



# **Materiales Compuestos de Vidrio Bioactivo Mesoporoso Funcionalizados con Zinc para Aplicación en Endodoncia Regenerativa**

Memoria presentada por:

**María del Carmen Jiménez Sánchez**

Para optar al grado de:

**Doctor en Odontología**

Dirigida por:

**Dra. María Aránzazu Díaz Cuenca**

**Dr. Juan José Segura Egea**

**Dra. Jenifer Martín González**

Tutor:

**Dr. Juan José Segura Egea**

Departamento de Estomatología

Universidad de Sevilla

Instituto de Ciencia de Materiales

CSIC-US

Sevilla, 2019



## Agradecimientos

Comenzar mis agradecimientos a mis directores de tesis el Dr. Juan José Segura Egea, la Dra. M<sup>a</sup> Aránzazu Díaz Cuenca y la Dra. Jenifer Martín González.

A Juanjo le tengo que agradecer todo. Gracias Juanjo por confiar en mí, por apostar por mí, por no abandonarme nunca brindándome siempre todo tu apoyo, por siempre tener unas palabras alentadoras y de ánimo. Gracias por transmitirme tu sabiduría y tu amor por la endodoncia y la investigación. Sabes que hubiera sido imposible llegar aquí sin ti. Espero seguir trabajando mucho tiempo a tu lado, porque para mí es todo un placer.

A Arantxa darle las gracias por haber llevado la gran carga de mi Tesis Doctoral. Arantxa me ha introducido en un mundo totalmente desconocido para mí como ha sido el mundo de los materiales. Muchas gracias por tu infinita paciencia, tu amabilidad y disposición para ayudarme en todo. También muchas gracias por confiar tanto en mí y por tus ánimos y esfuerzo, sobre todo en la recta final que tanto hemos trabajado. Pero lo que más debo agradecerte es que me hayas enseñado a pensar y a ser autocrítica y muy exigente con mi trabajo, no es fácil encontrar personas que se brinden a ello, muchas gracias, eres la mejor.

A Jenifer agradecerle que sea mi amiga, mi compañera, mi consejera... Muchas gracias por ser mi ejemplo a seguir, por tu ayuda y tu disponibilidad siempre que la he necesitado... aún nos queda mucho camino por recorrer juntas...

También quiero dar las gracias a mis compañeras del grupo del Instituto de Materiales Lilian, Sara y la nueva incorporación Xiaozhe. He conocido a tres

chicas maravillosas que no han dudado un momento en transmitirme sus conocimientos y su ayuda. Lilian fue mis manos en mis comienzos y Sara siempre ha estado disponible incluso en la distancia. A Xiaozhe le deseo lo mejor en los próximos años porque estoy segura que con su actitud y su constante trabajo llegará muy lejos, gracias por tu gran ayuda durante mis últimos experimentos.

A mis amigos de almuerzo Ángeles y Francisco por sus ánimos y su apoyo haciendo que por un momento me olvidara de todo y disfrutara de una buena charla.

Al personal técnico del Instituto, M<sup>a</sup> Carmen, José Carlos, Miguel Ángel, José Mari, Olga, Inma, Antonio de recepción... por ser personas súper agradables y estar siempre disponibles para ayudarme en lo que necesitara.

A Ketama, Antonio, Carlos, Víctor Sánchez... por permitirme trabajar en el laboratorio del Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina y adentrarme en el mundo celular. Ha sido un placer conocerlos a todos, en especial a mi Ketí al que le deseo toda la suerte del mundo porque se la merece.

A la Dra. Fionnuala T. Lundy por acogerme en su laboratorio de la Universidad de Queen en Belfast durante mis dos estancias. En Belfast me acogieron desde el primer momento como una integrante más del laboratorio. Gracias por hacer que mi estancia fuera maravillosa y por enseñarme tantas cosas. No puedo pasar sin mencionar a dos personas muy especiales como Marina Afami y Hayley McMillan que se convirtieron en mis amigas y que me ayudaron muchísimo cuando me encontraba perdida en un lugar que nada tenía que ver con Sevilla... También agradecer a la Dra. El Karim, a Catherine, Orla, Nicole, Banan, Harriet, Niall por su cariño y hacerme sentir la niña bonita española del laboratorio, los echo mucho de menos.

A mis compañeros del Máster de Endodoncia, tanto profesores (Benito, Isa, Milagros, Carlos, Martín, Paloma) como alumnos, por su preocupación y sus ánimos siempre a la “ratita de laboratorio” como me llamaban en mi promoción. A Daniel Cabanillas por su ayuda y por amenizar las mañanas de los lunes, con él también me quedan muchas horas que pasar en el departamento...

A mis chulitas (Marta, Maribel e Irene) por apoyarme en todo momento y darme todos los ánimos y fuerza del mundo en mis momentos de flaquezas, quiero mucho a estas tres personajas.

A María Murillo le tengo que hacer un agradecimiento especial porque ella es especial. Mi amiga desde el primer día de carrera y una de las mejores personas que tengo, con la que he podido contar siempre, que jamás me ha fallado y me ha ayudado en todo momento. Con ella he vivido muchas cosas y en cada una de ellas ha sabido cómo responder. Vamos a por todas compañera!!

A mis compañeras de clínica Loli, Rosario, Lourdes, M<sup>a</sup> Ángeles, Miriam, M<sup>a</sup> Carmen y Rubén. Muchas gracias Loli por tu apoyo y la gran flexibilidad que has tenido conmigo. Ellas hacen que si ya me gusta mi trabajo aún me guste más. Gracias por la simpatía, por el cero impedimento a nada, las meriendas, las risas y sacarle siempre el lado positivo a todo!

A mis amigos de la cafetera, a los cuales es imposible nombrarlos todos porque somos una gran familia. Si que voy a mencionar a M<sup>a</sup> Antonia y Rafi porque son nuestra mitad. No saben lo importante que es para mí tener su apoyo. Muchas gracias por todo amigos, ya queda menos para celebrarlo... Entre mis amigos tengo que hacer mención especial a Mercedes “la pollita”. Ha sido la única persona que me ha pedido aparecer en los agradecimientos de mi tesis, cosa que me encantó que

me pidiera y aquí está. Muchas gracias Mer por tus ánimos, tus piropos y esas ganas de vivir que transmites, sabes que eres la mejor!

A mis amiguísimas María, Mercedes y M<sup>a</sup> Antonia. Siempre están cuando las necesito y cada día doy gracias por tenerlas a mi lado. Son tres chicas valientes, luchadoras, que saben lo que quieren y con mucho estilo... os quiero muchísimo!

A mis amigas Mantis por ser las mejores amigas del mundo. A Ana, Siomara, Raquel, Rocío, Isa, María, Pepa, Ana, Carmen María, Elia. Sé que ellas se alegran por todo mi trabajo y mi esfuerzo y porque nadie como ellas sabe animarme y sacarme los colores. Gracias por ser mis amigas desde pequeñas, por quererme de verdad y por demostrarme tanto amor! Nunca nos vamos a separar...

A la familia de Jaime, por su comprensión, apoyo y ánimos, muchas gracias por hacerme parte de vuestra bonita familia.

A mi casa! Gracias a la mejor madre, hermana y hermanos del mundo. Gracias a mis cuatro tesoros de sobrinos, mi cuñado Jorge, mi tío Julio... ellos son los que realmente conocen todo el esfuerzo de estos cuatro años. Agradecer a mi madre y mi hermana su incondicional e infinito apoyo, su comprensión, sus palabras de aliento... gracias mamá por tu "tengo más ganas que tú que acabes la tesis"... creo que lo echaré de menos... son mi familia y no hay nada que me importe y quiera más que a ellos. Gracias por acompañarme siempre.

Acabaré mis agradecimientos con Jaime. Gracias por enseñarme lo que es el verdadero amor, la incondicionalidad, la lealtad y honestidad. Muchas gracias por no abandonarme cuando estaba totalmente perdida, por llegar hasta el final costase lo que costase, gracias por quererme como me quieres, por ser el gran responsable

de lo que soy hoy día... Muchas gracias por ser mi compañero, el mejor  
compañero, gracias mi amor. Perdóname. Te amo mi vida.





*A mi padre, por ser el responsable de todo...*

***Trabajo, compasión, humildad,  
paciencia, honestidad y coraje...***



# ÍNDICE

## **Introducción general**

1. Antecedentes
2. Procedimientos de regeneración en endodoncia (Regenerative Endodontic Procedures, REPs)
  - 2.1. Evolución en REPs
  - 2.2. Bases biológicas de la ingeniería de tejidos en endodoncia
  - 2.3. Indicaciones terapéuticas actuales para la realización de los procedimientos REPs
  - 2.4. Protocolos REPs realizados en clínica actualmente
  - 2.5. Retos actuales en REPs
3. Biomateriales diseñados para REPs
4. Referencias

## **Planteamiento del problema, hipótesis y objetivos**

### **Capítulo 1. Síntesis y caracterización de materiales de vidrio bioactivo mesoporoso en el sistema composicional $\text{SiO}_2\text{-CaO-P}_2\text{O}_5\text{-ZnO}$**

1. Introducción
  - 1.1. Métodos de síntesis de materiales de vidrio bioactivo
  - 1.2. Biocompatibilidad, biodegradación y bioactividad de materiales de vidrio bioactivo mesoporoso
2. Procedimiento experimental
  - 2.1. Síntesis de los materiales de vidrio bioactivo mesoporoso MBG y MBG-Zn

- 2.2. Caracterización físico-química de los materiales
3. Resultados
4. Discusión
5. Conclusiones
6. Referencias

## **Capítulo 2. Procesado y caracterización de biomateriales compuestos de colágeno (C) y vidrio bioactivo mesoporoso (MBG): C-MBG y C-MBG-Zn**

1. Introducción
  - 1.1. Biomateriales utilizados en REPs
2. Procedimiento experimental
  - 2.1. Procesado de biomateriales híbridos colágeno-MBG (C-MBG) y colágeno-MBG-Zn (C-MBG-Zn)
  - 2.2. Caracterización físico-química de los biomateriales híbridos C-MBG y C-MBG-Zn
3. Resultados
4. Discusión
5. Conclusiones
6. Referencias

## **Capítulo 3. Evaluación *in vitro* de los biomateriales C-MBG y C-MBG-Zn utilizando células madre de pulpa dental (hDPSCs)**

1. Introducción

## 2. Procedimiento experimental

2.1. Preparación de los medios de cultivo condicionados, análisis de los productos iónicos por espectroscopía de emisión atómica por plasma de acoplamiento inducido y medida de pH

### 2.2. Estudios celulares *in vitro*

2.2.1. Estudio de viabilidad celular *in vitro*

2.2.2. Tinción rojo alizarina

2.2.3. Ensayo de actividad de fosfatasa alcalina

2.2.4. Inmunofluorescencia y microscopía fluorescente

### 2.3. Análisis estadístico

## 3. Resultados

## 4. Discusión

## 5. Conclusiones

## 6. Referencias

# **Capítulo 4. Procesado de nuevas formulaciones de cemento endodóncico bioactivo (BEC) compuestas de MBG-Zn y Agregado Trióxido Mineral (MTA): MTA-MBG-Zn**

## 1. Introducción

## 2. Procedimiento experimental

2.1. Preparación de la formulación MTA-MBG-Zn

2.2. Caracterización físico-química de las formulaciones

2.2.1. Caracterización de las formulaciones en formato de partículas

2.2.2. Proceso de hidratación y caracterización de las formulaciones fraguadas

- 2.3. Ensayo de bioactividad *in vitro* en SBF
- 2.4. Estudio *in vitro* de biocompatibilidad de las formulaciones MTA y MTA-MBG-Zn utilizando células madre pulpares (hDPSCs)
  - 2.4.1. Ensayo de viabilidad celular
  - 2.4.2. Ensayo de actividad de fosfatasa alcalina
- 3. Resultados
  - 3.1. Caracterización físico-química
    - 3.1.1. Caracterización de los materiales en formato de partículas
    - 3.1.2. Proceso de hidratación y caracterización de las formulaciones fraguadas
  - 3.2. Evaluación de la bioactividad *in vitro* en SBF
- 4. Discusión
- 5. Conclusiones
- 6. Referencias

## **CONCLUSIONES GENERALES**

### **ANEXOS**

Anexo 1. Técnicas de caracterización y métodos utilizados

Anexo 2. Abreviaturas y acrónimos



# Introducción general

## 1. Antecedentes

La Endodoncia se define, según la Sociedad Americana de Endodoncia (American Association of Endodontists, AAE)<sup>1</sup>, como la rama de la odontología que trata de la morfología, fisiología y patología de la pulpa dental y los tejidos perirradiculares. Su estudio y práctica engloba las ciencias básicas y clínicas, incluyendo la biología de la pulpa normal y la etiología, diagnóstico, prevención y tratamiento de las patologías y lesiones de la pulpa y alteraciones perirradiculares asociadas (AAE 2019). Dada la fisiología de la pulpa dental, formativa e inductora de los tejidos de la dentina y esmalte, nutritiva y homeostática de las estructuras dentales, así como sensitiva y de defensa frente a la infección, se trata de una especialidad fundamental de la odontología como garante de la salud buco dental.

