



**UNIVERSIDAD DE CHILE**  
**FACULTAD DE ODONTOLÓGÍA**  
**INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS ODONTOLÓGICAS**  
**LABORATORIO DE NANOBIO MATERIALES**

**“SÍNTESIS DE NANOPARTÍCULAS DE VIDRIO BIOACTIVO DOPADAS  
CON LITIO Y EVALUACIÓN DE SU CAPACIDAD DE DIFERENCIACIÓN  
OSTEOGÉNICA DE CÉLULAS MADRE”**

**Camila Margarita Torres Ceballos**

**TRABAJO DE INVESTIGACIÓN**

**REQUISITO PARA OPTAR AL TÍTULO DE**

**CIRUJANO-DENTISTA**

**TUTOR PRINCIPAL:**

**Prof. Dr. Cristián Covarrubias Gallardo**

**Adscrito a Proyecto U-Redes NanoBioMat URC 026/16**

**Santiago – Chile**

**2018**





**UNIVERSIDAD DE CHILE**  
**FACULTAD DE ODONTOLÓGÍA**  
**INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS ODONTOLÓGICAS**  
**LABORATORIO DE NANOBIO MATERIALES**

**“SÍNTESIS DE NANOPARTÍCULAS DE VIDRIO BIOACTIVO DOPADAS  
CON LITIO Y EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD DE DIFERENCIACIÓN  
OSTEOGÉNICA DE CÉLULAS MADRE”**

**Camila Margarita Torres Ceballos**

**TRABAJO DE INVESTIGACIÓN**

**REQUISITO PARA OPTAR AL TÍTULO DE**

**CIRUJANO-DENTISTA**

**TUTOR PRINCIPAL:**

**Prof. Dr. Cristián Covarrubias Gallardo**

**Adscrito a Proyecto U-Redes NanoBioMat URC 026/16**

**Santiago – Chile**

**2018**

## **Agradecimientos**

A mi familia, pololo y amigos por brindarme apoyo incondicional durante todos estos años.

A mi tutor de tesis, Dr. Cristian Covarrubias por su colaboración para la realización de este trabajo.

A todos los miembros del laboratorio de nanobiomateriales: profesores, compañeros tesisistas, y en especial a Miguel y Sandra, quienes siempre tuvieron excelente disposición en ayudarnos. También agradezco a Rocío Orellana, quien es la experta a cargo del microscopio electrónico de barrido de FOUCH.

A los docentes que me formaron y dieron lo mejor para que sea un buen profesional y a los funcionarios de FOUCH.

## ÍNDICE

1	<b>RESUMEN</b> .....	1
2	<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	3
3	<b>MARCO TEÓRICO</b> .....	4
3.1	Tratamientos actuales con injertos óseos.....	4
3.2	Nuevas Alternativas: Ingeniería de Tejidos (IT).....	7
3.3	Ingeniería de Tejidos y Nanotecnología.....	10
3.4	Factores bioactivos: Alternativas sintéticas.....	11
3.5	El litio y sus propiedades osteogénicas.....	13
4	<b>HIPÓTESIS Y OBJETIVOS</b> .....	17
4.1	Hipótesis.....	17
4.2	Objetivo General.....	17
4.3	Objetivos Específicos.....	17
5	<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	18
5.1	Síntesis de nBG.....	18
5.2	Síntesis de nBG-Li.....	18
5.3	Caracterización de nanopartículas de litio.....	19
5.4	Análisis de la composición elemental por EDX.....	19
5.5	Ensayo de bioactividad en fluido fisiológico simulado (SBF).....	20
5.6	Ensayos con células madre.....	21
5.6.1	Medios acondicionados con nanopartículas.....	21

5.6.2	Ensayo de viabilidad celular MTS .....	22
5.6.3	Actividad de fosfatasa alcalina (ALP) .....	22
5.7	Medición de la liberación de litio en fotómetro de llama.....	23
5.8	Análisis estadístico .....	24
<b>6</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	<b>25</b>
6.1	Síntesis y caracterización de nanopartículas.....	25
6.2	Ensayo de bioactividad en SBF .....	27
6.3	Ensayos de viabilidad celular (MTS).....	30
6.4	Actividad de fosfatasa alcalina (ALP) .....	31
6.5	Ensayos de viabilidad (MTS) y actividad de enzima fosfatasa alcalina (ALP) en presencia de litio soluble. ....	33
<b>7</b>	<b>DISCUSIÓN</b> .....	<b>35</b>
<b>8</b>	<b>CONCLUSIONES</b> .....	<b>40</b>
<b>9</b>	<b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.</b> ....	<b>41</b>
<b>10</b>	<b>ANEXOS Y APÉNDICES</b> .....	<b>48</b>
10.1	Acta de aprobación de protocolo de investigación .....	48
10.2	Consentimiento informado (participantes adultos).....	51
10.3	Asentimiento informado (menores de 18 y mayores de 11 años).....	54

## 1 RESUMEN

**Introducción:** La reparación de defectos óseos en el complejo maxilofacial es uno de los principales desafíos del quehacer odontológico. La altura del reborde alveolar puede verse afectada por traumatismos, enfermedad periodontal, exodoncias, implantes, entre otros. Para reparar estos defectos se utilizan autoinjertos, aloinjertos y xenoinjertos que poseen desventajas y limitaciones que impiden obtener resultados clínicos óptimos. Bajo este escenario, la ingeniería de tejidos y la nanotecnología juegan un rol importante mediante la obtención de materiales aloplásticos con propiedades osteogenerativas, osteoinductivas y osteoconductoras. Entre ellos, las nanopartículas biocerámicas como las de vidrio bioactivo (nBG) han demostrado ser osteogénicas.

Durante los últimos años se han venido estudiando elementos que potencien las propiedades osteogénicas del vidrio bioactivo, incorporando estroncio, cobre, magnesio y litio. Este último, ha evidenciado poseer capacidad osteogénica, condrogénica y odontogénica; sin embargo, su incorporación a nBG había sido escasamente estudiada, así como la citocompatibilidad y potencial de la nanopartícula dopada con litio (nBG-Li) para estimular la diferenciación osteogénica de células madre.

**Hipótesis:** Nanopartículas de vidrio bioactivo dopadas con ciertos contenidos de litio son citocompatibles, y tienen capacidad de diferenciación osteogénica de células madre mayor que su contraparte sin litio.

**Objetivos:** Sintetizar nanopartículas de vidrio bioactivo dopado con litio, evaluar su citocompatibilidad y su capacidad de potenciar la diferenciación osteogénica en células madre.

**Materiales y métodos:** Para la síntesis de nanopartículas se utilizó la técnica sol-gel, y se estudiaron los siguientes contenidos de litio: nBG-Li 10%, nBG-Li 20% y nBG-Li 40%mol. Adicionalmente se realizaron experimentos combinando nBG con iones  $\text{Li}^+$  solubles en el medio en concentraciones 10 y 15 mM.

Las partículas fueron caracterizadas a través de microscopía electrónica de transmisión (TEM). Las muestras obtenidas se prensaron formando pastillas que fueron sometidas a ensayo de bioactividad en fluido fisiológico simulado (SBF). Para los ensayos de MTS y ALP, que evalúan la citocompatibilidad y diferenciación osteogénica, respectivamente, se utilizaron medios acondicionados con las partículas mencionadas anteriormente durante 5 días a 37°C, y células madre provenientes de pulpa de terceros molares. Para la determinación de la liberación de litio en las nanopartículas dopadas se utilizó un fotómetro de llama.

**Resultados:** Las partículas nBG y nBG-Li sintetizadas presentaron tamaños nanométricos (50-60 nm). Todas las nanopartículas presentaron capacidad de inducir la formación de apatita en SBF. Los ensayos *in vitro* mostraron viabilidad de las células estudiadas (MTS) y diferenciación osteogénica de las mismas mediante el ensayo de actividad de la enzima fosfatasa alcalina (ALP). La presencia de litio en el proceso de síntesis permitió obtener nanopartículas más amorfas y, por lo tanto, más bioactivas, no obstante, no fue posible corroborar la correcta incorporación de litio en la estructura de las mismas, ya que solo una de ellas liberó cantidades de litio medibles en el medio de cultivo.

Se demostró que *in vitro* el litio mejora la expresión de ALP en combinación con nBG, no en la misma partícula, alcanzando niveles de absorbancia mayores al nBG por sí solo.

**Conclusiones:** • Se requieren estudios adicionales para obtener nBG con mayor contenido y niveles de liberación de litio. La síntesis de nBG en presencia de iones litio produce la formación de un vidrio más amorfo y, por lo tanto, más soluble que promueve una mayor formación de hidroxiapatita *in vitro* en contacto con SBF. Ciertas combinaciones de nBG con Li<sup>+</sup> disuelto en el medio, favorecen la diferenciación osteogénica celular respecto al nBG puro. Esto confirma que el litio puede ser utilizado como un elemento para mejorar la capacidad osteogénica de biomateriales utilizados en reconstrucción de tejido óseo.

## 2 INTRODUCCIÓN

La reparación de defectos óseos en el complejo craneomáxilofacial debido a traumas, resorción consecuente a pérdida dentaria o enfermedad periodontal, cáncer y enfermedades degenerativas como la osteoporosis, es uno de los principales desafíos clínicos en el campo odontológico (Ward B. y cols., 2010).

Posterior a una exodoncia, el alveolo sana de forma natural, sin embargo, el hueso pierde el estímulo de reabsorción y reaposición ósea debido a la ausencia de la articulación dentoalveolar, que es la que mantiene el equilibrio dinámico de este proceso de remodelación (Alikhani M. y cols., 2016). Este fenómeno, conocido como Reabsorción del Rebordado Residual está definido en la literatura como una enfermedad crónica, localizada y multifactorial (Atwood D. A., 1971).

Gran parte de la población adulta padece enfermedad periodontal. La periodontitis al ser una enfermedad inflamatoria crónica, provoca una pérdida importante de la altura y soporte óseo. Esta enfermedad se asocia a inflamación gingival, destrucción alveolar y pérdida del tejido de soporte, y consecuente a esto, exposición radicular, aumento en la movilidad dentaria y posterior exfoliación de las piezas (Haffajee A. D. y Socransky S. S., 1994; Pihlstrom B. L. y cols., 2005; Slots J. y cols., 1999; Sowmya S. y cols., 2011). Para tratar los defectos óseos, en el mundo se realizan 2,2 millones de cirugías de injertos de hueso al año.

La conservación de la altura ósea después de una extracción dentaria tiene un impacto significativo en la funcionalidad y apreciación estética del paciente ante futuros tratamientos (Klemetti E., 1996; Nemcovsky C. E. y Serfaty V., 1996; Wiesen M. y Kitzis R., 1998). Para obtener resultados favorables en la regeneración y preservación de tejido óseo, es imprescindible recurrir a terapias clínicas más eficaces, particularmente en aplicaciones quirúrgicas, implantológicas y periodontales.

La respuesta ósea dependerá de la cantidad de tejido alveolar perdido, siendo plausible la autoregeneración cuando este volumen sea pequeño, esto implicaría la restitución morfológica y funcional del hueso. En pérdidas volumétricas superiores, como son 8 mm de diámetro y 15 mm de profundidad, el organismo no será capaz de reparar el defecto de manera autónoma y formará un tejido cicatricial, sin sus propiedades idóneas (Campion C. R. y cols., 2011; Hutchens S. A. y cols., 2016).

En implantología, la disponibilidad de hueso es crítica en la continuidad y éxito del tratamiento. En los maxilares se realiza la cirugía de elevación de seno cuando el espesor de hueso entre el piso del seno maxilar y la cresta alveolar es menor a 5 mm, lo que imposibilita la colocación de implantes en esta zona sin la previa colocación de un injerto (Tan W. C. y cols., 2008). En mandíbula, cuando la distancia entre el reborde alveolar al canal mandibular es crítica, se sugiere colocar injertos para aumentar la altura alveolar con la finalidad de evitar lesiones en el nervio durante la colocación de implantes en esa zona (Ueda M., 2011).

### **3 MARCO TEÓRICO**

#### **3.1 Tratamientos actuales con injertos óseos**

Los actuales tratamientos buscan disminuir los periodos de cicatrización y predecir la evolución de éstos en el tiempo, disminuyendo el número de complicaciones, la cantidad de intervenciones quirúrgicas y la morbilidad del paciente (Buser D., 2009). Para lograr una reparación exitosa, las estrategias terapéuticas involucran el uso de autoinjertos (tejido del mismo individuo), aloinjertos (tejido proveniente de un individuo de la misma especie) y xenoinjertos (donador de otra especie) (Zárate-Kalfópulos B. y Reyes-Sánchez A., 2006).

Los injertos óseos cumplen una función mecánica y una función biológica en la zona a reparar. La función mecánica corresponde al soporte brindado frente a cargas. La función biológica promueve la generación, el crecimiento y la maduración de nuevos tejidos óseos. La importancia de cada una de sus funciones estará dada por el resultado clínico deseado (Calvo R. y cols., 2011).

Además de las dos funciones mencionadas, un injerto óseo ideal debiese poseer tres propiedades que determinarán su mejor o peor desempeño e integración: (Soto S. y González M. G. T., 2005; Whang P. G. y Wang J. C., 2003)

- **Osteogénesis:** síntesis de tejido óseo nuevo a partir de células derivadas del injerto o del huésped. Requiere la presencia células capaces de generar hueso. Es más eficaz en hueso esponjoso que en hueso corticalizado, debido a la rápida revascularización del primero.
- **Osteoinducción:** proceso por el que las células madre mesenquimales son reclutadas en la zona receptora y a su alrededor para diferenciarse en condroblastos y osteoblastos. La diferenciación y el reclutamiento son modulados por factores de crecimiento derivados de la matriz del injerto, cuya actividad es estimulada al extraer el mineral óseo. Entre los factores de crecimiento se encuentran las proteínas morfogenéticas óseas 2, 4 y 7, factor de crecimiento derivado de las plaquetas, interleucinas, factor de crecimiento fibroblástico, factores de crecimiento pseudoinsulínico, factores estimuladores de las colonias de granulocitos y factores estimuladores de las colonias granulocitos y macrófagos. También se liberan factores angiogénicos, como el factor de crecimiento vascular derivado del endotelio y la angiogenina. Esta fase comienza 2 semanas después de la cirugía y alcanza un máximo entre la sexta semana y los 6 meses.

- **Osteoconducción:** proceso lento y prolongado en el que tiene lugar un crecimiento tridimensional de capilares, tejido perivascular y células madre mesenquimales, desde la zona receptora del huésped hacia el injerto. Este andamiaje permite absorción y formación de hueso nuevo mediante un patrón ya formado, determinado por la biología del injerto y el entorno biomecánico del mismo. Es predominante en injertos corticalizados.

De los injertos disponibles en el mercado, el más utilizado es el autoinjerto seguido por los aloinjertos, xenoinjertos y el uso de materiales sintéticos o aloplásticos (Lewandrowski K.-U. y cols., 2000; Soto S. y González M. G. T., 2005).

