroporosity ( $>100 \mu\text{m}$ ), which is necessary for cellular colonization as well as vascularization and microporosity ( $<10 \mu\text{m}$ ), which increases ionic exchange and protein adsorption [22,31]. Scaffolds had an adequate pore size, but their total porosity was slightly lower than that of trabecular or cancellous bone, which is in the range of 50–90% [30].

Scaffolds' mechanical properties are important for their possible application in BTE, because they need to be able to withstand sufficient pressure during surgery and new bone tissue formation. Their compressive strength before and after incorporating the hollow spheres was about 1.51 MPa and 1.78 MPa, respectively. The scaffolds with incorporated spheres presented a similar compressive strength to that of the scaffolds alone. In both cases, these values are among the highest for porous ceramic scaffolds, where values of 0.9–1.6 MPa and 1.0–1.7 MPa have been reported [32,33]. Although these values are lower than that of the trabecular bone, ranging between 2 and 12 MPa [34], it is generally accepted that the scaffolds' mechanical strength increases considerably with new bone tissue ingrowth [9].

To control the local release of therapeutic substances from scaffolds, their surface morphology was modified by incorporating hollow spheres as a drug delivery system. Hollow spheres were synthesized by a template-free hydrothermal method, which is a solution-based approach, that allows us to obtain particles with a defined morphology and composition under conditions of high temperature and pressure. This method has been commonly used for the fabrication of hollow spheres over the past few years [8,10].

The morphology of the particles obtained by the hydrothermal method was spherical with hollow interiors of about 350 nm in size, as the observation of some broken or not fully formed spheres revealed (Fig. 3c). They had a rough surface because they were probably formed by many small crystallites, and a shell thickness of about 196 nm. The EDX analysis of spheres revealed that they were composed of Sr, P, O and Mg, with an Sr/P ratio of 1.0, which corresponds to that of strontium hydrogen phosphate ( $\text{SrHPO}_4$ ). The synthesized spheres had a marked tendency to aggregate with one another, which is a common thing in the synthesis of nano-/microparticles ( $<1\text{--}10 \mu\text{m}$ ), which are much more prone to agglomeration than larger particles [12,13]. Moreover, the drying process is a very critical step, particularly in the presence of water, as it can promote the agglomeration of previously loose particles.

The size of spheres was in the range of 600 nm–1  $\mu\text{m}$  and varied slightly with the synthesis conditions. Hollow spheres with sizes of 300–650 nm and 0.8–2  $\mu\text{m}$  have been successfully employed to load drugs like alendronate [35] and doxorubicin [10], respectively.

Therefore, according to the previous literature, the size of the herein synthesized SrP hollow spheres would be appropriate for drug delivery applications.

XRD analysis was conducted to determine the phase composition and crystallinity of the synthesized spheres (Fig. 1a). Precipitates consisted of a main Mg-substituted strontium phosphate phase ( $(\text{Sr}_{0.86}\text{Mg}_{0.14})_3(\text{PO}_4)_2$ ) and some minor phases:  $\text{Mg}_2\text{O}_7\text{P}_2$ ,  $\text{Sr}_3(\text{PO}_4)_2$  and  $\text{Sr}_2(\text{P}_6\text{O}_{17})$ . The broad and weak diffraction peaks indicated that spheres had poor crystallinity, which could be due to them being composed of nanometer-sized crystals, to the ionic substitution of  $\text{Mg}^{2+}$  for  $\text{Sr}^{2+}$  ions in the apatite lattice, or a combination of both [13,36,37]. Whatever the reason, materials with low crystallinity are known to have higher biodegradation rates.

To determine the specific surface area and porous structure of the hollow spheres, the BET and BJH methods were applied to the  $\text{N}_2$  adsorption/desorption isotherms (Fig. 4). Spheres had a mesoporous structure with a pore size distribution between 1.43 and 7.75 nm, and an average pore size of 3.8 nm. Mesopores probably formed due to the existing spaces between nanocrystals in the shell of spheres [38]. Moreover, a pore size of  $\sim 3 \text{ nm}$  is considered appropriate for the effective loading and release of various drugs [39]. A high surface area and a mesoporous structure are important characteristics for an efficient adsorption and release of compounds [29,40]. These characteristics, together with their hollow interiors, confer them a much greater loading capacity compared with other types of structures, which make them ideal candidates to be used as drug carriers.