En los últimos años, la investigación en endodoncia está consiguiendo el desarrollo de tratamientos avanzados en procedimientos de regeneración del complejo dentino-pulpar (Regenerative Endodontic Procedures, REPs) (Shamszadeh et al. 2019). Entre los avances más prometedores, cabe destacar el desarrollo de nuevos biomateriales sintéticos (i.e. matrices de andamiaje tisular y relleno, materiales de obturación y sellado) adaptados para aplicación clínica, que estimulen y

<sup>1</sup> Las siglas empleadas en esta Memoria de Tesis para hacer referencias a distintos términos corresponden a su traducción al inglés, tal y como se va detallando en el texto del trabajo. Se ha decidido así para mantener la nomenclatura conocida en el ámbito científico y con difusión internacional.



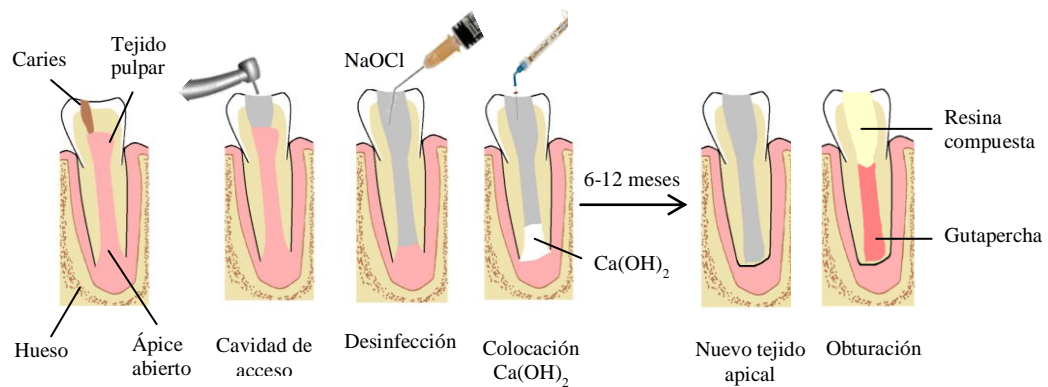
promuevan el proceso de regeneración natural (Baras et al. 2019; Meschi et al. 2019; Nosrat et al. 2019).

A pesar del reconocido éxito clínico de los tratamientos de conductos convencionales, es sabido que los dientes sometidos a este tipo de tratamiento, se vuelven desvitalizados, frágiles y susceptibles a fracturas postoperatorias u otras complicaciones como las reinfecciones (Kim et al. 2010). Estas complicaciones son inevitables debido a la desvitalización provocada durante el tratamiento, dando lugar a la pérdida de la homeostasis y mecanismos de defensa innatos del diente (Fristad et al. 2004; Kim et al. 2010; Landys et al. 2015; He et al. 2017; Prati et al. 2018).

Pero además, complicaciones adicionales se producen cuando la patología pulpar afecta a un diente que se encuentra en etapa de desarrollo radicular incompleto. La pérdida de vitalidad pulpar por infección bacteriana, bien por caries o traumatismos en dientes permanentes jóvenes, provoca la detención de la formación de dentina, interrumpiéndose así el desarrollo radicular, cierre apical y posterior maduración de los dientes. Así, esta situación plantea ciertas dificultades a la hora de realizar un tratamiento clínico de endodoncia convencional (Wigler et al. 2013; Medina y Celiz 2019).

Para hacer frente a las dificultades citadas, se han planteado alternativas de tratamiento como la apicoformación con hidróxido de calcio  $\text{Ca(OH)}_2$  (Frank 1966) o tapón apical de agregado de trióxido mineral (Mineral Trioxide Aggregate, MTA) (Torabinejab y Chivian 1999). A continuación, se describirán ambas técnicas.

La apicoformación se define como el proceso de acondicionamiento tanto en el interior del canal radicular como en los tejidos periradiculares, para favorecer la formación de una barrera de tejidos calcificados (Heithersay 1975). Para ello, es necesario la limpieza y desinfección del conducto, seguido de la colocación de un material adecuado para el ápice (O'Riordan et al. 1980). Diferentes compuestos y materiales han sido utilizados con tal fin, siendo el hidróxido de calcio el que ha presentado mayores tasas de éxito, debido a su acción biológica favorable, mecanismo antibacteriano y bajo coste (Frank 1966; Torneck y Smith 1970; Cvek et al. 1992; Rafter 2005). La apicoformación con  $\text{Ca(OH)}_2$  no sólo induce la curación de la patología apical, sino también el cierre del ápice radicular mediante la formación de un tejido calcificado que actúa como barrera apical, permitiendo así la colocación de un material de obturación en el interior del conducto sin que éste sea extruido al espacio periapical (Figura I.1). Los buenos resultados obtenidos, se han atribuido a su efecto antibacteriano al producir “*in situ*” un aumento del pH hasta valores de 12.5 (Gutmann y Heaton 1981, Granath 1987, Andreasen et al. 2002, Rafter 2005, Trope 2010, Mohammadi y Dummer 2011). El mecanismo de acción por el que el  $\text{Ca(OH)}_2$  favorece la formación de nuevo tejido calcificado no está totalmente claro. Se cree que la elevada alcalinidad producida neutraliza la acidosis provocada por la inflamación, favoreciendo así la mineralización. También se ha relacionado su acción con la gran cantidad de iones calcio liberados, creyéndose por tanto que la conjunción de un pH elevado y una alta concentración de iones de calcio son favorables para la proliferación celular y aposición de tejidos calcificados en el ápice radicular (Chong y Pitt 1992)



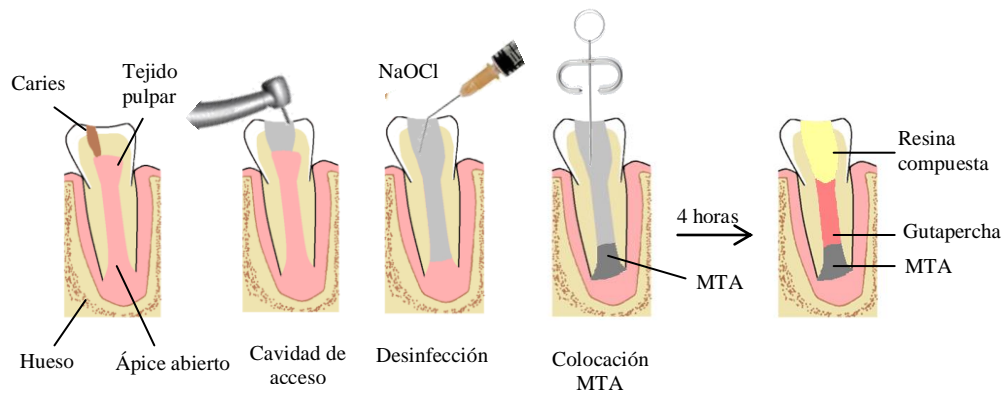
**Figura I.1.** Esquema descriptivo de la técnica de apicoformación con  $\text{Ca(OH)}_2$ .

Sin embargo, esta técnica de apicoformación con  $\text{Ca(OH)}_2$  presenta varios inconvenientes. Andreasen (Andreasen et al. 2002) observó cómo la resistencia a la fractura de la dentina radicular se reducía de forma significativa después de un periodo de exposición al hidróxido entre 6 meses y un año (Doyon et al. 2005). Además, este procedimiento requiere de una excelente colaboración del paciente debido a la necesidad de visitas múltiples programadas durante varios meses (Kleier y Barr 1991; Mohammadi y Dummer 2011).

En la década de los años 90, el agregado de trióxido mineral (MTA), fue propuesto por Torabinejab (Torabinejab y Chivian 1999), como un buen material alternativo para la creación de una barrera apical artificial en dientes con necrosis pulpar y ápices abiertos. Dicha barrera permite la compactación del material de obturación,

finalizando el tratamiento en sólo dos citas (Simon et al. 2007; Witherspoon et al. 2008; Mente et al. 2009). Así, son numerosos los estudios que han indicado que el tratamiento de apicoformación con MTA tiene una alta tasa de éxito con un número muy reducido de citas y tiempo (Rafter 2005; Simon et al. 2007; Mente et al. 2009; Chala et al. 2011; Torabinejab et al. 2018). Además, el MTA presenta buena capacidad de sellado (Torabinejab et al. 1995; Al-Kahtani et al. 2005), biocompatibilidad y bioactividad (Mitchell et al. 1999; Tomson et al. 2007), así como capacidad antibacteriana (Eldeniz et al. 2006) (Figura I.2).

Estudios clínicos comparativos a corto plazo han informado una tasa de éxito para el tratamiento de apicoformación con  $\text{Ca(OH)}_2$  de entre 73 y 100%, y de entre 70 y 100% para MTA con o sin apósito de  $\text{Ca(OH)}_2$  intermedio (El-Meligy y Avery 2006, Pradhan et al. 2006, Damle et al. 2012, Bonte et al. 2015; Kandemir et al. 2019). Sin embargo, a pesar de las buenas tasas de éxito, ambos procedimientos carecen de potencial para restaurar la vitalidad del tejido pulpar dañado, no promoviendo así el desarrollo radicular que ha sido interrumpido, permaneciendo por tanto, las paredes radiculares muy cortas y delgadas, aumentándose la susceptibilidad a la fractura radicular (Cvek et al. 1992, Chala et al. 2011).



**Figura I.2.** Esquema descriptivo de la técnica de apicoformación con MTA.

Es por ello que surge la necesidad de buscar alternativas de tratamiento que solventen las carencias de los tratamientos tradicionales llevados a cabo en este tipo de lesiones, mediante el avance de las terapias regenerativas también en el ámbito de la odontología. Éste es el origen de la aplicación de terapias regenerativas en endodoncia, que actualmente ya ofrecen ventajas biológicas como son, la promoción de la neoformación de tejido duro con el consiguiente desarrollo y maduración del ápice, así como el engrose de las paredes radiculares (Neha et al. 2011).

## **2. Procedimientos de regeneración en endodoncia (Regenerative Endodontic Procedures, REPs)**

Las terapias de regeneración en endodoncia consisten en tratamientos con fundamentos biológicos diseñadas para reparar estructuras dañadas o enfermas, incluyendo dentina o cemento, así como células del complejo dentino-pulpar,

mediante la utilización de tejidos viables, preferentemente del mismo origen, que permitan restaurar las funciones fisiológicas normales del complejo dentino-pulpar” (Wigler et al. 2013).

Entre los autores pioneros que introdujeron el concepto de regeneración para los tejidos dentales, cabe mencionar al Profesor Nygaard-Østby quién, en los años 70, evaluó un método para restablecer la funcionalidad del complejo pulpo-dentinario en un diente permanente inmaduro con necrosis pulpar (Nygaard-Østby y Hjortdal 1971). El procedimiento llevado a cabo consistía en provocar un sangrado en el interior del canal radicular al pasar una lima de endodoncia más allá del ápice, revelando el examen histológico realizado posteriormente, que se formaba tejido conectivo fibroso y cemento en los dientes cuyo diagnóstico previo era de pulpa vital, no ocurriendo en los casos de pulpas necróticas.

## **2.1. Evolución en REPs**

Los primeros avances de regeneración tisular en endodoncia han venido de la mano de la utilización de una serie de procedimientos clínicos encaminados a la revascularización, siendo el resultado muy limitado respecto a la restauración de las estructuras fisiológicas propiamente dichas. El término revascularización fue utilizado por primera vez por Iwaya y colaboradores en 2001 (Iwaya et al. 2001). Iwaya se basó para sus primeros casos en los experimentos de revascularización de reimplantes de dientes inmaduros de perros (Skoglund et al. 1978, Skoglund y Tronstad 1981), a los que añadió la desinfección del conducto radicular con una mezcla de antibióticos de ciprofloxacino y metronidazol (Hoshino et al. 1996, Sato et al. 1996). Este tratamiento dio como resultado la resolución de los signos y síntomas clínicos y promovió el engrosamiento de las paredes del canal radicular y cierre apical de los dientes permanentes inmaduros.

Posteriormente, el protocolo de revascularización fue propuesto por Banchs y Trope (Banchs y Trope 2004). Este protocolo se basa en los experimentos de revascularización (Kling et al. 1986), desinfección del conducto radicular (Hoshino et al. 1996) e inducción de sangrado en el espacio del canal radicular (Nygarrd-OstbyHjortdal1971).

Banchs y Trope añadieron la minociclina a la pasta antibiótica utilizada por Iwaya y cols. (Iwaya et al. 2001), siendo conocida como triple pasta antibiótica (Triple Antibiotic Paste; TAP). Además, como sellado coronal se utilizó el MTA en lugar del ionómero de vidrio. Este protocolo ha sido ampliamente adoptado en muchos estudios posteriores en la literatura, ya que también demostró resolución de síntomas y signos clínicos, además de promover engrosamiento de las paredes del canal y cierre apical de dientes permanentes inmaduros.