El autoinjerto óseo ha sido gold standard por más de 100 años, tiene potencial osteoinductivo, osteoconductor y osteogénico, además de presentar histocompatibilidad total sin riesgo de transmisión de enfermedades. Sin embargo, existen problemas en su uso, como la insuficiente cantidad de injerto, riesgo de morbilidad post quirúrgica en la zona donadora (dolor, infección, hemorragia, lesión neurológica) y mayor tiempo quirúrgico (Goldberg V. M., 1992).

Los aloinjertos presentan propiedades osteoconductoras. Tienen la ventaja de estar disponibles en grandes cantidades, en diferentes formas y tamaños, no se sacrifica tejido del huésped y, por lo tanto, no hay morbilidad del sitio donador. El mayor riesgo en su utilización es la posible transmisión de virus como VIH o hepatitis C o B. Además, los procesos utilizados para eliminar los antígenos del injerto (congelamiento o irradiación), tienen un efecto dosis dependiente sobre las propiedades biológicas y biomecánicas de éstos (Sheikh Z. y cols., 2017).

Los xenoinjertos, por su parte, presentan propiedades osteoconductoras con potencial resorte limitado. El xenoinjerto más utilizado es el mineral desproteinizado de hueso bovino, comercializado como Bio-Oss®. Estos injertos son tratados con calor y procesos químicos para eliminar la fase orgánica, sin embargo, a pesar de remover la mayoría de los componentes osteogénicos, no elimina por completo el riesgo potencial de transmitir enfermedades (encefalopatía bovina espongiiforme) (Sheikh Z. y cols., 2017).

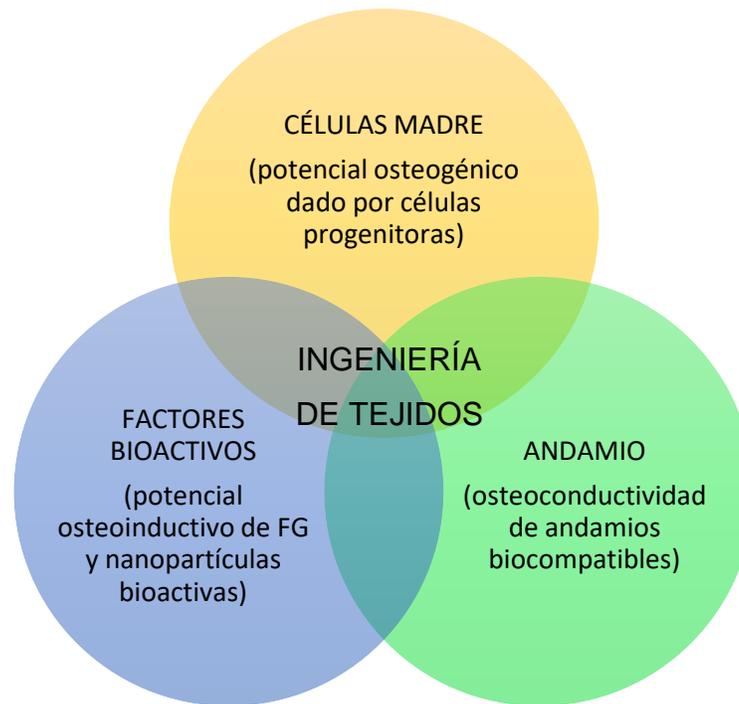
Los materiales sintéticos o aloplásticos fueron desarrollados con el fin de superar las desventajas de los autoinjertos. Usualmente poseen propiedades osteoconductoras, sin ningún potencial osteoinductivo u osteogénico. Su principal aplicación es en casos de regeneración periodontal. Los materiales aloplásticos más utilizados son HA, fosfatos tricálcicos (TCP) y vidrios bioactivos. (Sheikh Z. y cols., 2015; Shetty V. y Han T., 1991).

Otras alternativas de tratamientos, que involucran el uso de plasma rico en plaquetas (PRP), membranas de regeneración ósea guiada, distracción osteogénica, materiales poliméricos y materiales compuestos (polímeros combinados con partículas inorgánicas) (Peral Cagigal B. y cols., 2008), han demostrado una aceptable capacidad reparativa, pero escasa capacidad regenerativa (Lewandrowski K.-U. y cols., 2000).

### **3.2 Nuevas Alternativas: Ingeniería de Tejidos (IT)**

Como alternativa a las terapias convencionales actualmente se investigan nuevas alternativas basadas en ingeniería de tejidos (IT). La IT es un campo multidisciplinario que toma elementos de las ciencias de la ingeniería, ciencias biológicas y biomédicas. Dentro de sus objetivos se encuentra desarrollar tratamientos para la regeneración de los tejidos del cuerpo que no tienen capacidad regenerativa, así como para restaurar las funciones biológicas de los órganos dañados y heridos, controlando células con el potencial de proliferación y diferenciación (Reddi A. H., 2000).

La ingeniería de tejidos involucra tres pilares de la medicina regenerativa (**Figura 1**), que son células madre indiferenciadas, materiales diseñados para sostener y guiar la aposición de tejido en las tres dimensiones del espacio (andamio), y factores bioactivos capaces de inducir fenómenos de diferenciación celular (Bottino M. C. y cols., 2012; Sedgley C. M. y Botero T. M., 2012; Suchánek J. y cols., 2010).



**Figura 1.** Esquema de los principios de la Ingeniería de Tejidos y su interrelación.

Las **células madre** tienen la capacidad de auto-renovarse, diferenciarse a múltiples linajes y regenerar *in vivo* diferentes tejidos. Esta capacidad de diferenciación permite que la célula madre pierda sus características originales y adquiera propiedades nuevas condicionadas por el medio ambiente en el que se encuentre. En los últimos años se le han asociado las características de plasticidad y desdiferenciación. El primer concepto se refiere a la capacidad de una célula madre en dar origen a células de linajes distintos al de su origen pero de la misma capa embrionaria; mientras que la desdiferenciación permitiría que las células madre se diferencian a células de capas embrionarias distintas a las de su origen (Pérez Millán M. I. y Lorenti A., 2006; Rosales-Ibáñez R. y cols., 2012; Sujesh M. y cols., 2012).

Los **andamios** son materiales que favorecen la función mecánica y biológica de las células actuando como una matriz extracelular porosa. Debe ser un material biocompatible capaz de re-absorberse en el tiempo sin perder sus propiedades. De esta manera, estos biomateriales otorgan un espacio tridimensional a las células madre para formar nuevos tejidos con una estructura y función adecuada. Los andamios además permiten promover el crecimiento, diferenciación celular, el depósito de matriz mineralizada y ofrecen sitios específicos de adhesión celular (Baino F. y Vitale-Brovarone C., 2011; Chen Q. y cols., 2006; Rosales-Ibáñez R. y cols., 2012).

Por último, los **factores bioactivos** juegan un rol importante en la multiplicación y diferenciación de células madre a tipos celulares específicos. Estos elementos pueden ser también nanomateriales bioactivos con la capacidad de producir estímulos a nivel celular. La participación de estas sustancias es fundamental ya que contribuyen al crecimiento y desarrollo tisular, permitiendo los procesos de división celular, migración, diferenciación y destrucción vía apoptótica (Singh S. y cols., 2012).

El objetivo final de estos tres elementos interrelacionados entre sí es la formación de un constructo bioactivo que es integrado al sitio con pérdida de tejido, que debe cumplir con los tres atributos principales, necesarios para la regeneración ósea: osteogénesis, osteoinducción y osteoconductividad (Giannoudis P. V. y cols., 2005).

Dentro de los agentes bioactivos se encuentran los factores de crecimiento (FC) que, a pesar de haber demostrado su capacidad de mejorar la reparación de diferentes tipos de defectos óseos en modelos animales, su aplicación terapéutica en humanos presenta aún algunas limitaciones.

En primer lugar, los resultados experimentales entre estudios no son homogéneos debido a los distintos modelos metodológicos (humano y animal). La forma de administración de los FC no es idéntica, y tampoco está establecido un protocolo de dosificación de los mismos, incluso se ha argumentado que las características de la sustancia vehiculizadora podrían condicionar la farmacocinética del FC. Finalmente, no existen estudios clínicos prospectivos sobre la relación costo-beneficio para los pacientes sometidos a dicho tratamiento (Albarova G., 2003). Por su parte, en un estudio del año 2011, se vio que la vida media del factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF) no supera los 30 min, lo que implicaría múltiples inyecciones al paciente para mantener una concentración adecuada de FC en la sangre, además cabe considerar su alto costo, lo que vuelve aún menos ventajoso su uso (Lee K. y cols., 2011).

### **3.3 Ingeniería de Tejidos y Nanotecnología**

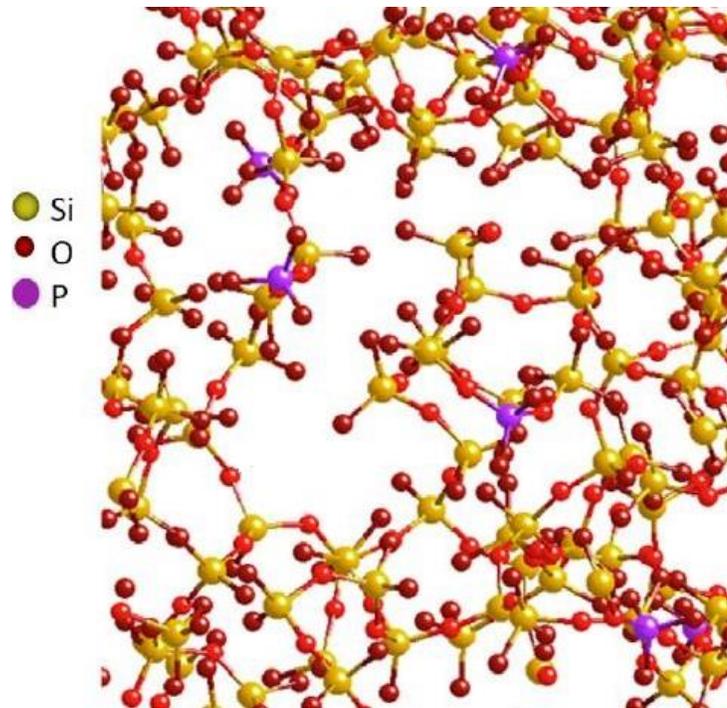
La ingeniería de tejidos, en colaboración con la **nanotecnología**, ha generado avances en la búsqueda y síntesis de materiales que compartan características de propias del huésped para promover la regeneración tisular con resultados clínicos favorables, como la creación de partículas nanométricas con propiedades osteoinductivas mejoradas respecto a sus equivalentes de mayor escala, entre las que encontramos la hidroxiapatita nanométrica (nHA) y el vidrio bioactivo nanométrico (nBG).

La **nanotecnología** se define como “la creación de materiales, dispositivos y sistemas funcionales con al menos una dimensión en la escala nanométrica (1-100 nm), y explotación de nuevos fenómenos y propiedades (físicas, químicas y biológicas) a esa escala (Mendonça G. y cols., 2008).

Los nanomateriales poseen propiedades únicas de superficie (topografía, química, humectabilidad y energía de superficie), debido a un incremento significativo en su área, rugosidad y energía superficial, lo cual se evidencia en una mayor reactividad química y selectividad, en comparación con materiales microestructurados (Alonso-Núñez G., 2008). Estas propiedades de superficie median la adsorción específica de proteínas y la bioactividad celular, dirigiendo su proliferación y diferenciación, la producción y organización de la matriz extracelular (Engel E. y cols., 2008). Estudios previos han demostrado que los materiales nanoestructurados pueden promover mayor cantidad de interacciones específicas de proteínas para estimular de manera eficaz el crecimiento de hueso nuevo, en comparación con los materiales convencionales. Todos estos mecanismos son clave para comprender por qué los nanomateriales tendrían propiedades superiores en estimular la regeneración ósea (Nayar S. y cols., 2011).

### **3.4 Factores bioactivos: Alternativas sintéticas**

Para la estimulación de tejido óseo, las biocerámicas aparecen como uno de los materiales más estudiados y con resultados favorables. Materiales como hidroxiapatita, fosfatos de calcio, y vidrio bioactivo poseen propiedades que estimulan la diferenciación osteogénica. El vidrio bioactivo (BG) 45S5 es el material que mejores resultados ha reportado, presentando el índice de bioactividad más alto hasta ahora conocido (Hench L. L. y Jones J. R., 2015). Se comercializa como Bioglass®, y es el vidrio más investigado en aplicaciones biomédicas (Thompson I. y Hench L., 1998). Además, se ha demostrado su capacidad de estimular la neoformación de hueso *in vivo* (Wheeler D. y cols., 1998; Wheeler D. y cols., 1997), su capacidad de promover la proliferación ósea en forma más rápida que hidroxiapatita (HA) sintética (Oonishi H. y cols., 1999), su estimulación de expresión osteoblástica (Xynos I. y cols., 2000), su capacidad de angiogénesis (Gorustovich A. A. y cols., 2009) y propiedades antibacterianas (Moghanian A. y cols., 2018).



**Figura 2.** Estructura química del vidrio bioactivo (los iones  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Na}^+$  fueron removidos del esquema para mayor claridad)

Este material está compuesto por una red tridimensional de  $\text{SiO}_2$  (**Figura 2**) formada por vidrio, en la cual un átomo de silicio (Si) está coordinado con cuatro átomos de oxígeno (O), y además están presentes iones de fosfato (P), calcio (Ca) y sodio (Na). La bioactividad del BG (**Figura 3**) se debe a la capacidad del material para estimular la formación de apatita tipo ósea cuando está en contacto con el fluido fisiológico, y formar una unión química con el hueso. Recientemente, mediante la técnica de sol-gel ha sido posible sintetizar nanopartículas de vidrio bioactivo (nBG). Dichas nanopartículas inducen un mayor grado de mineralización, aceleran el proceso de formación de tejido respecto a su contraparte micrométrica y facilitan la producción de nanocompuestos bioactivos (Covarrubias C. y cols., 2015; Lu H. H. y cols., 2003).



**Figura 3.** Esquema simplificado del mecanismo de acción del vidrio bioactivo (BG)

Últimamente se ha evidenciado que elementos como el estroncio (Sr, osteogénico), cobre (Cu, angiogénico), magnesio (Mg, osteoinducción), silicio (Si, osteoinducción y osteoconductor) y litio (Li), pueden favorecer el proceso óseo regenerativo (Bondarenko A. y cols., 2014; Carboneras M. y cols., 2010; Goñi I., 2014; Marie P. y cols., 2001; Wu C. y cols., 2013; Zreiqat H. y cols., 2010). Por lo anterior este tipo de elementos están siendo estudiados para modificar la composición del vidrio bioactivo y mejorar su capacidad de reparación de tejido óseo.