Regarding the hollow structure formation, we believe that a dissolution-recrystallization process, also known as Ostwald ripening, was the underlying mechanism responsible for the formation of hollow spheres. During the hydrothermal reaction, the inner crystallites gradually dissolve and move outwards, where outer crystallites serve as nucleation points for subsequent recrystallization. With enough ripening time, solid core dissolution results in the formation of hollow spheres [40].

It is known that precipitates' morphology and size very much depend on the hydrothermal temperature, reaction time and concentration of reactants [35,41]. To study the synthesis process, and to determine optimal hydrothermal conditions, different reaction parameters were studied. First, time-dependent experiments were conducted at a fixed temperature of 120  $^\circ\text{C}$ . Fig. 5 shows SEM images of the SrP hollow spheres synthesized for different reaction times. After a 6 h hydrothermal reaction time, some spherical particles had formed, and hollow spheres were observed after 12 h. Prolonging the reaction time to 24 h gave the best results, with well-defined and less aggregated spherical particles. Moreover, with longer synthesis times, more hollow particles are expected to form, as solid to hollow transformation is a time-dependent process [35].

Another key factor in the formation of spherical particles, apart from the reaction temperature and time, is the concentration of reactants, and Mg is particularly known to be a microstructural modifier [13]. To investigate the influence of Mg on precipitates' morphology, different Mg concentrations were used to synthesize hollow spheres. As shown in Fig. 6a, the particles obtained when Mg was absent were not spherically shaped, and instead presented a flower-like morphology. When the Mg concentration was increased to 0.45 mM and especially to 0.9 mM, spherical particles formed. Mg plays a critical role in the formation of spheres because it causes the distortion of the crystal structure, inhibiting crystal growth and allowing for self-assembly into spherical particles [13,42]. It is important to note that changes in the concentrations of Sr and P precursors had no significant effect on precipitates' morphology and size, being Mg the most important element for the formation of spheres.

The hydrothermal reaction temperature is also an important factor that influences precipitates' crystallinity and morphology [41,43]. Therefore, different synthesis temperatures (30, 60 and 120  $^\circ\text{C}$ ) were studied (Fig. 7). The 30  $^\circ\text{C}$  reaction temperature were insufficient and no

precipitate was obtained. At 60 °C, some spherical particles were observed, but the number of precipitates was relatively small. Conversely, with 120 °C, many precipitated spheres formed. High temperatures are essential for the formation of hollow structures because they promote the dissolution and diffusion of the inner crystallites from the solid core to the outer shell.

When spheres were hydrothermally treated a second time, a change in their morphology was observed. Particles presented a less spherical shape and, more importantly, a larger amount of open hollow spheres was obtained (Fig. 8). This could potentially increase the loading efficiency of therapeutic substances by making it easier for larger amounts of these compounds to adsorb on their open hollow interiors. Afterwards, to prevent a burst release, open hollow spheres can be coated with a biodegradable polymer, such as collagen or PLGA, which can help delay the drug release rate [22,29].

The SEM analysis of scaffolds confirmed that the SrP hollow spheres had been successfully incorporated and were well distributed all along the surface (Fig. 9). This was tested several times and with varying amounts of dispersed spheres, resulting in the successful incorporation of the spheres into the scaffolds' surface each time. Spheres' size and morphology remained the same after their incorporation, and some spheres with their exposed hollow interiors were observed. More importantly, the small dimensions of the synthesized spheres did not affect the scaffolds' interconnected porosity. Hollow spheres attachment most likely occurred via non-covalent bonding like electrostatic interactions between the  $\text{Sr}^{2+}$  of spheres and the  $\text{PO}_4^{3-}$  of the CaP material.

To the best of our knowledge, the incorporation of SrP hollow spheres into CaP porous scaffolds has not been previously reported in the literature. To date, hollow nano-/microspheres made of polymeric or ceramic materials have already been used as carriers for the local delivery of therapeutic substances. Xiao et al. [44] fabricated BMP2-loaded hollow HA microspheres and evaluated their bone regeneration capacity when implanted in rat calvarial defects for up to 6 weeks. The amount of new bone in the defects after 6 weeks was 43%, compared to 17% for defects implanted with microspheres without BMP-2. Furthermore, BMP2-loaded microspheres showed greater bone regeneration than 3D HA scaffolds loaded with twice the amount of BMP-2. However, little resorption of the HA microspheres was observed within the implantation period. Although CaPs like HA have a great adsorption capacity, the release of the adsorbed compounds is often dependent on the resorption rate of the material, which for HA, is known to be very low under physiological conditions [2,15]. In this context, SrPs, which are chemically similar to CaPs, are an interesting alternative. SrP materials are known to be biocompatible, biodegradable, osteoconductive and, in some cases, even osteoinductive [21]. Moreover, SrPs have an adsorption capacity comparable to that of CaPs [17].