Ya en 2007, el concepto de endodoncia regenerativa como terapia capaz de reemplazar de forma predecible estructuras dañadas, enfermas o perdidas, a través de tejidos viables, restaurando las funciones fisiológicas normales del complejo dentino-pulpar, fue adoptado por la AAE (Murray et al. 2007) como terapia alternativa de tratamiento a la tradicional apicoformación con  $\text{Ca(OH)}_2$  o MTA en dientes permanentes inmaduros con pulpas necróticas (Hargreaves et al. 2008).

## **2.2. Bases biológicas de la ingeniería de tejidos en endodoncia**

Desde una perspectiva biológica, el objetivo de la endodoncia regenerativa aplicada en clínica actualmente es el de prevenir (terapia pulpar vital) y/o tratar la periodontitis apical (Hargreaves y Cohen 2011). Los procedimientos actuales de regeneración pulpar están basados en la conservación de las células y moléculas de señalización supervivientes en el complejo dentino-pulpar, mediante el

reclutamiento, multiplicación y diferenciación de las mismas a células formadoras de tejidos que sean capaces de restablecer la función fisiológica perdida (Sonoyama et al. 2008). Aún no es bien conocido qué ocurre a nivel celular tras la aplicación de los diferentes protocolos de tratamiento propuestos, pero se conoce que al igual que en el tratamiento de conductos convencional, es de crucial importancia la reducción de la infección mediante el uso de una combinación de medicamentos (Chen et al. 2012; Fouad 2017).

Las bases biológicas de la ingeniería de tejidos implican el correcto ensamblaje de una triada de elementos, entre los que se encuentran: células madre progenitoras, moléculas señalizadoras y biomateriales (Figura I.3). Esto implica el estudio y comprensión de los distintos eventos biológicos y fisiológicos asociados al proceso de regeneración que orienten la selección adecuada de los elementos implicados (Tatullo et al. 2019).

Distintos tipos de células madre adultas han sido identificados en los tejidos dentales. Entre ellas, las células madre de la pulpa dental (Dental Pulp Stem Cells; DPSCs) han sido las más utilizadas en los estudios por su demostrada capacidad de diferenciación y formación de nuevo tejido pulpar (Bakhtiar et al. 2018)

El reclutamiento de células madre / precursoras, así como su diferenciación a células generadoras de tejido pulpar, requiere la acción de moléculas señalizadoras que, bien pueden ser liberadas por los biomateriales o proceder de la matriz de dentina (Hilkens et al. 2015). Entre estas moléculas, es conocido que el factor de crecimiento de fibroblastos (FGF-2), el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) y el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) promueven la angiogénesis y la regeneración de tejido pulpar (Kim et al. 2010). Tratamiento de células madre mesenquimales (Mesenchymal Stem Cells; MSC) con FGF-2 antes



de su implantación mejora la angiogénesis en construcciones de tejidos a través de VEGF (Gorin et al. 2016). En cuanto a la diferenciación celular, proteínas morfogenéticas óseas BMP-2 y BMP-4 promovieron sinérgicamente la diferenciación de odontoblastos y la formación de dentina (Nakashima 1994; Prescott et al. 2008).

El tercer componente consiste en un biomaterial diseñado específicamente para promover la adhesión, supervivencia, proliferación, migración y / o diferenciación de las células. Sus propiedades se adaptarán en función de la naturaleza del tejido a regenerar (Mele et al. 2016). A diferencia de los tratamientos de revascularización, los tratamientos de regeneración requieren la incorporación de un biomaterial, con o sin células madre precursoras, en el espacio endodónico. En el caso de los tratamientos sin trasplante celular, el biomaterial debe funcionalizarse incorporando moléculas bioactivas que se difundirán a través del canal radicular, para atraer células necesarias para el proceso de regeneración.

Así, aunque ya se han propuesto algunos biomateriales como quitosano, gelatina o colágeno entre otros (Albuquerque et al. 2014; Conde et al. 2015), existe un gran interés en el diseño y desarrollo de materiales avanzados que mimeticen las estructuras naturales de la matriz extracelular.

De acuerdo con los postulados del Prof. Williams, la ingeniería de tejidos es la creación de nuevos tejidos para la reconstrucción terapéutica del cuerpo humano, mediante la estimulación deliberada y controlada de células diana seleccionadas a través de una combinación sistemática de moléculas señalizadoras (Williams 2014). Aunque esto no implica directamente la utilización de biomateriales, es obvio que la vehiculización de estas moléculas hasta la células no tiene lugar en el vacío por lo que debe existir un agente transportador que controle, con una precisión espacio-temporal, los procesos relevantes.

Por tanto, los procedimientos de regeneración, requieren de la utilización de un biomaterial, también denominado matriz de soporte o andamiaje que simule a la matriz extracelular natural (Ducret et al. 2017).

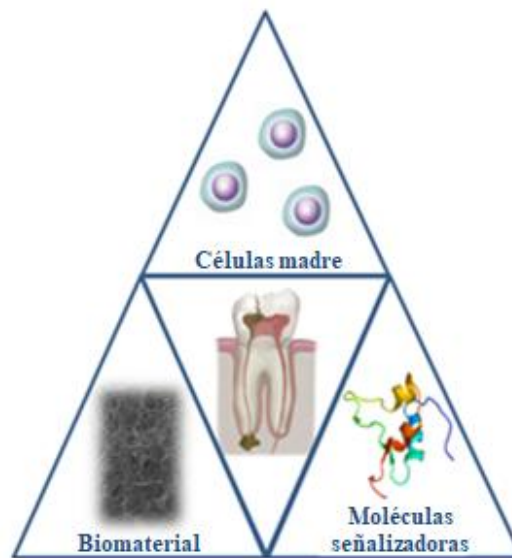


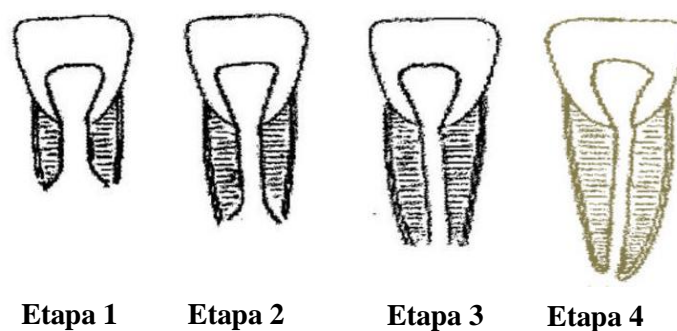
Figura I.3. Representación de la triada de elementos básicos en ingeniería de tejidos.

### **2.3. Indicaciones terapéuticas actuales para la realización de los procedimientos REPs**

Actualmente, las opciones terapéuticas disponibles hacen que no todos los casos clínicos sean candidatos a ser sometidos a tratamientos REPs. De forma similar a cualquier otra intervención de endodoncia convencional, debe realizarse una evaluación y diagnóstico previo del paciente teniendo en cuenta determinados factores como, el estadio de desarrollo radicular, edad del paciente, extensión e

historia de la infección endodónica, así como la restaurabilidad de la corona entre otros (Laureys et al. 2013).

Según la AAE (AAE 2018) serían candidatos adecuados para recibir tratamientos REPs aquellos dientes permanentes que presenten tejido pulpar necrótico y ápice radicular inmaduro, que permita la provocación de sangrado suficiente para llenar el canal radicular. Así, si nos basamos en la clasificación de desarrollo radicular de Cvek (Cvek 1992), estaría indicado realizar el tratamiento REPs (Figura I.4) en la etapa 1 (menos de la mitad de la raíz formada y ápice abierto), etapa 2 (formada la mitad de la raíz y ápice abierto) y etapa 3 (2/3 de la raíz formada y ápice abierto).



**Figura I.4.** Clasificación de desarrollo radicular de Cvek (Cvek 1992), (Figura modificada de Cvek 1992).

Sin embargo, cuando el diente se encuentra en la última etapa de desarrollo radicular de Cvek (Etapa 4; raíz casi completa con el ápice abierto), debe ser valorada la posibilidad de tratamiento con tapón apical de MTA, opción de tratamiento que estaría indicada en los casos que sea necesario la colocación de aditamentos como postes que aseguren la reconstrucción coronal (Kim et al. 2018).

Por tanto, un reto importante al que se enfrenta la práctica clínica en endodoncia regenerativa, es mejorar los tratamientos REPs para que puedan ser aplicados a un mayor número de pacientes, al incluir casos con dimensiones apicales más pequeñas, es decir, ápice apical maduro o dientes multirradiculares que presentan mayor complejidad anatómica y de desinfección (Ove 2014; He et al. 2017). En definitiva, aunque la principal y única indicación actual para este tipo de tratamientos sea dientes con necrosis pulpar en ápices inmaduros, la investigación está avanzando para conseguir un pronóstico predecible en ápices maduros, con el fin de devolver la funcionalidad perdida a un diente que ha sufrido necrosis pulpar (Kandemir et al. 2019).

#### **2.4. Protocolos REPs realizados en clínica actualmente**

Actualmente, no hay pautas basadas en la evidencia para respaldar un protocolo que proporcione un pronóstico favorable y predecible en el tratamiento de este tipo de casos (Wigler et al. 2013). Por lo tanto, las técnicas en regeneración pulpar son aplicaciones diversas de un procedimiento común que se inicia en una primera sesión de tratamiento de desinfección con el objetivo de controlar y disminuir lo máximo posible la carga bacteriana (Fouad 2017).

En la segunda sesión clínica (entre 2 y 4 semanas después) (Banchs y Trope 2004; Iwaya et al. 2001; Thibodeau y Trope 2007; Chen et al. 2012) y siempre y cuando hayan desaparecido tanto signos como síntomas de periodontitis apical (Huang 2008), se procede a la eliminación de la medicación intraconducto mediante irrigación suave con hipoclorito de sodio, NaOCl, e irrigación final con ácido etilendiaminotetraacético, EDTA (Ethylenediaminetetraacetic Acid; EDTA) antes

de la provocación del sangrado (Vishwanat et al. 2017). El siguiente paso es el de irritación y provocación de sangrado que inunde el canal radicular (Miller et al.

2012) y formación de coágulo sanguíneo (Jung et al. 2008; Reynolds et al. 2009) que actúe como estructura de soporte para las células y la formación de nuevo tejido (Nosrat et al. 2011). Una vez estabilizado el coágulo de sangre, se coloca en la parte superior una pieza de biomaterial de colágeno (Petrino et al. 2010; Jeeruphan et al. 2012; Nagata et al. 2014) para servir como matriz de soporte para la colocación de aproximadamente 3 mm de material MTA como material de sellado (Torabinejad y Parirokh 2010; Chen et al. 2012).

Aunque se ha descrito el procedimiento general, la Tabla I.1 detalla cómo en la práctica existe una gran variabilidad a la hora de elegir la concentración, fármacos o soluciones desinfectantes, provocación o no de sangrado, etc. Esto hace muy complicado el relacionar y comparar los resultados obtenidos. Además, como se apuntó al principio del apartado, no sólo el protocolo a seguir debe ser tenido en cuenta, sino que también es necesario la evaluación de otros factores como la severidad y duración de la infección, edad del paciente o etapa de desarrollo de la raíz (Saoud et al. 2014, Lin y Kahler 2017).

**Tabla I.1.** Procedimientos, compuestos, medicamentos y materiales utilizados en los tratamientos REPs en clínica actualmente

<b>Instrumentación</b>	<b>Irrigación [%]</b>	<b>Medicación intracanal</b>	<b>Irrigación final [%]</b>	<b>Provocación de sangrado</b>	<b>Aplicación PRP/PRF</b>	<b>Esponja de colágeno</b>	<b>Material sellado coronal</b>
No	NaOCl [1%, 1.25%, 2.5%, 3%, 5%, 5.25%, 6%]	Antibióticos (DAP/TAP)	NaOCl [1%, 1.25%, 2.5%, 3%, 5%, 5.25%, 6%]	Si	Si	Si	MTA
Mínima	CHX [0.12%, 0.2%, 2%]	Ca(OH) <sub>2</sub>	CHX [2%]	No	No	No	Ionómero de vidrio
Completa	EDTA [17%]  H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> [3%]	Formocresol	EDTA [17%]  Solución salina				Ca(OH) <sub>2</sub>

CHX: Chlorhexidine

DAP: Double Antibiotic Paste (metronidazon y ciprofloxacino)

TAP: Triple Antibiotic Paste (metronidazaol, ciprofloxacino y minociclina)

## **2.5. Retos actuales en REPs**

La AAE (AAE 2018), recoge que el éxito de un tratamiento REPs se mide en función de la consecución de tres objetivos. El primer y principal objetivo, es eliminar los signos y síntomas de infección, así como evidenciar la curación de la patología periapical. Los autores, Tong (Tong et al. 2017) y Torabinejad (Torabinejad et al. 2017) en sendas revisiones sistemáticas indican que dicho objetivo de curación periapical se logra para un 91-94% de los casos con el control de la infección sin que encuentren especialmente crítico el protocolo de desinfección utilizado.