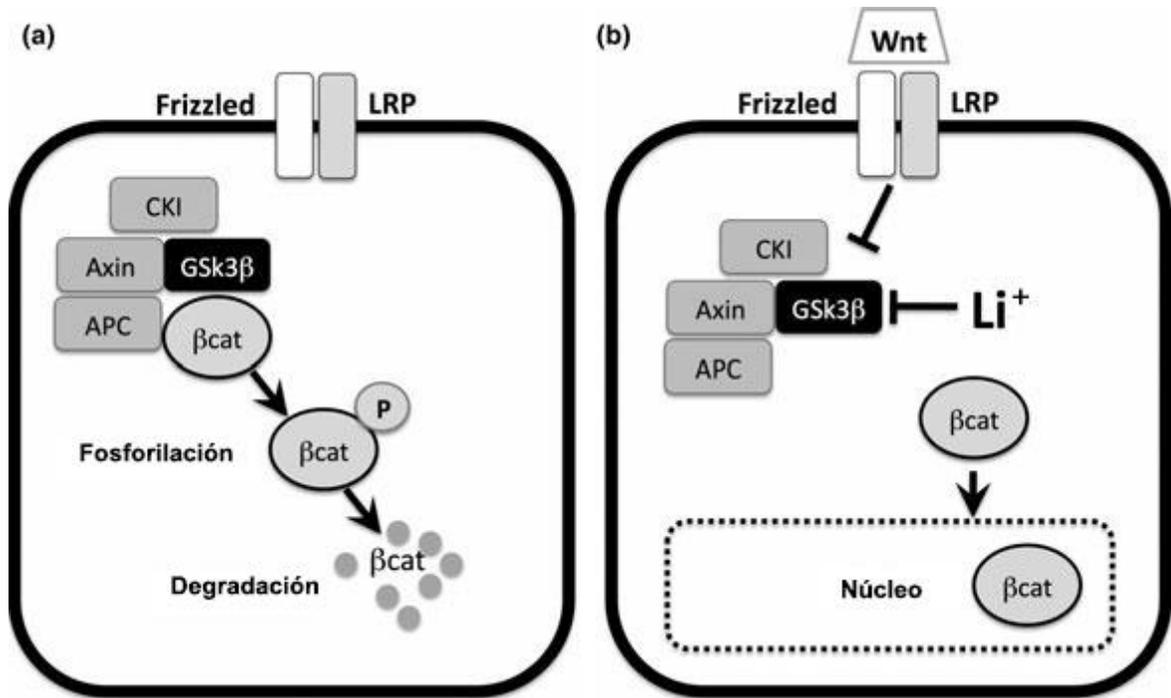
### 3.5 El litio y sus propiedades osteogénicas

El litio es un metal alcalino que se encuentra principalmente en salares, pozos petrolíferos, campos geotermales y agua de mar. Es el metal y elemento sólido más liviano, es univalente y muy reactivo, por lo que no se encuentra libre en su estado natural.

Chile es poseedor del 52% de las reservas mundiales de litio. La producción chilena es mayoritariamente de carbonato de litio, además de cloruro e hidróxido de litio, que se obtiene a partir de las salmueras contenidas en el salar de Atacama, en la II Región. La demanda mundial de este metal aumenta año tras año, debido a su uso y aplicación en el área energética para la fabricación de baterías de litio; sin embargo, su aplicación en el área de salud ha sido menos desarrollada en los últimos años (Ministerio de Minería de Chile).

El litio es un elemento reconocido como agente terapéutico para el tratamiento de enfermedades mentales, siendo aprobado para este uso por la FDA en el año 1970, y comercializado en Chile desde el año 1972 (Retamal Carrasco P. y Fullerton U., 1999).

El litio posee reconocida capacidad osteogénica, pero además se le han atribuido propiedades odontogénicas y condrogénicas. Se ha demostrado que la estimulación de las células madre con iones de litio ( $\text{Li}^+$ ) en solución en ciertas concentraciones (5-10 mM) aumenta la expresión de marcadores osteogénicos y condrogénicos, ya que los iones  $\text{Li}^+$  tienen la capacidad de regular la vía de señalización Wnt/ $\beta$ -catenina mediante la inhibición de la enzima glucógeno sintasa quinasa-3 $\beta$  (GSK-3 $\beta$ ) (**Figura 4**). Su inhibición permite la translocación nuclear de  $\beta$ -catenina y como consecuencia, aumenta la vía canónica de señalización celular Wnt/ $\beta$ -catenina (Klein P. S. y Melton D. A., 1996; Lenox R. H. y Wang L., 2003). La activación de esta vía estimula la expresión de genes en el núcleo asociados al proceso de diferenciación osteogénica, lo cual estimula el proceso de formación de tejido óseo.



**Figura 4.** Representación de la vía Wnt desactivada (a) y su posterior activación con el catión Li<sup>+</sup> (b) (Galli C. y cols., 2013).

El litio además, se ha incorporado y se ha usado para mejorar la bioactividad de biocerámicas como el vidrio bioactivo y la hidroxiapatita (da Silva J. G. y cols., 2017; Shainberg A. P. M. y cols., 2012; Wang Y. y cols., 2016). Un estudio que utiliza andamios de hidroxiapatita dopado con litio evidenció que la exposición de células osteoblásticas MG63 a este material, estimula la formación de apatita tipo ósea, promueve la proliferación y actividad de osteoblastos MG63 (Wang Y. y cols., 2016).

Durante la última década se han realizado múltiples ensayos que respaldan la efectividad de partículas **micrométricas** de vidrio bioactivo modificadas con litio (mBG-Li), tanto en la reparación de defectos óseos como cartilagosos (Khorami M. y cols., 2011; Maçon A. L. y cols., 2017; Miguez-Pacheco V. y cols., 2016). Sin embargo, la incorporación de litio en **nanopartículas** de vidrio bioactivo (nBG-Li) ha sido escasamente estudiada. En el año 2016, El-Kady A.M. y cols. prepararon nanopartículas de vidrio bioactivo modificadas con litio como vehículo del antibiótico vancomicina y del agente anticancerígeno 5-fluorouracil. En este estudio se encontró que las nanopartículas eran capaces de inducir la formación de apatitas en la superficie. La liberación de iones de litio mejoraría la osteogénesis, sin embargo, no se hace mención de la efectiva incorporación de litio a la partícula. Se comprobó que estas nanopartículas pueden actuar como dispositivo de administración controlada de antibióticos, lo cual sería útil en el tratamiento de enfermedades óseas como osteomielitis, cáncer de hueso y osteoporosis, sin embargo, no se reportaron datos acerca de su citocompatibilidad, ni tampoco existen antecedentes acerca de su capacidad para estimular la diferenciación osteogénica de células madre.

Considerando la evidencia y antecedentes expuestos, en este trabajo se propone sintetizar nanopartículas de BG dopadas con litio y evaluar su capacidad para estimular la diferenciación osteogénica de células madre.

## **4 HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**

### **4.1 Hipótesis**

Nanopartículas de vidrio bioactivo dopadas con ciertos contenidos de litio son citocompatibles, y tienen capacidad de diferenciación osteogénica de células madre mayor que su contraparte sin litio.

### **4.2 Objetivo General**

Sintetizar nanopartículas de vidrio bioactivo dopadas con ciertos contenidos de litio, evaluar su citocompatibilidad y su capacidad de diferenciación osteogénica de células madre.

### **4.3 Objetivos Específicos**

1. Sintetizar y caracterizar la estructura de nanopartículas de vidrio bioactivo dopado con litio (nBG-Li)
2. Evaluar la bioactividad *in vitro* de nBG-Li mediante el ensayo en suero fisiológico simulado (SBF).
3. Evaluar la citocompatibilidad de nBG-Li con células madre de pulpa dental.
4. Evaluar la capacidad nBG-Li para inducir la diferenciación osteogénica de células madre *in vitro*.

## 5 MATERIALES Y MÉTODOS

### 5.1 Síntesis de nBG.

Se sintetizaron nanopartículas de nBG con la siguiente composición molar:  $\text{SiO}_2\text{-P}_2\text{O}_5\text{-Ca}$ . Una solución basada en calcio se preparó disolviendo 7,7 g de  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  (Sigma-Aldrich) en 117 mL de agua destilada a temperatura ambiente (solución 1). Una segunda solución (solución 2) se preparó diluyendo 9,7 mL de tetraortosilicato (TEOS 98%; Aldrich) en 63,5 mL de etanol. La solución 2 se adicionó a la solución 1 y para obtener la solución A. El pH de la solución A se ajustó a 1-2 con ácido cítrico. La solución A fue lentamente adicionada bajo agitación vigorosa sobre una solución de 1,2 g de  $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$  (May & Becker) en 1500 mL de agua destilada (solución B). Durante el proceso de goteo el pH se mantuvo alrededor de 10 adicionando amonio acuoso. La mezcla se agitó por 48 h y posteriormente se dejó decantando por otras 24 h a temperatura ambiente.

El precipitado obtenido se separó por centrifugación a 13.520 g, y lavado mediante tres ciclos de centrifugado-redispersión con agua destilada. El sólido separado fue congelado a  $-80^\circ\text{C}$ , liofilizado y sometido a calcinación a  $700^\circ\text{C}$  por 3 h para obtener un polvo blanco y fino de nBG.

### 5.2 Síntesis de nBG-Li

Para la preparación de nBG-Li se utilizó el mismo procedimiento descrito anteriormente para nBG, excepto realizando una modificación en la solución 1. En este caso la solución 1 se preparó disolviendo 7,7 g de  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  (Sigma-Aldrich) en 117 mL de agua destilada a temperatura ambiente, para luego disolver ciertas cantidades de la sal precursora de iones litio ( $\text{CH}_3\text{COOLi}$ ). Se estudió la preparación de nBG-Li con contenidos de litio de 10, 20 y 40%mol.

### **5.3 Caracterización de nanopartículas de litio.**

El tamaño y morfología de nBG y nBG-Li se analizó en un microscopio electrónico de barrido (Jeol JSM-IT 300 LV) en modo de Transmisión (STEM). Las nanopartículas fueron dispersadas en una solución de etanol al 70%, y se sonicaron durante 30 min. Se tomó desde la parte superior una gota de la solución y se colocó sobre la cinta de carbono. Se esperó la evaporación completa del etanol, para posteriormente ser metalizadas con una capa de oro de 5 nm en un equipo Denton Vacuum desk V.

Se analizó la estructura química de las nanopartículas mediante espectroscopía infrarroja transformada de Fourier (FTIR-ATR), desde una longitud de onda de 400  $\text{cm}^{-1}$  a 4000  $\text{cm}^{-1}$ .

### **5.4 Análisis de la composición elemental por EDX**

El análisis EDX indica la proporción y porcentaje en peso de los elementos químico presente en las muestras de nBG. En este caso se identificó la presencia de fósforo (P), calcio (Ca), silicio (Si), oxígeno (O) y carbono (C). El litio no es detectable mediante esta técnica debido a la baja energía de los rayos X K del átomo ( $Z=3$ ).

### 5.5 Ensayo de bioactividad en fluido fisiológico simulado (SBF)

La bioactividad en términos de la habilidad de las partículas para inducir la formación de apatita tipo ósea *in vitro* se evaluó mediante el ensayo en fluido fisiológico simulado (SBF), el cual posee concentraciones iónicas similares a las del fluido extracelular humano. La solución de SBF se preparó de acuerdo a la composición iónica estándar ( $\text{Na}^+$  142,0;  $\text{K}^+$  5,0;  $\text{Ca}^{2+}$  2,5;  $\text{Mg}^{2+}$  1,5;  $\text{Cl}^-$  148,0;  $\text{HCO}_3^-$  4,2;  $\text{HPO}_4^{2-}$  1,0,  $\text{SO}_4^{2-}$  0,5 mM) (Kokubo T. y Takadama H., 2006). El fluido fue neutralizado, ajustándolo al pH fisiológico 7,4 con tri-(hidroximetil) aminometano y ácido hidroclicórico.

**Tabla 1.** Reactivos y sus respectivas cantidades utilizados en la preparación de SBF.

Reactivo	SBF para 500 mL
Agua destilada	450 mL
NaCl	3,998 g
NaHCO <sub>3</sub>	0,175 g
KCl	0,112 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 3H <sub>2</sub> O	0,114 g
MgCl <sub>2</sub> x 6H <sub>2</sub> O	0,153 g
HCl 1M	18 mL
CaCl	0,139 g
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0,036 g
(CH <sub>2</sub> OH) <sub>3</sub> CNH <sub>2</sub> (Buffer TRIS)	3,028 g
HCl para ajustar pH 7,4	-----

El polvo obtenido de menor tamaño y de mejor rendimiento se utilizó para producir prensados de cada muestra (pastillas circulares de 9 mm de diámetro por 2 mm de espesor). Estas pastillas fueron sumergidas en 50 mL de SBF en contenedores de polietileno y mantenidas bajo agitación de condiciones termostatzadas a 36,5 °C durante 72 h. Las pastillas fueron removidas del SBF al cumplir el tiempo correspondiente, y lavadas con agua destilada. Posteriormente se secaron a 40 °C.

La formación de apatita tipo ósea sobre el material se identificó mediante microscopía electrónica de barrido con microanálisis elemental (SEM-EDX) y espectroscopía FTIR-ATR.

## **5.6 Ensayos con células madre**

Se utilizaron células madre aisladas de pulpa dental (DPSCs) de terceros molares criopreservadas y previamente caracterizadas en el Laboratorio de Nanobiomateriales de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile (Santiago de Chile), según protocolo descrito por Balanda C. (2013).

### **5.6.1 Medios acondicionados con nanopartículas**

Para el acondicionamiento de medios de cultivo se utilizó como base  $\alpha$ -MEM (Sigma-Aldrich Corp., St Louis, MO, USA), suero fetal bovino (FBS) al 10%, antibióticos (penicilina-estreptomina) y antimicóticos, esta base se usó como control en los diferentes ensayos. En distintos tubos se agregó 50 mL de medio de cultivo y diferentes cantidades de nBG y nBG-Li. Se incubaron por 5 días a 37°C y posteriormente se filtraron.

### **5.6.2 Ensayo de viabilidad celular MTS**

La viabilidad celular en presencia de nanopartículas fue evaluada cuantitativamente luego de 7, 14 y 21 días de incubación, utilizando un medio previamente acondicionado con las nanopartículas a una concentración 15 mg/mL por 5 días. Para el análisis se utilizó el kit de ensayo de viabilidad celular que utiliza (4,5-dimetiltiazol-2-il)5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolio (MTS), según las instrucciones del fabricante. Se midió la absorbancia del sobrenadante a 492 nm en un lector de placa ELISA, que correspondió a la formación de formazán, debido a la reducción del reactivo MTS por las deshidrogenasas mitocondriales de las células viables presentes en el cultivo.

