



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

**“SÍNTESIS DE NANOPARTÍCULAS DE LITIO Y EVALUACIÓN DE SU  
CITOCOMPATIBILIDAD Y CAPACIDAD PARA ESTIMULAR LA  
DIFERENCIACIÓN OSTEOGÉNICA *IN VITRO* DE CÉLULAS MADRE DE LA  
PULPA DENTAL”**

**Juan Pablo Enrique Durán Jaramillo**

**TRABAJO DE INVESTIGACIÓN  
REQUISITO PARA OPTAR AL TÍTULO DE  
CIRUJANO-DENTISTA**

**TUTOR PRINCIPAL  
Prof. Dr. Cristian Covarrubias Gallardo**

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

**Santiago - Chile**

**2018**





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

**“SÍNTESIS DE NANOPARTÍCULAS DE LITIO Y EVALUACIÓN DE SU  
CITOCOMPATIBILIDAD Y CAPACIDAD PARA ESTIMULAR LA  
DIFERENCIACIÓN OSTEOGÉNICA *IN VITRO* DE CÉLULAS MADRE DE LA  
PULPA DENTAL”**

**Juan Pablo Enrique Durán Jaramillo**

**TRABAJO DE INVESTIGACIÓN  
REQUISITO PARA OPTAR AL TÍTULO DE  
CIRUJANO-DENTISTA**

**TUTOR PRINCIPAL  
Prof. Dr. Cristian Covarrubias Gallardo**

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

**Santiago - Chile**

**2018**

## **Dedicatoria**

A mi familia que me ha apoyado durante toda mi vida.

## **Agradecimientos**

A mi tutor de tesis, Dr. Cristian Covarrubias por su gran colaboración y apoyo para la realización de este trabajo. Al Dr. Juan Pablo Rodríguez (INTA) por su colaboración con sus conocimientos sobre células madre y ensayos PCR.

Al Laboratorio de Biología Celular por las facilidades otorgadas para realizar procedimientos de extracción y cuantificación de ARN/ADN y al Laboratorio de Biología Periodontal por facilitar el equipo de fotodocumentación.

A los miembros del Laboratorio de Nanobiomateriales con quienes compartí gran parte del tiempo mientras desarrollaba los experimentos de esta tesis. Los profesores: Yévenes, Díaz y Neira. También a Carlita, Sandra, Margarita, Matías y Miguel. También agradezco a Rocío Orellana por su dedicación para obtener imágenes de litio de buena calidad operando el microscopio electrónico de barrido de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile (FOUCH).

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

Al proyecto U-Redes por el financiamiento otorgado.

A mi familia que me ha apoyado durante toda mi vida.

A mis amigos y compañeros con quienes he pasado gratos momentos durante mi carrera universitaria.

Todos han contribuido de alguna forma para que este trabajo sea llevado a cabo exitosamente.

## Índice

|  |           |
|--|-----------|
| <b>1. Resumen.....</b>   | <b>1</b>  |
| <b>2. Introducción .....</b>   | <b>3</b>  |
| <b>3. Marco teórico.....</b>   | <b>4</b>  |
| 3.1 Reparación ósea en odontología .....   | 4         |
| 3.2 Ingeniería de tejidos aplicada a tejido óseo .....   | 7         |
| 3.3 El litio como elemento bioactivo .....   | 9         |
| 3.4 Nanopartículas de litio (nLi) .....  | 11        |
| <b>4. Hipótesis y Objetivos.....</b>   | <b>15</b> |
| 4.1 Hipótesis .....  | 15        |
| 4.2 Objetivo General .....   | 15        |
| 4.3 Objetivos específicos .....  | 15        |
| <b>5. Materiales y métodos.....</b>  | <b>16</b> |
| 5.1 Síntesis de nLi .....  | 16        |
| 5.1.1 Método por reducción química .....   | 16        |
| 5.1.2 Método por cristalización .....  | 16        |
| 5.1.3 Método por liofilización .....   | 17        |
| 5.2 Caracterización de nLi .....   | 17        |
| 5.2.1 Microscopía electrónica de barrido con espectroscopía<br>dispersiva de rayos X (MEB-EDX).....        | 17        |
| 5.2.2 Espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier de<br>reflexión total atenuada (FTIR-ATR)..... | 18        |
| 5.3 Espectrofotometría UV.....   | 18        |
| 5.4 Fotometría de emisión de llama.....  | 19        |
| 5.5 Difracción de rayos X (DRX).....   | 19        |

|            |   |           |
|------------|---|-----------|
| 5.6        | Ensayos de bioactividad en fluido fisiológico simulado (SBF).....                               | 19        |
| 5.7        | Ensayos con células madre .....   | 21        |
| 5.7.1      | Medios acondicionados con nLi.....  | 21        |
| 5.7.2      | Ensayo de viabilidad celular por MTS .....  | 21        |
| 5.7.3      | Ensayo actividad enzimática de fosfatasa alcalina (ALP).....                                    | 22        |
| 5.7.4      | Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (RT-PCR).....                     | 23        |
| 5.8        | Análisis estadístico .....  | 24        |
| <b>6.</b>  | <b>Resultados .....</b>   | <b>25</b> |
| 6.1        | Síntesis de nLi por reducción química .....   | 25        |
| 6.2        | Síntesis de nLi por métodos de cristalización y liofilización .....                             | 26        |
| 6.3        | Análisis DRX .....  | 28        |
| 6.4        | Espectroscopía infrarroja transformada de Fourier de reflexión total atenuada (FTIR-ATR). ..... | 29        |
| 6.5        | Ensayos de bioactividad en SBF .....  | 30        |
| 6.6        | Curva de liberación de iones de litio desde nanopartículas .....                                | 33        |
| 6.7        | Ensayos con células madre .....   | 34        |
| 6.7.1      | Ensayo de viabilidad celular por MTS .....  | 34        |
| 6.7.2      | Actividad de ALP .....  | 35        |
| 6.7.3      | Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (RT-PCR).....                     | 36        |
| <b>7.</b>  | <b>Discusión .....</b>  | <b>37</b> |
| <b>8.</b>  | <b>Conclusiones.....</b>  | <b>42</b> |
| <b>9.</b>  | <b>Referencias bibliográficas.....</b>  | <b>43</b> |
| <b>10.</b> | <b>Anexos y apéndices.....</b>  | <b>51</b> |
| 10.1       | Anexo 1: Acta de aprobación de protocolo de investigación.....                                  | 51        |

|   |    |
|---|----|
| 10.2 Anexo 2: Consentimiento Informado para participantes adultos .....               | 54 |
| 10.3 Anexo 3: Consentimiento Informado para padres o tutores .....                    | 57 |
| 10.4 Anexo 4: Asentimiento informado para menores de 18 y mayores de<br>11 años ..... | 60 |
| 10.5 Anexo 5: Publicación científica realizada a partir de este trabajo ...           | 63 |



## 1. Resumen.

**Introducción:** Actualmente la reconstrucción de defectos óseos del complejo cráneo–máxilo–facial, es un desafío en el campo odontológico y se requieren terapias clínicas más eficientes para lograr la regeneración de tejido óseo.

El litio es un elemento con demostradas propiedades osteogénicas *in vitro* e *in vivo*. Sin embargo, este elemento no ha sido estudiado como nanopartícula.

En este trabajo, se estudió la síntesis de nanopartículas de litio (nLi) y se evaluaron sus propiedades osteogénicas *in vitro*.

**Objetivos:** Sintetizar partículas de litio con tamaño nanométrico y evaluar su citocompatibilidad y capacidad para estimular la diferenciación osteogénica *in vitro* de células madre de pulpa dental.

**Materiales y métodos:** Se sintetizaron nLi utilizando distintos agentes separadores: polivinil alcohol (PVA), polivinil pirrolidona (PVP) y bromuro de hexadeciltrimetilamonio (CTA), en conjunto con distintos métodos de síntesis. Los productos sintetizados fueron caracterizados mediante difracción de rayos X (DRX), microscopía electrónica de barrido (MEB), espectroscopía infrarroja transformada de Fourier de reflexión total atenuada (FTIR-ATR) y espectrofotometría. La bioactividad *in vitro* se evaluó mediante la capacidad para inducir la formación de apatita tipo ósea en fluido fisiológico simulado (SBF). Se evaluó citocompatibilidad de las nanopartículas y su capacidad para estimular la diferenciación osteogénica, utilizando células madre de pulpa dental de terceros molares.

**Resultados:** El método de liofilización y usando PVA como agente separador (PVA/nLi) permitió sintetizar nLi en polvo, con el menor tamaño (~88 nm) de partícula y mayor rendimiento. Se comprobó que las nanopartículas corresponden a  $\text{Li}_2\text{CO}_3$ .

Las PVA/nLi son capaces de inducir la formación química de apatita tipo ósea en SBF, mostraron ser citocompatibles y aumentan la actividad enzimática de fosfatasa alcalina (ALP) así como la expresión del gen RUNX2 en células madre,

ambos marcadores asociados al proceso de diferenciación osteogénica. Las PVA/nLi también mostraron una liberación sostenida de iones litio en el tiempo.

**Conclusión:** nLi pueden ser sintetizadas en forma de polvo por medio de una ruta simple y usando preferentemente PVA como agente separador. Las nanopartículas inducen la mineralización de apatita en SBF, son citocompatibles y promueven la diferenciación osteogénica *in vitro* de células madre. Las propiedades bioactivas exhibidas por las PVA/Li podrían ser de utilidad para el mejoramiento de tratamientos de reconstrucción ósea.

## 2. Introducción

En el campo clínico odontológico, especialmente en aplicaciones quirúrgicas, maxilofaciales, implantológicas y periodontales la reconstrucción de defectos óseos del complejo cráneo-máxilo-facial constituye un actual desafío. Con el propósito de lograr la reparación óptima del tejido, se requieren terapias clínicas más eficientes tendientes a producir un tejido de superior calidad y reducir los tiempos requerido en el tratamiento de reconstrucción ósea.

El desarrollo de la nanotecnología, en conjunto con la ingeniería de tejidos, ofrece innovadoras soluciones a través del estudio, diseño y uso de nanopartículas bioactivas. Este tipo de partículas pueden ser usadas para el diseño de biomateriales con propiedades más avanzadas para estimular la regeneración de tejidos, debido a que ofrecen mejores propiedades bioactivas que los biomateriales tradicionales.

El litio es un elemento utilizado por décadas en el ámbito médico en el tratamiento de trastornos psicopatológicos (Shorter E., 2009). Sin embargo, el litio es también una sustancia con demostradas propiedades osteogénicas *in vitro* e *in vivo*. Actualmente todos los estudios sobre litio como estimulador osteogénico se realizaron utilizando este elemento en la forma de ion  $\text{Li}^+$ , y no se reportan estudios de este elemento en la forma de nanopartícula. Adicionalmente, la síntesis de partículas nanométricas de litio, es un desafío poco abordado en la literatura. Chile es el segundo productor de litio a nivel global, después de Australia, y contiene una de las más grandes reservas de este mineral, por lo que estratégicamente surge el interés por investigar nuevas aplicaciones para este elemento, especialmente en la forma de nanopartícula y en el contexto odontológico (Ober J. A., 2018).

El presente trabajo de tesis tiene como objetivo estudiar métodos para la síntesis de partículas nanométricas de litio y evaluar por primera vez sus propiedades osteogénicas *in vitro*.

### **3. Marco teórico**

#### **3.1 Reparación ósea en odontología**

Actualmente en Chile el edentulismo constituye un problema importante de salud pública, gran parte de la población adulta pierde una cantidad considerable de dientes, debido a la presencia de caries y enfermedad periodontal, así como también por lesiones menos comunes como traumatismos y patologías malignas o benignas (Urzua I. y cols., 2012). El tejido óseo es el sostén de las piezas dentales y del organismo en general. Cuando el paciente ha perdido un diente, el hueso alveolar comienza un proceso llamado Reabsorción del Reborde Residual (RRR) que corresponde a la reabsorción del hueso que rodeaba al diente extraído (Atwood D. A., 1971). Como tratamiento a los pacientes que han perdido sus dientes naturales se utilizan prótesis, ya sean de tipo removible o fija, en este último caso, en ciertas situaciones es necesaria la ayuda de implantes cuando se ha perdido la pieza dentaria y no existen las condiciones para utilizar prótesis fija dentosoportada. Estos aparatos fabricados en titanio generalmente requieren además de una cirugía y tienen un costo económico mayor, pero para los pacientes es más confortable y otorga mayor seguridad (Turkyilmaz I. y cols., 2010).

El organismo tiene límites de reparación de un defecto óseo dependiendo de su tamaño, este límite es conocido como “defecto de tamaño crítico” (CSD). En general, se refiere a un defecto óseo que no se recuperará espontáneamente y requerirá una intervención quirúrgica utilizando biomateriales o injertos óseos para estimular la regeneración o reparación del mismo. El rango de reparación crítico de este tejido va desde 1 a 3 cm, y depende de la ubicación anatómica del defecto óseo y el estado del tejido blando que lo rodea (Schemitsch E. H., 2017).

Cuando el odontólogo decide rehabilitar a un paciente mediante implantes, necesita tener hueso suficiente para poder realizar la colocación del implante a la profundidad necesaria para soportar la carga funcional y cumplir con los requerimientos mínimos. Es por esto, que comúnmente es necesaria una

intervención quirúrgica que permita aumentar el nivel óseo. El proceso de reabsorción ósea se manifiesta marcadamente en la zona del seno maxilar, en donde para elevar el nivel del hueso se practica una cirugía rutinaria denominada elevación de seno maxilar (Aghaloo T. L. y cols., 2016). Para efectuar esta cirugía, se necesita un injerto óseo o de otro material que cumpla la función del hueso que existió originalmente o mejor aún, que lo regenere. Hay distintos tipos de injertos óseos: autoinjertos, aloinjertos, xenoinjertos y, últimamente, se ha introducido el uso de materiales sintéticos o aloplásticos (Kaigler D. y Mooney D., 2001; Lewandrowski K. U. y cols., 2000). Otras técnicas para aumentar o producir tejido óseo es la utilización de plasma rico en plaquetas (PRP), materiales para la regeneración ósea guiada y combinaciones entre ellos (Dimitriou R. y cols., 2011; Lekovic V. y cols., 2002; Mellonig J. T. y cols., 1981).

Los autoinjertos son considerados actualmente como el método clínico más efectivo entre las técnicas de reconstrucción ósea. El receptor y donante son el mismo individuo, por lo que se obvian problemas de compatibilidad con el sistema inmune del hospedero y se disminuye la posibilidad de rechazo (Marx R. E., 1994). Sin embargo, los autoinjertos, al igual que los aloinjertos y xenoinjertos, carecen de propiedades osteoinductivas, es decir, que no tienen la capacidad de inducir la diferenciación de células madre mesenquimales en condroblastos y osteoblastos. En el caso del autoinjerto, solo ocurre en un corto período de tiempo por los factores de crecimiento, proteínas y células presentes en el hueso extraído. Estos son principalmente osteoconductivos; no son capaces de liberar componentes bioactivos que generen una respuesta celular específica en el tiempo, pero permiten la reparación del hueso funcionando como un esqueleto. Además, implica una cirugía en que se extrae tejido óseo desde un lugar del mismo individuo, con limitadas cantidades de hueso disponible, produciéndose una pérdida de tejido en el sitio donante, y aumentando la morbilidad del paciente con tiempos de recuperación mayores (Soto Góngora S. y Taxis González M. G., 2005).

El xenoinjerto es un injerto proveniente desde una especie diferente al ser humano, generalmente de hueso bovino el cual puede contener virus y/o priones produciendo morbilidad en el paciente (Kim Y. y cols., 2013; Sogal A. y Tofe A., 1999). Este tipo de injerto tampoco posee características osteoinductoras, siendo sólo osteoconductor, es decir, no estimula los mecanismos biológicos de regeneración y pasa a ser sólo un andamio, con limitadas capacidades de reparación. Similares características tienen los aloinjertos los cuales se obtienen de hueso liofilizado de seres humanos (Soto Góngora S. y Taxis González M. G., 2005).