El segundo objetivo, al cual se considera deseable pero no esencial, es que se produzca un aumento del grosor y longitud de la pared dentinaria de la raíz. La mayoría de los estudios (Kim et al. 2018) coinciden en que los procedimientos de revascularización presentan potencial para promover el engrosamiento de las paredes del canal y/o desarrollo continuo de raíces inmaduras de dientes permanentes, aunque estas observaciones no siempre son predecibles (Silujjai y Linsuwanont 2017).

El tercer y último objetivo, es conseguir una respuesta positiva a las pruebas de sensibilidad pulpar. La naturaleza de los tejidos formados en el espacio intraconducto no es fácil de dilucidar ya que sólo puede conocerse mediante estudios histológicos (Jung et al. 2008; Wang et al. 2010; Martin et al. 2014). Observaciones histológicas en estudios en modelos animales, muestran que las paredes dentinarias se cubrieron con una capa de cemento, neo-ligamento y una estructura de osteoide tras tratamientos de revascularización (Wang et al. 2010; Nosrat et al. 2011).

De lo anterior, se puede concluir que el primer y segundo objetivo pueden ser alcanzados con la aplicación de los protocolos REPs actuales, sin embargo, la regeneración propiamente dicha correspondiente a un tejido pulpo-dentinario plenamente estructurado y funcional aún no se ha conseguido tras aplicación de los citados protocolos (El-Ashiry et al. 2018).

Por tanto, esto sugiere que los procedimientos REPs utilizados no son plenamente satisfactorios, reclamando la investigación nuevos desarrollos en ingeniería de tejidos considerando los tres pilares fundamentales en los que se basa: el estudio del aislamiento y potencial de células progenitoras tanto exógenas como endógenas (Egusa et al. 2012), la comprensión y actuación de los distintos factores de crecimiento y biomoléculas responsables de una adecuada señalización (Kuashik et al. 2016; Marí-Beffa et al. 2017), y el desarrollo de biomateriales que estimulen la formación del microambiente (nicho) adecuado para asistir el proceso de regeneración (Gupta y Kumar 2008; Piva et al. 2014; Schmalz et al. 2016).

Este trabajo de Tesis se centra en el tercer pilar mencionado, el desarrollo de un biomaterial biomimético, es decir, específico para el tejido a tratar como plantilla temporal a modo de matriz extracelular artificial, para asistir el proceso de regeneración del complejo dentino-pulpar.

### **3. Biomateriales diseñados para REPs**

Como se ha indicado, el biomaterial es un elemento esencial para que se produzca regeneración tisular, al actuar como una plantilla temporal simulando a la matriz extracelular del tejido a regenerar.



Estudios para aplicaciones en endodoncia regenerativa, han ensayado la utilización de varios tipos de biomateriales como: i) el plasma rico en plaquetas (Platelet-Rich Plasma; PRP) (Bezgin et al. 2015; Kawase 2015), fibrina rica en plaquetas (Platelet-Rich Fibrin; PRF) (Hiremath et al. 2012; Chen et al. 2015; Torabinejab et al. 2015); ii) biopolímeros naturales como el colágeno (Nevins et al. 2015; Kontakiotis et al. 2015), ácido hialurónico (Ferroni et al. 2015), quitosano (Shresthe et al. 2014), hidrogeles peptídicos (Piva et al. 2014); iii) polímeros sintéticos tales como ácido poliláctico (Polylactic Acid; PLA) (Ling et al. 2015) y ácido poliláctico-co-glicólico (Poly Lactic-co-Glycolic Acid; PLGA) (Zhou et al. 2014; Chen et al. 2015) y iv) biocerámicos como hidroxiapatito de calcio (Yang et al. 2013; Ling et al. 2015; Nevins et al. 2015), fosfato tricálcico (Zheng et al. 2011; Varalakshmi et al. 2013), vidrios bioactivos (Zhang et al. 2015) y varias composiciones de agregado de trióxido mineral (Kontakiotis et al. 2015; Lee et al. 2015). Actualmente, la aplicación de estos biomateriales se encuentra en estudio, no pudiendo confirmar con la escasa evidencia disponible que algunas de las combinaciones utilizadas hasta el momento en distintos modelos animales sea capaz de regenerar un tejido pulpo-dentinario bien estructurado y plenamente funcional. La cantidad y la calidad del tejido tipo pulpa recién formado depende de varios factores, como el tipo de biomaterial y su lugar de implantación o el modelo animal utilizado (Fukushima et al. 2019).

Por ello, y con el objetivo de avanzar, la tendencia de las últimas investigaciones están dirigidas a la hipótesis de que si la composición del complejo dentino-pulpar está constituida mayoritariamente por hidroxiapatito de calcio y colágeno (dentina) y fibras de colágeno (pulpa), lo ideal sería el diseño y fabricación de configuraciones de biomateriales avanzados que integren estos componentes.

El colágeno tipo I es el principal componente de la matriz extracelular (Extracellular Matrix; ECM) orgánica de la dentina (Feng et al. 2003; Prescott et

al. 2008) y proporciona una microestructura fibrilar que permite el anclaje y migración de las células madre, así como su posterior proliferación y la diferenciación a odontoblastos (Fukushima et al. 2019). Además, el colágeno tiene alta afinidad por las moléculas de agua y presenta por tanto propiedades hemostáticas, baja respuesta inflamatoria (inmunogénica) del huésped y ausencia de toxicidad (Ramshaw 2016), por lo que resulta un material muy indicado para su utilización, por ello que se trate del material más utilizado en las investigaciones sobre REPs (Fukushima et al. 2019). Por su parte, el componente inorgánico de la dentina, el hidroxiapatito de calcio presenta alternativas muy interesantes como los vidrios bioactivos (Bioactive Glass, BG) (Hench y Jones 2015) que exhiben propiedades únicas para esta aplicación, ya que muestran capacidad de unirse a los tejido blando y a tejido duro mediante la formación de una capa de hidroxiapatita carbonatada (HAC) cuando entran en contacto con fluido fisiológico (Kokubo y Takadama 2006).

Como versión avanzada de los BG, los materiales mesoporosos basados en sílice como los vidrios bioactivos mesoporosos (Mesoporous Bioactive Glass; MBG) son sólidos nanoporosos ordenados con un volumen de poro y área de superficie muy altos que han surgido como materiales prometedores para su uso en la liberación de fármacos, regeneración ósea y nanomedicina (Fernandes et al. 2018). Además, se están investigando nuevos enfoques para mejorar la bioactividad de los biomateriales introduciendo en su composición iones con propiedades terapéuticas. A este respecto, el elemento de Zinc (Zn) se ha propuesto como muy interesante para asistir en el proceso de regeneración, ya que puede actuar como un inhibidor de las metaloproteinasas de la matriz (matrix metalloproteinases; MMP) (Toledano et al. 2012). Además, también se ha descrito que este elemento puede influir en las vías de señalización y producir una estimulación metabólica promotora de los procesos de remineralización (Toledano et al. 2013). Se ha demostrado que el Zn

inhibe la desmineralización de la dentina y de alguna manera facilita la remineralización del esmalte.

Además, se conoce que muchos de los elementos que son liberados por estos materiales durante su degradación en el lugar de implantación (silicio, calcio, sodio, fósforo, magnesio, cobre, zinc) participan en las vías de señalización e interacciones intracelulares (O'Conner et al 2001; Hoppe et al. 2011). En particular, se ha demostrado que el Zn afecta a la bioactividad, biocompatibilidad y propiedades antimicrobianas cuando se incorporan a la estructura de varios vidrios (Goel et al. 2013; Liu et al. 2014; Bakopoulou et al. 2016).

A pesar de las propiedades mencionadas, un reto importante en el desarrollo de los MBG es su procesado en estructuras funcionales adecuadas para asistir y guiar la formación de nuevo tejido tridimensional (3D), así como facilitar la vascularización. Además, en el caso de la regeneración pulpar, el biomaterial debe tener una geometría y requerimientos mecánicos específicos para su manipulación e implantación dentro de la cavidad pulpar.

Por lo tanto, la fabricación de biomateriales híbridos formados por colágeno y MBG con estructura porosa interconectada que actúen como plantilla temporal tridimensional capaces de liberar iones Zn con propiedades señalizadoras para las células progenitoras, se postulan altamente interesantes para mejorar los resultados en REPs actuales. Así, podrían diseñarse para utilizarse de la misma forma que los rellenos dentales, colocados en contacto con la pulpa para estimular la población de células madre nativas.

Por otra parte, el uso de materiales del tipo cementos endodónticos bioactivos (Bioactive Endodontic Cements; BECs) en los REPs es determinante para

proporcionar un sellado coronal que separe el tratamiento realizado intraconducto de la reconstrucción coronal (Torabinejad et al. 2018). Estos materiales, presentan el potencial de interactuar con las células madre y los biomateriales utilizados en REPs debido a su capacidad conductiva (Torabinejad y Parirokh 2010, Kontakiotis et al. 2015). Por todo ello también han sido estudiados en la presente Tesis Doctoral. Así, los estudios realizados han demostrado la bioactividad de los BECs (Jiménez et al. 2018) y la conductividad del tejido duro (Parirokh et al. 2011); sin embargo, hay pocas investigaciones basadas en evidencia sobre la efectividad de las barreras coronales en REPs utilizando estos materiales.

El agregado de trióxido mineral (MTA) ha sido el material más popular para el sellado coronal en los procesos de REPs debido a su biocompatibilidad, capacidad de sellado y adaptación marginal; de hecho, más del 85% de los estudios han usado MTA para este propósito (Torabinejad et al. 2018). No hay estudios de resultados a largo plazo de procedimientos REPs en humanos. De los estudios disponibles, la mayoría ha utilizado como se ha comentado anteriormente el MTA como material para el sellado coronal, siendo por ello el material de elección debido a su mayor evidencia científica en comparación con otros materiales BECs (Wigler et al. 2013, Kontakiotis et al. 2015).

Los resultados clínicos en REPs podrían mejorar y ser más predecibles si se consigue reconstruir el microambiente favorable para las células que intervienen en el proceso de regeneración. Este objetivo, se conseguirá con protocolos estandarizados y el uso de materiales que estimulen la actividad de las células supervivientes a través de la liberación tanto de factores intrínsecos de la dentina como de la liberación controlada por los biomateriales utilizados en cada caso.

#### 4. Referencias

Andreasen JO, Farik B, Munksgaard EC. Long-term calcium hydroxide as a root canal dressing may increase risk of root fracture. *Dent Traumatol* 2002;18:134-7.

Albuquerque MTP, Valera MC, Nakashima M, Nor JE, Bottino MC. Tissue-engineering-based strategies for regenerative endodontics, *J Dent Res* 2014;93:1222-31.

Al-Kahtani A, Shostad S, Schifferle R, Bhambhani S. In-vitro evaluation of microleakage of an orthograde apical plug of mineral trioxide aggregate in permanent teeth with simulated immature apices. *J Endod* 2005 ;31:117-9.

American Association of Endodontists (AAE) (2019) Glossary endodontic terms. Revised 2019. <https://www.aae.org/specialty/clinical-resources/glossary-endodontic-terms/> GlossaryOfEndodonticTerms.pdf.

American Association of Endodontists (AAE) (2018) Glossary endodontic terms. Revised 2018. [https://www.aae.org/specialty/clinical-resources/glossary-endodontic-terms/specialty/wpcontent/uploads/sites/2/2018/06/ConsiderationsForRegEndo\\_AsOfApril2018.pdf](https://www.aae.org/specialty/clinical-resources/glossary-endodontic-terms/specialty/wpcontent/uploads/sites/2/2018/06/ConsiderationsForRegEndo_AsOfApril2018.pdf).

Bakhtiar H, Mazidi SA, Mohammadi AslS, Ellini MR, Moshiri A, Nekoofar MH, Dummer PMH. The role of stem cell therapy in regeneration of dentine-pulp complex: a systematic review. *Prog Biomater* 2018;7:249-68.

Bakopoulou A, Papachristou E, Bousnakia M, Hadjichristou C, Kontonasakia E, Theocharidou A, Papadopoulou L, Kantiranis N, Zachariadis G, Leyhausen G, Geurtsen W, Koidisa P. Human treated dentin matrices combined with Zn-doped, Mg-based bioceramic scaffolds and human dental pulp stem cells towards targeted dentin regeneration. *Dent Mater* 2016;32:e159-75.

Banchs F, Trope M. Revascularization of immature permanent teeth with apical periodontitis: New treatment protocol? *J Endod* 2004;30:196-200.