### **5.6.3 Actividad de fosfatasa alcalina (ALP)**

La capacidad de diferenciación osteogénica de DPSCs cultivadas en medios acondicionados con nBG-Li se evaluó cuantitativamente midiendo la actividad de la enzima fosfatasa alcalina (ALP) a los 7, 14 y 21 días de iniciado el tratamiento. Una vez completado el tiempo de incubación, se retiró el medio acondicionado y las DPSCs cultivadas se fijaron en una solución de 90% de etanol y 10% de formaldehído (cuya concentración es de 37%) durante 30 s, tras lo cual se lavaron con una solución tampón fosfato salino (TBS) y se agregó el reactivo fosfato de p-nitrofenol en buffer de reacción compuesto por bicarbonato de sodio 100 mM y  $MgCl_2$  1 mM a un pH 9,6. Las células fijadas se incubaron con fosfato de p-nitrofenol a pH básico (pNPP, incoloro) durante 20 min a 37 °C, tiempo durante el cual el pNPP es lisado en presencia de ALP, liberando p-nitrofenol, que en condiciones fisiológicas pierde un protón generando p-nitrofenolato, de color amarillo. La cantidad de p-nitrofenolato generado es directamente proporcional a la actividad de fosfatasa alcalina, y se midió por absorbancia a una longitud de onda de 405 nm en un lector de placa ELISA.

Este ensayo se realizó en una primera instancia cultivando las células con muestras de nBG, nBG dopado con litio (nBG-Li 10, 20 y 40%mol), medio osteogénico y medio normal como control.

Posteriormente se repitió el mismo ensayo cultivando las células con nBG, nBG más litio soluble ( $\text{CH}_3\text{COOLi}$ ) en concentraciones 10 y 15 mM, litio (10, 15 mM), medio osteogénico y control con medio normal.

### **5.7 Medición de la liberación de litio en fotómetro de llama**

Se evaluó la liberación de litio contenido en medios de cultivo nBG-Li 10%, 20% y 40%, acondicionados durante 5 días a 37°C. Para esta medición se utilizó un fotómetro de llama (Jenway PFP7), cuyo límite de detección para el litio es  $\leq 0,25$  ppm. El análisis mediante esta técnica se basa en la medida de la emisión espontánea de radiación electromagnética emitida por un elemento previamente excitado con el calor de una llama. Cada elemento emite una radiación con una longitud de onda específica para el mismo (670 nm en el caso del litio), lo cual proporciona información cualitativa de la presencia del elemento en la solución. La intensidad de la radiación es proporcional a la concentración del elemento en la muestra. Esta técnica instrumental, está especialmente indicada en la determinación de metales alcalinos en disolución (Na, K, Ba, Ca, Li).

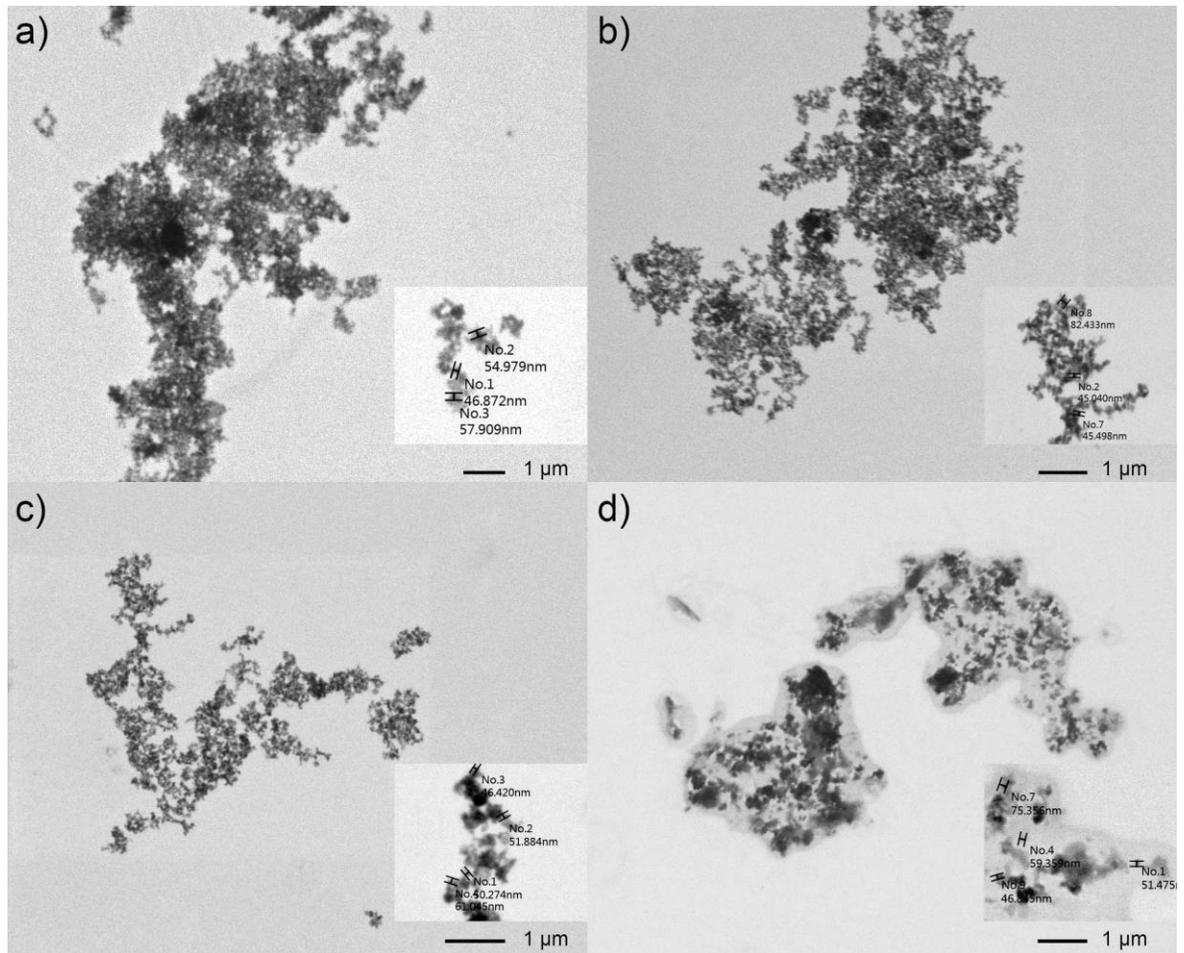
## 5.8 Análisis estadístico

Los datos experimentales presentados corresponden al promedio  $\pm$  desviación estándar de un número de experimentos indicados como (n), en este trabajo n=9. Los datos obtenidos en los ensayos de degradación *in vitro* y ensayo de proliferación celular por MTS y ALP se analizaron mediante el programa GraphPad Prism 7 (Graphpad Software Inc., USA). Para comprobar la normalidad de la distribución de los datos, se realizó la prueba estadística de Shapiro-Wilk. Se utilizó un nivel de significancia de 95% ( $p < 0,05$ ). Para comparar las medias entre los distintos grupos se realizó el test ANOVA de una sola vía y la prueba de Tukey con un nivel de significancia de 95% ( $p < 0,05$ ).

## 6 RESULTADOS

### 6.1 Síntesis y caracterización de nanopartículas.

En la **Fig. 5** se muestran las imágenes TEM de las nanopartículas de nBG pura y modificada con los diferentes contenidos de litio. Se puede observar que los tamaños de todas las partículas preparadas se encuentran dentro del rango nanométrico, con un promedio de tamaño de ~54,8 nm. En la **Tabla 2** se detalla el tamaño promedio por partícula.

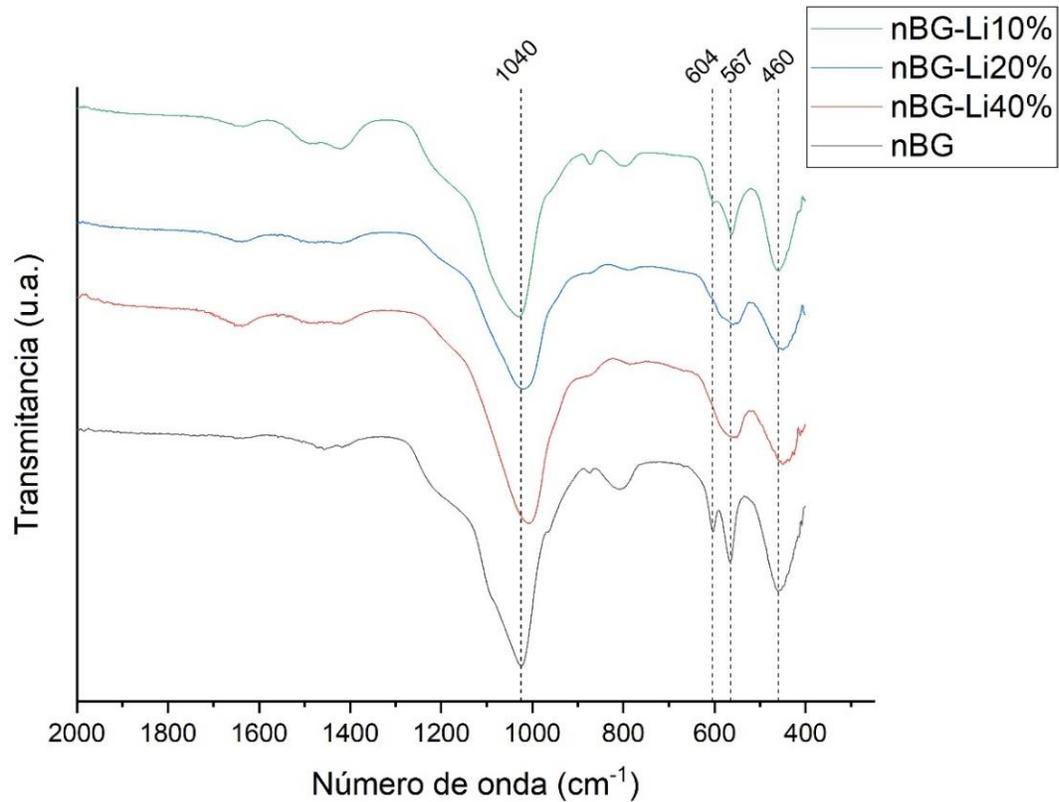


**Figura 5.** Imágenes TEM de nanopartículas de a) nBG y modificadas con b) 10%, c) 20% y d) 40%mol de litio.

**Tabla 2.** Tamaños promedio de partícula de los diferentes productos de síntesis.

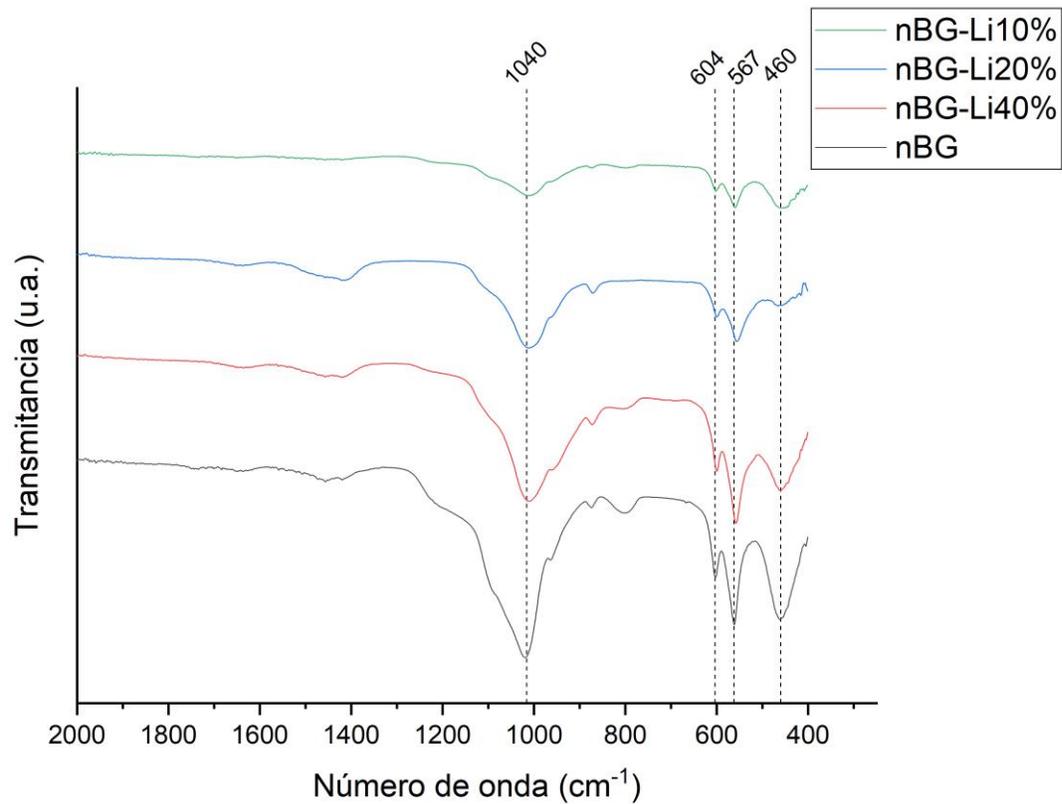
Partícula	Tamaño promedio (nm)
nBG	53,2
nBG-Li 10%	57,6
nBG-Li 20%	50,0
nBG-Li 40%	58,2

En la **Fig. 6** se muestra el análisis FTIR de las diferentes nanopartículas sintetizadas. El espectro FTIR de nBG muestra bandas asociadas a su estructura silícea ( $460\text{ cm}^{-1}$ ), pero además se observan bandas relacionadas con una estructura tipo apatita ( $567, 604, 1040\text{ cm}^{-1}$ ), lo cual indica que el nBG preparado no es completamente amorfo. Sin embargo las partículas obtenidas en presencia de litio presentaron una estructura más amorfa propia de la estructura del vidrio, ya que la doble banda de apatita alrededor de los  $600\text{ cm}^{-1}$  desaparece con un mayor contenido de litio.