Otras opciones de tratamiento involucran PRP, membranas de regeneración ósea guiada, distracción osteogénica, materiales poliméricos y materiales compuestos (Peral B. y cols., 2008). La mayoría de los materiales de injerto han demostrado una aceptable capacidad reparativa, pero una insuficiente capacidad regenerativa (Lewandrowski K. U. y cols., 2000), entendiéndose por regeneración a aquel proceso en que un tejido específico es reemplazado por uno nuevo con características histológicas y funcionales equivalentes a las del tejido original (Mason C. y Dunnill P., 2008). La limitada capacidad para regenerar de los materiales usados en la actualidad se debe a que son fundamentalmente osteoconductivos y no estimulan una respuesta celular específica que active los mecanismos de osteoproducción (Polo-Corrales L. y cols., 2014; Sandor G. y cols., 2003). A pesar de ser técnicas efectivas y materiales que son capaces de restaurar la estabilidad y función en algún grado, son limitados, es por esto que es necesario continuar el estudio mediante la ingeniería de tejidos para dar lugar a nuevos biomateriales y técnicas alternativas de tratamiento, que permitan producir injertos óseos de forma ilimitada de tipo sintéticos o aloplásticos y disminuir los tiempos postoperatorios. Estos biomateriales son osteoconductores y osteoinductores, es decir, permiten la formación de tejido óseo a través de la estimulación de vías osteogénicas, acelerando la síntesis y mejorando la calidad histológica del mismo.

De acuerdo a algunos estudios *in vitro* e *in vivo*, el ion litio podría cumplir un rol como componente bioactivo (osteoaductor) para generar una respuesta celular

específica que colabore a una reparación y/o regeneración del tejido óseo más rápido y de mejor calidad (Arioka M. y cols., 2014; Covarrubias C. y cols., 2018; Galli C. y cols., 2013; Shan T. y cols., 2015; Xu H. y cols., 2014).

### 3.2 Ingeniería de tejidos aplicada a tejido óseo

Mediante la ingeniería de tejidos y la nanotecnología se busca producir nuevos materiales, con el fin de lograr una regeneración ósea más efectiva. Como por ejemplo el vidrio bioactivo, una biocerámica que tiene la capacidad de inducir la osteogénesis en células madre (Gong W. y cols., 2017). Nanopartículas de este material, han demostrado su capacidad de acelerar la formación de tejido óseo en implantes de titanio mediante modelos en animales (Covarrubias C. y cols., 2016). Estos estudios son relativamente recientes y se necesitan estudios clínicos para confirmar su efectividad (Mistry S. y cols., 2016).

La base de la ingeniería de tejidos está formada por una tríada de factores imprescindibles, (**Figura 1**). En primer lugar, debe existir una matriz o andamiaje que sustente, permita y guíe el crecimiento de células madre de forma óptima para la formación del tejido que se busca reparar, con requerimientos como una alta porosidad, poros interconectados y propiedades mecánicas adecuadas. Como segundo factor fundamental son las células madre o células osteoproducidas, las cuales se adhieren, proliferan y se diferencian en la matriz. Para que esto ocurra las células deben ser estimuladas por factores externos a ellas que pueden encontrarse en el andamio. Estas señales bioactivas osteogénicas y/o angiogénicas pueden ser de distinta naturaleza tales como biomoléculas, iones, péptidos, proteínas, biocerámicas, factores de crecimiento, etc. (Kaigler D. y Mooney D., 2001; Saska S. y cols., 2015).



**Figura 1.** Componentes básicos para la ingeniería de tejido óseo. Estos componentes se encuentran interrelacionados entre sí.

Los factores de crecimiento son sustancias capaces de estimular la regeneración ósea. Presentan ciertas desventajas como su elevado costo y vida media corta, ya que se desestabilizan rápidamente luego de ser administrados (Wei G. y cols., 2007). Últimamente, se ha evidenciado que ciertos elementos como estroncio (Sr), cobre (Cu), magnesio (Mg) y silicio (Si), entre otros, pueden colaborar con la regeneración ósea (Bondarenko A. y cols., 2014; Marie P. J. y cols., 2001; Wu C. y cols., 2013; Zreiqat H. y cols., 2010).



### 3.3 El litio como elemento bioactivo

El litio (Li) es un elemento que tiene reconocida capacidad osteogénica. Se ha demostrado que la estimulación de las células madre con iones  $\text{Li}^+$  aumenta la expresión de marcadores osteogénicos, ya que tienen la capacidad de regular la vía de señalización Wnt/ $\beta$ -catenina. Esta vía ocupa un importante rol en la formación y reparación del hueso y dientes (Duan P. y Bonewald L., 2016). Los iones  $\text{Li}^+$  en solución promueven la reparación de tejido duro o su regeneración (Arioka M. y cols., 2014) inhibiendo a la enzima glucógeno sintasa quinasa-3 $\beta$  (GSK-3 $\beta$ ), la que regula la localización celular de  $\beta$ -catenina. Su inhibición permite la translocación nuclear de  $\beta$ -catenina y como resultado, 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 vía Wnt ocupa un importante rol en la formación del tejido mineralizado, tiene la capacidad de promover la expresión de genes tales como RUNX2, CBFA1, y AML3, los cuales son requeridos para la diferenciación de las células madre en osteoblastos (Gaur T. y cols., 2005).

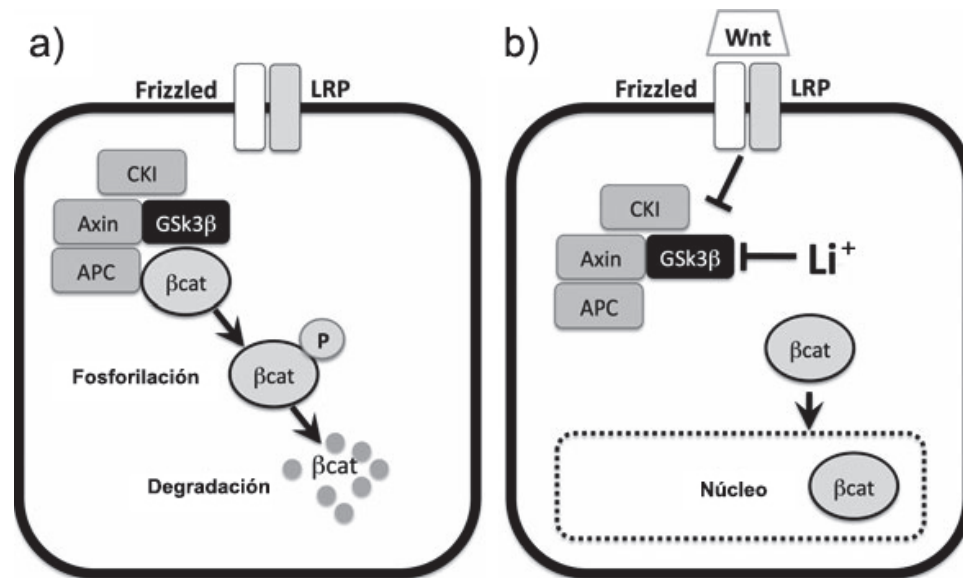
Estudios demuestran que pacientes tratados por enfermedades psiquiátricas con sales de litio vía oral por un largo plazo, se produce de forma sistémica un aumento de la densidad mineral ósea (Zamani A. y cols., 2009). En un estudio realizado *in vivo* en un modelo animal en ratas se realizó un defecto óseo controlado en la tibia del animal, se analizó el efecto de la administración local de  $\text{Li}_2\text{CO}_3$  y se comprobó que la aplicación de litio local, efectivamente facilita la recuperación del defecto óseo promoviendo la osteoblastogénesis e inhibiendo la osteoclastogénesis (Arioka M. y cols., 2014). Otros estudios de administración directa del litio, demuestran que al encontrarse disueltos en solución, provocan un aumento en la expresión del gen AXIN2 dependiente de la dosis de LiCl (Shan T. y cols., 2015). El gen AXIN2 ocupa un importante rol en la regulación de la  $\beta$ -catenina en la vía Wnt canónica. También se reportó que la expresión de  $\beta$ -catenina nuclear y citoplasmática aumentó después del tratamiento con LiCl, lo que sugiere que la vía canónica de señalización Wnt/ $\beta$ -catenina fue activada (Shan T. y cols., 2015). Así mismo, la expresión de los marcadores

odontoblastos RUNX2, DSP y DMP1, aumentó ante la exposición a LiCl de células de la cresta neural del folículo piloso (hfNCCs) (Shan T. y cols., 2015).

El litio además ha sido incorporado a biocerámicas como el vidrio bioactivo y la hidroxiapatita con el fin de mejorar la bioactividad de las partículas (da Silva J. G. y cols., 2017; Shainberg A. P. M. y cols., 2012; Wang Y. y cols., 2016). En este tipo de modificaciones el litio actúa como un agente dopante de biomateriales ya conocidos por sus propiedades de reparación ósea. El concepto de *agente dopante* en Ciencia de Materiales está referido a cualquier tipo de elemento que es incorporado en la estructura cristalina o amorfa de un material, generalmente en muy bajas cantidades y que es capaz de modificar alguna propiedad física, química o biológica del material, u otorgarle propiedades adicionales (Callister W. D. y Rethwisch D. G., 2013).

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).

En la **Figura 2a**, en la ausencia de una señal WNT canónica,  $\beta$ -catenina es secuestrada por un complejo multimolecular compuesto por Axin, APC, GSK3- $\beta$ , y CKI. Luego, es fosforilada y apuntada para su degradación proteosomal. En la **Figura 2b** Tras la unión de factores específicos de la vía WNT al complejo receptor Frizzled-LRP, el complejo de destrucción es inhibido y la  $\beta$ -catenina puede translocarse al núcleo e iniciar su programa transcripcional. Inhibidores de GSK3- $\beta$  tales como  $\text{Li}^+$  pueden aumentar la señalización de la vía Wnt canónica al aumentar la disponibilidad de  $\beta$ -catenina en el citoplasma. (Galli C. y cols., 2010; Galli C. y cols., 2013).



**Figura 2.** Diagrama de los principales eventos moleculares en la regulación de la vía de señalización WNT canónica en ausencia de litio (a) y en presencia de litio (b). Frizzled: familia de proteínas de receptores acoplados a proteínas G. LRP: proteína 5/6 relacionada con el receptor de lipoproteínas de baja densidad, CKI: caseína quinasa 1a, Axin: proteína axin1/2, APC: gen adenomatoso poliposis coli, βcat: catenina beta, GSK3β: glucógeno sintasa quinasa 3 beta (Galli C. y cols., 2010; Galli C. y cols., 2013).

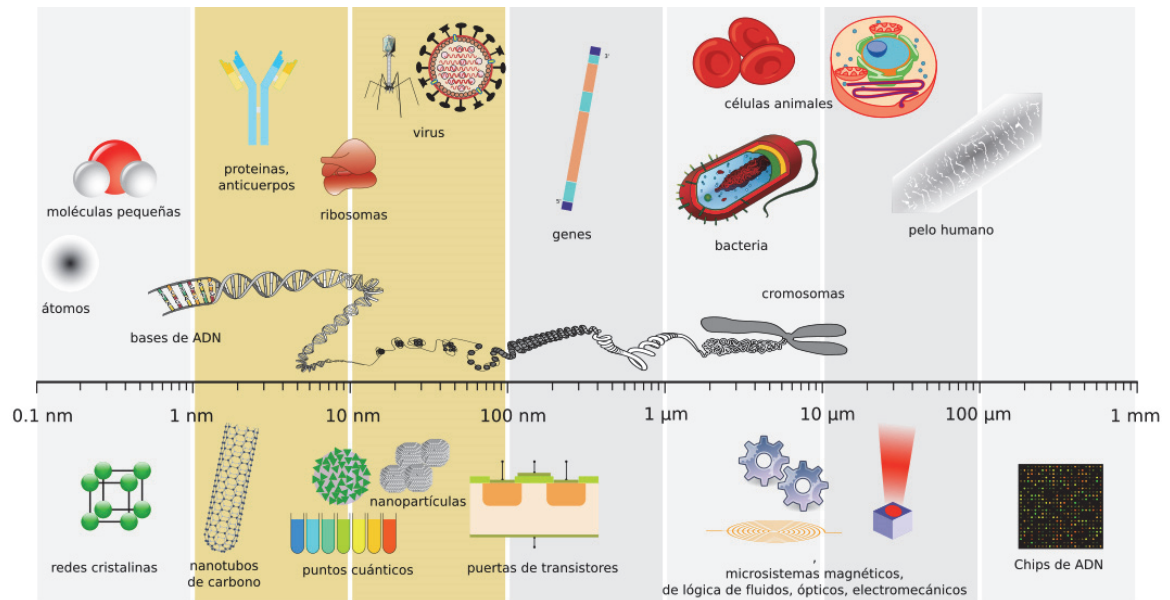
### 3.4 Nanopartículas de litio (nLi)

En un nivel fundamental, la nanotecnología ayuda a manipular átomos individuales y moléculas para producir estructuras con propiedades únicas y/o mejoradas. Esto involucra la producción y aplicación en fenómenos físicos, químicos y biológicos. Por ejemplo, fármacos más específicos, resinas compuestas mejoradas con nanopartículas, y un sinnúmero de aplicaciones (El-Kady A. M. y cols., 2016; Emerich D. F. y Thanos C. G., 2003; Mirsasaani S. S. y cols., 2013; Mitra S. B., 2018).

Los materiales que se trabajan en la nanotecnología oscilan entre los 1 – 100 nm (Mendonça G. y cols., 2008). La nanotecnología ofrece la habilidad de diseñar materiales con características deseadas completamente nuevas, es por

eso que ha tenido un crecimiento explosivo de su uso en medicina y odontología (Mirsasaani S. S. y cols., 2013).

En la **Figura 3** se pone en perspectiva la escala a la cual se trabaja.



**Figura 3.** Comparación de la dimensión de diferentes elementos biológicos y tecnológicos en relación a la escala nanométrica (Commons W., 2008).

Una nanopartícula es un “cluster” de pocos átomos del elemento, generalmente en estado de oxidación cero, pero también pueden producirse nanopartículas como óxidos del metal (Salata O., 2004). Se usa la misma sustancia, pero con mejor rendimiento y eficacia, ya que hay una mejor respuesta biológica, al existir una mayor área de superficie específica para la estimulación biológica y ofrecen una liberación más controlada del elemento. Adicionalmente, se pueden incorporar en el diseño de nuevos materiales de tipo nanocompuestos. A diferencia de los iones de  $\text{Li}^+$  en estado soluble. El uso de nLi ofrecería la ventaja de una mayor área superficial para interacciones biológicas, un mayor control sobre la liberación y administración del elemento, así como la posibilidad de modificar las propiedades de otros biomateriales incorporándoles la nanopartícula (Mirsasaani S. S. y cols., 2013; Mitra S. B., 2018).

La síntesis de nLi ha sido escasamente estudiada. Hasta el momento, en la literatura la mayoría de los trabajos reportan la preparación de nLi combinadas con otros metales, por ejemplo Li-Cr o Li-Mo para su uso en baterías, en donde se utilizó una técnica que consume alta energía como lo es el plasma por inducción (Tanaka M. y cols., 2016). El único trabajo de la síntesis de nLi puras es el reportado por Álvarez R. A. y cols. (2015), no obstante, en este trabajo las nLi se obtuvieron en una suspensión acuosa, y no en forma de polvo, que es la presentación más versátil para el desarrollo de aplicaciones. Además, estas partículas se encontraban con tamaños coloidales de morfología esférica de alrededor de 5 nm de diámetro, que requieren métodos muy sofisticados de separación para obtener nanopartículas en la forma de polvo. En el estudio de Lu Y. y cols. (2014) se prepararon nanopartículas de  $\text{Li}_2\text{CO}_3$  utilizando un reactor de membrana de microfiltración, que implica un sistema multifase, con limitaciones de transferencia de masa durante la reacción y de mayores costos.

Al encontrarse la nanopartícula de forma sólida y seca en forma de polvo se puede incorporar en otros materiales, tales como andamios nanocompuestos de ingeniería de tejidos, nuevos recubrimientos para superficies de implantes y otros dispositivos biomédicos (Dvir T. y cols., 2010; Pina S. y cols., 2015; Tripathy J., 2017).

Adicionalmente, en la literatura no hay reportes de la evaluación de las propiedades biológicas, distribución de tamaño por distinto método de síntesis o bioactividad de nLi.

Las nanopartículas de un metal se pueden producir por reducción química a partir del ion o mediante procesos de cristalización. Dentro de las estrategias para controlar el tamaño y dispersión de las nanopartículas, se encuentra la utilización de compuestos orgánicos de cadena larga, mediana o corta, que permiten separar las moléculas y lograr de esa forma la producción de nanopartículas (Bakshi M. S., 2015; Farrukh M. A. y cols., 2010; Koczur K. M. y cols., 2015). Entre estas sustancias se encuentran PVA, PVP, CTA, entre otros. Cada uno de estos compuestos puede tener un comportamiento distinto y controlar el tamaño de la partícula de forma diferente. Por lo tanto, resulta de interés investigar el efecto que

tendrían estos separadores orgánicos en el control del tamaño de las partículas de litio, con el fin de obtener dimensiones nanométricas (Bakshi M. S., 2015; Farrukh M. A. y cols., 2010; Koczur K. M. y cols., 2015).