Previous studies demonstrate that therapeutic substances can be effectively delivered to injured sites via spherical particles incorporated into bone substitute scaffolds to promote osteogenesis *in vivo* [24,45]. This strategy offers the possibility of a controlled release at the implant site, which improves the bioavailability of the substances while minimizing potential toxic side effects that are normally associated with an uncontrolled burst release. Therefore, the development of bone substitute materials with enhanced delivery capacity represents a topic of interest.

The *in vitro* bioactivity of the CaP scaffolds with incorporated hollow spheres was evaluated by immersion in SBF solution, with an ionic composition similar to that of human blood plasma, as established by Kokubo and Takadama [26]. Prior to the incorporation of spheres, scaffolds were coated with a bioactive composition for the external layers doped with 3% of  $\text{Mg}^{2+}$  ions, which are known to promote apatite nucleation and growth [33]. Fig. 10b shows that after 7 days, bone-like apatite precipitates had formed on scaffolds' surface. These precipitates were composed of Ca, P and O, with a Ca/P ratio of  $\sim 1.5$ , which is slightly lower than the stoichiometric one for HA (1.67), indicating the formation of calcium-deficient hydroxyapatite (CDHA) [9,22]. Apatite

precipitates partially dissolved after 14 days in SBF (Fig. 10c) and precipitated again after 21 days to form a dense layer on the surface (Fig. 10d). The formation of an apatite layer on scaffolds' surface after 7 and 14 days, and especially after 21 days, confirmed the *in vitro* bioactive capacity of the scaffolds with incorporated spheres, which is a desirable characteristic for BTE applications. Furthermore, hollow spheres were still attached to scaffolds' surface after 14 days, which denotes their good stability *in vitro* and their potential capacity for a slow and sustained release of therapeutic substances.

On bioactive materials, it is well known that bone-like apatite forms on the surface due to the ionic exchange between the ceramic material and SBF. Therefore, the changes in the concentrations of  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Si}^{4+}$  and  $\text{PO}_4^{3-}$  ions after the different soaking periods in SBF were analyzed by ICP-OES (Fig. 11). The  $\text{Ca}^{2+}$  concentration lowered on the first 7 days, when the first CDHA precipitates started to appear. After this time, the  $\text{Ca}^{2+}$  concentration slightly rose to one of 55.29 mg/L on day 14, probably due to the partial dissolution of the previously formed precipitates, before lowering again to one of 47.55 mg/L on the last day, which was when CDHA precipitated again. The  $\text{Si}^{4+}$  concentration continuously increased from 0.05 mg/L on the first day to 16.19 mg/L on day 14, when it dropped slightly to a final concentration of 14.22 mg/L. This sustained release of  $\text{Si}^{4+}$  ions is related to scaffold degradation. The  $\text{PO}_4^{3-}$  concentration steadily decreased from 28.28 mg/L to 11.28 mg/L by the end of the experiment, as the  $\text{PO}_4^{3-}$  ions from the SBF reacted with the  $\text{Ca}^{2+}$  ion released from scaffolds to form CDHA, which precipitated on scaffolds' surface.

We also studied the release of  $\text{Sr}^{2+}$  and  $\text{Mg}^{2+}$  ions to determine spheres' degradation behavior. The  $\text{Sr}^{2+}$  concentration increased throughout the assay, going from 0.03 mg/L to a final concentration of 0.57 mg/L on day 21. Moreover, the concentration of  $\text{Sr}^{2+}$  ions released from scaffolds fell within the 0.001 mM–0.2 mM range, which has been demonstrated to stimulate osteoblast proliferation [31]. The  $\text{Mg}^{2+}$  concentration remained stable and lowered from 32.03 mg/L to about 31.67 mg/L, probably due to the incorporation of the released ions in the CDHA precipitates partially substituting the  $\text{Ca}^{2+}$  ions. The release of  $\text{Sr}^{2+}$  and  $\text{Mg}^{2+}$  ions indicated that spheres started to degrade after the first 7 days.  $\text{Sr}^{2+}$  and  $\text{Mg}^{2+}$  ions can synergistically enhance cell growth and osteoblastic differentiation, while inhibiting osteoclastic activity at the same time [39,46].