Baras BH, Sun J, Melo MAS, Tay FR, Oates TW, Zhang K, Weir MD, Xu HHK. Novel root canal sealer with dimethylaminohexadecyl methacrylate, nano-silver and nano-calcium phosphate to kill bacteria inside root dentin and increase dentin hardness. *Dent Mater* 2019; S0109-5641:30690-6.

Bezgin T, Yilmaz AD, Celik BN, et al. Efficacy of platelet-rich plasma as a scaffold in regenerative endodontic treatment. *J Endod* 2015;41:36-44.

Bonte E, Beslot A, Baukpepsi T, Lasfarques J-J. MTA versus  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  in apexification of non-vital immature permanent teeth: a randomized clinical trial comparison. *Clinic Oral Invest* 2015;19:1381-8.

Chala S, Abouqal R, Rida S. Apexification of immature teeth with calcium hydroxide or mineral trioxide aggregate: systematic review and meta-analysis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2011;112:e36-42.

Chen G, Chen J, Yang B, et al. Combination of aligned PLGA/Gelatin electrospun sheets, native dental pulp extracellular matrix and treated dentin matrix as substrates for tooth root regeneration. *Biomaterials* 2015;52:56–70.

Chen MY, Chen KL, Chen CA, et al. Responses of immature permanent teeth with infected necrotic pulp tissue and apical periodontitis/abscess to revascularization procedures. *Int Endod J* 2012;45:294-05.

Chen YJ, Zhao YH, Zhao YJ, et al. Potential dental pulp revascularization and odonto-/osteogenic capacity of a novel transplant combined with dental pulp stem cells and platelet-rich fibrin. *Cell Tissue Res* 2015;361:439–55.

Chong BS, Pitt Ford TR. The role of intracanal medication in root canal treatment. *Int Endod J* 1992;25:97-106.

Conde MCM, Chisini LA, Demarco FF, Nör JE, Casagrande L, Tarquinio SBC. Stem cell-based pulp tissue engineering: Variables enrolled in translation from the bench to the bedside, a systematic review of literature, *Int Endod J* 2015;49:543-50.

Cvek M. Prognosis of luxated non-vital maxillary incisors treated with calcium hydroxide and filled with gutta-percha: a retrospective clinical study. *Endod Dent Traumatol* 1992;8:45-55.

Damle SG, Bhattal H, Loomba A. Apexification of anterior teeth: a comparative evaluation of mineral trioxide aggregate and calcium hydroxide paste. *J Clin Pediatr Dent.* 2012;36:263-8.

Doyon GE, Dumsha T, Fraunhofer JA. Fracture resistance of human root dentin exposed to intracanal calcium hydroxide. *J Endod* 2005;31:895-7.

Ducret M, Fabre H, Celle A, Mallein-Gerin F, Perrier-Groult E, Alliot-Licht B, Farges JC. Current challenges in human tooth revitalization. *Biomed Mater Eng* 2017;28:S159-S168.

Egusa H, Sonoyama W, Nishimura M, Atsuta I, Akiyama K. Stem cells in dentistry--Part II: Clinical applications. *J Prosthodont Res* 2012;56:229-48.

El Ashiry EA, Alamoudi NM, El Ashiry MK, Bastawy HA, El Derwi DA, Atta HM. Tissue Engineering of Necrotic Dental Pulp of Immature Teeth with Apical Periodontitis in Dogs: Radiographic and Histological Evaluation. *J Clin Pediatr Dent* 2018;42:373-82.

Eldeniz AU, Hadimli HH, Ataoglu H, Orstavik D. Antibacterial effect of selected root-end filling materials. *J Endod* 2006;32:345-9.

El-Meligly OA, Avery DR. Comparison of apexification with mineral trioxide aggregate and calcium hydroxide. *Pediatr Dent* 2006;28:248-53.

Feng Z, Yamato M, Akutsu T, Nakamura T, Okano T, Umezu M. Investigation on the mechanical properties of contracted collagen gels as a scaffold for tissue engineering. *Artificial Organs* 2003;27:84-91.

Fernandes HR, Gaddam A, Rebelo A, Brazete D, Stan GE, Ferreira JMF. Bioactive Glasses and Glass-Ceramics for Healthcare Applications in Bone Regeneration and Tissue Engineering. *Materials (Basel)* 2018;12:11.

Ferroni L, Gardin C, Sivoletta S, et al. A hyaluronan-based scaffold for the in vitro construction of dental pulp-like tissue. *Int J Mol Sci* 2015;16:4666-81.

Fouad AF. Microbial Factors and Antimicrobial Strategies in Dental Pulp Regeneration. *J Endod* 2017;43:S46-S50.

Frank AL. Therapy for the divergent pulpless tooth by continued apical formation. *J Am Dent Assoc* 1966;72:87-93.

Fristad I, Molven O, Halse A. Nonsurgically retreated root filled teeth- Radiographic findings after 20-27 years. *Inter Endod J* 2004;37:12-8.



Fukushima KA, Marques MM, Tedesco TK, Carvalho GL, Gonçalves F, Caballero-Flores H, Morimoto S, Moreira MS. Screening of hydrogel-based scaffolds for dental pulp regeneration-A systematic review. *Arch Oral Biol* 2019 ;98:182-94.

Goel A, Kapoor S, Tilocca A, Rajagopal RR, Ferreira JMF. Structural role of zinc in biodegradation of alkali-free bioactive glasses. *J Mater Chem B* 2013;1:3073-82.

Gorin C, Rochefort GY, Bascetin R, Ying H, Lesieur J, Sadoine J et al. Priming dental pulp stem cells with fibroblast growth factor-2 increases angiogenesis of implanted tissue-engineered constructs through hepatocyte growth factor and vascular endothelial growth factor secretion. *Stem Cells Transl Med* 2016;5:392-403.

Granath L. Hard tissue barrier formation in pulpotomised monkey teeth capped with cyanoacrylate or calcium hydroxide for 10 and 60 minutes. *J Dent Res* 1987;66:1166-74.

Gupta R, Kumar A. Bioactive Materials for Biomedical Applications Using Sol-Gel Technology. *Biomed Mater* 2008;3:34005-20.

Gutmann JL, Heaton JF. Management of the open (immature) apex. 2. Non-vital teeth. *Int Endod J* 1981;14:173-8.

Hargreaves KM, Giesler T, Henry M, Wang Y. Regeneration potential of the young permanent tooth: what does the future hold? *J Endod* 2008;34:S51-6.

Hargreaves KM, Cohen S. *Vías de la pulpa*. 2011. 10ª edición. Editos: Louis H Berman Capítulo 12;452. Elsevier, 2011.

He L, Kim SG, Gong Q, Zhong J, Wang S, Zhou X, Ye L, Ling J, Mao JJ. Regenerative Endodontics for Adult Patients. *J Endod* 2017;43:S57-S64.

Heithersay GS. Calcium hydroxide in the treatment of pulpless teeth with associated pathology. *J Br Endod Soc* 1975;8:74-93.

Hench LL, Jones JR. Bioactive Glasses: Frontiers and Challenges. *Front Bioeng Biotechnol* 2015;3:194.

Hilkens P, Meschi N, Lambrechts P, Bronckaers A, Lambrichts I. Dental stem cells in pulp regeneration: Near future or long road ahead?. *Stem Cells Dev* 2015;24:1610-22.

Hiremath H, Saikalyan S, Kulkarni SS, Hiremath V. Second-generation platelet concentrate (PRF) as a pulpotomy medicament in a permanent molar with pulpitis: a case report. *Int Endod J* 2012;45:105–12.

Hoppe A, Güldal NS, Boccaccini AR. A review of the biological response to ionic dissolution products from bioactive glasses and glass-ceramic. *Biomaterials* 2011;32:2757-74.

Hoshino E, Kurihara-Ando N, Sato I et al. In-vitro antibacterial susceptibility of bacteria taken from infected root dentine to a mixture of ciprofloxacin, metronidazole and minocycline. *Int Endod J* 1996;29:125-30.

Huang GT. A paradigm shift in endodontic management of immature teeth: conservation of stem cells for regeneration. *J Dent* 2008;36:379-86.

Iwaya SI, Ikawa M, Kubota M. Revascularization of an immature permanent tooth with apical periodontitis and sinus tract. *Dent Traumatol* 2001;17:185-187.

Jeeruphan T, Jantararat J, Yanpiset K, et al. Mahidol study 1: comparison of radiographic and survival outcomes of immature teeth treated with either regenerative endodontic or apexification methods: a retrospective study. *J Endod* 2012;38:1330-6.

Jiménez-Sánchez MDC, Segura-Egea JJ, Díaz-Cuenca A. Higher hydration performance and bioactive response of the new endodontic bioactive cement MTA HP repair compared with ProRoot MTA white and NeoMTA plus. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 2019;107:2109-20.

Jung IY, Lee SJ, Hargreaves KM. Biologically based treatment of immature permanent teeth with pulpal necrosis: A case series. *J Endod* 2008;34:876-87.

Kandemir Demirci G, Kaval ME, Güneri P, Çalışkan MK. Treatment of immature teeth with nonvital pulps in adults : A prospective comparative clinical study comparing MTA with Ca(OH)<sub>2</sub>. *Int Endod J* 2019;9.

Kaushik SN, Kim B, Walma AM, Choi SC, Wu H, Mao JJ, Jun HW, Cheon K. Biomimetic microenvironments for regenerative endodontics. *Biomater Res* 2016;20:14.

Kawase T. Platelet-rich plasma and its derivatives as promising bioactive materials for regenerative medicine: basic principles and concepts underlying recent advances. *Odontology* 2015;103:126-35.

Kim JY, Xin X, Moioli EK, Chung J, Lee CH, Chen M, Mao, JJ. Regeneration of dental-pulp-like tissue by chemotaxis-induced cell homing. *Tissue Eng Part A* 2010;16:3023-31.

Kim SG, Malek M, Sigurdsson A, Lin LM, Kahler B. Regenerative endodontics: a comprehensive review. *Int Endod J* 2018;51:1367-88.

Kleier DJ, Barr ES. A study of endodontically apexified teeth. *Endod Dent Traumatol* 1991;7:112-7.

Kling M, Cvek M, Mejare I. Rate and predictability of pulp revascularization in therapeutically reimplanted permanent incisors. *Endod Dent Traumatol.* 1986;2:83-9.

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

Kontakiotis EG, Filippatos CG, Tzanetakakis GN, Agrafioti A. Regenerative endodontic therapy: A data analysis of clinical protocols. *J Endod* 2015;41:146-154.

Landys Boren D, Jonasson P, Kvist T. Long-term survival of endodontically treated teeth at a public dental specialist clinic. *J Endod* 2015;41:176-81.

Laureys WG, Cuvelier CA, Dermaut LR, De Pauw GA. The critical apical diameter to obtain regeneration of the pulp tissue after tooth transplantation, replantation, or regenerative endodontic treatment. *J Endod* 2013;39:759-63.

Lee JT, Choi SY, Kim HL, et al. Comparison of gene expression between mandibular and iliac bone-derived cells. *Clin Oral Investig* 2015;19:1223–33.

Lin LM, Kahler B. A review of regenerative endodontics: current protocols and future directions. *J Istanbul Univ Fac Dent* 2017;51:S41-S51.

Ling LE, Feng L, Liu HC, et al. The effect of calcium phosphate composite scaffolds on the osteogenic differentiation of rabbit dental pulp stem cells. *J Biomed Mater Res A* 2015;103:1732–45.

Liu L, Pushalkar S, Saxena D, LeGeros RZ, Zhang Y. Antibacterial property expressed by a novel calcium phosphate glass. *J Biomed Mater Res B: Appl Biomater* 2014;102:423-9.

Marí-Beffa M, Segura-Egea JJ, Díaz-Cuenca A. Regenerative Endodontic Procedures: A Perspective from Stem Cell Niche Biology. *J Endod* 2017;43:52-62.

Martin DE, De Almeida JF, Henry MA, et al. Concentration-dependent effect of sodium hypochlorite on stem cells of apical papilla survival and differentiation. *J Endod* 2014;40:51-5.

Medina-Fernández I, Celiz AD. Acellular biomaterial strategies for endodontic regeneration. *Biomater Sci* 2019;7:506-19.

Mele L, Vitiello PP, Tirino V, Paino F, De Rosa A, Liccardo D et al. Changing paradigms in cranio-facial regeneration: Current and new strategies for the activation of endogenous stem cells, *Front Physiol* 2016; 7: 62.

Mente J, Hage N, Pfefferle T, Koch MJ, Dreyhayupt J, Staehle HJ, et al. Mineral Trioxide Aggregate apical plugs in teeth With open apical foramina: A retrospective analysis of treatment outcome. *J Endod* 2009;35:1354-8.

Meschi N, Li X, Van Gorp G, Camilleri J, Van Meerbeek B, Lambrechts P. Bioactivity potential of Portland cement in regenerative endodontic procedures: From clinic to lab. *Dent Mater* 2019;35:1342-50.