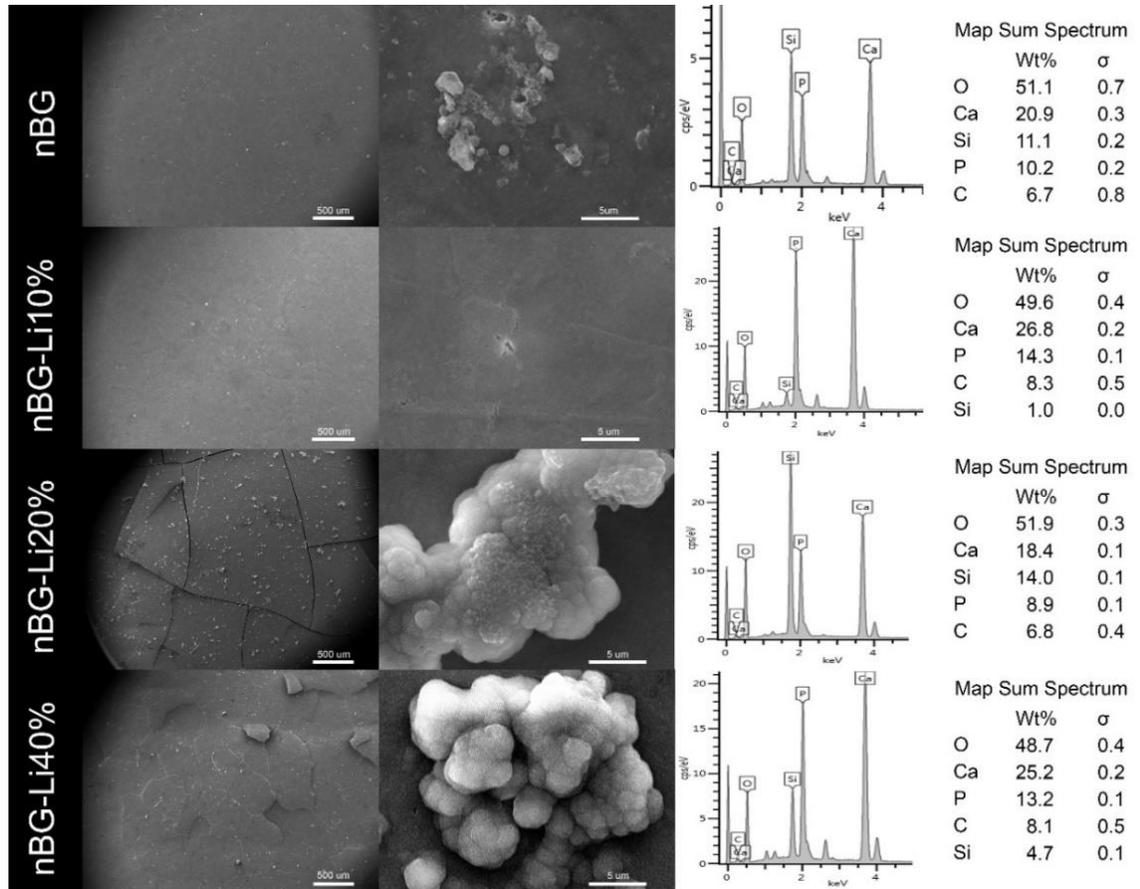
**Figura 6.** Espectro de FTIR-ART de las diferentes nanopartículas estudiados.

**6.2 Ensayo de bioactividad en SBF** Los cambios en la superficie de las nanopartículas luego del ensayo de bioactividad SBF se analizaron mediante FTIR (**Fig. 7**). Se puede apreciar bandas relacionadas con la estructura tipo apatita a 1040, 604 y 567 cm<sup>-1</sup> correspondientes a los enlaces del grupo PO<sub>4</sub>. En las nanopartículas con litio, la intensidad de los picos de hidroxiapatita aumenta con un mayor contenido de litio en la partícula.



**Figura 7.** Análisis FTIR-ART de la nanopartículas luego de 3 días de inmersión en SBF.

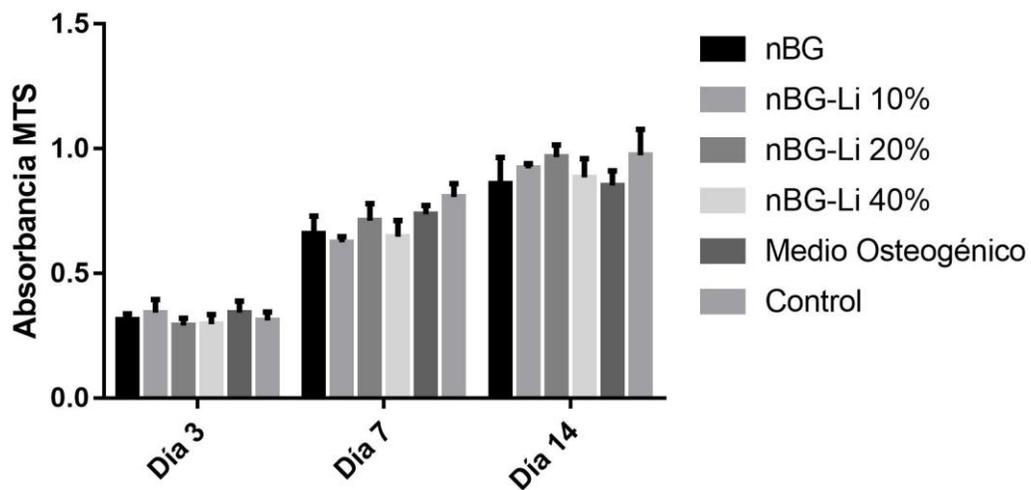
Mediante microscopia SEM (**Fig. 8**) se confirmó la formación de apatita en las partículas con mayor contenido de litio, que se puede observar por la morfología típica de depósitos de cristales de apatita comúnmente producidos por el vidrio bioactivo. El análisis EDX también confirma que se producen mayores contenidos de Ca y P asociados con la formación de cristales de hidroxiapatita.



**Figura 8.** Imágenes SEM de la superficie de las nanopartículas luego de 3 días de inmersión en SBF.

### 6.3 Ensayos de viabilidad celular (MTS)

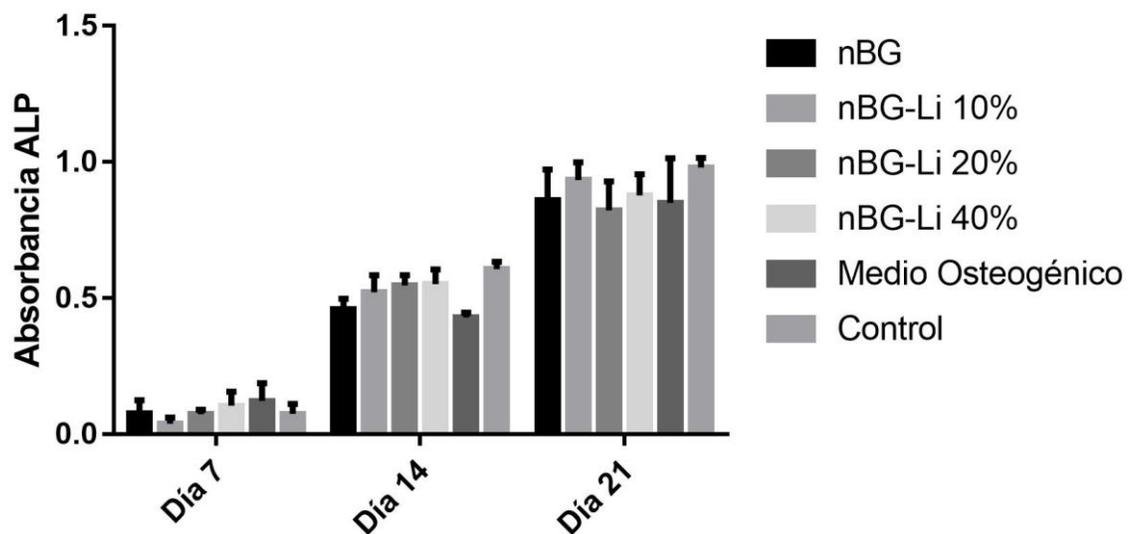
En la **Fig. 9** se muestran los resultados de viabilidad celular de DPSCs cultivadas con medios acondicionados con las respectivas partículas. Durante los días de ensayo, se puede observar que la viabilidad de las DPSCs no cambia en presencia de las nanopartículas respecto al grupo control cultivado sin éstas, no encontrándose diferencias estadísticamente significativas.



**Figura 9.** Ensayo de viabilidad celular MTS de DPSCs cultivadas con medios acondicionados con las nanopartículas. Se observa un aumento de la viabilidad celular de DPSCs en todos los medios analizados, no existiendo diferencias estadísticamente significativas al ser comparados entre ellos en un mismo día. Los resultados se expresan como un promedio  $\pm$  desviación estándar. El  $n=9$  para cada uno de los grupos descritos.

#### 6.4 Actividad de fosfatasa alcalina (ALP)

La capacidad de las nanopartículas para estimular la diferenciación osteogénica de células madre (DPSCs) se evaluó midiendo la actividad enzimática de ALP. La **Fig. 10** muestra los valores de actividad de ALP obtenidos. Se encontró que ninguna composición de nanopartículas de nBG con litio produce una mayor actividad de ALP comparado a lo que produce el nBG puro. Debido a que la actividad para incrementar el estímulo de diferenciación osteogénica estaría dado por la concentración de litio liberado por la nanopartícula, se procedió a medir los niveles liberados de este elemento.



**Figura 10.** Ensayo de actividad de fosfatasa alcalina de nBG y nBG dopado con litio medido en tres tiempos (7, 14, 21 días). Se observa que la expresión de la enzima ALP aumenta con el transcurso de los días. No se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos. Los resultados se expresan como un promedio  $\pm$  desviación estándar. El  $n=9$  para cada uno de los grupos descritos.

## 2.5. Ensayo de liberación de litio

En la **Tabla 3** se muestran las concentraciones de litio liberadas por las nanopartículas luego de 5 días de incubación en medio de cultivo medidas mediante fotometría de llama. Los resultados muestran que solo la partícula preparada con un contenido teórico de 40% de litio, fue la única composición que liberó niveles detectables de litio en el medio. Es importante mencionar que debido al bajo número atómico del litio ( $Z=3$ ), el contenido de este elemento en la partícula no se puede determinar mediante las técnicas convencionales de análisis composicional de sólidos tales como Fluorescencia de rayos X (FRX) o Espectroscopia dispersiva de rayos X (EDX). Por lo anterior no fue posible verificar el grado de incorporación del elemento en la estructura del nBG.

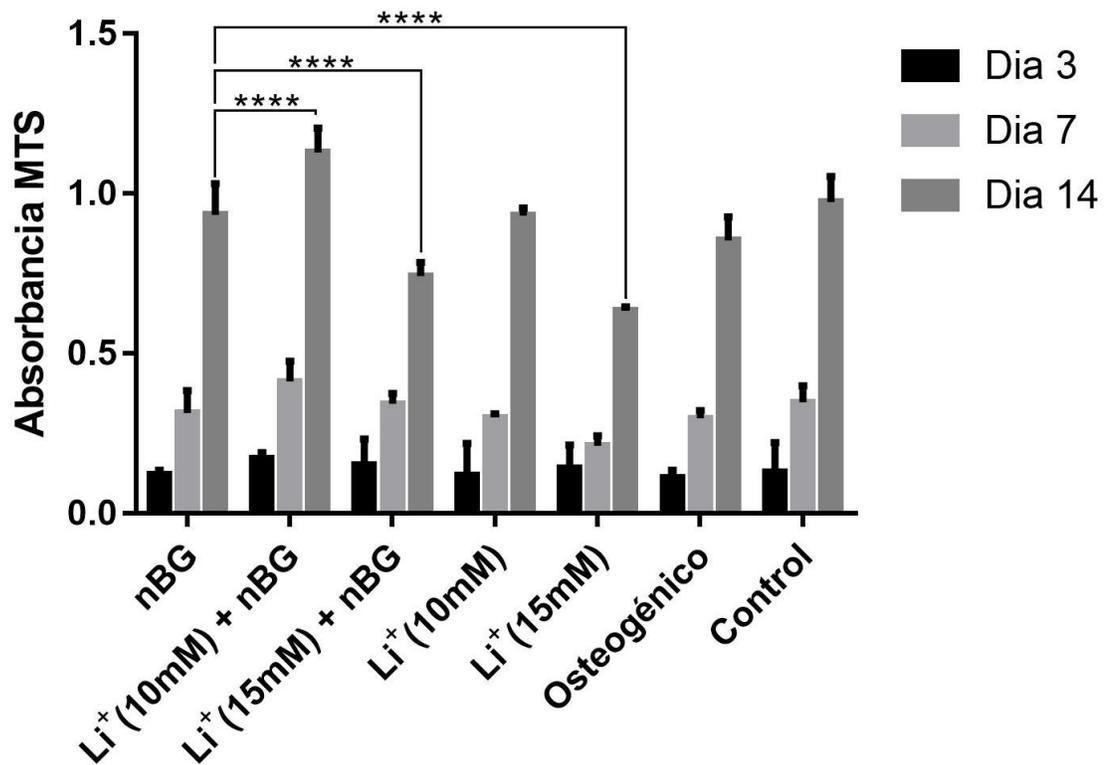
**Tabla 3.** Concentraciones de litio liberadas por las nanopartículas sintetizadas

(%mol)	Concentración ( $\mu\text{g/mL}$ )
<b>Li 10%</b>	0
<b>Li 20%</b>	0
<b>Li 40%</b>	0,66

Debido a este resultado, se planificaron nuevos experimentos para demostrar la hipótesis planteada respecto a la capacidad del litio para potenciar las propiedades del nBG de promover la diferenciación osteogénica celular. En estos experimentos se combinaron las nanopartículas de nBG con iones solubles de litio ( $\text{Li}^+$ ) adicionados de manera separada al medio de cultivo.

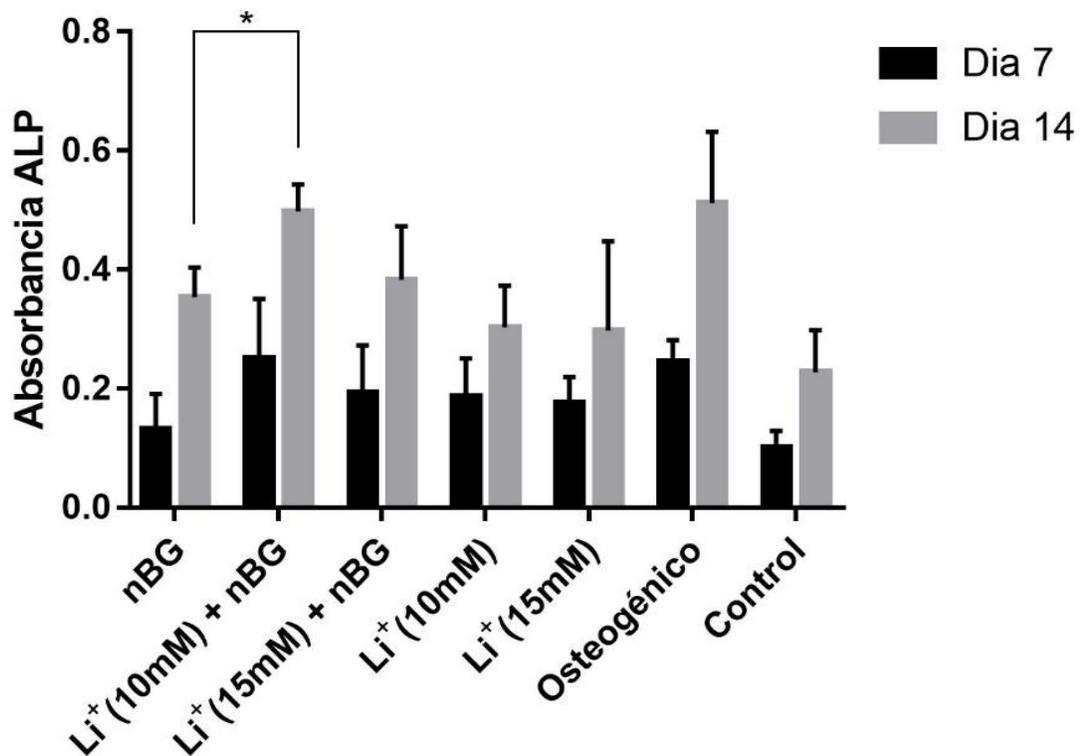
### 6.5 Ensayos de viabilidad (MTS) y actividad de enzima fosfatasa alcalina (ALP) en presencia de litio soluble.