We believe that the incorporation of a local delivery system into bone substitute scaffolds is a promising strategy to achieve a controlled release of therapeutic substances for the *in situ* treatment of infected or damaged bone tissue as an alternative to the systemic administration of these substances. In future studies, it would be of interest to load the synthesized spheres with therapeutic agents (i.e., anti-inflammatory drugs, antibiotics, growth factors, etc.) to determine their loading and releasing efficiencies *in vitro*.

## 5. Conclusion

In this study, novel multifunctional 3D CaP porous scaffolds were developed by incorporating SrP hollow nano-/microspheres for enhanced drug delivery capacity. The calcium pyrophosphate scaffolds presented an interconnected porosity, with a porosity value of 37.79%, and a compressive strength of around 1.56–1.98 MPa.

The SrP hollow spheres with a size between 600 nm–1  $\mu\text{m}$  were obtained by a simple hydrothermal method without any surfactant or template, just by adjusting the reaction temperature, time, and the concentration of reactants. Furthermore, to control the opening of spheres and to, thus, be able to introduce drugs of different sizes, a new procedure was developed to achieve their opening prior to the incorporation into the scaffolds. When spheres were hydrothermally treated a second time, more open hollow particles were obtained.

Spheres were incorporated into scaffolds' surface by immersion in an ethanol solution with dispersed hollow spheres at 37 °C for 4 h. The obtained scaffolds presented a large quantity of spheres homogeneously

distributed along the surface, which were superficially adsorbed through electrostatic interactions. The *in vitro* bioactive capacity of the scaffolds with incorporated spheres was also investigated. Scaffolds were bioactive after 7 days in SBF. Furthermore, hollow spheres remained adhered to their surface after 14 days of immersion. These spheres could potentially be used to load and deliver therapeutic agents to enhance the bone regeneration process. Multifunctional scaffolds with incorporated spheres are a promising alternative to the traditional scaffolds currently used in BTE.

### Funding source

This work is part of the project PID2020-116693RB-C21 funded by MCIN/AEI/10.13039/501100011033 Spain. Grant CIAICO/2021/157 funded by Generalitat Valenciana Spain.