La implementación y potencial uso biomédico de las nLi requiere que sean producidas de una manera eficiente, con métodos de bajo costo energético y obtenido preferentemente en forma de polvo. En una segunda etapa de este trabajo, se evaluará por primera vez la respuesta biológica de células madre cultivadas en medios acondicionados con nLi. No se han encontrado reportes previos sobre el estudio de la respuesta de células expuestas a nLi, sólo existen antecedentes sobre sales de litio que no se encuentran en tamaño nanométrico (Galli C. y cols., 2013; Xu H. y cols., 2014).

Se espera que estas nLi tengan la capacidad de estimular la vía osteogénica de células madre, puedan ser liberadas sostenidamente en el tiempo, y además puedan ser incorporadas a andamios reabsorbibles biocompatibles, similar a lo que sucede con otras nanopartículas bioactivas como el vidrio bioactivo, hidroxiapatita y otras (Boccaccini A. R. y cols., 2010; Peter M. y cols., 2010; Valenzuela F. y cols., 2012).

Por los antecedentes expuestos en el presente trabajo de investigación, se propone estudiar diferentes metodologías para sintetizar nLi elemental, en forma de óxido o carbonato y con un rendimiento adecuado. Posteriormente, se evaluará la citocompatibilidad y la capacidad de las nanopartículas para estimular la diferenciación osteogénica de células madre.

## **4. Hipótesis y Objetivos**

### **4.1 Hipótesis**

Es posible sintetizar partículas de litio con tamaño nanométrico y con capacidad para estimular la diferenciación osteogénica de células madre de la pulpa dental.

### **4.2 Objetivo General**

Sintetizar partículas de litio con tamaño nanométrico y evaluar su citocompatibilidad y capacidad para estimular la diferenciación osteogénica *in vitro* de células madre de la pulpa dental.

### **4.3 Objetivos específicos**

1. Optimizar una metodología para la síntesis de partículas de litio con tamaño nanométrico.
2. Determinar la viabilidad de células madre de la pulpa dental cultivadas con nLi.
3. Determinar la capacidad de diferenciación osteogénica de células madre de la pulpa dental cultivadas en presencia de nLi.

## **5. Materiales y métodos**

### **5.1 Síntesis de nLi**

En este trabajo se evaluaron y desarrollaron diferentes estrategias para la síntesis de nLi, en función del menor tamaño de partícula y del rendimiento obtenido.

#### **5.1.1 Método por reducción química**

Se preparó una solución reductora al 10% ácido ascórbico y 1% almidón. Para disolver completamente los solutos, la mezcla se calentó bajo microondas por aproximadamente 45 segundos. Luego, se procedió a agregar 50 mL de la solución reductora a una solución acuosa de 50 mL 0,2 M de  $\text{LiCH}_3\text{COO}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , se calentó bajo microondas por 3 ciclos de 30 segundos con intervalos de 10 segundos sin calentamiento entre cada ciclo. La masa de acetato de litio utilizada dependió de los resultados experimentales obtenidos, particularmente del rendimiento de la síntesis y del tamaño de la partícula. Se probaron distintas concentraciones de acetato de litio hasta lograr los resultados esperados.

#### **5.1.2 Método por cristalización**

Se evaluó el efecto de tres tipos de compuestos orgánicos en el control del tamaño de la nanopartícula PVA (PM= 85.000-124.000 g/mol), PVP (PM= 40.000 g/mol) y CTA.

Se disolvió 0,5 g del compuesto orgánico en 50 mL de agua a temperatura ambiente bajo agitación. Luego de la total disolución del compuesto orgánico, se disolvió cierta cantidad obteniendo una concentración C de hidróxido de litio en la solución y se sometió a un período de evaporación para producir la partícula por



cristalización. La masa de hidróxido de litio a utilizar fue determinada a partir de los resultados experimentales obtenidos. Particularmente, del rendimiento de la síntesis y del tamaño de la partícula. El sólido obtenido se calcinó a 700 °C a una velocidad de 4 °C/min durante 3 horas. Posteriormente se molieron en un mortero de ágata.

Bajo las mismas condiciones anteriores se evaluó el efecto al usar una concentración 1/4C de hidróxido de litio, y se evaluó el efecto de tres tipos de compuestos orgánicos: PVA, PVP y CTA en el tamaño final de la partícula y su rendimiento.

### **5.1.3 Método por liofilización**

La mezcla de reacción indicada en la sección 5.1.2 en lugar de ser evaporada y cristalizada se congeló a -80 °C durante al menos 4 horas, secada mediante liofilización y calcinada a 700 °C a una velocidad de 4 °C/min durante 3 horas. Este proceso solo se realizó usando una concentración C de hidróxido de litio, utilizando como agente separador a PVA, PVP y CTA.

## **5.2 Caracterización de nLi**

### **5.2.1 Microscopía electrónica de barrido con espectroscopía dispersiva de rayos X (MEB-EDX)**

El tamaño y la morfología de las nLi se analizó mediante MEB con un microscopio (Jeol JSM-IT300LV, JEOL USA Inc., USA) equipado con detector dispersivo de rayos X Aztec EDS (Oxford Instruments) para microanálisis.

Las nLi fueron dispersadas en una solución de etanol al 70%, y se sonicaron durante 30 minutos. Se tomó desde la parte superior una gota de la solución y se puso sobre cinta de carbono doble faz. Se esperó la evaporación

completa del etanol y posteriormente se metalizaron con una capa oro de 2 nm de grosor en una atmósfera de baja presión en un Denton Vacuum desk V. (Denton Vacuum Inc., NJ, USA). Posteriormente fueron analizadas mediante MEB-EDX.

### **5.2.2 Espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier de reflexión total atenuada (FTIR-ATR)**

Se analizó la estructura química de las nLi mediante FTIR-ATR en un espectrómetro FTIR-ATR Agilent Cary 630, desde una longitud de onda de  $400\text{ cm}^{-1}$  a  $4000\text{ cm}^{-1}$

### **5.3 Espectrofotometría UV**

Para los productos en solución acuosa obtenidos mediante la reducción química, se detectó la resonancia del plasmón superficial de la nanopartícula metálica utilizando espectrofotometría UV-visible con un barrido de longitud de onda de 200 nm hasta los 600 nm. Este fenómeno físico característico de una nanopartícula metálica se observa mediante un *peak* de absorción a una longitud de onda específica.

#### 5.4 Fotometría de emisión de llama

La cuantificación del  $\text{Li}^+$  liberado desde las nanopartículas al medio de cultivo acondicionado a  $37^\circ\text{C}$ , se midió mediante fotometría de emisión de llama en un fotómetro de llama Jenway PFP7, usando la línea de emisión a 671 nm.

#### 5.5 Difracción de rayos X (DRX)

El patrón de DRX de las partículas fue medido en un difractómetro Siemens D5000 usando radiación  $\text{CuK}\alpha$  dentro del rango  $2\theta$  de  $5^\circ - 80^\circ$  a una velocidad de escaneo de  $1,2^\circ/\text{min}$ . La fase de identificación se llevó a cabo usando la base datos ICDD Powder Diffraction File (PDF2).

#### 5.6 Ensayos de bioactividad en fluido fisiológico simulado (SBF)

Para este ensayo, las partículas de litio fueron prensadas para formar piezas circulares de 9 mm de diámetro por 2 mm de espesor (**Figura 4**).



**Figura 4.** Pastilla de PVA/nLi usada para ensayo de bioactividad en SBF.

PVA/nLi: Nanopartículas de litio obtenidas mediante método de liofilización y agente separador PVA.

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 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, a partir

de los iones y concentración especificadas en la **Tabla 1** (Kokubo T. y Takadama H., 2006). El fluido se neutralizó, ajustándolo al pH fisiológico 7,4 con tri-(hidroximetil) aminometano y ácido hidroclicóricó.

**Tabla 1.** Iones y sus respectivas concentraciones en la solución de SBF.

| Iones                          | Concentración (mM) |
|--------------------------------|--------------------|
| Na <sup>+</sup>                | 142,0              |
| K <sup>+</sup>                 | 5,0                |
| Mg <sup>2+</sup>               | 1,5                |
| Ca <sup>2+</sup>               | 2,5                |
| Cl <sup>-</sup>                | 147,8              |
| HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup>  | 4,2                |
| HPO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> | 1,0                |
| SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>  | 0,5                |
| pH                             | 7,4                |

SBF: fluido fisiológico simulado.

El polvo obtenido de menor tamaño y de mejor rendimiento se utilizó para producir prensados (pastillas). Esta pastilla fue sumergida en 50 mL de SBF en contenedores de polietileno y mantenidas bajo agitación en condiciones termostatzadas a 36,5 °C por diferentes tiempos (3 días, 7 días y 14 días). La pieza fue removida del SBF al cumplir sus correspondientes tiempos y lavadas con agua destilada. Posteriormente se sometió a secado a 40 °C.

La formación de apatita tipo ósea sobre el material fue identificada mediante DRX, MEB-EDX y espectroscopía FTIR-ATR.

## 5.7 Ensayos con células madre

Para llevar a cabo estos ensayos se utilizó muestras de células madre de pulpa dental (DPSCs) criopreservadas en el Laboratorio de Nanobiomateriales de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile (Santiago de Chile), aisladas según protocolo descrito por Balanda C. (2013). Protocolo aprobado por comité de ética de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile (Anexo 1-4).

### 5.7.1 Medios acondicionados con nLi

Para el acondicionamiento de medios de cultivo se utilizó como base medio de cultivo  $\alpha$ -MEM (Sigma-Aldrich Corp., St Louis, MO, USA), suero fetal bovino (FBS) al 10%, antibióticos y antimicóticos. En distintos tubos se agregó 50 mL de medio de cultivo y diferentes cantidades de PVA/nLi. Se dejaron incubando por 4 días y posteriormente se filtraron a través de membranas estériles con tamaño de poro de 0,22  $\mu$ m (Merk Millipore, USA).

### 5.7.2 Ensayo de viabilidad celular por MTS

La viabilidad celular en presencia de nanopartículas se evaluó cuantitativamente en placas de 24 pocillos a una densidad de  $2,0 \times 10^4$  células/pocillo luego de 3, 7 y 14 días de incubación en medio de cultivo  $\alpha$ -MEM acondicionado con 150  $\mu$ g/mL, 300  $\mu$ g/mL, 600  $\mu$ g/mL y 1200  $\mu$ g/mL de PVA/nLi, de acuerdo a lo descrito en la sección 5.7.1. Las concentraciones de  $\text{Li}^+$  en cada medio fueron: 1,47 mM; 3,90 mM; 9,71 mM y 16,75 mM. Estas concentraciones utilizadas estuvieron basadas en experimentos *in vitro* con iones de litio y adaptadas de acuerdo a la solubilidad de las nLi (Maçon A. L. B. y cols., 2017; Tsai L. K. y cols., 2011; Wang Y. y cols., 2016). Para el análisis se utilizó el kit de

ensayo de viabilidad celular CellTiter 96® Aqueous OneSolution Cell Proliferation Assay (Promega Corporation) cuyo componente principal es (4,5- dimetiltiazol-2-il)5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfonil)-2H-tetrazolio (MTS), siguiendo las instrucciones del fabricante. Se midió la absorbancia del sobrenadante a 492 nm en un lector de placa ELISA, la cual corresponde a la formación de formazán, debido a la reducción del reactivo MTS por las deshidrogenasas mitocondriales de las células viables presentes en el cultivo.

### **5.7.3 Ensayo actividad enzimática de fosfatasa alcalina (ALP)**

La capacidad de diferenciación osteogénica de DPSCs cultivadas en medios acondicionados con 150 µg/mL, 300 µg/mL y 600 µg/mL de PVA/nLi de acuerdo a lo descrito en la sección 5.7.1, se evaluó cuantitativamente midiendo la actividad de la enzima ALP a los 3, 7 y 14 días de incubación. 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 segundos, 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<sub>2</sub> 1 mM a un pH 9,6.

El principio de la medición cuantitativa de la actividad de ALP se esquematiza a continuación: 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 fue 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 ALP, y se midió por absorbancia a una longitud de onda de 405 nm en un lector de placa ELISA.

#### 5.7.4 Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (RT-PCR)

En placas de 35 mm se sembraron  $4 \times 10^4$  células por pocillo. Una vez que alcanzaron la confluencia, se les agregó los medios acondicionados con nLi (placa diferenciada) y la placa control fue cultivada con medio  $\alpha$ -MEM, FBS al 10%, antibióticos y antimicóticos. Completado el tiempo de incubación de 3 días, se lavaron las placas dos veces con PBS y se agregó 1 mL del reactivo Trizol para extraer RNA, el cual fue utilizado para evaluar la expresión del gen osteogénico RUNX2 y el gen de la subunidad ribosomal 18S (control de carga).

El RNA total se obtuvo de acuerdo al protocolo del fabricante y se cuantificó espectrofotométricamente. El DNA complementario (cDNA) se obtuvo por RT-PCR, utilizando RNA en una concentración de 50 ng/ $\mu$ L, la enzima transcriptasa inversa del virus de la leucemia murina Moloney (M-MLV) y los partidores especificados en la **Tabla 2**. El programa del RT-PCR consistió en 5 min a 70°C, 1 hora y 30 min a 42°C y 15 min a 70°C; el cDNA obtenido de la reacción se cuantificó espectrofotométricamente. Para las reacciones de PCR se utilizó 1,5  $\mu$ L de cDNA, en un volumen total de 20  $\mu$ L. Una vez realizado el PCR, los amplicones fueron corridos en geles de agarosa al 1% y teñidos con bromuro de etidio para su visualización. Se utilizó una escala de DNA de 100 pb. (AccuRuler 100 bp DNA Ladder, Maestrogen, USA)

El análisis de la imagen del gel de agarosa fue procesada según el protocolo de Antiabong J. F. y cols. (2016) usando el software ImageJ versión 1.52a. Se evaluó la expresión de los genes RUNX2 y 18S. Se usó como control de carga la expresión del gen de la subunidad ribosomal 18s. Los resultados de intensidad de los genes en estudio se normalizaron con respecto a la intensidad del gen 18S.

**Tabla 2.** Partidores utilizados en la amplificación de los genes RUNX2 y 18S (Balanda C., 2013).

| Genes | Forward                    | Reverse                     | T <sub>m</sub><br>(°C) |
|-------|----------------------------|-----------------------------|------------------------|
| 18S   | 5'-GGACACGGACAGGATTGACA-3' | 5'-GGACATCTAAGGGCATCACAG-3' | 64                     |
| RUNX2 | 5'-TTGTGGGCCGGAGTGGACGA-3' | 5'-AGGGAGGGCCGTGGGTTCTG-3'  | 57                     |

## 5.8 Análisis estadístico

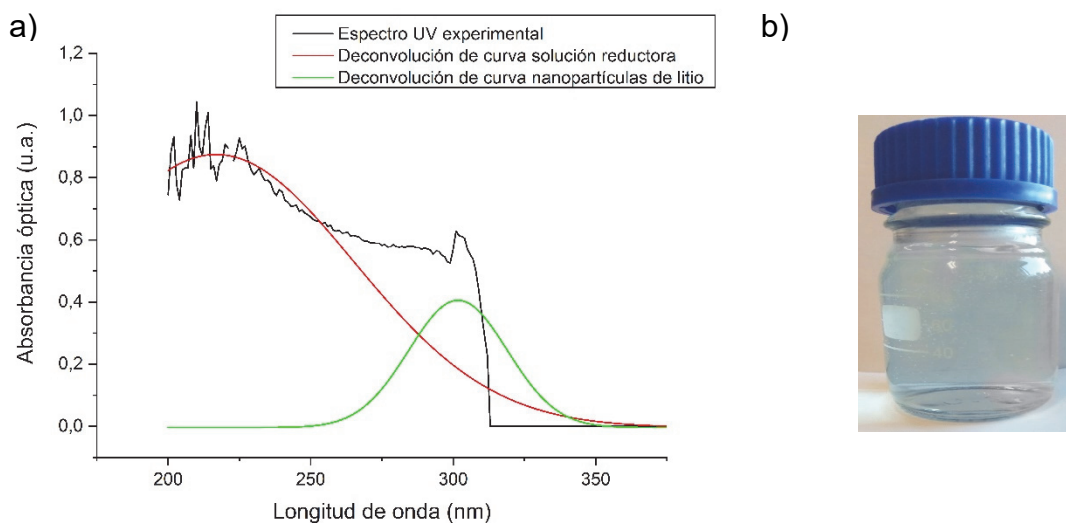
Los datos obtenidos de los ensayos MTS, ALP y PCR fueron analizados mediante el software GraphPad Prism 7 (Graphpad Software Inc., USA) para comprobar la normalidad de la distribución de los datos fue realizada la prueba estadística de Shapiro-Wilk. Luego se aplicó el test ANOVA One Way y se comparó las medias usando el método de Tukey con un nivel de significancia de 95% ( $p < 0,05$ ).