En la **Fig. 11** se puede observar que al día 14 la viabilidad de las células madre cultivadas en el medio  $\text{Li}^+$ (10mM)+nBG es significativamente mayor a las células cultivadas en los otros sistemas.



**Figura 11.** Ensayo de viabilidad celular (MTS) de los medios acondicionados con nBG puro, a los que se les adicionó iones de litio soluble ( $\text{Li}^+$ ) en concentraciones de 10 y 15 mM. El día 14 se observa un aumento de la viabilidad celular de DPSCs en el medio acondicionado con  $\text{Li}^+$ (10mM)+nBG, con diferencia significativa respecto a nBG puro. También se observa una disminución significativa de viabilidad celular en los medios acondicionados con  $\text{Li}^+$ (15mM)+nBG y  $\text{Li}^+$ (15mM) respecto al nBG puro. Los resultados se expresan como un promedio  $\pm$  desviación estándar. El  $n=9$  para cada uno de los grupos descritos. \*\*\*\*  $p < 0,0001$

Al medir la actividad ALP de esta serie de muestras (**Fig. 12**), se puede observar que la adición de 10 mM de  $\text{Li}^+$  al medio acondicionado con nBG produce un incremento en la actividad de ALP a un nivel equivalente a la del medio suplementado con factores osteogénicos. La adición de 15 mM de  $\text{Li}^+$ , así como la incubación directa de las células con 10 y 15 mM de  $\text{Li}^+$  no producen diferencias respecto al grupo control sin suplementos osteogénicos.



**Figura 12.** Ensayo de actividad de la enzima fosfatasa alcalina (ALP). Al día 14 se observa diferencia estadística en la diferenciación celular entre nBG y  $\text{Li}^+$ (10mM)+nBG. Los resultados se expresan como un promedio  $\pm$  desviación estándar. El  $n=9$  para cada uno de los grupos descritos. \*  $p < 0,05$ .

## 7 DISCUSIÓN.

Uno de los principales desafíos en este trabajo de investigación fue la obtención de nanopartículas de vidrio bioactivo con litio en su estructura. El vidrio bioactivo está formado por unidades tetraédricas vecinas de  $(\text{SiO}_4)^{4-}$ , las que están unidas entre sí por los 4 vértices con un átomo de silicio en la posición central, además de contener iones de fosfato (P), calcio (Ca) y sodio (Na). Se espera que precisamente los iones de sodio sean reemplazados por átomos de litio en diferentes concentraciones, y de esta forma obtener nanopartículas de vidrio bioactivo con litio en su estructura.

Para la síntesis de las nanopartículas, se optó por utilizar el método sol-gel, por ser el método químico de síntesis más ampliamente utilizado, debido a que permite la obtención de vidrios bioactivos de elevada pureza y homogeneidad (Aguiar H. y cols., 2011). Durante este proceso se vio que la incorporación de litio al nBG es un método extremadamente sensible a la velocidad de mezcla de los componentes y al pH del medio, la estructura reticular cristalina de las nanopartículas obtenidas está estrechamente relacionada a estas condicionantes.

Los resultados indicaron que solo las partículas preparadas con un contenido teórico de 40% de litio, exhibieron liberación de iones litio en el medio. Lo anterior sugiere que las composiciones de síntesis de 10 y 20% no permitieron incorporar niveles suficientes de litio en la estructura del vidrio o que el litio incorporado en estas condiciones queda de alguna forma estabilizado en la estructura del vidrio, que dificulta su liberación a pH fisiológico. Cabe recordar que el contenido de litio en la nanopartícula no puede determinarse a través de las técnicas convencionales de análisis composicional de sólidos, debido al bajo número atómico del elemento ( $Z=3$ ).

Sin embargo, se pudo observar que la presencia de litio en el proceso de elaboración de la nanopartícula favorece una estructuración más amorfa de la misma. Lo anterior es un aspecto deseable desde el punto de vista de la solubilidad y por lo tanto de la bioactividad de la partícula.

En la segunda parte de este trabajo, se evaluaron las propiedades bioactivas de las nanopartículas sintetizadas.

El ensayo de bioactividad en fluido fisiológico simulado (SBF) es una prueba que se utiliza para evaluar la capacidad de materiales biocerámicos de estimular químicamente la formación de hidroxiapatita en contacto con el fluido fisiológico. Todas las nanopartículas mostraron esbozos de formación de HA sobre su superficie al ser sumergidas en SBF en forma de pastillas durante 3 días. En el análisis FTIR-ART se observaron señales correspondientes a la estructura de la hidroxiapatita. Las imágenes SEM también confirmaron un aumento cualitativo de la formación de minerales con morfología que caracteriza a la hidroxiapatita sobre las superficies de nBG-Li 20% y nBG-Li 40%, mientras que el análisis EDX confirmó mayores contenidos de Ca y P asociados con la formación de cristales de hidroxiapatita. El efecto del litio en el mejoramiento de la bioactividad en SBF se puede explicar debido a que el litio genera una estructura más amorfa en el vidrio (análisis FTIR), lo cual aumenta la solubilidad de la partícula y su reactividad para formar hidroxiapatita en contacto con los iones en SBF. Probablemente las altas concentraciones de litio en el medio modifican el ambiente de reacción, que favorecería una estructura más amorfa de la red del vidrio.

Por otro lado, las nanopartículas con potencial para aplicaciones de regeneración ósea deben ser citocompatibles y capaces de estimular la diferenciación osteogénica de células madre. El ensayo MTS muestra que no hay diferencias significativas de viabilidad y proliferación celular entre el grupo control y las células incubadas con medios acondicionados con las nanopartículas de vidrio bioactivo dopadas con litio. Lo anterior concuerda con las propiedades biológicas conocidas para el litio, elemento que no se caracteriza por su toxicidad, y que desde su aprobación por la FDA en la década de los setenta ha sido utilizado como fármaco para el tratamiento de enfermedades mentales en Chile y el mundo (Retamal Carrasco P. y Fullerton U., 1999).

La actividad de la enzima ALP es uno de los típicos marcadores relacionados con la diferenciación osteogénica de células madre. En los primeros experimentos se encontró que las partículas de nBG preparadas con litio no presentaban diferencias significativas, comparado a la partícula sin litio respecto a su capacidad para aumentar la actividad de ALP. Este resultado se explica debido a que probablemente no se logró una incorporación eficiente de litio en la partícula, lo puede ser deducido por el hecho de que solo las partículas sintetizadas con 40% de litio teórico liberaron iones de litio al medio, aunque en bajas concentraciones (0,66  $\mu\text{g/mL}$ ). Adicionalmente, el litio podría haber sido incorporado, pero encontrarse estabilizado en la estructura del vidrio (nBG) que dificulte su liberación al medio. En cualquiera de los dos casos la no existencia de técnicas de análisis apropiadas para determinar litio en estado sólido resulta limitante para dilucidar la causa del resultado obtenido. El uso de espectroscopía de emisión atómica de plasma acoplado por inducción (ICP-AES) constituye una alternativa para medir litio en estado disuelto, sin embargo, requiere un proceso de digestión de la muestra para disolver sus componentes. Esta técnica podría ser considerada en estudios posteriores para verificar los contenidos de litio efectivamente incorporados.

Con el propósito de comprobar en parte la hipótesis de trabajo respecto a que el litio es un elemento que puede potenciar las propiedades osteogénicas de las nanopartículas de nBG, se realizaron experimentos adicionales añadiendo litio en forma de iones solubles a los medios acondicionados con nBG. Los resultados demostraron que el litio mejora la expresión de ALP en combinación con nBG (no en la misma partícula), alcanzando niveles de absorbancia mayores al nBG por sí solo. Es conocido que la actividad osteogénica del nBG es debido a sus productos iónicos de disolución, especialmente a concentraciones específicas de especies solubles de silicio (13 – 20 ppm) y de iones calcio (84 – 93 ppm) (Xynos I. D. y cols., 2001). Lo anterior sumado a la también demostrada capacidad de iones litio  $\text{Li}^+$  explicarían en conjunto la capacidad para promover una mayor expresión de ALP de la combinación nBG + Li. Recientemente nuestro grupo también reportó la capacidad para promover diferenciación osteogénica de nanopartículas puras de  $\text{Li}_2\text{CO}_3$ , la cual fue dependiente de la concentración de iones  $\text{Li}^+$  liberados por la partícula, confirmando la actividad osteogénica de este elemento (Covarrubias C. y cols., 2018).

A pesar de que existen estudios reportados de vidrio bioactivo **micrométrico** con litio, ninguno de ellos confirma su incorporación en su estructura, aunque sí el mejoramiento de la bioactividad (Khorami M. y cols., 2011; Maçon A. L. y cols., 2017; Miguez-Pacheco V. y cols., 2016). Los resultados del presente trabajo de tesis indican que se requieren estudios adicionales para optimizar el grado de incorporación de litio en la estructura del vidrio bioactivo **nanométrico**. Los métodos de síntesis del vidrio bioactivo micrométrico (mBG) difieren del usado para obtener nBG, y probablemente la formación de un macrogel en la síntesis de mBG facilita la incorporación de cualquier tipo de elementos en el producto final. La síntesis de nBG requiere que unos pocos átomos se unan coordinadamente para formar una nanopartícula, pudiendo quedar excluidos algunos de ellos en el producto final, especialmente aquellos de menor carga como los iones  $\text{Li}^+$ .

Los resultados del trabajo demuestran que ciertas combinaciones de nBG con iones de litio disueltos en el medio generan un ambiente más favorable para estimular la diferenciación osteogénica de células madre, lo cual podría ser de interés para desarrollar biomateriales más eficientes para la reparación de tejido óseo.

Los actuales biomateriales utilizados en odontología están basados en autoinjertos óseos o biocerámicas (fosfato tricálcico, HA) que no presentan un mecanismo genético de estimulación ósea, razón por la cual estos materiales producen en la mayoría de los casos una reparación y no necesariamente la regeneración del tejido óseo, lo que involucra largos periodos de reconstrucción ósea (3-4 meses) y un tejido de baja calidad histológica. Por lo anterior, los mecanismos más avanzados de nanopartículas de vidrio combinadas con litio podrían ofrecer el desarrollo de biomateriales más eficientes para la reparación de tejido óseo en términos de calidad del mismo y menor tiempo de tratamiento, esto podría disminuir la tasa de fracasos consecuente a la instalación de implantes de titanio. Para ello se requieren futuros estudios que permitan diseñar biomateriales a base de estas nanopartículas que además cumplan con las exigencias clínicas deseables en manipulación y estabilidad.

## 8 CONCLUSIONES

1. A diferencia de la incorporación de litio reportada en vidrios bioactivos micrométricos, la síntesis de nBG dopadas con este elemento no permite el mismo grado de incorporación y/o liberación, requiriéndose estudios adicionales para obtener nBG con mayor contenido y niveles de liberación del elemento.
2. La síntesis de nBG en presencia de iones litio produce la formación de un vidrio con una estructura más amorfa y por lo tanto más soluble que promueve a una mayor formación de hidroxiapatita *in vitro* en contacto con SBF.
3. Ciertas combinaciones de nBG con litio en la forma iones disueltos en el medio, favorecen la diferenciación osteogénica celular en términos de actividad de ALP respecto al nBG, potenciando la bioactividad. Lo anterior confirma que el litio puede ser utilizado como un elemento para mejorar la capacidad osteogénica de biomateriales empleados en reconstrucción de tejido óseo.
4. La capacidad mostrada por las nanopartículas de vidrio combinadas con iones litio para estimular el proceso de diferenciación osteogénica *in vitro*, podría ser de utilidad en el futuro desarrollo de tratamientos de reconstrucción ósea maxilofacial más eficiente, que permitan la obtención de un tejido óseo de mayor calidad y la reducción de los tiempo de tratamiento.

## 9 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

1. Aguiar H., Serra J., y González P. (2011). Los vidrios bioactivos en el mundo de los biomateriales. *Anales de Química*, 107(3).
2. Albarova G. (2003). Materiales para la reparación y sustitución ósea. Factores de crecimiento y terapia genética en Cirugía Ortopédica y Traumatología. *Mapfre Medicina* 14(1):51-65.
3. Alikhani M., Lopez J., Alabdullah H., Vongthongleur T., Sangsuwon C., Alikhani M. y cols. (2016). High-frequency acceleration: Therapeutic tool to preserve bone following tooth extractions. *Journal of dental research* 95(3):311-318.
4. Alonso-Núñez G. (2008). Nanoquímica: Ingeniería de Nanomateriales. *Mundo Nano. Revista Interdisciplinaria en Nanociencia y Nanotecnología* 1(1).
5. Atwood D. A. (1971). Reduction of residual ridges: a major oral disease entity. *Journal of Prosthetic Dentistry* 26(3):266-279.
6. Baino F., y Vitale-Brovarone C. (2011). Three-dimensional glass-derived scaffolds for bone tissue engineering: current trends and forecasts for the future. *Journal of biomedical materials research Part A* 97(4):514-535.
7. Balanda C. (2013). Aislamiento de células madre a partir de tejidos dentales y su capacidad de diferenciación osteogénica. Tesis de Pregrado para optar al título de cirujano dentista. *Universidad de Chile*.
8. Bondarenko A., Angrisani N., Meyer-Lindenberg A., Seitz J., Waizy H., y Reifenrath J. (2014). Magnesium-based bone implants: Immunohistochemical analysis of peri-implant osteogenesis by evaluation of osteopontin and osteocalcin expression. *Journal of biomedical materials research Part A* 102(5):1449-1457.
9. Bottino M. C., Thomas V., Schmidt G., Vohra Y. K., Chu T.-M. G., Kowolik M. J. y cols. (2012). Recent advances in the development of GTR/GBR membranes for periodontal regeneration—a materials perspective. *Dental materials* 28(7):703-721.
10. Buser D. (2009). *20 years of guided bone regeneration in implant dentistry*: Quintessence Publishing Company.
11. Calvo R., Figueroa D., Díaz-Ledezma C., Vaisman A., y Figueroa F. (2011). Aloinjertos óseos y la función del banco de huesos. *Revista médica de Chile* 139:660-666.
12. Champion C. R., Chander C., Buckland T., y Hing K. (2011). Increasing strut porosity in silicate-substituted calcium-phosphate bone graft substitutes enhances osteogenesis. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials* 97(2):245-254.