Miller EK, Lee JY, Tawil PZ, et al. Emerging therapies for the management of traumatized immature permanent incisors. *Pediatr Dent* 2012;34:66-9.

Mitchell PJ, Pitt Ford TR, Torabinejad M, McDonald F. Osteoblast biocompatibility of mineral trioxide aggregate. *Biomaterials* 1999;20:167-73.

Mohammadi Z, Dummer P. Properties and applications of calcium hydroxide in endodontics and dental traumatology. *Inter Endod J* 2011;44:697-730.

Murray PE, Garcia-Godoy F, Hargreaves KM. Regenerative endodontics: a review of current status and a call for action. *J Endod* 2007;33:377-90.

Nagata JY, Gomes BP, Rocha Lima TF, et al. Traumatized immature teeth treated with 2 protocols of pulp revascularization. *J Endod* 2014;40:606-12.

Nakashima M. Induction of dentin formation on canine amputated pulp by recombinant human bone morphogenetic proteins (BMP)-2 and -4, *J. Dent Res* 1994;73:1515-22.

Neha K, Kansal R, Garg P, et al. Management of immature teeth by dentin-pulp regeneration: a recent approach. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 2011;16:e997-1004.

Nevins AJ, Cymerman JJ. Revitalization of open apex teeth with apical periodontitis using a collagen-hydroxyapatite scaffold. *J Endod* 2015;41:966-73.

Nosrat A, Seifi A, Asgary S. Regenerative endodontic treatment (revascularization) for necrotic immature permanent molars: A review and report of two cases with a new biomaterial. *J Endod* 2011;37:562-7.

Nosrat A, Kollahdouzan A, Khatibi AH, Verma P, Jamshidi D, Nevins AJ, Torabinejad M. Clinical, Radiographic, and Histologic Outcome of Regenerative Endodontic Treatment in Human Teeth Using a Novel Collagen-hydroxyapatite Scaffold. *J Endod* 2019;45:136-43.

Nygaard-Ostby B, Hjortdal O. Tissue formation in the root canal following pulp removal. *Scand J Dent Res* 1971;79:333-49.

O'Conner SM, Stenger D, Shaffer K, Ma W. Survival and neurite outgrowth of rat cortical neurons in three dimensional agarose and collagen gel matrices. *Nuerosci Lett* 2001;2001:189-93.

O'Riordan M. Apexification of deciduous incisor. *J Endod* 1980;6:607-9.

Ove A. Translational Opportunities in Stem Cell-based Endodontic Therapy: Where Are We and What Are We Missing?. *J Endod* 2014;40:S82-S85.

Parirokh M, Asgary S, Eghbal MJ, Kakoei S, Samiee M. A comparative study of using a combination of calcium chloride and mineral trioxide aggregate as the pulp-capping agent on dogs' teeth. *J Endod* 2011;37:786-8.

Petrino JA, Boda KK, Shambarger S, Bowles WR, McClanahan SB. Challenges in regenerative endodontics: A case series. *J Endod* 2010;36:536-41.

Piva E, Silva A and Jacques E. Functionalized Scaffolds to Control Dental Pulp Stem Cell Fate. *J Endod* 2014;40:S33-S40.

Pradhan DP, Chawla HS, Gauba K, Goyal A. Comparative evaluation of endodontic management of teeth with unformed apices with mineral trioxide aggregate and calcium hydroxide. *J Dent Child (Chic)* 2006;73:79-85.

Prati C, Pirani C, Zamparini F, Gatto MR, Gandolfi MG. A 20-year historical prospective cohort study of root canal treatments. A multilevel analysis. *Inter Endod J* 2018; 51:955-68.

Prescott RS, Alsanea R, Fayad MI, et al. In vivo generation of dental pulp-like tissue by using dental pulp stem cells, a collagen scaffold, and dentin matrix protein 1 after subcutaneous transplantation in mice. *J Endod* 2008;34:421-26.

Rafter M. Apexification: a review. *Dent Traumatol* 2005;21:1-8.

Ramshaw, J. A. M. Biomedical Applications of Collagens. *J Biomed Mater Res - Part B Appl. Biomater* 2016;104: 665-75.

Reynolds K, Johnson JD, Cohenca N. Pulp revascularization of necrotic bilateral bicuspid using a modified novel technique to eliminate potential coronal discoloration: A case report. *Int Endod J* 2009;42:84-92.

Saoud TM, Sigurdsson A, Rosenberg PA, et al. Treatment of a large cystlike inflammatory periapical lesion associated with mature necrotic teeth using regenerative endodontic therapy. *J Endod* 2014;40:2081-6.

Sato I, Ando-Kurihara N, Kota K, et al. Sterilization of infected root-canal dentine by topical application of a mixture of ciprofloxacin, metronidazole and minocycline in situ. *Int Endod J* 1996;29:118-24.

Schmalz G, Widbiller M, Galler KM. Material Tissue Interaction-From Toxicity to Tissue Regeneration. *Oper Dent* 2016;41:117-31.

Shamszadeh S, Asgary S, Nosrat A. Regenerative Endodontics: A Scientometric and Bibliometric Analysis. *J Endod* 2019;45:272-80.

Shrestha S, Diogenes A, Kishen A. Temporal-controlled release of bovine serum albumin from chitosan nanoparticles: effect on the regulation of alkaline phosphatase activity in stem cells from apical papilla. *J Endod* 2014;40:1349-54.

Silujjai J, Linsuwanont P. Treatment Outcomes of Apexification or Revascularization in Non vital Immature Permanent Teeth: A Retrospective Study. *J Endod* 2017;43:238-45.

Simon S, Rilliard F, Berdal A, Machtou P. The use of Mineral Trioxide Aggregate in one-visit apexification treatment: A prospective study. *Int Endod J* 2007;40:186-97.



Skoglund A, Tronstad L, Wallenius K. A microangiographic study of vascular changes in replanted and autotransplanted teeth of young dogs. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1978;45:17-28.

Skoglund A, Tronstad L. Pulpal changes in replanted and autotransplanted immature teeth of dogs. *J Endod* 1981;7:309-16.

Sonoyama W, Liu Y, Yamaza T, et al. Characterization of the apical papilla and its residing stem cells from human immature permanent teeth: a pilot study. *J Endod* 2008;34:166-71.

Tatullo M, Codispoti B, Sied J, Makeeva I, Paduano F, Amantea M, Marrelli M, Spagnuolo G. Stem cells-based and molecular-based approaches in regenerative dentistry: A topical review. *Curr Stem Cell Res Ther* 2019;26.

Thibodeau B, Trope M. Pulp revascularization of a necrotic infected immature permanent tooth: case report and review of the literature. *Pediatr Dent* 2007;29:47-50.

Toledano M, Sauro S, Cabello I, Watson T, Osorio R. A Zn-doped etch-and-rinse adhesive may improve the mechanical properties and the integrity at the bonded-dentin interface. *Dent Mater* 2013;29:e142-52.

Toledano M, Yamauti M, Osorio E, Osorio R. Zinc-inhibited MMP-mediated collagen degradation after different dentine desmineralization procedures. *Caries Res* 2012;46:201-7.

Tomson PL, Grover LM, Lumley PJ, Sloan AJ, Smith AJ, Cooper PR. Dissolution of bio-active dentine matrix components by mineral trioxide aggregate. *J Dent* 2007;35:636-42.

Tong HJ, Rajan S, Bhujel N et al. Regenerative endodontic therapy in the management of nonvital immature permanent teeth: a systematic review – outcome evaluation and meta-analysis. *J Endod* 2017;43:1453-64.

Torabinejad M, Smith PW, Kettering JD, Pitt Ford TR. Comparative investigation of marginal adaptation of mineral trioxide aggregate and other commonly used root-end filling materials. *J Endod* 1995;21:295-9.

Torabinejad M, Chivian N. Clinical applications of mineral trioxide aggregate. *J Endod* 1999;25:197-205.

Torabinejad M, Parirokh M. Mineral trioxide aggregate: a comprehensive literature review--part II: leakage and biocompatibility investigations. *J Endod* 2010;36:190-202.

Torabinejad M, Milan M, Shabahang S, et al. Histologic examination of teeth with necrotic pulps and periapical lesions treated with 2 scaffolds: an animal investigation. *J Endod* 2015;41:846–52.

Torabinejad M, Nosrat A, Verma P, Udochukwu O. Regenerative Endodontic Treatment or Mineral Trioxide Aggregate Apical Plug in Teeth with Necrotic Pulps

and Open Apices: A Systematic Review and Meta-analysis. *J Endod*. 2017;43:1806-20.

Torabinejad M, Parirokh M, Dummer PMH. Mineral trioxide aggregate and other bioactive endodontic cements: an updated overview - part II: other clinical applications and complications. *Int Endod J* 2018;51:284-317.

Torneck CD, Smith J. Biologic effects of endodontic procedures on developing incisor teeth. I. Effect of partial and total pulp removal. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1970;30:258-66.

Trope M. Treatment of the immature tooth with a non-vital pulp and apical periodontitis. *Dent Clin North Am* 2010;54:313-24.

Varalakshmi PR, Kavitha M, Govindan R, Narasimhan S. Effect of statins with atricalcium phosphate on proliferation, differentiation, and mineralization of human dental pulp cells. *J Endod* 2013;39:806-12.

Vishwanat L, Duong R, Takimoto K, Phillips L, Espitia CO, Diogenes A, Ruparel SB, Kolodrubetz D, Ruparel NB. Effect of Bacterial Biofilm on the Osteogenic Differentiation of Stem Cells of Apical Papilla. *J Endod* 2017;43:916-22.

Wang X, Thibodeau B, Trope M, Lin LM, Huang GT. Histologic characterization of re-generated tissues in canal space after the revitalization/revascularization procedure of immature dog teeth with apical periodontitis. *J Endod* 2010;36:56-63.

Wigler R, Kaufman AI, Lin S, Steinbock N, Molina H, Torneck CD. Revascularization: A Treatment for Permanent Teeth with Necrotic Pulp and Incomplete Root Development. *J Endod* 2013;39:319-26.

Williams DF. The biomaterials conundrum in tissue engineering. *Tissue Eng Part A* 2014;20:1129-31.

Witherspoon DE, Small JC, Regan JD, Nunn M. Retrospective analysis of open apex teeth obturated with mineral trioxide aggregate. *J Endod* 2008;34:1171-6.

Yang C, Lee JS, Jung UW, et al. Periodontal regeneration with nano-hydroxyapatite-coated silk scaffolds in dogs. *J Periodontal Implant Sci* 2013;43:315-22.

Zhang J, Park YD, Bae WJ, El-Fiqi A, Shin SH, Lee EJ, Kim HW, Kim EC. Effects of bioactive cements incorporating zinc-bioglass nanoparticles on odontogenic and angiogenic potential of human dental pulp cells. *J Biomater Appl* 2015;29:954-64.

Zheng L, Yang F, Shen H, et al. The effect of composition of calcium phosphate composite scaffolds on the formation of tooth tissue from human dental pulp stem cells. *Biomaterials* 2011;32:7053-9.

Zhou P, Cheng X, Xia Y, et al. Organic/inorganic composite membranes based on poly(L-lactic-coglycolic acid) and mesoporous silica for effective bone tissue engineering. *ACS Appl Mater Interfaces* 2014;6:20895–903.



## **PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**

A pesar de la resolución de la sintomatología pulpo-periapical, los tratamientos REPs aplicados en la actualidad, presentan deficiencias a la hora de conseguir una regeneración fisiológica completa (funcional) del complejo dentino-pulpar.

### **Las hipótesis de partida:**

- El **biomaterial** juega un papel importante en el proceso de regeneración del complejo dentino-pulpar, al reconstruir el nicho favorable para las células progenitoras encargadas de asistir la formación de nuevo tejido.

- Los materiales de vidrio bioactivo mesoporoso (MBG) en el sistema composicional  $\text{SiO}_2\text{-CaO-P}_2\text{O}_5$  han mostrado propiedades promotoras de la mineralización a fases de fosfato de calcio. Su alta superficie y volumen de nanoporo les brinda excelentes propiedades para la adsorción de factores, biomoléculas y otros agentes terapéuticos. Por otra parte, el Zinc se ha propuesto como un elemento estimulante de la mineralización, además de presentar propiedades antiinflamatorias así como antibacterianas entre otras. La ruta de síntesis sol-gel permite la incorporación del elemento Zn en su composición para obtener materiales en el sistema  $\text{SiO}_2\text{-CaO-P}_2\text{O}_5\text{ZnO}$ .

- Los tejidos presentes en el complejo dentino-pulpar son una combinación de estructuras con distinto contenido en biopolímero colágeno y compuestos biocerámicos en forma de fosfatos de calcio. Por tanto, la utilización de biomateriales compuestos de biopolímero-MBG se aproxima en composición a la matriz extracelular natural.