### Declaration of competing interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

### References

- [1] Y. Xu, L. An, L. Chen, H. Xu, D. Zeng, G. Wang, Controlled hydrothermal synthesis of strontium-substituted hydroxyapatite nanorods and their application as a drug carrier for proteins, *Adv. Powder Technol.* 29 (2018) 1042–1048, <https://doi.org/10.1016/j.apt.2018.01.008>.
- [2] G. Singh, R.P. Singh, S.S. Jolly, Customized hydroxyapatites for bone-tissue engineering and drug delivery applications: a review, *J. Sol. Gel Sci. Technol.* 94 (2020) 505–530, <https://doi.org/10.1007/s10971-020-05222-1>.
- [3] S.F. Soares, T. Fernandes, A.L. Daniel-Da-Silva, T. Trindade, The controlled synthesis of complex hollow nanostructures and prospective applications, *Proc. Math. Phys. Eng. Sci.* 475 (2019), <https://doi.org/10.1098/rspa.2018.0677>.
- [4] C. Zhang, S. Shan, T. Hu, G. Wang, Y. Zhi, H. Su, L. Jiang, Y. Ni, Recent progress on biomedical applications of functionalized hollow hydroxyapatite microspheres, *Ceram. Int.* 47 (2021) 13552–13571, <https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2021.01.214>.
- [5] H. Fu, M.N. Rahaman, D.E. Day, R.F. Brown, Hollow hydroxyapatite microspheres as a device for controlled delivery of proteins, *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 22 (2011) 579–591, <https://doi.org/10.1007/s10856-011-4250-6>.
- [6] D. Feng, J. Shi, X. Wang, L. Zhang, S. Cao, Hollow hybrid hydroxyapatite microparticles with sustained and pH-responsive drug delivery properties, *RSC Adv.* 3 (2013) 24975–24982, <https://doi.org/10.1039/c3ra44609c>.
- [7] Y. Jiao, Y.P. Lu, G.Y. Xiao, W.H. Xu, R.F. Zhu, Preparation and characterization of hollow hydroxyapatite microspheres by the centrifugal spray drying method, *Powder Technol.* 217 (2012) 581–584, <https://doi.org/10.1016/j.powtec.2011.11.025>.
- [8] Y.J. Guo, Y.Y. Wang, T. Chen, Y.T. Wei, L.F. Chu, Y.P. Guo, Hollow carbonated hydroxyapatite microspheres with mesoporous structure: hydrothermal fabrication and drug delivery property, *Mater. Sci. Eng. C* 33 (2013) 3166–3172, <https://doi.org/10.1016/j.msec.2013.03.040>.
- [9] S.C. Wu, H.C. Hsu, S.K. Hsu, F.W. Lin, W.F. Ho, Preparation and characterization of porous calcium-phosphate microspheres, *Ceram. Int.* 41 (2015) 7596–7604, <https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2015.02.084>.
- [10] W. Lai, C. Chen, X. Ren, I.S. Lee, G. Jiang, X. Kong, Hydrothermal fabrication of porous hollow hydroxyapatite microspheres for a drug delivery system, *Mater. Sci. Eng. C* 62 (2016) 166–172, <https://doi.org/10.1016/j.msec.2016.01.055>.
- [11] B. Liu, X. Hu, Hollow micro- and nanomaterials: synthesis and applications, in: *Advanced Nanomaterials for Pollutant Sensing and Environmental Catalysis*, Elsevier, 2019, pp. 1–38, <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814796-2.00001-0>.
- [12] W. Wen-shou, X. Cheng-Yan, Y. Li, S. Wen-Zhu, Controlled synthesis of calcium tungstate hollow microspheres via ostwald ripening and their photoluminescence property, *J. Phys. Chem. C* 112 (2008) 19390–19398, <https://doi.org/10.1021/jp8074783>.
- [13] C. Berg, H. Engqvist, W. Xia, Ion substitution induced formation of spherical ceramic particles, *Ceram. Int.* 45 (2019) 10385–10393, <https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2019.02.097>.
- [14] K.M.Z. Hossain, U. Patel, I. Ahmed, Development of microspheres for biomedical applications: a review, *Prog. Biomater.* 4 (2015) 1–19, <https://doi.org/10.1007/s40204-014-0033-8>.
- [15] H. Fu, M.N. Rahaman, R.F. Brown, D.E. Day, Evaluation of bone regeneration in implants composed of hollow HA microspheres loaded with transforming growth factor  $\beta$ 1 in a rat calvarial defect model, *Acta Biomater.* 9 (2013) 5718–5727, <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2012.11.017>.
- [16] J. Christoffersen, M.R. Christoffersen, N. Kolthoff, O. Bärenholdt, Effects of strontium ions on growth and dissolution of hydroxyapatite and on bone mineral detection, *Bone* 20 (1997) 47–54, [https://doi.org/10.1016/S8756-3282\(96\)00316-X](https://doi.org/10.1016/S8756-3282(96)00316-X).
- [17] M. Schumacher, M. Gelinsky, Strontium modified calcium phosphate cements - approaches towards targeted stimulation of bone turnover, *J. Mater. Chem. B* 3 (2015) 4626–4640, <https://doi.org/10.1039/c5tb00654f>.
- [18] K. Lin, P. Liu, L. Wei, Z. Zou, W. Zhang, Y. Qian, Y. Shen, J. Chang, Strontium substituted hydroxyapatite porous microspheres: surfactant-free hydrothermal synthesis, enhanced biological response and sustained drug release, *Chem. Eng. J.* 222 (2013) 49–59, <https://doi.org/10.1016/j.cej.2013.02.037>.
- [19] M.H. Frere, The solubility of some strontium phosphates, *Soil Sci. Soc. Am. J.* 26 (1962) 48–51, <https://doi.org/10.2136/sssaj1962.03615995002600010013x>.
- [20] C. Zhang, Z. Cheng, P. Yang, Z. Xu, C. Peng, G. Li, J. Lin, Architectures of strontium hydroxyapatite microspheres: solvothermal synthesis and luminescence properties, *Langmuir* 25 (2009) 13591–13598, <https://doi.org/10.1021/la9019684>.
- [21] H. Shi, T. Wu, J. Zhang, X. Ye, S. Zeng, X. Liu, T. Yu, J. Ye, C. Zhou, Biocompatible  $\beta$ -SrHPO<sub>4</sub> clusters with dandelion-like structure as an alternative drug carrier, *Mater. Sci. Eng. C* 81 (2017) 8–12, <https://doi.org/10.1016/j.msec.2017.07.034>.