13. Carboneras M., Hernández-Alvarado L., Mireles Y., Hernández L., García-Alonso M., y Escudero Rincón M. L. (2010). Tratamientos químicos de conversión para la protección de magnesio biodegradable en aplicaciones temporales de reparación ósea.
14. Covarrubias C., Arroyo F., Balanda C., Neira M., Von Martens A., Caviedes P. y cols. (2015). The effect of the nanoscale structure of nanobioceramics on their in vitro bioactivity and cell differentiation properties. *Journal of Nanomaterials* 16(1):430.
15. Covarrubias C., Durán J. P., y Maureira M. (2018). Facile synthesis of lithium carbonate nanoparticles with potential properties for bone repair applications. *Materials Letters* 219:205-208.
16. Chen Q., Rezwan K., Armitage D., Nazhat S., y Boccaccini A. (2006). The surface functionalization of 45S5 Bioglass®-based glass-ceramic scaffolds and its impact on bioactivity. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* 17(11):979-987.
17. da Silva J. G., Babb R., Salzlechner C., Sharpe P. T., Brauer D. S., y Gentleman E. (2017). Optimisation of lithium-substituted bioactive glasses to tailor cell response for hard tissue repair. *Journal of materials science* 52(15):8832-8844.
18. El-Kady A. M., Farag M. M., y El-Rashedi A. M. (2016). Bioactive glass nanoparticles designed for multiple deliveries of lithium ions and drugs: Curative and restorative bone treatment. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 91:243-250.
19. Engel E., Michiardi A., Navarro M., Lacroix D., y Planell J. A. (2008). Nanotechnology in regenerative medicine: the materials side. *Trends in biotechnology* 26(1):39-47.
20. Galli C., Piemontese M., Lumetti S., Manfredi E., Macaluso G., y Passeri G. (2013). GSK 3b-inhibitor lithium chloride enhances activation of Wnt canonical signaling and osteoblast differentiation on hydrophilic titanium surfaces. *Clinical oral implants research* 24(8):921-927.
21. Giannoudis P. V., Dinopoulos H., y Tsiridis E. (2005). Bone substitutes: an update. *Injury* 36(3):S20-S27.
22. Goldberg V. M. (1992). Natural history of autografts and allografts *Bone implant grafting* (pp. 9-12): Springer.
23. Goñi I. (2014). Estudio in vitro e in vivo de un recubrimiento osteoinductor para implantes dentales. *GACETA DENTAL* 255:85.

24. Gorustovich A. A., Roether J. A., y Boccaccini A. R. (2009). Effect of bioactive glasses on angiogenesis: a review of in vitro and in vivo evidences. *Tissue Engineering Part B: Reviews* 16(2):199-207.
25. Haffajee A. D., y Socransky S. S. (1994). Microbial etiological agents of destructive periodontal diseases. *Periodontology 2000* 5(1):78-111.
26. Hench L. L., y Jones J. R. (2015). Bioactive glasses: frontiers and challenges. *Frontiers in bioengineering and biotechnology* 3:194.
27. Hutchens S. A., Campion C., Assad M., Chagnon M., y Hing K. A. (2016). Efficacy of silicate-substituted calcium phosphate with enhanced strut porosity as a standalone bone graft substitute and autograft extender in an ovine distal femoral critical defect model. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* 27(1):20.
28. Khorami M., Hesaraki S., Behnamghader A., Nazarian H., y Shahrabi S. (2011). In vitro bioactivity and biocompatibility of lithium substituted 45S5 bioglass. *Materials Science and Engineering: C* 31(7):1584-1592.
29. Klein P. S., y Melton D. A. (1996). A molecular mechanism for the effect of lithium on development. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 93(16):8455-8459.
30. Klemetti E. (1996). A review of residual ridge resorption and bone density. *The Journal of prosthetic dentistry* 75(5):512-514.
31. Kokubo T., y Takadama H. (2006). How useful is SBF in predicting in vivo bone bioactivity? *Biomaterials* 27(15):2907-2915.
32. Lee K., Silva E. A., y Mooney D. J. (2011). Growth factor delivery-based tissue engineering: general approaches and a review of recent developments. *Journal of the Royal Society Interface* 8(55):153-170.
33. Lenox R. H., y Wang L. (2003). Molecular basis of lithium action: integration of lithium-responsive signaling and gene expression networks. *Mol Psychiatry* 8(2):135-144.
34. Lewandrowski K.-U., Gresser J. D., Wise D. L., Trantolo D. J., y Hasirci V. (2000). Tissue responses to molecularly reinforced polylactide-co-glycolide implants. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition* 11(4):401-414.
35. Lu H. H., El-Amin S. F., Scott K. D., y Laurencin C. T. (2003). Three-dimensional, bioactive, biodegradable, polymer-bioactive glass composite scaffolds with improved mechanical properties support collagen synthesis and mineralization of human osteoblast-like cells in vitro. *Journal of Biomedical Materials Research Part A: An Official Journal of The Society for Biomaterials, The Japanese Society for Biomaterials, and The Australian Society for Biomaterials and the Korean Society for Biomaterials* 64(3):465-474.

36. Maçon A. L., Jacquemin M., Page S. J., Li S., Bertazzo S., Stevens M. M. y cols. (2017). Lithium-silicate sol-gel bioactive glass and the effect of lithium precursor on structure-property relationships. *Journal of Sol-Gel Science and Technology* 81(1):84-94.
37. Marie P., Ammann P., Boivin G., y Rey C. (2001). Mechanisms of action and therapeutic potential of strontium in bone. *Calcified tissue international* 69(3):121-129.
38. Mendonça G., Mendonça D. B., Aragao F. J., y Cooper L. F. (2008). Advancing dental implant surface technology—from micron-to nanotopography. *Biomaterials* 29(28):3822-3835.
39. Miguez-Pacheco V., Büttner T., Maçon A., Jones J., Fey T., De Ligny D. y cols. (2016). Development and characterization of lithium-releasing silicate bioactive glasses and their scaffolds for bone repair. *Journal of Non-Crystalline Solids* 432:65-72.
40. Ministerio de Minería de Chile. ¿Qué es el litio? Disponible en: <http://www.minmineria.gob.cl/?que-es-el-litio> [Consultado en Octubre de 2018]
41. Moghanian A., Firoozi S., Tahiri M., y Sedghi A. (2018). A comparative study on the in vitro formation of hydroxyapatite, cytotoxicity and antibacterial activity of 58S bioactive glass substituted by Li and Sr. *Materials Science and Engineering: C* 91:349-360.
42. Nayar S., Bhuminathan S., y Muthuvignesh J. (2011). Upsurge of nanotechnology in dentistry and dental implants. *Indian Journal of Multidisciplinary Dentistry* 1(5).
43. Nemcovsky C. E., y Serfaty V. (1996). Alveolar ridge preservation following extraction of maxillary anterior teeth. Report on 23 consecutive cases. *Journal of periodontology* 67(4):390-395.
44. Oonishi H., Hench L., Wilson J., Sugihara F., Tsuji E., Kushitani S. y cols. (1999). Comparative bone growth behavior in granules of bioceramic materials of various sizes. *Journal of Biomedical Materials Research: An Official Journal of The Society for Biomaterials, The Japanese Society for Biomaterials, and the Australian Society for Biomaterials* 44(1):31-43.
45. Peral Cagigal B., Redondo González L., Verrier Hernández A., Serrat Soto A., Torres Nieto M., y Vaquero Puerta C. (2008). Estudio experimental sobre la regeneración ósea mandibular de la rata con diferentes biomateriales. *Revista Española de Cirugía Oral y Maxilofacial* 30(5):313-323.
46. Pérez Millán M. I., y Lorenti A. (2006). Células troncales (stem cells) y regeneración cardíaca. *Medicina (Buenos Aires)* 66(6):574-582.

47. Pihlstrom B. L., Michalowicz B. S., y Johnson N. W. (2005). Periodontal diseases *Lancet* 366: 1809–1820. doi: 10.1016. *S0140-6736 (05):67728-67728*.
48. Reddi A. H. (2000). Morphogenesis and tissue engineering of bone and cartilage: inductive signals, stem cells, and biomimetic biomaterials. *Tissue engineering* 6(4):351-359.
49. Retamal Carrasco P., y Fullerton U. (1999). Litis y enfermedad bipolar. *Rev Med Chil* 127(10):1274-1276.
50. Rosales-Ibáñez R., Alvarado-Estrada K. N., y Ojeda-Gutiérrez F. (2012). Tissue Engineering in Dentistry. *Revista de la Asociación Dental Mexicana* 69(4):164-167.
51. Sedgley C. M., y Botero T. M. (2012). Dental stem cells and their sources. *Dent Clin North Am* 56(3):549-561.
52. Shainberg A. P. M., Valério P., Zonari A., Oktar F. N., Ozyegin L. S., Graça M. P. F. y cols. (2012). Attachment and proliferation of osteoblasts on lithium-hydroxyapatite composites. *Advances in Materials Science and Engineering 2012*.
53. Sheikh Z., Hamdan N., Ikeda Y., Grynypas M., Ganss B., y Glogauer M. (2017). Natural graft tissues and synthetic biomaterials for periodontal and alveolar bone reconstructive applications: a review. *Biomaterials research* 21(1):9.
54. Sheikh Z., Najeeb S., Khurshid Z., Verma V., Rashid H., y Glogauer M. (2015). Biodegradable materials for bone repair and tissue engineering applications. *Materials* 8(9):5744-5794.
55. Shetty V., y Han T. (1991). Alloplastic materials in reconstructive periodontal surgery. *Dent Clin North Am* 35(3):521-530.
56. Singh S., Wu B. M., y Dunn J. C. (2012). Delivery of VEGF using collagen-coated polycaprolactone scaffolds stimulates angiogenesis. *Journal of biomedical materials research Part A* 100(3):720-727.
57. Slots J., MacDonald E. S., y Nowzari H. (1999). Infectious aspects of periodontal regeneration. *Periodontology 2000* 19(1):164-172.
58. Soto S., y González M. G. T. (2005). Injertos óseos: Una alternativa efectiva y actual para la reconstrucción del complejo cráneo-facial. *Revista Cubana de estomatología* 42(1):0-0.
59. Sowmya S., Kumar P. S., Chennazhi K., Nair S., Tamura H., y Rangasamy J. (2011). Biocompatible  $\beta$ -chitin hydrogel/nanobioactive glass ceramic nanocomposite scaffolds for periodontal bone regeneration. *Artif. Organs* 25(1):1-11.

60. Suchánek J., Visek B., Soukup T., El-Din Mohamed S., Ivancakova R., Mokry J. y cols. (2010). Stem cells from human exfoliated deciduous teeth-isolation, long term cultivation and phenotypical analysis. *Acta Medica (Hradec Kralove)* 53(2):93-99.
61. Sujesh M., Rangarajan V., Kumar C. R., y Kumar G. S. (2012). RETRACTED ARTICLE: Stem Cell Mediated Tooth Regeneration: New Vistas in Dentistry. *The Journal of Indian Prosthodontic Society* 12(1):1-7.
62. Tan W. C., Lang N. P., Zwahlen M., y Pjetursson B. E. (2008). A systematic review of the success of sinus floor elevation and survival of implants inserted in combination with sinus floor elevation Part II: transalveolar technique. *Journal of clinical periodontology* 35:241-254.
63. Thompson I., y Hench L. (1998). Mechanical properties of bioactive glasses, glass-ceramics and composites. *Proceedings of the Institution of Mechanical Engineers, Part H: Journal of Engineering in Medicine* 212(2):127-136.
64. Ueda M. (2011). Tissue engineered bone; Application for implant surgery. *Inflammation and Regeneration* 31(2):202-218.
65. Wang Y., Yang X., Gu Z., Qin H., Li L., Liu J. y cols. (2016). In vitro study on the degradation of lithium-doped hydroxyapatite for bone tissue engineering scaffold. *Materials Science and Engineering: C* 66:185-192.
66. Ward B., Brown S., y Krebsbach P. (2010). Bioengineering strategies for regeneration of craniofacial bone: a review of emerging technologies. *Oral diseases* 16(8):709-716.
67. Whang P. G., y Wang J. C. (2003). Bone graft substitutes for spinal fusion. *The Spine Journal* 3(2):155-165.
68. Wheeler D., Stokes K., Hoellrich R., Chamberland D., y McLoughlin S. (1998). Effect of bioactive glass particle size on osseous regeneration of cancellous defects. *Journal of Biomedical Materials Research: An Official Journal of The Society for Biomaterials, The Japanese Society for Biomaterials, and the Australian Society for Biomaterials* 41(4):527-533.
69. Wheeler D., Stokes K., Park H., y Hollinger J. (1997). Evaluation of particulate Bioglass® in a rabbit radius ostectomy model. *Journal of Biomedical Materials Research: An Official Journal of The Society for Biomaterials and The Japanese Society for Biomaterials* 35(2):249-254.
70. Wiesen M., y Kitzis R. (1998). Preservation of the alveolar ridge at implant sites. *Periodontal clinical investigations: official publication of the Northeastern Society of Periodontists* 20(2):17-20.

71. Wu C., Zhou Y., Xu M., Han P., Chen L., Chang J. y cols. (2013). Copper-containing mesoporous bioactive glass scaffolds with multifunctional properties of angiogenesis capacity, osteostimulation and antibacterial activity. *Biomaterials* 34(2):422-433.
72. Xynos I., Hukkanen M., Batten J., Buttery L., Hench L., y Polak J. (2000). Bioglass® 45S5 stimulates osteoblast turnover and enhances bone formation in vitro: implications and applications for bone tissue engineering. *Calcified tissue international* 67(4):321-329.
73. Xynos I. D., Edgar A. J., Buttery L. D., Hench L. L., y Polak J. M. (2001). Gene-expression profiling of human osteoblasts following treatment with the ionic products of Bioglass® 45S5 dissolution. *Journal of Biomedical Materials Research: An Official Journal of The Society for Biomaterials, The Japanese Society for Biomaterials, and The Australian Society for Biomaterials and the Korean Society for Biomaterials* 55(2):151-157.
74. Zárate-Kalfópulos B., y Reyes-Sánchez A. (2006). Injertos óseos en cirugía ortopédica. *Cirugía y Cirujanos* 74(3):217-222.
75. Zreiqat H., Ramaswamy Y., Wu C., Paschalidis A., Lu Z., James B. y cols. (2010). The incorporation of strontium and zinc into a calcium–silicon ceramic for bone tissue engineering. *Biomaterials* 31(12):3175-3184.