## 6. Resultados

### 6.1 Síntesis de nLi por reducción química

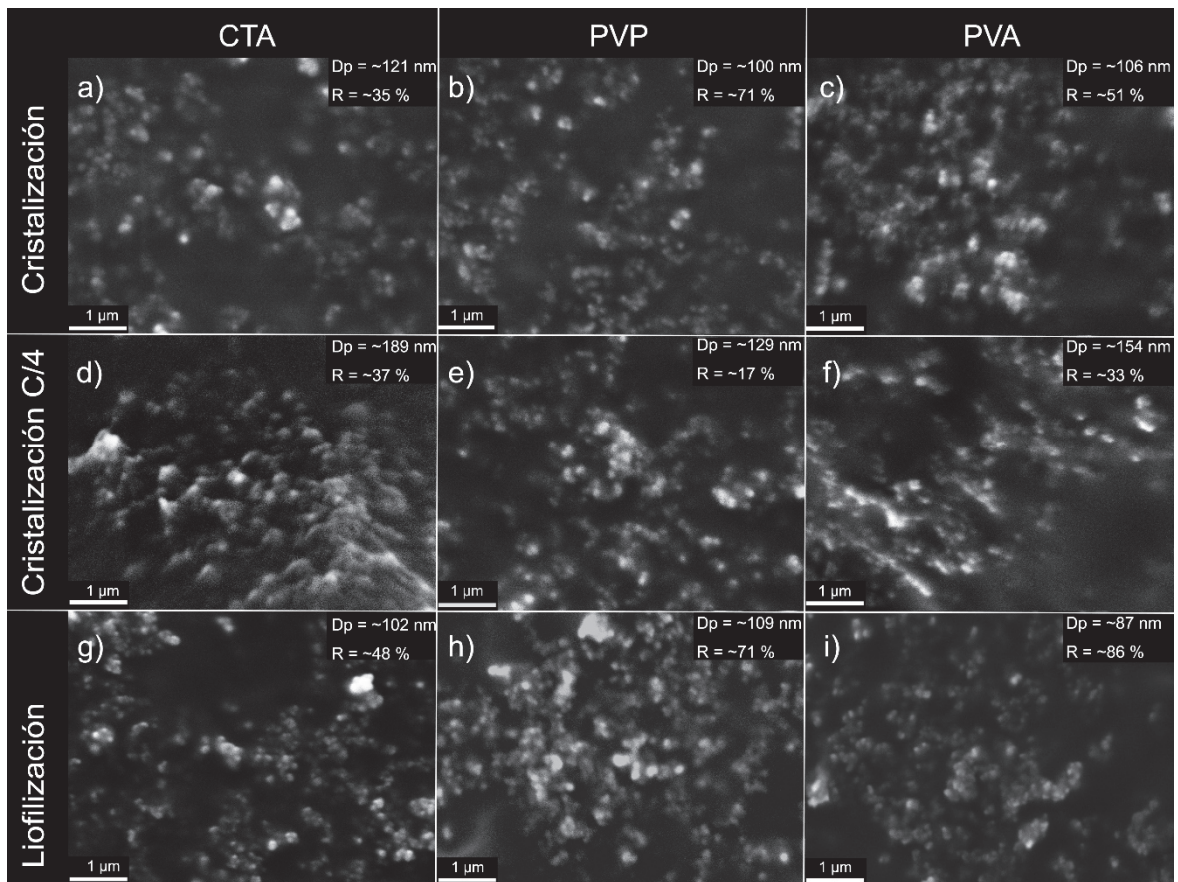
El producto de la síntesis de nLi utilizando como agentes reductores ácido ascórbico y almidón se analizó mediante espectroscopía UV. En la **Figura 5a** se muestra el espectro UV experimental y las curvas resultantes de la deconvolución del peak cercano a 310 nm. Para una mejor resolución de esta banda. La presencia de este peak está relacionada con la resonancia magnética de plasmones superficiales, que es un fenómeno físico que caracteriza a las partículas metálica con tamaño nanométrico. Por lo tanto, el análisis confirma la presencia de nLi en el producto de síntesis. La curva de color rojo se genera por el resto de los componentes presentes en la solución reductora. En este producto sintetizado las nanopartículas no fueron visibles a simple vista (**Figura 5b**), lo que indica que se encuentran de forma coloidal con tamaños nanométricos muy pequeños.



**Figura 5.** Espectro UV experimental y curvas de deconvolución de peaks de suspensión con nLi obtenida mediante método de reducción química (a). Fotografía de la suspensión transparente con nLi obtenida (b).

## 6.2 Síntesis de nLi por métodos de cristalización y liofilización

En la **Figura 6** se muestran las imágenes MEB de los productos de síntesis obtenidos mediante métodos de cristalización y liofilización utilizando los diferentes agentes separadores PVA, PVP y CTA. En general, se puede observar que todos los productos presentan tamaño de partícula nanométrico, sin embargo, el método mediante liofilización (**Figura 6 g-i**) permitió obtener el menor tamaño de partícula ( $\sim 87\text{nm}$ ), con mejor uniformidad y rendimiento de producto (86 %), particularmente usando PVA como agente separador.



**Figura 6.** Imagen MEB de nanopartículas sintetizadas mediante método de cristalización con concentración de litio C (a – c), 1/4C (d – f) y mediante método de liofilización (g – i) con cada tipo de agente separador (PVA, PVP y CTA). Dp: Diámetro de Partícula. R: Rendimiento.

La **Tabla 3** resume las características de los productos obtenidos mediante el método de liofilización

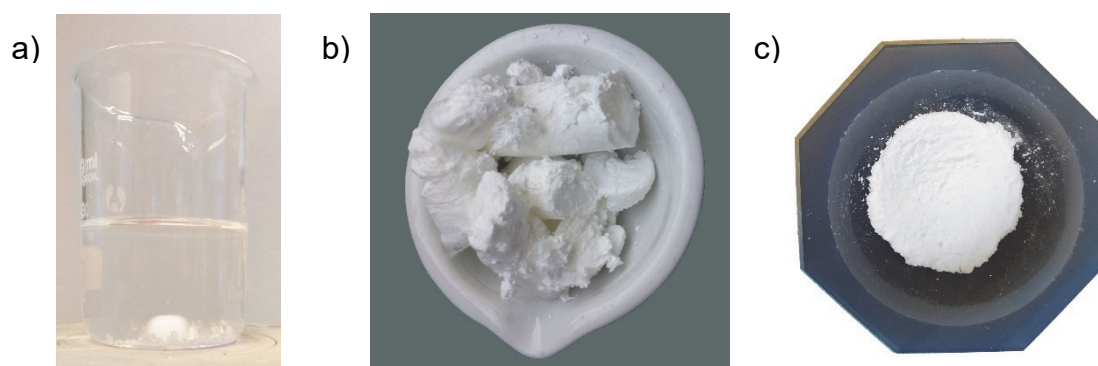
**Tabla 3.** Promedio de tamaño de partículas y rendimiento de la síntesis mediante el método de liofilización.

|         | Tamaño partícula (nm) | Rendimiento (%) |
|---------|-----------------------|-----------------|
| PVA/nLi | 86,6 ± 10,8           | 86              |
| PVP/nLi | 108,5 ± 19,3          | 71              |
| CTA/nLi | 101,9 ± 17,5          | 48              |

PVA/nLi: Nanopartículas de litio obtenidas mediante método de liofilización y agente separador PVA. PVP/nLi: Nanopartículas de litio obtenidas mediante método de liofilización y agente separador PVP. CTA/nLi: Nanopartículas de litio obtenidas mediante método de liofilización y agente separador CTA.

En la **Figura 7** se puede observar algunas de las etapas para la síntesis de nLi. También se observa macroscópicamente el producto de síntesis (PVA/nLi).

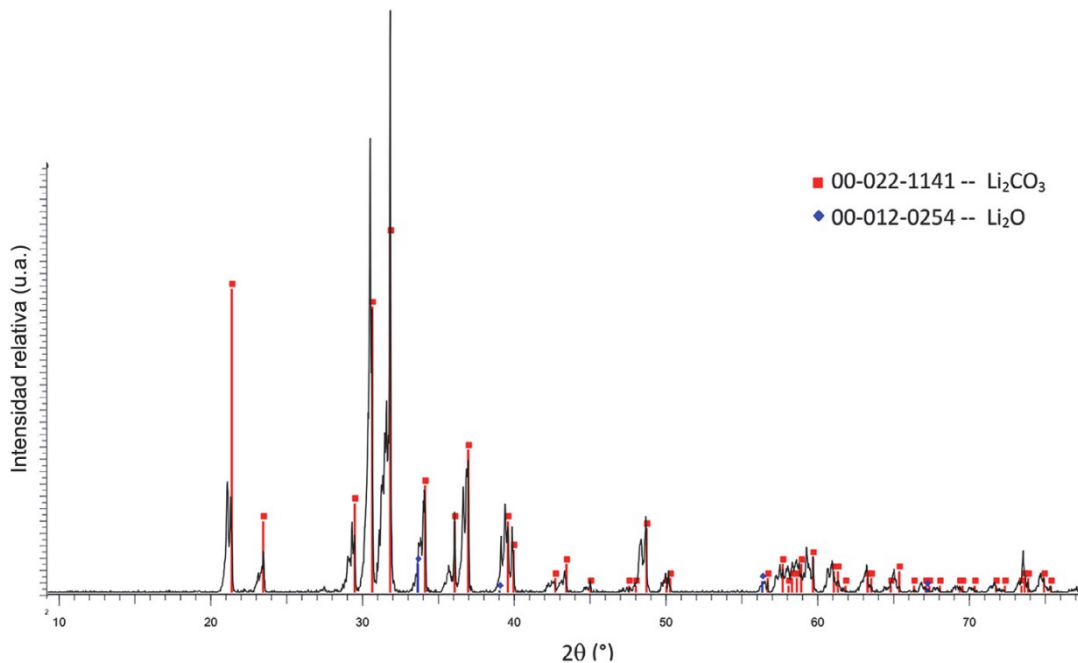
Las nanopartículas producidas mediante el método de liofilización y PVA (PVA/nLi) fueron elegidas para un posterior análisis estructural y para pruebas de bioactividad porque exhibieron el tamaño de partícula más pequeño, mayor uniformidad en la distribución del tamaño y mayor rendimiento de síntesis.



**Figura 7.** Mezcla de reactivos en el método de cristalización o liofilización (a), Producto de síntesis PVA/nLi obtenido posterior a la liofilización (b), luego de ser calcinado a 700 °C y posteriormente molido en mortero de ágata (c). PVA/nLi: Nanopartículas de litio obtenidas mediante método de liofilización y agente separador PVA.

### 6.3 Análisis DRX

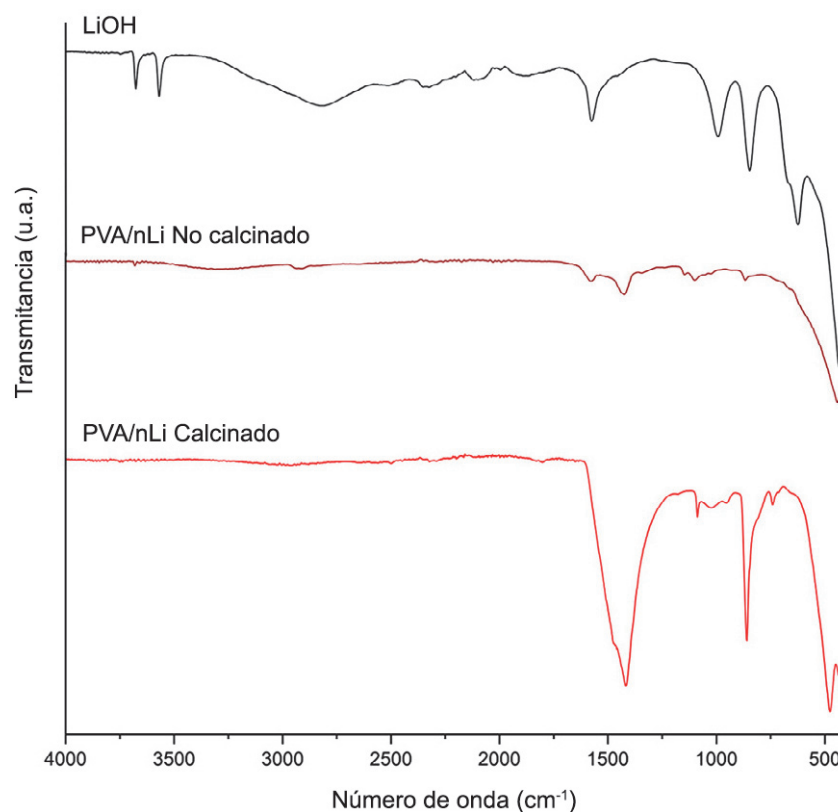
El producto de síntesis PVA/nLi también se analizó mediante DRX. El difractograma de DRX de la **Figura 8** reveló que las nanopartículas presentan una estructura altamente cristalina correspondiente a la fase  $\text{Li}_2\text{CO}_3$  (ICDD: 00-022-1141) con un grupo espacial monoclinico C2/c. Además, se detectaron algunos peaks de  $\text{Li}_2\text{O}$ , lo que sugiere la presencia de trazas del óxido metálico en el producto.



**Figura 8.** Patrón de análisis de difracción de rayos X (DRX) de producto PVA/nLi. PVA/nLi: Nanopartículas de litio obtenidas mediante método de liofilización y agente separador PVA.

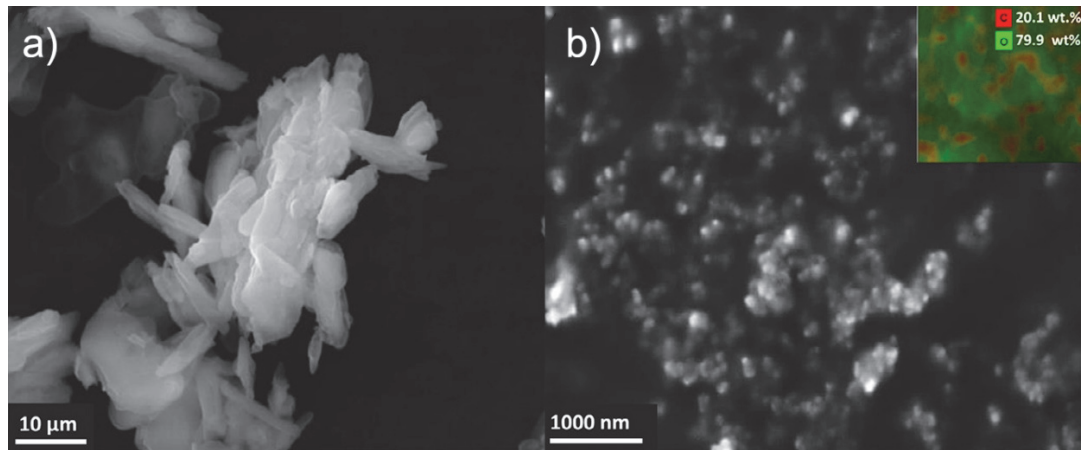
#### 6.4 Espectroscopía infrarroja transformada de Fourier de reflexión total atenuada (FTIR-ATR).

La formación de PVA/nLi a partir de LiOH fue analizada mediante FTIR-ATR (**Figura 9**). Las vibraciones de estiramiento de O–H del LiOH están alrededor de  $3600\text{ cm}^{-1}$  y para el  $\text{H}_2\text{O}$  asociada al LiOH a los  $1573\text{ cm}^{-1}$ . Estas bandas desaparecen o disminuyen su intensidad en el producto sintetizado por liofilización (no calcinado). Por otro lado el espectro de PVA/nLi presenta bandas a  $1419\text{ cm}^{-1}$  y  $853\text{ cm}^{-1}$ , correspondientes a las vibraciones del enlace C–O del grupo  $\text{CO}_3^{2-}$  (Brooker M. y Bates J. B., 1971) que confirman la formación de carbonato de litio en el producto de síntesis.



**Figura 9.** Análisis FTIR-ATR de productos sintetizados PVA/nLi. PVA/nLi: Nanopartículas de litio obtenidas mediante método de liofilización y agente separador PVA.