- Los resultados clínicos en REPs podrían mejorar y ser más predecibles si se consigue reconstruir el microambiente favorable para las células que intervienen en el proceso de regeneración. Este objetivo, se conseguirá con protocolos estandarizados y el uso de biomateriales que estimulen la actividad de las células supervivientes.

### **Objetivo:**

Síntesis y caracterización de biomateriales MBG incorporando Zn (MBG-Zn) y su integración en estructuras híbridas colágeno-MBG-Zn y cementos bioactivos MTA-MBG-Zn para su aplicación en REPs.

El **objetivo general** de esta investigación es el desarrollo de biomateriales avanzados que estimulen el proceso de regeneración. Para ello, se va a estudiar la síntesis y caracterización de biomateriales MBG incorporando Zn (MBG-Zn) y su integración en estructuras híbridas colágeno-MBG-Zn y cementos bioactivos MTA-MBG-Zn.

El trabajo realizado se ha presentado organizado en los siguientes capítulos:

### **Introducción general**

Revisión del estado actual de los procedimientos REPs, con detalle de los materiales y protocolos existentes, como pautas de tratamiento para dientes inmaduros con necrosis pulpar. Justificación de nuevos tratamientos avanzados mediante la implementación de nuevos biomateriales basados en la utilización de vidrio bioactivo mesoporoso (MBG).

## **Capítulo 1**

Síntesis y caracterización físico-química de materiales MBG con la incorporación del ion Zinc, en el sistema composicional  $\text{SiO}_2\text{-CaO-P}_2\text{O}_5\text{-ZnO}$ .

## **Capítulo 2**

Procesado y caracterización físico-química de estructuras híbridas compuestas de colágeno y MBG, así como colágeno y MBG-Zn, con el fin de obtener biomateriales avanzados con propiedades biomiméticas con el tejido del complejo pulpo-dentinario.

## **Capítulo 3**

Ensayos *in vitro* de viabilidad y diferenciación celular de los biomateriales colágeno-MBG y colágeno-MBG-Zn con el fin de evaluar la biocompatibilidad de los materiales con las células madre de la pulpa dental (hDPSCs).

## **Capítulo 4**

Desarrollo de una formulación de cemento endodónico bioactivo (BEC) incorporando MBG-Zn a un cemento comercial, y estudio de sus propiedades físico-químicas, el efecto en el tiempo de fraguado, respuesta bioactiva *in vitro*, así como ensayos *in vitro* con el fin de evaluar la biocompatibilidad y diferenciación celular de los materiales con hDPSCs.





# CAPÍTULO 1

## **Síntesis y caracterización de materiales de vidrio bioactivo mesoporoso en el sistema composicional (SiO<sub>2</sub>-CaO-P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>-ZnO): MBG y MBG-Zn**

### **1. Introducción**

El primer material denominado “vidrio bioactivo” fue sintetizado en 1969 por el Profesor Larry Hench en la Universidad de Florida (Hench 1971; Hench 2006), en el marco de una investigación que pretendía la síntesis de materiales para implantes capaces de formar una interfaz y/o unión biocompatible y estable con el tejido vivo. Un primer y principal descubrimiento de esta investigación fue que el vidrio, de composición molar 46.1% SiO<sub>2</sub>, 24.4% Na<sub>2</sub>O, 26.9% CaO y 2.6% P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> una vez implantado, se enlazaba al hueso de una forma tan fuerte y robusta que, no era posible retirarlo sin romper el hueso. Esta composición original se llamó 45S5 y se registró con el nombre de Bioglass® (Hench et al. 1971), por lo que el nombre “Bioglass” debería reservarse únicamente para referirse específicamente al vidrio de composición 45S5 (Jones 2013), y bioactive glass; BG o vidrio bioactivo en español para el resto de composiciones.

Este primer material Bioglass®, comercializado tanto como dispositivo monolítico como en formato particulado, se ha utilizado clínicamente en más de un millón de

pacientes para reparar defectos óseos en cirugía maxilofacial y traumatología (Hench 2016), pero su mayor éxito comercial ha sido su uso como agente activo en productos dentífricos para el tratamiento de la hipersensibilidad dental al promover la remineralización de la dentina (Jones 2013).

De forma general, los vidrios bioactivos (Bioactive Glass, BGs), se definen como materiales vítreos que son capaces de unirse al tejido vivo, sin la formación de una interfaz fibrosa o cápsula de reacción a cuerpo extraño (Hench 1991). A esta unión o fijación interfacial entre el material y el tejido vivo se la denomina “fijación bioactiva” y se observó que se producía a través de la formación de una capa de hidroxiapatito (Hidroxiapatite; HA) carbonatada en la superficie del material, cuando éste entra en contacto con el fluido fisiológico. Así, la capa de HA se forma como consecuencia de la alta reactividad de los vidrios en medio fisiológico, lo que propicia el intercambio entre los iones de la superficie del material y el medio del fluido circundante. La formación de esta capa de HA en la superficie de los materiales se ha considerado como una medida para evaluar su bioactividad y se ha aplicado mediante el ensayo en disolución salina simulando condiciones fisiológicas (Simulated Body Fluid; SBF), estandarizado por Kokubo y cols. (Kokubo et al. 2006), y que contiene los iones fisiológicos en concentraciones similares a las presentes en el plasma sanguíneo.

### **1.1. Métodos de síntesis de materiales de vidrio bioactivo**

Inicialmente el material Bioglass® (45S5) y otras composiciones, tanto experimentales de laboratorio como industriales, fueron obtenidas por el método tradicional de fundido. Este procedimiento consiste en la mezcla de las sales inorgánicas precursoras, utilizando sílice (SiO<sub>2</sub>) como composición mayoritaria, a temperaturas generalmente superiores a 1300°C para alcanzar la fusión homogénea de todos los componentes. A la fusión le sigue un paso de enfriamiento rápido, el

cual produce un aumento de la viscosidad del fluido y solidificación. Como el sólido resultante conserva la estructura desordenada del fluido, el vidrio puede definirse como un material inorgánico sólido producto de la fusión que se ha enfriado hasta su rigidez sin que se haya producido la cristalización (Aguilar et al. 2011). Este método de fabricación tradicional daba lugar a materiales que hoy día se puede considerar que presentan ciertas desventajas. Así, los vidrios obtenidos por fundido son materiales con baja superficie específica ( $< 1 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$ ) y ausencia de porosidad. En cuanto a su fabricación, los procesos de difusión molecular son lentos y la obtención de vidrios homogéneos y reproducibles requiere de ciclos de alta temperatura largos y costosos. Además, el hecho de utilizar temperaturas tan elevadas para su obtención impide utilizar en sus formulaciones compuestos que sólo son estables a baja temperatura (Sepulveda et al. 2001).

Por lo tanto, la demanda de biomateriales con propiedades mejoradas condujo al desarrollo de nuevas rutas de síntesis para estos materiales vítreos, como el proceso sol-gel, que se comenzó a utilizar a principios de los años 90 (Li et al. 1991). El método sol-gel es una ruta de síntesis muy versátil. Se basa en una síntesis química a bajas temperaturas (muy próximas a la temperatura ambiente) en la que se emplean precursores de sílice en solución (sol) para solidificar la estructura vítrea primero en forma de gel (gel) que luego se seca hasta su formato como material sólido (Li et al. 1991). Los vidrios de sílice se preparan a partir de la policondensación de un alcóxido de silicio, comúnmente, el tetraetilortosilicato (TEOS);  $[\text{Si}(\text{OC}_2\text{H}_5)_4]$ . La reacción de hidrólisis ocurre cuando el TEOS y el agua se mezclan en un solvente común, generalmente etanol, en presencia de un catalizador ácido o básico. La reacción de hidrólisis conduce a la formación de grupos silanol ( $\equiv\text{Si}-\text{OH}$ ), mientras que la condensación produce enlaces siloxanos ( $\equiv\text{Si}-\text{O}-\text{Si}\equiv$ ), resultando como productos de la reacción agua y alcohol.

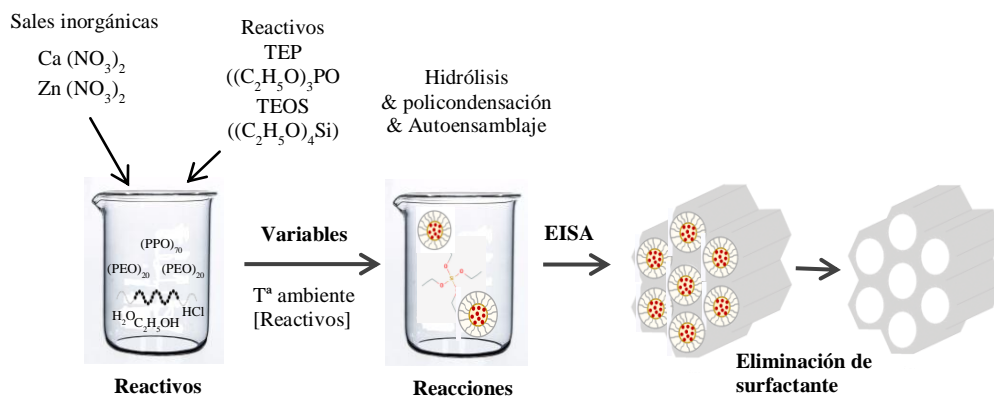
Durante el proceso de secado se elimina el agua y los otros disolventes percusores ocluidos en la red silíceica (Arcos y Vallet 2010). La utilización de bajas temperaturas características de este método de síntesis tiene grandes ventajas frente al método de fundido citado, así, no es necesario incluir componentes como el  $\text{Na}_2\text{O}$  que se venía empleando para disminuir la temperatura de fusión.

Por otra parte, el uso de la técnica sol-gel ha permitido la obtención de BGs con una mayor pureza y un rango composicional ampliado, posibilitando la incorporación de un mayor contenido en silicio, además de proporcionar al material final una nanoporosidad inherente que le aporta una mayor superficie específica (Hench et al. 1998). Estas propiedades de superficie y porosidad favorecen la reactividad superficial y por tanto la formación de HA, como consecuencia, los vidrios sol-gel exhiben mayor bioactividad (Hamadouche et al. 2001; Hench y Xynos et al. 2004).

Además, esta técnica permite la incorporación de sustancias orgánicas e incluso moléculas con actividad biológica (Brinker y Scherer 1990; Hench y West 1990). Por otra parte, el control del método de procesado permite actuar para variar la conformación de los materiales sintetizados y así obtener materiales en distintos formatos como partículas (Isobe y Kaneko 1999), películas (Yoshida et al. 1999), monolitos (Cho et al. 1995) o fibras (Sakka y Yoko 1992). Todas estas particularidades permiten obtener materiales con alto valor añadido (Gupta y Kumar 2008; Ciriminna et al. 2013).

Sin embargo, han sido los avances en la síntesis química que combina este proceso sol-gel con el empleo de moléculas de surfactante (directoras de estructura), lo que ha dado lugar a la obtención de vidrios bioactivos con propiedades texturales más

avanzadas que se denominan vidrios bioactivos mesoporosos (Mesoporous Bioactive Glass, MBGs) (Brinker et al. 1999; Yan et al. 2004; Yan et al. 2005). La Figura 1.1. presenta un esquema general de estos procedimientos mostrando la integración de los reactivos en las distintas etapas de una ruta de síntesis de material mesoporoso.



**Figura 1.1.** Esquema mostrando las etapas necesarias para la síntesis de vidrios bioactivos mesoporosos (MBGs). Los parámetros finales del material (texturales y estructurales) van a ser función de las distintas variables de síntesis, como la concentración de la molécula de surfactante, las temperaturas y el tiempo de reacción, el solvente, el tipo y concentración de los reactivos inorgánicos y alcoxidos y el tratamiento elegido para la eliminación de la molécula de surfactante y otros subproductos de reacción.

Los MBGs presentan una estructura nanoporosa altamente ordenada con un diámetro de poro que varía entre 5 y 20 nm y valores de superficie y porosidad hasta cinco veces superiores a las obtenidas por el método sol-gel convencional (Yan et al. 2004). Como consecuencia de ello, nos encontramos ante BGs que presentan una mayor cinética de bioactividad (Ramiro et al. 2016). Es conveniente indicar que la terminología empleada para designar los MBGs proviene de la nomenclatura IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry) y no guarda relación con prefijos métricos (Rouquerol et al. 1994). Según este criterio,

los poros con un diámetro inferior a 2 nm se clasifican como microporos, los que cuentan con un diámetro entre 2 y 50 nm se denominan mesoporos, y los que tienen un tamaño superior a 50 nm son macroporos.

Es de especial relevancia que la estructura final del material está constituida fundamentalmente por sílice vítrea (por tanto no cristalina) y está repleta de defectos estructurales como resultado de la condensación incompleta de los átomos de silicio tras la hidrólisis, lo que origina la presencia de átomos de silicio unidos a grupos OH, es decir, grupos silanol (Si-OH) en la superficie, de gran interés para la posterior funcionalización orgánica de la superficie (Arcos et al. 2010).