## 10 ANEXOS Y APÉNDICES.

### 10.1 Acta de aprobación de protocolo de investigación

Ed- 02 de agosto de 2018



#### ACTA DE APROBACION DE PROTOCOLO DE INVESTIGACIÓN

ACTA N° 2018/06

PROTOCOLO DE ESTUDIO N°2018/06

1. Acta de Aprobación de Proyecto, titulado: "Diseño de nuevos biomateriales y aislamiento de células madre para ingeniería de tejido óseo y cartilaginoso"
2. Miembros del Comité Ético-Científico de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile participantes en la aprobación del Proyecto:

**Dr. Eduardo Fernández**  
Presidente CEC

**Dr. Marco Cornejo**  
Miembro permanente CEC

**Dr. Juan Estay**  
Miembro permanente CEC

**Sra. Rebeca Galarce**  
Miembro permanente CEC

**Dra. Viviana Toro**  
Miembro alterno CEC

**Dr. Aler Fuentes D.**  
Miembro permanente CEC

**Dr. José Suazo**  
Miembro Alterno CEC

3. Fecha de Aprobación: 24-07-2018
4. Título completo del proyecto: "Diseño de nuevos biomateriales y aislamiento de células madre para ingeniería de tejido óseo y cartilaginoso"
5. Investigador responsable: Cristian Covarrubias Gallardo
6. Institución Patrocinante: Instituto de Investigación en Ciencias Odontológicas, Facultad de Odontología Universidad de Chile

**7. Documentación Revisada:**

- Proyecto y resumen
- Currículo del investigador responsable y coinvestigadores
- Carta Solicitud Evaluación
- Carta autorización Director de Clínica
- Carta compromiso del Investigador Principal
- Carta director del Instituto de Investigación en Ciencias Odontológicas

**8. Fundamentación de la aprobación**

Este proyecto es aprobado luego que se realizaran las siguientes modificaciones en relación a los aspectos sugeridos por CEC:

**Aspectos Metodológicos**

- En el objetivo específico 4 se hace necesario especificar si se analizará la viabilidad de las células madre de ambas fuentes.
- Justificar con más detalle el tamaño muestral, mencionando si hay algún cálculo matemático que lo justifique o si se basa en algún estudio previo citando dichos estudios. Además debe entregarse más información sobre variables de estos individuos como edad, sexo y/o patologías de base. El proyecto indica que se tratará de "pacientes sanos", lo que debe también ser especificado respecto a los criterios para considerar a un individuo sano para este estudio.
- El procedimiento de obtención de muestras de tejido indica que se realizara un incisión de un área cuadrada de 3x3 mm y de una profundidad de 3 mm. La pregunta es si este procedimiento es parte de la rutina de la instalación de implantes o sólo está considerado para efectos del proyecto. De ser así, debe indicarse en el documento de consentimiento informado detallando el posible riesgo asociado a esta intervención.
- Dado que son 60 voluntarios en total es importante, luego de justificar esta cifra, detallar si todas las muestras serán sujetas a todas las condiciones o serán subdivididas en grupos. Si es esta última opción considerar que los grupos deben ser homogéneos en promedio de edad y proporción de sexos.
- Se debe considerar un mayor detalle respecto a los métodos estadísticos a utilizar, las variables que se considerarán y los grupos a comparar.

Ed- 02 de agosto de 2018

**Aspectos Éticos:**

El formulario tanto de consentimiento informado como de asentimiento informado debe ser presentado en el formato disponible en la página web de la Facultad de Odontología, en el sitio correspondiente al CEC.

Estos formularios deben ser redactados de manera tal que cualquier persona sin una formación médica/científica los pueda comprender, evitando el uso de lenguaje muy técnico.

Es necesario considerar el riesgo para el paciente, por mínimo que este sea, si se somete a la intervención para obtener la muestra.

En consecuencia, el Comité Ético Científico de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile, ha aprobado el Proyecto, titulado **“Diseño de nuevos biomateriales y aislamiento de células madre para ingeniería de tejido óseo y cartilaginosa”**

  
**Dr. Eduardo Fernández G.**  
**Presidente CEC**



**C/c.: Investigador Principal y Secretaría C.E.C.**

## 10.2 Consentimiento informado (participantes adultos)



### CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

#### (Participantes adultos)

**Nombre de estudio:**

“Diseño de nuevos biomateriales y aislamiento de células madre para ingeniería de tejido óseo y cartilaginoso”

**Investigador Principal:**

Prof. Dr. Cristian Covarrubias Gallardo.

Instituto de Investigación en Ciencias Odontológicas

Facultad de Odontología, Universidad de Chile.

Sergio Livingstone Pohlhammer 943, Independencia, Santiago.

Fono: 9781719, E-mail: [ccovarrubias@odontología.uchile.cl](mailto:ccovarrubias@odontología.uchile.cl)

**Nombre del Patrocinante:**

Facultad de Odontología, Universidad de Chile

Proyecto revisado y aprobado por el Comité Ético Científico de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile.

Presidente CEC:

Dr. Eduardo Fernández G.

Departamento de Odontología Restauradora. Universidad de Chile

Sergio Livingstone Pohlhammer 943, Independencia, Santiago.

E-mail: [edofdez@u.uchile.cl](mailto:edofdez@u.uchile.cl)

**Nombre del Participante:** \_\_\_\_\_

Este Documento de Consentimiento Informado tiene dos partes:

- Información (proporciona información sobre el estudio para usted)
- Formulario de Consentimiento (para firmar si está de acuerdo en participar)

Se le dará una copia del Documento completo de consentimiento informado

Solicitamos a Usted su colaboración con este estudio. Antes de decidir si colabora o no, debe conocer y comprender los aspectos que se exponen a continuación. Siéntase con absoluta libertad para preguntar sobre cualquier aspecto sobre el cual tenga dudas. Una vez que haya comprendido el estudio y si usted desea colaborar, entonces se le pedirá que firme este formulario.





## EXPLICACIÓN DEL PROYECTO

El hueso de nuestro cuerpo se puede perder por diferentes motivos, tales como accidentes, enfermedades, malformaciones, o infecciones como las que afectan el hueso que sostiene nuestros dientes. Para recuperar el hueso perdido se debe extraer al paciente hueso de otra zona de su cuerpo o utilizar algunos injertos sintéticos que no siempre son muy efectivos. Por esta razón hoy en día la ingeniería de tejidos estudia formas para regenerar hueso utilizando biomateriales y células madre.

Se está haciendo un estudio para desarrollar biomateriales, utilizando unas partículas muy pequeñas (nanopartículas) que estimulan la formación de hueso, las que se combinarán con células madre, que pueden formar un hueso nuevo. Estas células madre se obtendrán desde la pulpa de los dientes o de una parte de la encía que se conoce como zona retromolar.

Lo hemos contactado porque usted requiere la extracción de algunos dientes que cumplen con los requisitos requeridos para este estudio (la extracción del tercer molar por indicaciones quirúrgicas o protésicas u ortodóncicas, sin enfermedad periodontal ni otras enfermedades generales); quisiéramos solicitar a Usted, la donación de sus dientes extraídos. De otra forma, si usted está siendo sometido a un tratamiento con implantes dentales le solicitamos donar una pequeña muestra de su encía obtenida de la zona que está detrás de su último diente. Estas muestras de tejido serán tomadas por el cirujano maxilofacial y no implicará un procedimiento extra.

Los dientes o el tejido de la zona retromolar donados, se utilizarán sólo con el fin recién expuesto y no se guardará ningún registro de su relación con el donante (con usted). Ningún otro tipo de estudio se realizará con tejidos dentales ni con las células madre obtenidas de ellos. Una vez utilizados, los dientes serán destruidos y eliminados siguiendo los protocolos de bioseguridad vigentes. La obtención de estas muestras en sí no presenta riesgos, ni costos adicionales para usted, pero el financiamiento del proceso quirúrgico de extracción será su responsabilidad.

No existe ningún tipo beneficio inmediato por su participación en el estudio, ya que los tejidos dentales a utilizar son normalmente desechados. Sin embargo, como consecuencia de esta donación y de la investigación a realizar se espera contribuir a aplicaciones futuras en el ámbito clínico.

### Aclaraciones

La colaboración con el estudio es completamente voluntaria, y usted puede dejar de participar libremente.

No habrá ninguna consecuencia desfavorable para usted en caso de no aceptar la invitación.

No tendrá que efectuar gasto alguno como consecuencia del estudio.

No recibirá pago por su donación.

Si considera que no existen dudas ni preguntas acerca de su participación, le solicitamos firmar el Formulario de consentimiento Informado anexo al documento. Si usted desea conocer los resultados o tiene cualquier pregunta puede hacerla ahora o más tarde, contactando al Dr. Cristian Covarrubias (Instituto de investigación en ciencias odontológicas, Facultad de Odontología, U. de Chile. Fono: 9781719, E-mail: [ccovarrubias@odontologia.uchile.cl](mailto:ccovarrubias@odontologia.uchile.cl) o si lo desea al Dr. Eduardo Fernández G. presidente del Comité de Ética y aclarar sus dudas.



### 10.3 Asentimiento informado (menores de 18 y mayores de 11 años)



#### ASENTIMIENTO INFORMADO PARA PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

(Menores de 18 y mayores de 11 años)

**Nombre de Estudio:** "Diseño de nuevos biomateriales y aislamiento de células madre para ingeniería de tejido óseo y cartilaginoso"

**Investigador Principal:** Prof. Dr. Cristián Covarrubias Gallardo  
 Instituto de Investigación Odontológica (ICOD)  
 Facultad de Odontología, Universidad de Chile.  
 Sergio Livingstone Pohlhammer 943, Independencia, Santiago.  
 Fono: 978581751, E-mail: ccovarrubias@odontologia.uchile.cl

**Nombre del Patrocinante:** Facultad de Odontología, Universidad de Chile

Proyecto revisado y aprobado por el Comité Ético Científico de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile.

**Presidente CEC:** Prof. Dr. Eduardo Fernández.

**Nombre del Participante:** \_\_\_\_\_

Este Documento de Consentimiento Informado tiene dos partes:

- Información (proporciona información sobre el estudio para usted)
- Formulario de Consentimiento (para firmar si está de acuerdo en participar)

Se le dará una copia del Documento completo de Asentimiento Informado

Solicitamos su colaboración con este estudio. Antes de decidir si colabora o no, debe conocer y comprender los aspectos que se exponen a continuación. Debe sentirse con absoluta libertad para preguntar sobre cualquier aspecto del cual tenga dudas. Una vez que haya comprendido y si aún quiere colaborar, entonces se le pedirá que firme este formulario.





## EXPLICACION DEL PROYECTO

El hueso de nuestro cuerpo se puede perder por diferentes motivos, tales como accidentes, enfermedades, malformaciones, o infecciones como las que afectan el hueso que sostiene nuestros dientes. Para recuperar el hueso perdido se debe extraer al paciente hueso de otra zona de su cuerpo o utilizar algunos injertos sintéticos que no siempre son muy efectivos. Por esta razón hoy en día la ingeniería de tejidos estudia formas para regenerar hueso utilizando biomateriales y células madre.

Se está haciendo un estudio para desarrollar biomateriales, utilizando unas partículas muy pequeñas (nanopartículas) que estimulan la formación de hueso, las que se combinarán con células madre, que pueden formar un hueso nuevo. Estas células madre se obtendrán desde la pulpa de los dientes o de una parte de la encía que se conoce como zona retromolar.

Lo hemos contactado porque usted requiere la extracción de algunos dientes que cumplen con los requisitos requeridos para este estudio (la extracción del tercer molar por indicaciones quirúrgicas o protésicas u ortodóncicas, sin enfermedad periodontal ni otras enfermedades generales); quisiéramos solicitar a Usted, la donación de sus dientes extraídos. De otra forma, si usted está siendo sometido a un tratamiento con implantes dentales le solicitamos donar una pequeña muestra de su encía obtenida de la zona que está detrás de su último diente. Estas muestras de tejido serán tomadas por el cirujano maxilofacial y no implicará un procedimiento extra.

Los dientes o el tejido de la zona retromolar donados, se utilizarán sólo con el fin recién expuesto y no se guardará ningún registro de su relación con el donante (con usted). Ningún otro tipo de estudio se realizará con tejidos dentales ni con las células madre obtenidas de ellos. Una vez utilizados, los dientes serán destruidos y eliminados siguiendo los protocolos de bioseguridad vigentes. La obtención de estas muestras en sí no presenta riesgos, ni costos adicionales para usted, pero el financiamiento del proceso quirúrgico de extracción será su responsabilidad.

No existe ningún tipo beneficio inmediato por su participación en el estudio, ya que los tejidos dentales a utilizar son normalmente desechados. Sin embargo, como consecuencia de esta donación y de la investigación a realizar se espera contribuir a aplicaciones futuras en el ámbito clínico.

### Aclaraciones

La colaboración con el estudio es completamente voluntaria, y usted puede dejar de participar libremente.

No habrá ninguna consecuencia desfavorable para usted en caso de no aceptar la invitación.

No tendrá que efectuar gasto alguno como consecuencia del estudio.

No recibirá pago por su donación.

Si considera que no existen dudas ni preguntas acerca de su participación, le solicitamos firmar el Formulario de consentimiento Informado anexo al documento. Si usted desea conocer los resultados o tiene cualquier pregunta puede hacerla ahora o más tarde, contactando al Dr. Cristian Covarrubias (Instituto de investigación en ciencias odontológicas, Facultad de Odontología, U. de Chile. Fono: 9781719, E-mail: [ccovarrubias@odontologia.uchile.cl](mailto:ccovarrubias@odontologia.uchile.cl) o si lo desea al Dr. Eduardo Fernández G. presidente del Comité de Ética y aclarar sus dudas.





**FORMULARIO DE ASENTIMIENTO INFORMADO**

He sido invitado a colaborar con la investigación de creación y evaluación de nuevos materiales para evitar la formación de manchas blancas. Entiendo que colaboraré donando mis dientes extraídos o una pequeña muestra de encía. Sé que no existen beneficios inmediatos para mí persona, y que no se me recompensará por participar. Se me ha proporcionado el nombre de un investigador que puede ser fácilmente contactado y su dirección de correo electrónico.

**He leído la información proporcionada. He tenido la oportunidad de preguntar sobre ella y se me ha contestado satisfactoriamente las preguntas que he realizado. Consiento voluntariamente colaborar en esta investigación donando mis dientes extraídos o una pequeña muestra de encía.**

Nombre del Donante \_\_\_\_\_

Firma \_\_\_\_\_

Nombre del Tutor \_\_\_\_\_

Firma \_\_\_\_\_



Santiago, \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

**Sección a llenar por el Investigador o su representante:**

He explicado al Sr(a)..... la naturaleza de la investigación. He contestado a las preguntas en la medida de lo posible y he preguntado si tiene alguna duda. Una vez concluida la sesión de preguntas y respuestas, se procedió a firmar el presente documento

Nombre y Firma del Investigador que toma el CI \_\_\_\_\_ Fecha \_\_\_\_\_

Dr. Cristian Covarrubias G. \_\_\_\_\_

Nombre y Firma del Investigador Principal \_\_\_\_\_ Fecha \_\_\_\_\_

Dra. Andrea Véliz Ramírez \_\_\_\_\_

Nombre y Firma del director del Centro o de su Representante \_\_\_\_\_ Fecha \_\_\_\_\_