En la **Figura 10** se compara los cristales de LiOH, utilizados como precursores (**Figura 10a**), con los del producto de síntesis PVA/nLi (**Figura 10b**). Se puede observar que a partir de las partículas micrométricas de LiOH ( $>10\ \mu\text{m}$ ) se forman partículas nanométricas de  $\text{Li}_2\text{CO}_3$ .



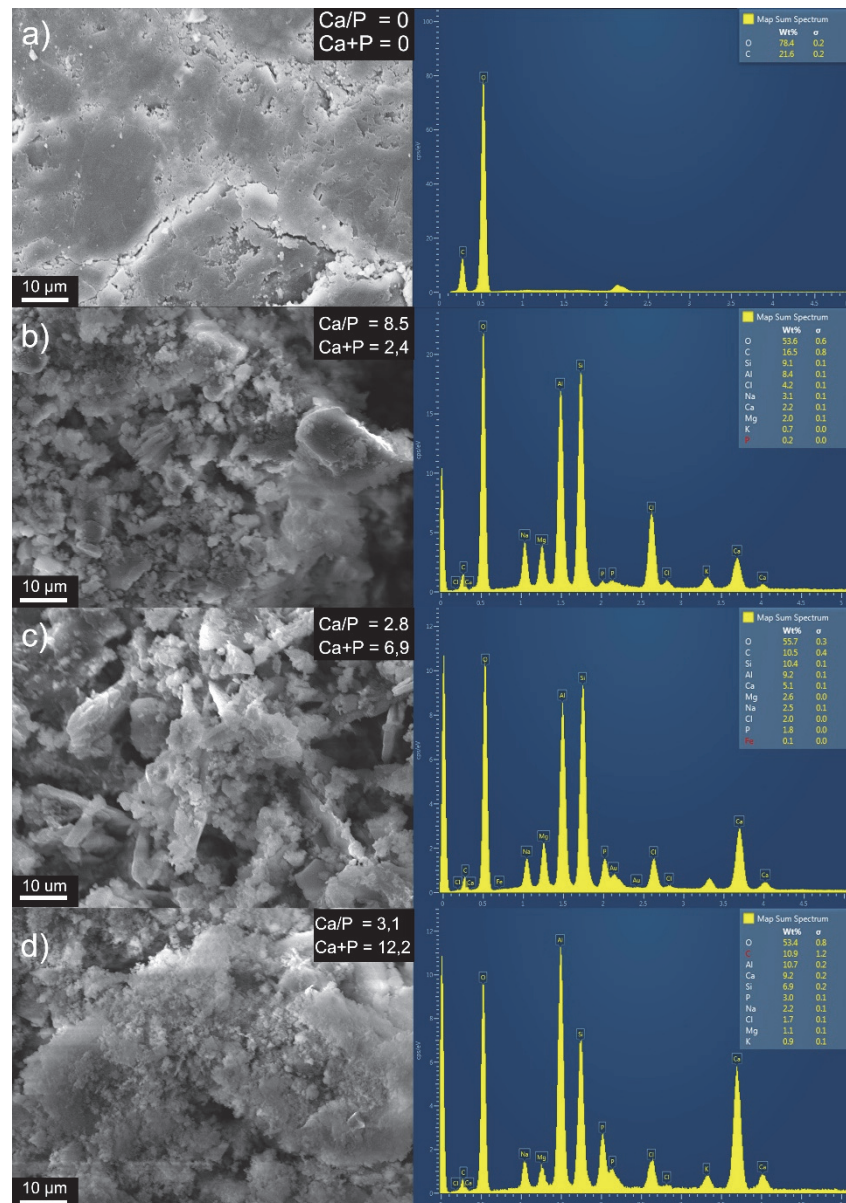
**Figura 10.** Precursor de nanopartículas bajo MEB (a). Nanopartículas de litio utilizando método de liofilización con separador PVA (PVA/nLi) bajo MEB (b).

El análisis de la composición química mediante EDX (**Figura 10b, recuadro verde/rojo**) muestra solo los contenidos de C y O en la nanopartícula, ya que el elemento litio debido a su número atómico muy bajo ( $Z=3$ ) no es detectable por ésta ni por otras técnicas de análisis de sólidos. Sin embargo, la proporción molar de los elementos C:O fue de 1:3, lo cual concuerda con la proporción teórica en el ion  $\text{CO}_3^{2-}$ .

## 6.5 Ensayos de bioactividad en SBF

La capacidad *in vitro* de PVA/nLi para estimular la formación de apatita tipo ósea se evaluó mediante inmersión en SBF. En la **Figura 11a-d** se muestra los resultados mediante microscopía MEB de la superficie de las partículas con diferentes períodos de inmersión y su composición química que fue analizada

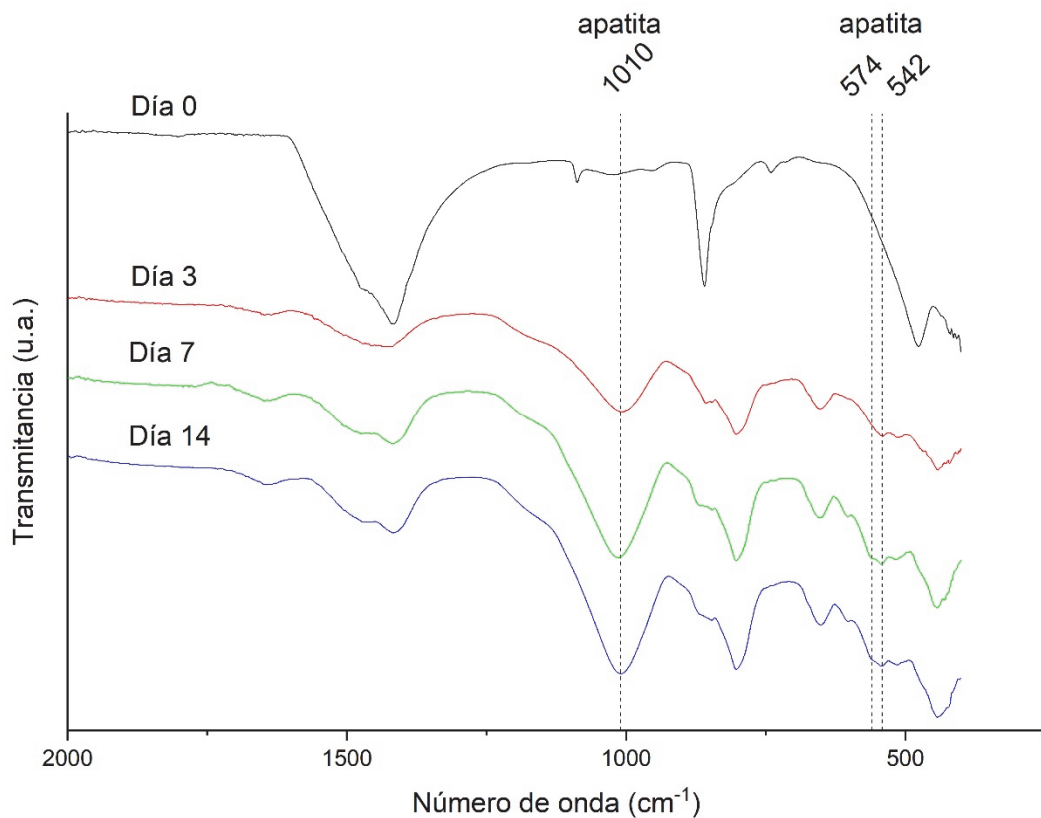
mediante EDX. Se puede observar una mayor deposición mineral a medida que aumenta el tiempo de inmersión. Además, el contenido total de Ca y P aumenta, y la relación Ca/P tiende a disminuir haciéndose más cercana a la relación de teórica de la hidróxiapatita (Ca/P = 1,7).



**Figura 11.** Imágenes MEB y análisis EDX de la superficie de las nanopartículas luego de 0 días (a), 3 días (b), 7 días (c) y 14 días (d) en SBF.

SBF: fluido fisiológico simulado. Ca/P: Porcentaje de calcio dividido por porcentaje de fósforo. Ca+P: Porcentaje de calcio sumado a porcentaje de fósforo.

Estas superficies también fueron analizadas mediante FTIR-ATR, con el propósito de obtener mayor información sobre la estructura química de los depósitos minerales formados. En los espectros FTIR obtenidos (**Figura 12**) se observa un peak a  $1010\text{ cm}^{-1}$  que se va intensificando desde el día 3 al día 14. Lo mismo ocurre con un doble peak en  $574\text{ cm}^{-1}$  y  $542\text{ cm}^{-1}$ , estos peaks señalados, aún con una leve traslación horizontal negativa  $\leq 50\text{ cm}^{-1}$  respecto a lo encontrado por Qing L. y cols. (2009) corresponden a la formación de apatita tipo ósea. Esto evidencia que las nLi son capaces de inducir la formación de apatita tipo ósea en SBF.



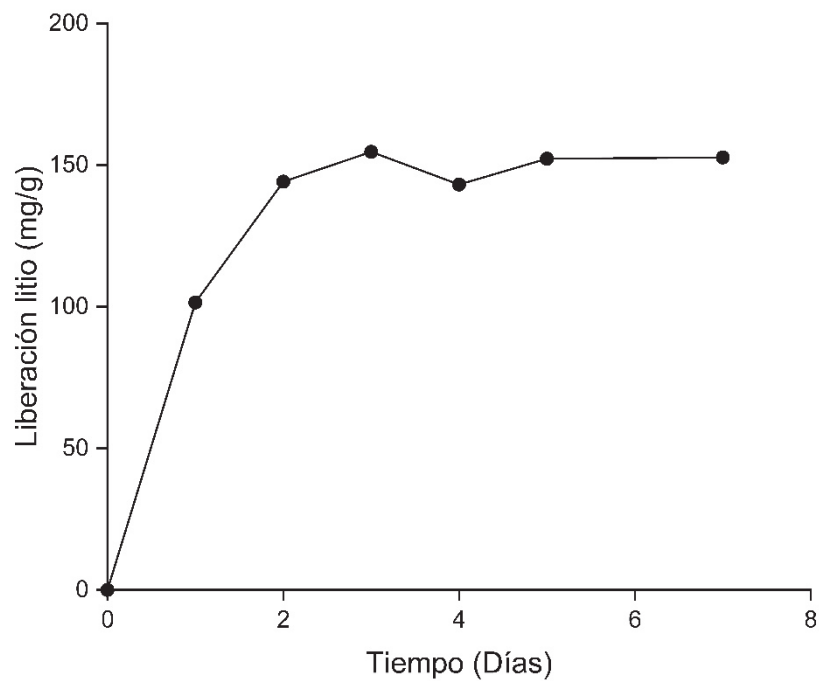
**Figura 12.** Análisis FTIR-ATR de las nanopartículas PVA/nLi luego de 3 días, 7 días y 14 días sumergidas en SBF.

FTIR-ATR: Espectroscopía infrarroja transformada de Fourier de reflexión total atenuada. SBF: fluido fisiológico simulado. PVA/nLi: Nanopartículas de litio obtenidas mediante método de liofilización y agente separador PVA.



## 6.6 Curva de liberación de iones de litio desde nanopartículas

En la **Figura 13** se muestra la curva de liberación de iones litio ( $\text{Li}^+$ ) en el tiempo desde las PVA/nLi en medio de cultivo  $\alpha$ -MEM. Se puede observar que la liberación de iones litio a partir de las PVA/nLi se estabiliza después de los 2 días alrededor de un valor de 150mg/g (10,2 mM), mostrando una tasa sostenida de liberación del elemento.

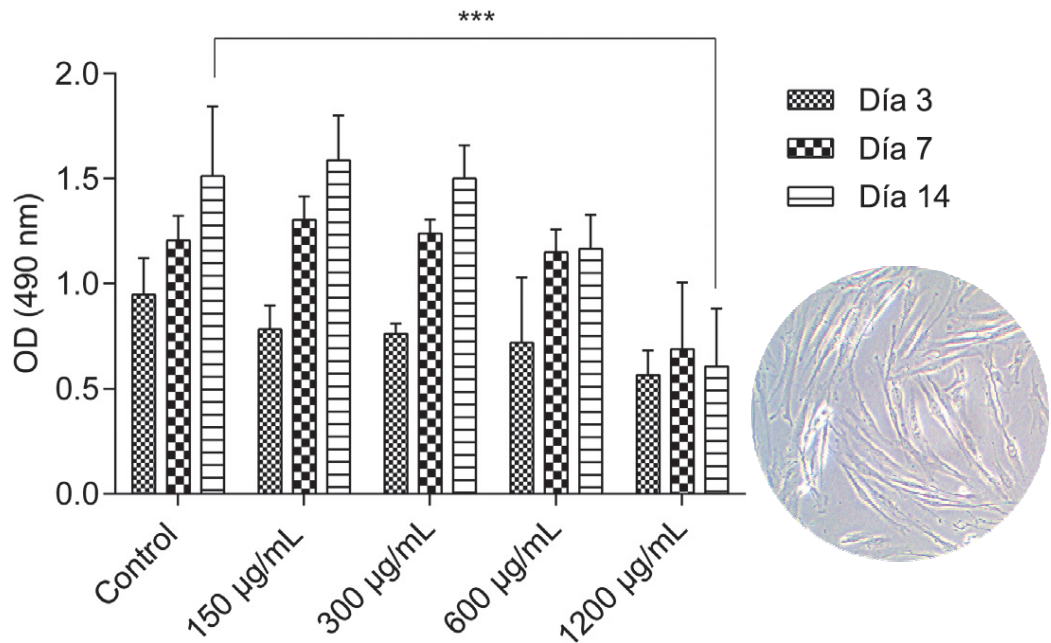


**Figura 13.** Curva de liberación de  $\text{Li}^+$  desde PVA/nLi en medio de cultivo. Cantidad de litio liberada está expresada como masa de  $\text{Li}^+$  por masa de nanopartículas.

## 6.7 Ensayos con células madre

### 6.7.1 Ensayo de viabilidad celular por MTS

La **Figura 14** muestra que PVA/nLi induce cambios estadísticamente significativos en la viabilidad celular en concentraciones de 1200  $\mu\text{g/mL}$ . Bajo esta concentración solo se observan disminuciones marginales.

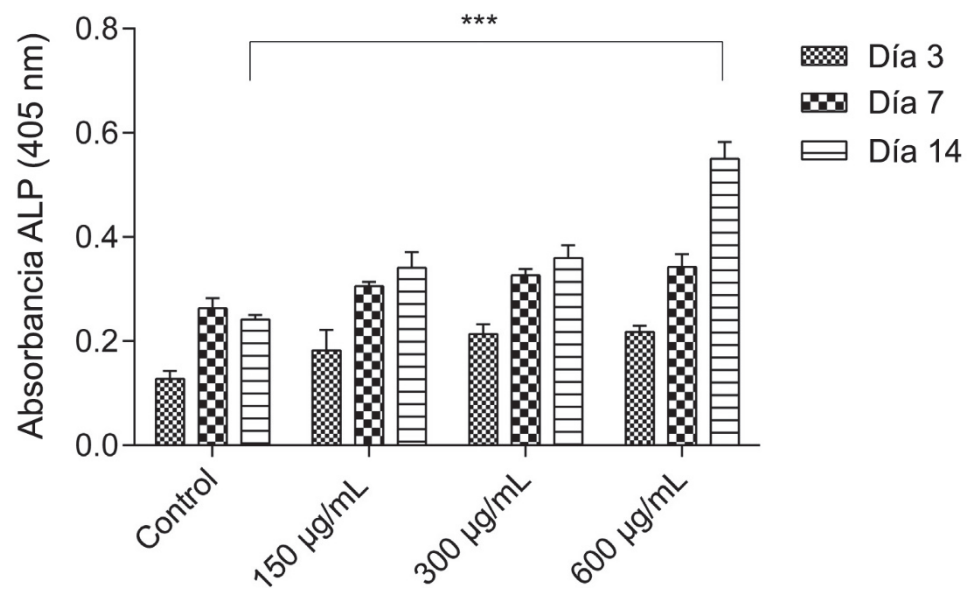


**Figura 14.** Viabilidad MTS de cultivo de DPSCs en medios acondicionados con distintas cantidades de nanopartículas PVA/nLi e imagen control de cultivo celular bajo microscopía de contraste de fases (\*\*\*)  $P < 0,001$ ).

PVA/nLi: Nanopartículas de litio obtenidas mediante método de liofilización y agente separador PVA.