- [22] S. Bose, S. Tarafder, Calcium phosphate ceramic systems in growth factor and drug delivery for bone tissue engineering: a review, *Acta Biomater.* 8 (2012) 1401–1421, <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2011.11.017>.
- [23] B. Wan, R. Wang, Y. Sun, J. Cao, H. Wang, J. Guo, D. Chen, Building osteogenic microenvironments with strontium-substituted calcium phosphate ceramics, *Front. Bioeng. Biotechnol.* 8 (2020), <https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.591467>.
- [24] J.S. Son, M. Appleford, J.L. Ong, J.C. Wenke, J.M. Kim, S.H. Choi, D.S. Oh, Porous hydroxyapatite scaffold with three-dimensional localized drug delivery system using biodegradable microspheres, *J. Contr. Release* 153 (2011) 133–140, <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2011.03.010>.
- [25] P. Ros-Tárraga, A. Murciano, P. Mazón, S.A. Gehrke, P.N. de Aza, New 3D stratified Si-Ca-P porous scaffolds obtained by sol-gel and polymer replica method: microstructural, mineralogical and chemical characterization, *Ceram. Int.* 43 (2017) 6548–6553, <https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2017.02.081>.
- [26] T. Kokubo, H. Takadama, How useful is SBF in predicting *in vivo* bone bioactivity? *Biomaterials* 27 (2006) 2907–2915, <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2006.01.017>.
- [27] M. Thommes, K. Kaneko, A.v. Neimark, J.P. Olivier, F. Rodriguez-Reinoso, J. Rouquerol, K.S.W. Sing, Physisorption of gases, with special reference to the evaluation of surface area and pore size distribution (IUPAC Technical Report), *Pure Appl. Chem.* 87 (2015) 1051–1069, <https://doi.org/10.1515/pac-2014-1117>.
- [28] S.N.L. Ramlie, N.S.A.N. Sharifulden, H. Mohamad, S.N.F.M. Noor, Sol-gel derived bioactive glass scaffolds incorporated with polyvinyl-alcohol and pluronic P123 polymers using sponge replication technique, *Mater. Today Proc.* 17 (2019) 966–975, <https://doi.org/10.1016/J.MATPR.2019.06.463>.
- [29] D. Loca, J. Locs, A. Dubnika, V. Zalite, L. Berzina-Cimdina, Porous hydroxyapatite for drug delivery, in: *Hydroxyapatite (Hap) for Biomedical Applications*, Elsevier, 2015, pp. 189–209, <https://doi.org/10.1016/b978-1-78242-033-0.00009-2>.
- [30] M. Kucharska, K. Walenko, M. Lewandowska-Szumiel, T. Brynck, J. Jaroszewicz, T. Ciach, Chitosan and composite microsphere-based scaffold for bone tissue engineering: evaluation of tricalcium phosphate content influence on physical and biological properties, *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 26 (2015), <https://doi.org/10.1007/s10856-015-5464-9>.
- [31] S. Meiningner, C. Moseke, K. Spatz, E. März, C. Blum, A. Ewald, E. Vorndran, Effect of strontium substitution on the material properties and osteogenic potential of 3D powder printed magnesium phosphate scaffolds, *Mater. Sci. Eng. C* 98 (2019) 1145–1158, <https://doi.org/10.1016/j.msec.2019.01.053>.
- [32] P. Ros-Tárraga, N.A. Mata, Á. Murciano, P. Velasquez, P.N. de Aza, Multilayer ceramic materials: a method to link bioactivity and durability, *Ceram. Int.* 45 (2019) 23611–23618, <https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2019.08.072>.
- [33] N.A. Mata, P. Ros-Tárraga, P. Velasquez, A. Murciano, P.N. de Aza, 3D Multiphase Porous Scaffolds of Calcium Phosphates Doping with Silicon and Magnesium, *Boletín de La Sociedad Española de Cerámica y Vidrio*, 2021, <https://doi.org/10.1016/j.bsecv.2021.03.004>.
- [34] T.M. de Witte, L.E. Fratila-Apachitei, A.A. Zadpoor, N.A. Peppas, Bone tissue engineering via growth factor delivery: from scaffolds to complex matrices, *Regen. Biomater.* 5 (2018) 197–211, <https://doi.org/10.1093/rb/rby013>.
- [35] H. Duan, J. Diao, N. Zhao, Y. Ma, Synthesis of hollow mesoporous bioactive glass microspheres with tunable shell thickness by hydrothermal-assisted self-transformation method, *Mater. Lett.* 167 (2016) 201–204, <https://doi.org/10.1016/j.matlet.2015.12.162>.
- [36] H. Zhou, M. Nedley, S.B. Bhaduri, The impacts of Mg<sup>2+</sup> on strontium phosphate: a preliminary study, *Mater. Lett.* 113 (2013) 63–66, <https://doi.org/10.1016/j.matlet.2013.09.079>.
- [37] L. Xiong, J. Zeng, A. Yao, Q. Tu, J. Li, L. Yan, Z. Tang, BMP2-loaded hollow hydroxyapatite microspheres exhibit enhanced osteoinduction and osteogenicity in large bone defects, *Int. J. Nanomed.* 10 (2015) 517–526, <https://doi.org/10.2147/IJN.S74677>.
- [38] H. Duan, Y. Ma, X. Liu, L. Hao, N. Zhao, Hierarchically nanostructured hydroxyapatite microspheres as drug delivery carriers and their effects on cell viability, *RSC Adv.* 5 (2015) 83522–83529, <https://doi.org/10.1039/c5ra11956a>.
- [39] G.K. Pouroutzidou, L. Liverani, A. Theocharidou, I. Tsamesidis, M. Lazaridou, E. Christodoulou, A. Beketova, C. Pappa, K.S. Triantafyllidis, A.D. Anastasiou, L. Papadopoulou, D.N. Bikiaris, A.R. Boccaccini, E. Kontonasi, Synthesis and characterization of mesoporous Mg- and Sr-doped nanoparticles for moxifloxacin drug delivery in promising tissue engineering applications, *Int. J. Mol. Sci.* 2021 (2021) 577, <https://doi.org/10.3390/ijms>.
- [40] S.D. Jiang, Q.Z. Yao, G.T. Zhou, S.Q. Fu, Fabrication of hydroxyapatite hierarchical hollow microspheres and potential application in water treatment, *J. Phys. Chem. C* 116 (2012) 4484–4492, <https://doi.org/10.1021/jp211648x>.