### 6.7.2 Actividad de ALP

La actividad enzimática de ALP se midió en las concentraciones que no provocaron una disminución de la viabilidad celular. En la **Figura 15** se puede observar que la actividad enzimática de ALP incrementó significativamente en el medio acondicionado con 600  $\mu\text{g/mL}$  de PVA/nLi después de 14 días de incubación en relación al control solo con DPSCs.

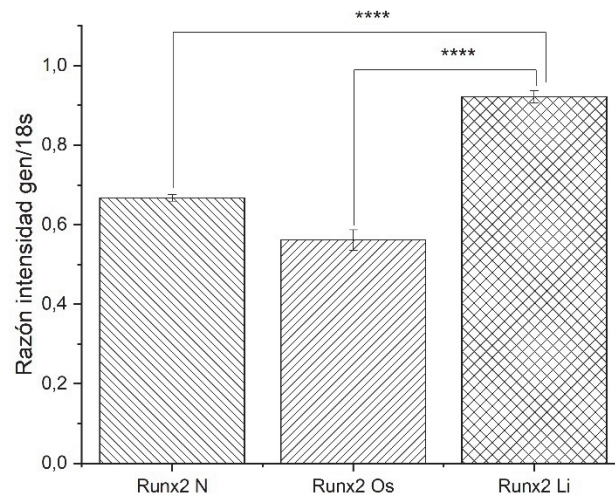


**Figura 15.** Actividad de ALP en DPSCs en medios de cultivo acondicionados con nanopartículas PVA/nLi (\*\*\*) P < 0,001).

PVA/nLi: Nanopartículas de litio obtenidas mediante método de liofilización y agente separador PVA. ALP: fosfatasa alcalina

### 6.7.3 Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (RT-PCR)

El gen RUNX2 es un importante marcador de diferenciación osteogénica, de expresión temprana, que ha sido demostrado como indispensable para la formación ósea y que permite evaluar si existe la diferenciación hacia células osteoblásticas (Komori T., 2003; Miron R. y Zhang Y., 2012). En la **Figura 16** se puede observar la expresión del gen RUNX2 en células cultivadas durante 3 días con 600 µg/mL de PVA/nLi fue significativamente mayor ( $p < 0,0001$ ) respecto al de las células incubadas en medio de cultivo  $\alpha$ -MEM y medio osteogénico.



**Figura 16.** Expresión de RUNX2 de DPSCs cultivadas en medio de cultivo  $\alpha$ -MEM (Runx2 N), medio  $\alpha$ -MEM osteogénico (Runx2 Os) y en medio de cultivo  $\alpha$ -MEM con nanopartículas PVA/nLi (Runx2 Li) (\*\*\*\*  $P < 0,0001$ ).

## 7. Discusión

En este trabajo se estudió la síntesis de nLi utilizando distintos métodos de síntesis y usando diferentes agentes separadores.

El método y el agente que permitió obtener nLi con el menor y más uniforme tamaño fue el de liofilización y utilizando PVA como agente separador. PVA produjo partículas de aproximadamente 87 nm con un tamaño menor a 100 nm que por definición corresponden a nanopartículas (Mendonça G. y cols., 2008). Además, el método de síntesis usando PVA y liofilización presentó el mejor rendimiento de las nanopartículas en polvo. Una explicación de por qué este agente separador tuvo una mayor influencia en la formación de partículas con tamaño nanométrico, puede ser que los grupos polares –OH de las moléculas de PVA tienen una interacción más fuerte con los cationes  $\text{Li}^+$  que la producida por los grupos amida del PVP, lo cual estabiliza más fuertemente al catión de litio, controlando de este modo el crecimiento de la nanopartícula y previniendo su agregación. Un efecto similar ha sido observado en la síntesis de nanopartículas de plata a partir de cationes de plata ( $\text{Ag}^+$ ) usando PVA y PVP (Ajitha B. y cols., 2016). En contraste, el uso de CTA catiónico produjo partículas de mayor tamaño, aun cuando ha sido reportado que las micelas de surfactante pueden influenciar el tamaño y la forma de las nanopartículas (Al-Thabaiti S. A. y cols., 2015).

Además del método de liofilización, se utilizó un método de reducción con almidón/ácido ascórbico a partir de acetato de litio. En este producto de síntesis fue posible demostrar la formación de nLi mediante el plasmón de resonancia superficial (**Figura 5a**), que es un fenómeno que solo presenta un elemento metálico cuando tiene tamaño nanométrico detectado bajo espectrofotometría UV a una longitud de onda de 310 nm al igual que lo reportado por. Álvarez R. A. y cols. (2015). También lograron sintetizar nLi, pero utilizando un extracto vegetal de nopal como agente reductor. Sin embargo, no hay evidencias en la literatura utilizando el sistema almidón/ácido ascórbico. Este producto de síntesis es completamente transparente (**Figura 5b**), lo cual sugiere que se trata de

nanopartículas en estado coloidal muy pequeñas, probablemente menor a 10 nm, por lo que es difícil su separación en forma de polvo.

Debido a que las nanopartículas producidas con PVA y liofilización exhibieron un tamaño de partícula menor, mayor uniformidad, mayor rendimiento de síntesis y fue posible obtenerlas en forma de polvo, fueron elegidas para un análisis estructural más profundo, así como para los ensayos de bioactividad.

El análisis DRX reveló que las nanopartículas corresponden a la fase  $\text{Li}_2\text{CO}_3$ . El proceso de formación de la nanopartícula PVA/nLi a partir de LiOH fue analizado mediante FTIR-ATR. Se encontró que las señales del grupo O–H del LiOH desaparecen o disminuyen su intensidad luego de ser liofilizadas (no calcinado), mientras que luego de ser calcinado aparecen las bandas del grupo  $\text{CO}_3^{2-}$ . Estos resultados indican que el producto liofilizado es transformado en  $\text{Li}_2\text{CO}_3$  durante el período de calcinación. Existe una similitud química entre litio y sodio (Na), en este contexto una conversión de NaOH en  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  ha sido también detectada por FTIR después del tratamiento térmico del hidróxido alcalino a  $120^\circ\text{C}$  en el aire por otros autores (Sun K. y cols., 2011). Análogamente, en el presente estudio, la calcinación de LiOH produce la descomposición térmica de PVA y simultáneamente la formación de la fase  $\text{Li}_2\text{CO}_3$ .

El método de síntesis de cristalización y liofilización utilizado en el presente trabajo resulta relativamente simple para producir nLi, comparado al método reportado por Lu Y. y cols. (2014), en el que se preparan nanopartículas de  $\text{Li}_2\text{CO}_3$  utilizando un reactor de membrana de microfiltración, que también implica un sistema multifase y con limitaciones de transferencia de masa durante la reacción.

En una segunda parte del trabajo, se evaluaron las propiedades bioactivas de las nanopartículas PVA/nLi. El uso de nanopartículas presenta varias ventajas técnicas respecto a utilizar el elemento en su forma de ion o compuesto. En primer lugar, las nanopartículas constituyen un material y no un compuesto químico, lo que le confiere propiedades químicas, físicas y biológicas diferentes. Particularmente, las nanopartículas presentan muy baja solubilidad comparado a la de un compuesto del mismo elemento. Este aspecto permite que una

nanopartícula tenga la capacidad de liberar iones al medio sostenidamente, lo cual permitiría un efecto terapéutico más prolongado en el tiempo. Por otro lado, las nanopartículas son más apropiadas para el diseño de biomateriales o dispositivos biomédicos, ya que se pueden incorporar en polímeros o superficies de otros dispositivos, permitiendo por ejemplo el diseño de biomateriales de ingeniería de tejidos o superficies bioactivas para implantes de titanio. Además, las nanopartículas presentan propiedades únicas que solo se generan por tener tamaño nanométrico. Estas propiedades están relacionadas con una mayor área y energía superficial, que puede traducirse en diferentes propiedades bioactivas debido a su diferente interacción con biomoléculas, células y tejidos biológicos.

El ensayo de bioactividad en SBF, es una prueba que se utiliza normalmente para evaluar la capacidad de materiales biocerámicos para estimular químicamente la formación de hidroxiapatita tipo ósea en contacto con el SBF. Aunque el litio no es un material que espere presentar esta capacidad, las nanopartículas de PVA/nLi fueron sometidas a este ensayo. En general, se encontró que las nanopartículas promueven la formación de una fase mineral rica en Ca y P, y de acuerdo al análisis FTIR esta fase presenta señales asociadas a la estructura de la hidroxiapatita. Este resultado indicaría que las nanopartículas de PVA/nLi también podrían contribuir a la reparación ósea promoviendo la formación química de apatita tipo ósea.

Las nanopartículas con potencial para aplicaciones de regeneración ósea deben ser citocompatibles y estimular la diferenciación osteogénica de células madre. Los ensayos MTS demostraron que PVA/nLi no induce cambios estadísticamente significativos en la viabilidad celular a concentraciones de hasta 600  $\mu\text{g/mL}$ , sobre esa cantidad solamente es observada una disminución marginal.

Por otro lado, la actividad enzimática ALP fue medida para las concentraciones de nanopartículas que no provocaron una disminución en la viabilidad celular. ALP es un marcador importante para el proceso de diferenciación osteogénico que es producido cuando los osteoblastos aposicionan matriz extracelular de hueso (Blair H. C. y cols., 2017). Se encontró que la actividad de ALP en el cultivo de DPSCs con 600  $\mu\text{g/mL}$  PVA/nLi después de 14

días de incubación es significativamente mayor ( $p < 0,001$ ) en relación al control. Un resultado similar se encontró al medir la expresión del gen RUNX2, el cual es un gen de expresión temprana del proceso de diferenciación osteogénico. La capacidad de PVA/nLi para estimular la diferenciación celular puede ser atribuida a los iones  $\text{Li}^+$  liberados por la disolución de las nanopartículas  $\text{Li}_2\text{CO}_3$ . Los iones  $\text{Li}^+$  son conocidos por activar la vía de señalización Wnt/ $\beta$ -catenina canónica que promueve la diferenciación de células madre en células especializadas formadoras de hueso. El análisis de iones de litio en los medios de cultivo que contenían 150  $\mu\text{g/mL}$ , 300  $\mu\text{g/mL}$ , 600  $\mu\text{g/mL}$ , 1200  $\mu\text{g/mL}$  de PVA/nLi revelaron concentraciones de  $\text{Li}^+$  de 1,47 mM; 3,90 mM; 9,71 mM y 16,75 mM, respectivamente. Estos resultados indican que las concentraciones de  $\text{Li}^+$  cercanas a 9,71 mM serían más favorables para promover el proceso de diferenciación osteogénico, el cual coincide con las concentraciones de litio reportadas que sobreexpresan los marcadores de diferenciación y que aceleran la osteogénesis después de una administración local de sales convencionales de litio (Arioka M. y cols., 2014). Debido a que no existían reportes previos acerca de la actividad biológica de nLi, especialmente respecto a su capacidad para estimular la expresión de marcadores de diferenciación osteogénica, los resultados del presente trabajo dieron origen a una reciente publicación (Covarrubias C. y cols., 2018. Anexo 5).

Las nanopartículas de PVA/nLi también presentaron una liberación sostenida de iones  $\text{Li}^+$ , que se estabilizó a los 2 días alrededor de 150 mg/g. A diferencia de los compuestos de litio que se disuelven fácilmente en agua (solubilidad: 15,4 g/L), las partículas nanométricas de PVA/nLi presentaron una baja solubilidad y una liberación controlada de litio en concentraciones terapéuticas para el tratamiento óseo de largo plazo.

Otra característica importante de las PVA/nLi, es que pueden ser obtenidas en forma de polvo con un rendimiento de 86%. Las partículas en polvo son materiales preferidos para diseñar biomateriales avanzados, tales como andamios para ingeniería de tejido óseo, superficies osteoinductivas para promover la oseointegración de implantes de titanio y otros materiales o dispositivos en donde la estimulación de nuevo tejido óseo sea de interés. Actualmente en los



tratamientos de reconstrucción cráneo–máxilo–facial, se requiere prescindir de los autoinjertos óseos y disponer de agentes sintéticos que aceleren los tiempos de reparación y permitan la obtención de un tejido óseo de mayor calidad histológica. En este contexto las nLi con propiedades osteogénicas podrían contribuir a la mejora de este tipo de tratamientos.

## 8. Conclusiones

1. Las nLi pueden ser sintetizadas en forma de polvo mediante una ruta química simple, usando un proceso de liofilización y preferentemente PVA como agente separador.

2. Las nLi inducen la mineralización de apatita en contacto con SBF.

3. Las nLi son citocompatibles y promueven la diferenciación osteogénica *in vitro* de células de la pulpa dental.

4. Las propiedades bioactivas exhibidas por las nLi podrían ser de utilidad para el mejoramiento de tratamientos de reconstrucción ósea o procesos de oseointegración.

## 9. Referencias bibliográficas

Aghaloo T. L., Misch C., Lin G. H., Iacono V. J., y Wang H. L. (2016). Bone Augmentation of the Edentulous Maxilla for Implant Placement: A Systematic Review. *Int J Oral Maxillofac Implants* 31 Suppl:s19-30.

Ajitha B., Reddy Y. A. K., Reddy P. S., Jeon H.-J., y Ahn C. W. (2016). Role of capping agents in controlling silver nanoparticles size, antibacterial activity and potential application as optical hydrogen peroxide sensor. *RSC Advances* 6(42):36171-36179.

Al-Thabaiti S. A., Obaid A. Y., Hussain S., y Khan Z. (2015). Shape-directing role of cetyltrimethylammonium bromide on the morphology of extracellular synthesis of silver nanoparticles. *Arabian Journal of Chemistry* 8(4):538-544.

Álvarez R. A., Cortez-Valadez M., Britto-Hurtado R., Bueno L. O. N., Flores-Lopez N., Hernández-Martínez A. y cols. (2015). Raman scattering and optical properties of lithium nanoparticles obtained by green synthesis. *Vibrational Spectroscopy* 77:5-9.

Antiabong J. F., Ngoepe M. G., y Abechi A. S. (2016). Semi-quantitative digital analysis of polymerase chain reaction-electrophoresis gel: Potential applications in low-income veterinary laboratories. *Veterinary world* 9(9):935-939.

Arioka M., Takahashi-Yanaga F., Sasaki M., Yoshihara T., Morimoto S., Hirata M. y cols. (2014). Acceleration of bone regeneration by local application of lithium: Wnt signal-mediated osteoblastogenesis and Wnt signal-independent suppression of osteoclastogenesis. *Biochemical pharmacology* 90(4):397-405.

Atwood D. A. (1971). Reduction of residual ridges: a major oral disease entity. *J Prosthet Dent* 26(3):266-279.

Bakshi M. S. (2015). How surfactants control crystal growth of nanomaterials. *Crystal Growth & Design* 16(2):1104-1133.

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*.

Blair H. C., Larrouture Q. C., Li Y., Lin H., Beer-Stoltz D., Liu L. y cols. (2017). Osteoblast differentiation and bone matrix formation in vivo and in vitro. *Tissue Engineering Part B: Reviews* 23(3):268-280.

Boccaccini A. R., Erol M., Stark W. J., Mohn D., Hong Z., y Mano J. F. (2010). Polymer/bioactive glass nanocomposites for biomedical applications: a review. *Composites science and technology* 70(13):1764-1776.

Bondarenko A., Angrisani N., Meyer-Lindenberg A., Seitz J. M., Waizy H., y Reifenrath J. (2014). Magnesium-based bone implants: immunohistochemical analysis of peri-implant osteogenesis by evaluation of osteopontin and osteocalcin expression. *J Biomed Mater Res A* 102(5):1449-1457.

Brooker M., y Bates J. B. (1971). Raman and infrared spectral studies of anhydrous  $\text{Li}_2\text{CO}_3$  and  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ . *The Journal of Chemical Physics* 54(11):4788-4796.

Callister W. D., y Rethwisch D. G. (2013). *Materials Science and Engineering: An Introduction* (9th ed.): John Wiley and Sons, Incorporated.

Commons W. (2008). Biological and technological scales compared. Accedido: Junio 2018, Disponible en: [https://en.wikipedia.org/wiki/File:Biological\\_and\\_technological\\_scales\\_compared-en.svg](https://en.wikipedia.org/wiki/File:Biological_and_technological_scales_compared-en.svg)

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.

Covarrubias C., Mattmann M., Von Marttens A., Caviedes P., Arriagada C., Valenzuela F. y cols. (2016). Osseointegration properties of titanium dental implants modified with a nanostructured coating based on ordered porous silica and bioactive glass nanoparticles. *Applied Surface Science* 363:286-295.

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.

Dimitriou R., Jones E., McGonagle D., y Giannoudis P. V. (2011). Bone regeneration: current concepts and future directions. *BMC medicine* 9(1):66.