- [41] Y. Zhu, L. Xu, C. Liu, C. Zhang, N. Wu, Nucleation and growth of hydroxyapatite nanocrystals by hydrothermal method, *AIP Adv.* 8 (2018), <https://doi.org/10.1063/1.5034441>.
- [42] T. Qin, P. Zhang, I.H. Wani, Y. Han, K. Leifer, F. Nikolajeff, H. Engqvist, A general strategy for template-free and low-cost synthesis of inorganic hollow spheres, *Powder Technol.* 319 (2017) 163–171, <https://doi.org/10.1016/j.powtec.2017.06.051>.
- [43] M. Sadat-Shojai, M.T. Khorasani, E. Dinpanah-Khoshdargi, A. Jamshidi, Synthesis methods for nanosized hydroxyapatite with diverse structures, *Acta Biomater.* 9 (2013) 7591–7621, <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2013.04.012>.
- [44] W. Xiao, H. Fu, M.N. Rahaman, Y. Liu, B.S. Bal, Hollow hydroxyapatite microspheres: a novel bioactive and osteoconductive carrier for controlled release of bone morphogenetic protein-2 in bone regeneration, *Acta Biomater.* 9 (2013) 8374–8383, <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2013.05.029>.
- [45] A.H. Yao, X.D. Li, L. Xiong, J.H. Zeng, J. Xu, D.P. Wang, Hollow hydroxyapatite microspheres/chitosan composite as a sustained delivery vehicle for rhBMP-2 in the treatment of bone defects, *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 26 (2015) 1–12, <https://doi.org/10.1007/s10856-014-5336-8>.
- [46] F. He, T. Lu, X. Fang, C. Qiu, Y. Tian, Y. Li, F. Zuo, J. Ye, Study on Mg<sub>x</sub>Sr<sub>3-x</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> bioceramics as potential bone grafts, *Colloids Surf. B Biointerfaces* 175 (2019) 158–165, <https://doi.org/10.1016/J.COLSURFB.2018.11.085>.