Duan P., y Bonewald L. (2016). The role of the wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway in formation and maintenance of bone and teeth. *The international journal of biochemistry & cell biology* 77:23-29.

Dvir T., Timko B. P., Kohane D. S., y Langer R. (2010). Nanotechnological strategies for engineering complex tissues. *Nature Nanotechnology* 6:13.

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.

Emerich D. F., y Thanos C. G. (2003). Nanotechnology and medicine. *Expert Opinion on Biological Therapy* 3(4):655-663.

Farrukh M. A., Teck H. B., y Adnan R. (2010). Surfactant-controlled aqueous synthesis of SnO<sub>2</sub> nanoparticles via the hydrothermal and conventional heating methods. *Turkish Journal of Chemistry* 34(4):537-550.

Galli C., Passeri G., y Macaluso G. (2010). Osteocytes and WNT: the mechanical control of bone formation. *J Dent Res* 89(4):331-343.

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.

Gaur T., Lengner C. J., Hovhannisyan H., Bhat R. A., Bodine P. V., Komm B. S. y cols. (2005). Canonical WNT signaling promotes osteogenesis by directly stimulating Runx2 gene expression. *J Biol Chem* 280(39):33132-33140.

Gong W., Dong Y., Wang S., Gao X., y Chen X. (2017). A novel nano-sized bioactive glass stimulates osteogenesis via the MAPK pathway. *RSC Advances* 7(23):13760-13767.

Kaigler D., y Mooney D. (2001). Tissue engineering's impact on dentistry. *Journal of dental education* 65(5):456-462.

Kim Y., Nowzari H., y Rich S. K. (2013). Risk of prion disease transmission through bovine-derived bone substitutes: A systematic review. *Clinical implant dentistry and related research* 15(5):645-653.

Klein P. S., y Melton D. A. (1996). A molecular mechanism for the effect of lithium on development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93(16):8455-8459.

Koczkur K. M., Mourdikoudis S., Polavarapu L., y Skrabalak S. E. (2015). Polyvinylpyrrolidone (PVP) in nanoparticle synthesis. *Dalton Trans* 44(41):17883-17905.

Kokubo T., y Takadama H. (2006). How useful is SBF in predicting in vivo bone bioactivity? *Biomaterials* 27(15):2907-2915.

Komori T. (2003). Requisite roles of Runx2 and Cbfb in skeletal development. *Journal of bone and mineral metabolism* 21(4):193-197.

Lekovic V., Camargo P. M., Weinlaender M., Vasilic N., y Kenney E. B. (2002). Comparison of platelet-rich plasma, bovine porous bone mineral, and guided tissue regeneration versus platelet-rich plasma and bovine porous bone mineral in the treatment of intrabony defects: a reentry study. *Journal of periodontology* 73(2):198-205.

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.

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. *J Biomater Sci Polym Ed* 11(4):401-414.

Lu Y., Liu Y., Zhou C., y Luo G. (2014). Preparation of Li<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> Nanoparticles by Carbonation Reaction Using a Microfiltration Membrane Dispersion Microreactor. *Industrial & Engineering Chemistry Research* 53(27):11015-11020.

Maçon A. L. B., 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.

Marie P. J., Ammann P., Boivin G., y Rey C. (2001). Mechanisms of action and therapeutic potential of strontium in bone. *Calcif Tissue Int* 69(3):121-129.

Marx R. E. (1994). Clinical application of bone biology to mandibular and maxillary reconstruction. *Clin Plast Surg* 21(3):377-392.

Mason C., y Dunnill P. (2008). A brief definition of regenerative medicine. *Regen Med* 3(1):1-5.

Mellonig J. T., Bowers G. M., y Cotton W. R. (1981). Comparison of bone graft materials: Part II. New bone formation with autografts and allografts: a histological evaluation. *Journal of periodontology* 52(6):297-302.

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.

Miron R., y Zhang Y. (2012). Osteoinduction: a review of old concepts with new standards. *J Dent Res* 91(8):736-744.

Mirsasaani S. S., Hemati M., Tavasoli T., Dehkord E. S., Yazdi G. T., y Poshtiri D. A. (2013). Chapter 2 - Nanotechnology and Nanobiomaterials in Dentistry. In Subramani K, Ahmed W, y Hartsfield JK (Eds.), *Nanobiomaterials in Clinical Dentistry* (pp. 17-33): William Andrew Publishing.

Mistry S., Roy R., Kundu B., Datta S., Kumar M., Chanda A. y cols. (2016). Clinical Outcome of Hydroxyapatite Coated, Bioactive Glass Coated, and Machined Ti6Al4V Threaded Dental Implant in Human Jaws: A Short-Term Comparative Study. *Implant Dent* 25(2):252-260.

Mitra S. B. (2018). Chapter 2 - Nanoparticles for dental materials: Synthesis, analysis, and applications. In Subramani K, y Ahmed W (Eds.), *Emerging Nanotechnologies in Dentistry (Second Edition)* (pp. 17-39): William Andrew Publishing.

Ober J. A. (2018). Mineral commodity summaries 2018: US Geological Survey.

Peral B., Redondo L. M., Verrier A., Serrat A., Torres M. A., y Vaquero C. (2008). Estudio experimental sobre la regeneración ósea mandibular de la rata con diferentes biomateriales. *Rev Esp Cir Oral y Maxilofac* 30:313-323.

Peter M., Binulal N., Nair S., Selvamurugan N., Tamura H., y Jayakumar R. (2010). Novel biodegradable chitosan–gelatin/nano-bioactive glass ceramic composite scaffolds for alveolar bone tissue engineering. *Chemical Engineering Journal* 158(2):353-361.

Pina S., Oliveira J. M., y Reis R. L. (2015). Natural-Based Nanocomposites for Bone Tissue Engineering and Regenerative Medicine: A Review. *Advanced Materials* 27(7):1143-1169.

Polo-Corrales L., Latorre-Esteves M., y Ramirez-Vick J. E. (2014). Scaffold design for bone regeneration. *J Nanosci Nanotechnol* 14(1):15-56.

Qing L., Yanbao L., Xianghui L., Chunhua L., Yixin C., y Zhongzi X. (2009). The apatite formation ability of CaF<sub>2</sub> doping tricalcium silicates in simulated body fluid. *Biomedical Materials* 4(4):045005.

Salata O. (2004). Applications of nanoparticles in biology and medicine. *J Nanobiotechnology* 2(1):3.

Sandor G., Lindholm T., y Clokie C. (2003). Bone regeneration of the cranio-maxillofacial and dento-alveolar skeletons in the framework of tissue engineering. *Topics in tissue engineering* 7:1-46.

Saska S., Mendes L. S., Gaspar A. M. M., y de Oliveira Capote T. S. (2015). Bone substitute materials in implant dentistry *Current Concepts in Dental Implantology: InTech*.

Schemitsch E. H. (2017). Size matters: defining critical in bone defect size! *Journal of orthopaedic trauma* 31:S20-S22.

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.

Shan T., Zhou C., Yang R., Yan F., Zhang P., Fu Y. y cols. (2015). Lithium chloride promotes the odontoblast differentiation of hair follicle neural crest cells by activating Wnt/beta-catenin signaling. *Cell Biol Int* 39(1):35-43.

Shorter E. (2009). The history of lithium therapy. *Bipolar Disorders* 11(s2):4-9.

Sogal A., y Tofe A. (1999). Risk assessment of bovine spongiform encephalopathy transmission through bone graft material derived from bovine bone used for dental applications. *Journal of periodontology* 70(9):1053-1063.



Soto Góngora S., y Taxis González M. G. (2005). Injertos óseos: Una alternativa efectiva y actual para la reconstrucción del complejo cráneo-facial. *Revista Cubana de estomatología* 42(1):0-0.

Sun K., Zhang H., y Ouyang J. (2011). Indium tin oxide modified with sodium compounds as cathode of inverted polymer solar cells. *Journal of Materials Chemistry* 21(45):18339-18346.

Tanaka M., Kageyama T., Sone H., Yoshida S., Okamoto D., y Watanabe T. (2016). Synthesis of Lithium Metal Oxide Nanoparticles by Induction Thermal Plasmas. *Nanomaterials (Basel)* 6(4):60.

Tripathy J. (2017). Polymer Nanocomposites for Biomedical and Biotechnology Applications *Properties and Applications of Polymer Nanocomposites* (pp. 57-76): Springer.

Tsai L. K., Wang Z., Munasinghe J., Leng Y., Leeds P., y Chuang D. M. (2011). Mesenchymal stem cells primed with valproate and lithium robustly migrate to infarcted regions and facilitate recovery in a stroke model. *Stroke* 42(10):2932-2939.

Turkyilmaz I., Company A. M., y McGlumphy E. A. (2010). Should edentulous patients be constrained to removable complete dentures? The use of dental implants to improve the quality of life for edentulous patients. *Gerodontology* 27(1):3-10.

Urzua I., Mendoza C., Arteaga O., Rodríguez G., Cabello R., Faleiros S. y cols. (2012). Dental caries prevalence and tooth loss in Chilean adult population: first national dental examination survey. *International journal of dentistry* 2012.

Valenzuela F., Covarrubias C., Martínez C., Smith P., Díaz-Dosque M., y Yazdani-Pedram M. (2012). Preparation and bioactive properties of novel bone-repair bionanocomposites based on hydroxyapatite and bioactive glass nanoparticles. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials* 100(6):1672-1682.

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. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl* 66:185-192.

Wei G., Jin Q., Giannobile W. V., y Ma P. X. (2007). The enhancement of osteogenesis by nano-fibrous scaffolds incorporating rhBMP-7 nanospheres. *Biomaterials* 28(12):2087-2096.

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.

Xu H., Duan J., Ning D., Li J., Liu R., Yang R. y cols. (2014). Role of Wnt signaling in fracture healing. *BMB reports* 47(12):666-672.

Zamani A., Omrani G. R., y Nasab M. M. (2009). Lithium's effect on bone mineral density. *Bone* 44(2):331-334.

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 Anexo 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.

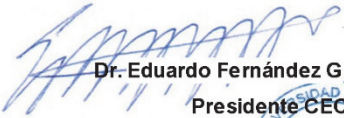
**Aspectos Éticos:**


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 cartilaginoso”**

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



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

## 10.2 Anexo 2: Consentimiento Informado para 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@odontologia.uchile.cl](mailto: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:**

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

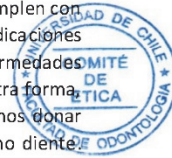
La colaboración con el estudio es completamente voluntaria, y usted puede dejar de participar libremente.

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: [covarrubias@odontologia.uchile.cl](mailto:covarrubias@odontologia.uchile.cl)) o si lo desea al Dr. Eduardo Fernández G. presidente del Comité de Ética y aclarar sus dudas.





**FORMULARIO DE CONSENTIMIENTO INFORMADO**

He sido invitado a colaborar con la investigación de creación y evaluación de nuevos materiales para la regeneración ósea. Entiendo que colaboraré donando mis dientes extraídos o una muestra de encía, los que serán utilizados para la extracción de células madre y destruidos una vez tratados y observados. Sé que no existen beneficios para mi 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 Participante \_\_\_\_\_

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 Gallardo (PhD).

Nombre y Firma del Investigador Principal

Fecha

Dra. Andrea Véliz Ramírez

Nombre y Firma del director del Centro o de su Representante

Fecha



## 10.3 Anexo 3: Consentimiento Informado para padres o tutores



### CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

(Padres o Tutores)

**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@odontologia.uchile.cl](mailto: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:** 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.





### FORMULARIO DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

He sido invitado a colaborar con la investigación de creación y evaluación de nuevos materiales para la regeneración del hueso. Entiendo que colaboraré donando mis dientes extraídos o una muestra de encía, los que serán utilizados para la extracción de células madre y destruidos una vez tratados y observados. Sé que no existen beneficios para mi 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 \_\_\_\_\_



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 Gallardo (PhD) .

Nombre y Firma del Investigador Principal

Fecha

Dra. Andrea Véliz Ramírez

Nombre y Firma del director del Centro o de su Representante

Fecha

## 10.4 Anexo 4: Asentimiento informado para 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 mi 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

## 10.5 Anexo 5: Publicación científica realizada a partir de este trabajo

Materials Letters 219 (2018) 205–208



Contents lists available at ScienceDirect

Materials Letters

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/mlblue](http://www.elsevier.com/locate/mlblue)



### Facile synthesis of lithium carbonate nanoparticles with potential properties for bone repair applications

Cristian Covarrubias\*, Juan Pablo Durán, Miguel Maureira

Laboratory of Nanobiomaterials, ICOD, Faculty of Dentistry, University of Chile, Sergio Livingstone 943, Independencia, Santiago, Chile



#### ARTICLE INFO

##### Article history:

Received 2 October 2017  
Received in revised form 5 February 2018  
Accepted 18 February 2018  
Available online 19 February 2018

##### Keywords:

Lithium nanoparticles  
Bioactive nanoparticles  
Biomaterials  
Bone repair

#### ABSTRACT

Lithium carbonate nanoparticles were synthesized by facile chemical route in the presence of organic capping agents. Nanosized  $\text{Li}_2\text{CO}_3$  particles of  $\sim 86$  nm in size were produced from LiOH solution and preferably using PVA as a capping agent. FTIR-ATR analysis revealed that  $\text{Li}_2\text{CO}_3$  phase is formed during calcination of the freeze-dried synthesis product. *In vitro* tests shown that nanoparticle concentrations up to 600  $\mu\text{g}/\text{mL}$  do not disturb cell viability and promote the osteogenic differentiation of stem cells by  $\text{Li}^+$  ions (9.7 mM) leached from the nanoparticle. The biological properties exhibited by the  $\text{Li}_2\text{CO}_3$  nanoparticles make of them attractive for bone repair applications.

© 2018 Elsevier B.V. All rights reserved.

#### 1. Introduction

Lithium, a key ingredient for batteries, is also a therapeutic element with properties to stimulate the cellular mechanisms of bone tissue formation [1]. Local application of  $\text{Li}^+$  ions enhances bone healing by increasing bone mineral density or accelerating the bone formation process [2]. Likewise, bioceramics such as calcium phosphate cement [3] and microbioactive glass [4,5] have shown a superior osteogenic and angiogenic [6] properties when doped with lithium.

Elements produced in nanoparticle form offer greater surface area for biological interactions, a more controlled release of ions, and the possibility of designing nanocomposite materials. Bioactive nanoparticles in powder are also demanded in bone reconstruction and tissue engineering. The synthesis of zero-valent lithium 5 nm – colloidal nanoparticles has been reported by chemical reduction of  $\text{Li}^+$  ions [7], which however requires sophisticated separation methods [8]. In this respect, lithium carbonate ( $\text{Li}_2\text{CO}_3$ ) nanoparticles can be produced in their powder form as demonstrated by Lu et al. [9] by precipitation reactions in a membrane microreactor.

In this work, we reported the synthesis of powdered  $\text{Li}_2\text{CO}_3$  nanoparticles by using facile chemical routes and studied the influence of different capping agents on particle size. The cytocompatibility and ability of the nanoparticles to enhance the alkaline phosphatase (ALP) activity in stem cells is also demonstrated.

\* Corresponding author.

E-mail address: [ccovarrubias@odontologia.uchile.cl](mailto:ccovarrubias@odontologia.uchile.cl) (C. Covarrubias).

<https://doi.org/10.1016/j.matlet.2018.02.075>  
0167-577X/© 2018 Elsevier B.V. All rights reserved.

#### 2. Materials and methods

##### 2.1. Synthesis of nanoparticles

Nanoparticles were synthesized from a lithium hydroxide (LiOH) solution in the presence of polyvinyl alcohol (PVA), polyvinylpyrrolidone (PVP), or cetyltrimethylammonium bromide (CTA) as capping agents. Briefly, 0.5 g of capping agent compound was dissolved in 50 mL distilled water at room temperature for 1.5 h. Then, 1 g of LiOH was added and the reacting solution was kept under stirring at room temperature for 1 h. Afterward, the suspension was frozen at  $-80$  °C, lyophilized and calcined at 700 °C in air for 5 h at a heating rate of 4 °C/min to obtain a fine white powder.

##### 2.2. Nanoparticle characterization

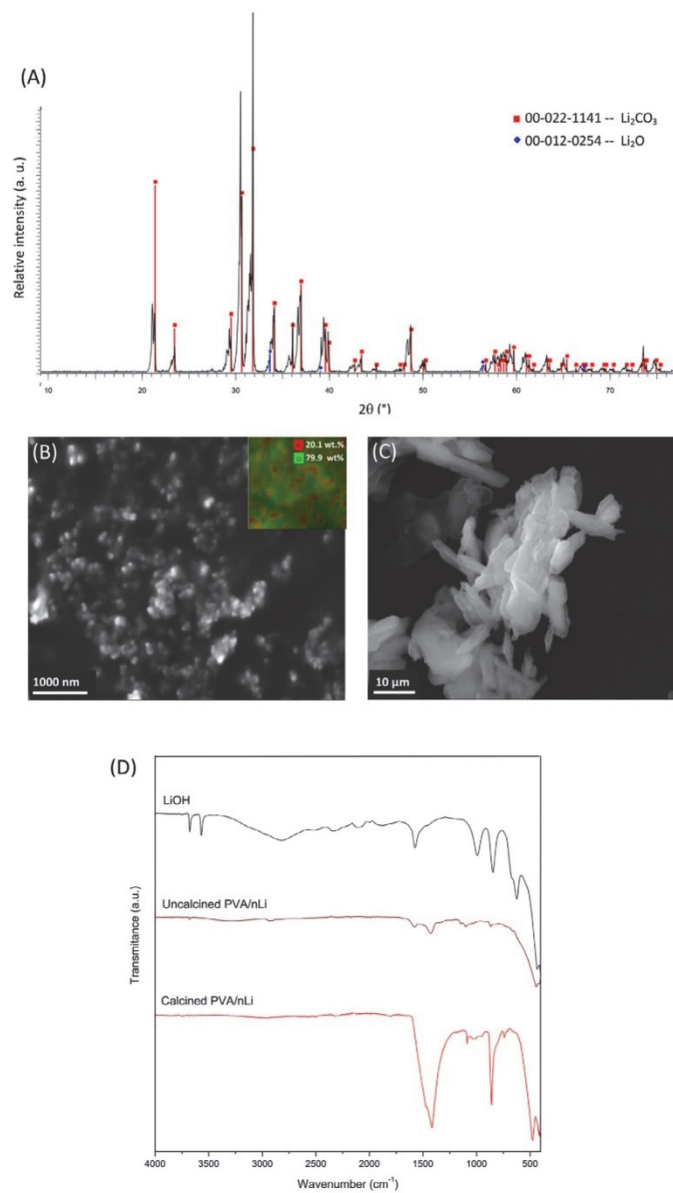
The particle size and morphology of the synthesized products were analyzed by scanning electron microscopy (SEM) with a Jeol JSM-IT300LV microscope equipped with energy dispersive X-ray detector Aztec EDS (Oxford Instruments) for microanalysis. Particle size distribution was estimated by using the analysis tools of the microscope software. The data were analyzed using One-way ANOVA analysis and Tukey's multiple comparison tests in Graph Pad Prism software at  $p < 0.05$ .

The percentage yield of the synthesis process was estimated by dividing the mass of the synthesis product by the mass of LiOH used in the reaction according to the following expression: % Yield = (mass of synthesized product/LiOH mass)  $\times$  100.

**Table 1**  
Mean particle size of products and synthesis yields.

|         | Particle size (nm) | Yield (%) |
|---------|--------------------|-----------|
| PVA/nLi | 86.6 ± 10.8        | 86        |
| PVP/nLi | 108.5 ± 19.3       | 71        |
| CTA/nLi | 101.9 ± 17.5       | 48        |

A selected nanoparticle product was further analyzed by attenuated total reflectance with Fourier transform infrared spectroscopy (ATR-FTIR) on an Agilent Cary 630 ATR-FTIR spectrometer. X-ray diffraction (XRD) pattern was measured on a Siemens D 5000 diffractometer using  $\text{CuK}\alpha$  radiation within a  $2\theta$  range of



**Fig. 1.** XRD analysis (A) and SEM image (B) of PVA/nLi particles. SEM image of traditional  $\text{Li}_2\text{CO}_3$  microparticles (C). FTIR-ATR analysis of PVA/nLi synthesis products (D).



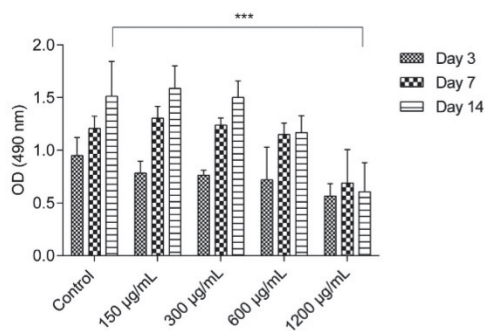


Fig. 2. Viability of DPSCs cultured in media conditioned with PVA/nLi nanoparticles.

5–80° at a scanning speed of 1.2°/min. Phase identification was carried out using the ICDD Powder Diffraction File (PDF2).

### 2.3. Cell culture

The viability of Dental Pulp Stem Cells (DPSCs) cultured in nanoparticle conditioned medium with 150, 300, 600, and 1200 µg/ml of PVA/nLi was assessed at 3, 7 and 14 days of incubation. Cell viability was determined with CellTiter 96® Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay (Promega Corporation). ALP activity was determined by absorbance measurements at 405 nm in the supernatant of lysed cells caused by dephosphorylation of p-nitrophenyl phosphate substrate.

The release of  $\text{Li}^+$  from nanoparticle in the cell culture media at 37 °C were measured by flame emission photometry in a JENWAY PFP7 flame photometer using the lithium emission line at 671 nm.

### 3. Results and discussion

Table 1 presents the particle size of the obtained products and the yields of each synthesis condition. The product synthesized in the presence of PVA was found to exhibit the smallest and uniform particle size. PVA was the only capping agent that produced particles with a size smaller than 100 nm. In addition, the synthesis

method using PVA exhibited the highest yield of nanoparticle powder. Polar —OH groups of PVA molecules have a stronger interaction with the  $\text{Li}^+$  cations than that produced through amide groups of PVP, which stabilize more strongly the cations, controls the nanoparticle growth and prevent their aggregation. A similar effect has been observed in the synthesis of silver nanoparticles from  $\text{Ag}^+$  cations by using PVA and PVP [10]. By contrast, the use of cationic CTA yielded larger particle sizes, even when surfactant micelles have been found influence the shape and size of nanoparticles [11].

The nanoparticles produced with PVA were chosen for further structural analysis and bioactivity testing because it exhibited the smaller particle size and higher synthesis yield. XRD analysis (Fig. 1a) revealed that nanoparticles present a highly crystalline structure corresponding to that of  $\text{Li}_2\text{CO}_3$  phase (ICDD: 00-022-1141) with monoclinic space group C2/c. Some peaks of  $\text{Li}_2\text{O}$  were also detected, suggesting the presence of traces of the metallic oxide. SEM image of PVA/nLi particles (Fig. 1b) confirms their nanometric nature, which clearly contrasts with that of traditional microsized  $\text{Li}_2\text{CO}_3$  particles (>10 µm) (Fig. 1c). EDX analysis and most of the conventional solid-state analysis techniques do not detect lithium because of the too low energy of Li ( $Z = 3$ ) K X-rays. However, C/O molar ratio of PVA/nLi (1:3) matches with that of  $\text{CO}_3^{2-}$  anion. The formation of PVA/nLi from LiOH was followed by ATR-FTIR (Fig. 1d). The O—H stretching vibrations of LiOH around  $3600\text{ cm}^{-1}$  and for  $\text{H}_2\text{O}$  in LiOH at  $1573\text{ cm}^{-1}$  disappear or decrease their intensity in the freeze-dried synthesis product (uncalcined), while PVA/nLi spectrum presents the antisymmetric C—O stretching vibrations of  $\text{CO}_3^{2-}$  at  $1419\text{ cm}^{-1}$  and those of out-of-plane deformation modes at  $853\text{ cm}^{-1}$  [12]. These results indicate that the freeze-dried product is transformed into  $\text{Li}_2\text{CO}_3$  during the calcination period. The conversion of NaOH into  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  has been also detected by FTIR after thermal treatment of the alkali hydroxide at 120 °C in air [13]. Similarly, in the present study, calcination of LiOH produces the thermal decomposition of PVA and simultaneous formation of the  $\text{Li}_2\text{CO}_3$  phase. Our single-phase synthesis method is proved to be simpler than the nanoparticle preparation process carried out in a microfiltration membrane dispersion reactor [9], which also involves a multiphase system with interphase mass transfer considerations.

Nanoparticles with potential for bone regeneration applications should be cytocompatible and stimulate the osteogenic differentiation of stem cells. Fig. 2 show that PVA/nLi do not induce

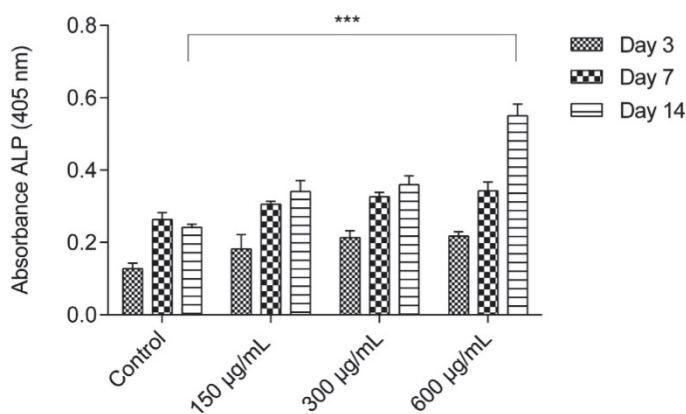


Fig. 3. ALP activity in DPSCs cultured in media conditioned with PVA/nLi nanoparticles.

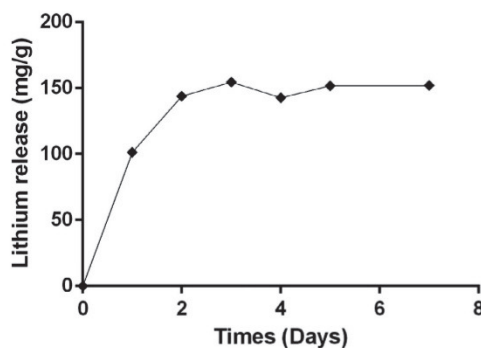


Fig. 4. Cumulative  $\text{Li}^+$  release from PVA/nLi in cell culture medium. The amount of lithium released is expressed as  $\text{Li}^+$  mass per nanoparticle mass.

statistically significant changes in cell viability at concentrations up to  $600 \mu\text{g/mL}$ , above which only a marginal decrease is observed. The ALP enzymatic activity was measured for the nanoparticle concentrations that did not provoke a decrease in cell viability. ALP is an important marker of the osteogenic differentiation process that is produced when bone forming cells lay down the bone extracellular matrix [14]. From Fig. 3 it can be seen that the ALP activity is significantly increased relative to control in DPSCs cultured with  $600 \mu\text{g/mL}$  PVA/nLi after 14 days of incubation ( $p < 0.001$ ).  $\text{Li}^+$  ions are known to activate the Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway that promotes stem cell differentiation into specialized bone-forming cells. In the current study, the capacity of the PVA/nLi to stimulate the cell differentiation can be attributed to the  $\text{Li}^+$  ions generated by dissolution of the  $\text{Li}_2\text{CO}_3$  nanoparticles. Lithium analysis in the culture medium containing 150, 300, 600, and 1200 of PVA/nLi revealed  $\text{Li}^+$  concentrations of 1.47 mM, 3.90 mM, 9.71 mM and 16.75 mM, respectively. These results indicate that  $\text{Li}^+$  concentrations around 9.71 mM would be more favorable to promote the osteogenic differentiation process, which agrees well with reported lithium concentrations that upregulated differentiation markers and accelerated osteogenesis after local administration of conventional lithium salts [15]. Due to that lithium compounds dissolve readily in water, nanosized PVA/nLi particles are expected to provide a more controlled release of therapeutic lithium concentrations for long-term bone treatment.  $\text{Li}^+$  release from nanoparticle became stabilized after 2 days around  $150 \text{ mg/g}$  ( $10.2 \text{ mM}$ ) (Fig. 4), showing a sustained release rate of the element. In addition, powdered nanoparticles are preferred materials for the design of advanced biomaterials, such as 3D nanocomposite scaffolds for bone tissue engineering or osteoinductive surfaces to promote titanium implant osseointegration.

#### 4. Conclusions

Nanosized  $\text{Li}_2\text{CO}_3$  particles can be successfully synthesized by a facile chemical route and preferably using PVA as a capping agent. The nanoparticles produce significantly high cell viability and promote the osteogenic differentiation of stem cells. The biological properties exhibited by the nanoparticles are promising to be exploited in bone regeneration applications.

#### Acknowledgements

This work was supported by the Academic Productivity Support Program, U-Redes Consolidación 2017; University of Chile.

#### References

- [1] Z. Zhu et al., Lithium stimulates human bone marrow derived mesenchymal stem cell proliferation through gsk-3beta-dependent beta-catenin/wnt pathway activation, *FEBS J.* 281 (2014) 5371–5389.
- [2] M. Arioka et al., Acceleration of bone regeneration by local application of lithium: Wnt signal-mediated osteoblastogenesis and Wnt signal-independent suppression of osteoclastogenesis, *Biochem. Pharmacol.* 90 (2014) 397–405.
- [3] L. Li et al., Acceleration of bone regeneration by activating Wnt/ $\beta$ -catenin signalling pathway via lithium released from lithium chloride/calcium phosphate cement in osteoporosis, *Sci. Rep.* 7 (2017) 45204.
- [4] V. Miguez-Pacheco et al., Development and characterization of lithium-releasing silicate bioactive glasses and their scaffolds for bone repair, *J. Non Cryst. Solids* 432 (2016) 65–72.
- [5] J.G. da Silva et al., Optimisation of lithium-substituted bioactive glasses to tailor cell response for hard tissue repair, *J. Mater. Sci.* 52 (2017) 8832–8844.
- [6] L.A. Haro Durand et al., In vitro human umbilical vein endothelial cells response to ionic dissolution products from lithium-containing 45S5 bioactive glass, *Materials* 10 (2017) 740.
- [7] R.A.B. Álvarez, M. Cortez-valadez, R. Britto-hurtado, L.O. Neira, N.S. Flores-Lopez, A.R. Hernández-martínez, R. Gámez-corrales, R. Vargas-ortiz, Vibrational spectroscopy Raman scattering and optical properties of lithium nanoparticles obtained by green synthesis, *Vib. Spectrosc.* 77 (2015) 5–9.
- [8] X. Sun, S.M. Tabakman, W. Seo, L. Zhang, G. Zhang, S. Sherlock, L. Bai, H. Dai, Separation of nanoparticles in a density gradient: FeCo@C and gold, *Angew. Chem. Int. Ed.* 48 (2009) 939–942.
- [9] Y. Lu, Y. Liu, C. Zhou, G. Luo, Preparation of  $\text{Li}_2\text{CO}_3$  nanoparticles by carbonation reaction using a microfiltration membrane dispersion microreactor, *Ind. Eng. Chem. Res.* 53 (2014) 11015–11020.
- [10] B. Ajitha, Y.A. Kumar Reddy, P.S. Reddy, H.-J. Jeon, C.W. Ahn, T. Rojo, V. Serpooshan, W.J. Parak, M. Mahmoudi, Role of capping agents in controlling silver nanoparticles size, antibacterial activity and potential application as optical hydrogen peroxide sensor, *RSC Adv.* 6 (2016) 36171–36179.
- [11] S.A. Al-Thabaiti, A. Yousif, S. Hussain, Z. Khan, Shape-directing role of cetyltrimethylammonium bromide on the morphology of extracellular synthesis of silver nanoparticles, *Arab. J. Chem.* 8 (2015) 538–544.
- [12] M.H. Brooker, J.B. Bates, Raman and infrared spectral studies of anhydrous  $\text{Li}_2\text{CO}_3$  and  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , *J. Chem. Phys.* 54 (1971) 4788–4796.
- [13] J.M. Chem, K. Sun, H. Zhang, J. Ouyang, Indium tin oxide modified with sodium compounds as cathode of inverted polymer solar cells, *J. Mater. Chem. View.* 21 (2011) 18339–18346.
- [14] H.C. Blair, Q.C. Larrouture, Y. Li, H. Lin, D. Beer-stoltz, L. Liu, S. Rocky, L.J. Robinson, P.H. Schlesinger, D.J. Nelson, Osteoblast differentiation and bone matrix formation in vivo and in vitro, *Tissue Eng. B* 23 (2016) 1–29.
- [15] M. Arioka, F. Takahashi-yanaga, M. Sasaki, T. Yoshihara, Acceleration of bone regeneration by local application of lithium: Wnt signal-mediated osteoblastogenesis and Wnt signal-independent suppression of osteoclastogenesis, *Biochem. Pharmacol.* 90 (2014) 397–405.