## **1.2. Biocompatibilidad, biodegradación y bioactividad de materiales de vidrio bioactivo mesoporoso**

El concepto de biocompatibilidad ha evolucionado en las últimas décadas como consecuencia del gran desarrollo de los biomateriales y sus nuevas aplicaciones. Actualmente, biocompatibilidad se extiende a la capacidad de un material, que bien por sí solo o como parte de un sistema más complejo, dirige o promueve mediante el control de sus interacciones con los componentes de los sistemas vivos, la evolución de cualquier procedimiento o protocolo terapéutico o de diagnóstico (Williams 2009).

La biocompatibilidad, lleva por tanto implícita la ausencia de toxicidad. En el caso de los MBGs, se ha determinado que variables como la concentración, el tamaño de partícula, la superficie específica y la funcionalización de la superficie de los materiales juegan un papel fundamental en su toxicidad *in vitro* (Radu et al. 2004;

Colilla y Vallet 2009). Al variar la naturaleza química y la concentración de los componentes del MBG, nuevas propiedades biológicas importantes se pueden agregar, siendo así el material adaptado a aplicaciones clínicas específicas (Oudadesse et al 2011).

El proceso de biodegradación *in vivo* de estos materiales basados en sílice se produce principalmente por su disolución al entrar en contacto con los fluidos fisiológicos. Así, el estudio de los productos iónicos de disolución de los MBGs, concentración de las distintas especies iónicas, influencia en el pH y el equilibrio químico para la formación de HA es clave para entender el comportamiento *in vitro* e *in vivo* de los MBGs (Gómez et al. 2018; Vallet y Salinas 2018).

Como se ha indicado previamente, la bioactividad y la capacidad de los MBGs para estimular la regeneración del tejido a nivel celular se ha relacionado con su cinética de disolución y formación superficial de una capa de HA (Linati et al. 2005; Oudadesse et al 2011). En este sentido, una línea de investigación prometedora es la introducción de elementos químicos adicionales en su composición que puedan liberarse en el proceso de biodegradación del material y aplicarse como iones terapéuticos. Se ha encontrado que la liberación de distintos productos iónicos en un entorno fisiológico puede promover la mineralización de la dentina, mejorar la respuesta biológica de células progenitoras en la dentinogénesis y la angiogénesis, promover la diferenciación celular a odontoblastos, así como proporcionar un efecto antibacteriano (Hoppe et al. 2011; Zhang et al. 2014; Rabiee et al. 2015).



El elemento Zinc (Zn) tiene un particular interés en odontología por su actividad bacteriostática o bactericida (Balamurugan et al. 2007; Bini et al. 2009; Pasquet et al. 2014; Sánchez et al. 2014; Atkinson et al. 2015; Riaz et al. 2015; Wajdaa et al. 2019). Se ha demostrado su papel en la estimulación de la proliferación y diferenciación celular (Brandão-Neto et al. 1995), así como su actuación como cofactor en la activación para enzimas (Tapiero y Tew 2003; Lázaro et al. 2014). Interviene en la síntesis de proteínas y la replicación del ADN y ARN (Coleman 1992; Tang et al. 2001; Maret 2007; Popp et al. 2007; Lázaro et al. 2014; Li et al. 2015; Rabiee et al. 2015). Los estudios han demostrado que el Zn aumenta la mineralización mediante la estimulación de la fosfatasa alcalina (Alkaline Phosphatase; ALP), enzima clave para la calcificación ósea y colágeno tipo I en la matriz extracelular. Por otra parte, la deficiencia en Zn ha sido asociada con retraso en el crecimiento esquelético y alteraciones en la calcificación del tejido óseo (Holloway et al. 1996; Kwun et al. 2010).

Además, la incorporación de Zn en materiales vítreos puede tener otras propiedades interesantes a considerar como son prolongar su durabilidad química, retrasando su disolución y mejorando las propiedades mecánicas del material (Lusvardi et al. 2002; Karthika et al. 2015).

Los estudios de Osorio y cols., entre otros demuestran que el Zn reduce la degradación del colágeno mediada por las metaloproteinasas de la matriz (MMPs) (Toledano et al. 2016), actúa como vía de señalización produciendo un efecto estimulante en la mineralización de los tejidos duros (Hoppe et al. 2011), estimulando la remineralización de la dentina (Toledano et al. 2013) a la vez que inhibe la desmineralización de la misma (Takatsuka et al. 2005). Otro de los efectos descritos para el Zn, es su capacidad antiinflamatoria, lo cual es esencial

para que pueda llevarse a cabo el proceso de regeneración del tejido dañado (Lang et al. 2007). Además, se han relacionado a las partículas de ZnO con efectos antibacterianos, lo cual es bastante interesante para aplicaciones en REPs (Wang et al. 2014; Liu et al. 2015). Sin embargo, también hay que tener en cuenta que un alto número de iones Zn dará lugar a citotoxicidad (Huang et al. 2017) por lo que para mantener las funciones celulares en equilibrio con un efecto antibacteriano, va a ser fundamental identificar tanto las propiedades de biodegradación de los materiales de Zn, así como las proporciones indicadas para su aplicación terapéutica.

En la búsqueda de un material avanzado para su aplicación en nuevas terapias REPs, un primer objetivo del presente trabajo de Tesis Doctoral ha sido la incorporación del elemento Zn a un material MBG en el sistema composicional  $\text{SiO}_2\text{-CaO-P}_2\text{O}_5$ . En este Capítulo se presenta el estudio de la síntesis de un material MBG y composiciones relacionadas funcionalizadas con distinto contenido en Zn (MBG-Zn). Igualmente, se analiza el efecto de la incorporación de Zn en distintos parámetros físico-químicos del material mesoporoso.

## **2. Procedimiento experimental**

### **2.1. Síntesis de los materiales de vidrio bioactivo mesoporoso MBG y MBG-Zn**

La síntesis del sol MBG, en el sistema composicional  $80\text{SiO}_2 - 15\text{CaO} - 5\text{P}_2\text{O}_5$ , se realizó según el protocolo descrito por Yan y cols. (Yan et al. 2004). La síntesis consiste en disolver 4 g del polímero director de estructura P-123 Pluronic® (Sigma-Aldrich) en 60 mL de etanol absoluto (AnalaR Normapur) y 1 mL de

solución de HCl 0.5 M (Panreac, PA-ACS-ISO 37%) durante 1 hora. Una vez completada la disolución del P123, se procede a la adición de 1.4 g de nitrato de calcio tetrahidratado,  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  (C4955 Sigma-Aldrich), 685  $\mu\text{L}$  de trietil fosfato, TEP,  $(\text{C}_2\text{H}_5\text{O})_3\text{PO}$  (538725 Sigma-Aldrich) y 7.125  $\mu\text{L}$  de tetraetilortosilicato (TEOS,  $\text{Si}(\text{OC}_2\text{H}_5)_4$  (14082 Alfa-Aesar). Los reactivos se añadieron de forma consecutiva con intervalos de 1 h para cada reactivo y se mantuvieron en agitación constante a 500 rpm durante 24 horas a temperatura ambiente.

Para las preparaciones MBG-Zn se siguió el mismo procedimiento que para MBG, con la variación de que parte de sal de calcio se sustituyó por diferentes cantidades de nitrato de zinc hexahidratado,  $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  (96482 Sigma-Aldrich). Las sales de nitrato de Ca y Zn, se añadieron al mismo tiempo. La Tabla 1.1.1 detalla las composiciones nominales de los materiales sintetizados y la tabla 1.1.2 las cantidades de reactivos añadidos para cada caso.

**Tabla 1.1.1** Nomenclatura y composición nominal de los materiales MBG y MBG-Zn. Proporción de los reactivos precursores para la síntesis por el método sol-gel.

<b>Nomenclatura</b>	<b>Composición nominal (mol)</b>
<b>MBG</b>	80SiO <sub>2</sub> :15CaO:5P <sub>2</sub> O <sub>5</sub>
<b>MBG-2.5Zn</b>	80SiO <sub>2</sub> :12.5CaO:5P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> :2.5ZnO
<b>MBG-5Zn</b>	80SiO <sub>2</sub> :10CaO:5P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> :5ZnO
<b>MBG-7.5Zn</b>	80SiO <sub>2</sub> :7.5CaO:5P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> :7.5ZnO

**Tabla 1.1.2** Proporción de los reactivos precursores para los materiales MBG y MBG-Zn sintetizados por el método sol-gel.

<b>Nomenclatura</b>	<b>TEOS (mL)</b>	<b>TEP (μL)</b>	<b>Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> 4H<sub>2</sub>O (g)</b>	<b>Zn (NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> 6 H<sub>2</sub>O (g)</b>
<b>MBG</b>	7.125	685	1.400	-
<b>MBG-2.5Zn</b>	7.125	685	1.166	0.297
<b>MBG-5Zn</b>	7.125	685	0.933	0.594
<b>MBG-7.5Zn</b>	7.125	685	0.700	0.891

La mezcla (sol) se mantuvo a temperatura ambiente y sometida a un proceso de evaporación inducida por auto-ensamblaje (Evaporation Induced Self Assembly; EISA) para formar un gel durante 72 horas. Posteriormente, los geles se envejecieron a 80 °C en la estufa durante 24 horas. Finalmente, para eliminar los nitratos de las sales percursoras de Ca y Zn y los restos orgánicos de la molécula de surfactante, se realizó un tratamiento térmico a 700 °C en atmosfera de aire durante 2 h usando una rampa de calentamiento de 1 °C min<sup>-1</sup>. Los sólidos obtenidos se molieron ligeramente para homogeneización y se tamizaron por debajo de 32 µm.

## **2.2. Caracterización físico-química de los materiales**

Para la caracterización de los materiales se emplearon las siguientes técnicas: Análisis de tamaño de partícula por espectrometría de difracción por rayos láser (Laser Diffraction; LD), microscopía electrónica de barrido (Field Emission Gun-Scanning Electron Microscopy; FEG-SEM), análisis de dispersión de energía de rayos X de dispersión de energía (EDX), fluorescencia de rayos X (X-Ray Fluorescence; XRF), difracción de rayos X en condiciones de rutina (Wide Angle X-Ray Diffraction; WAXRD); difracción de rayos X de bajo ángulo ( Small Angle X-ray diffraction, SAXRD), fisisorción de N<sub>2</sub>, análisis termogravimétrico (Thermogravimetric Analysis; TGA), análisis térmico diferencial (Differential Thermal Analysis; DTA), y espectroscopia infrarroja (Fourier-Transform Infrared Spectroscopy; FT-IR). Las técnicas y las condiciones de medida utilizadas se detallan en el Anexo I.

### 3. Resultados

Los materiales obtenidos son sólidos en forma de partículas. El aspecto macroscópico se muestra en la Figura 1.2.

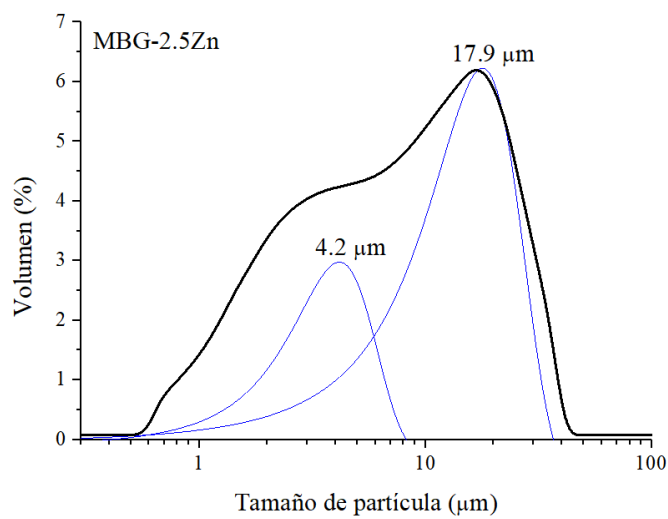
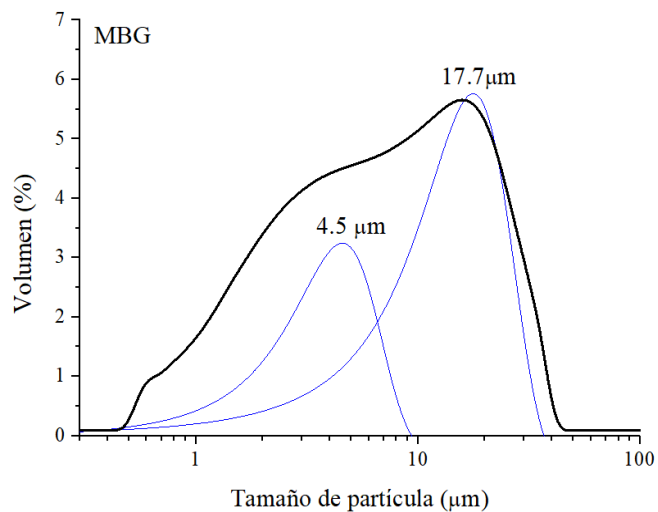


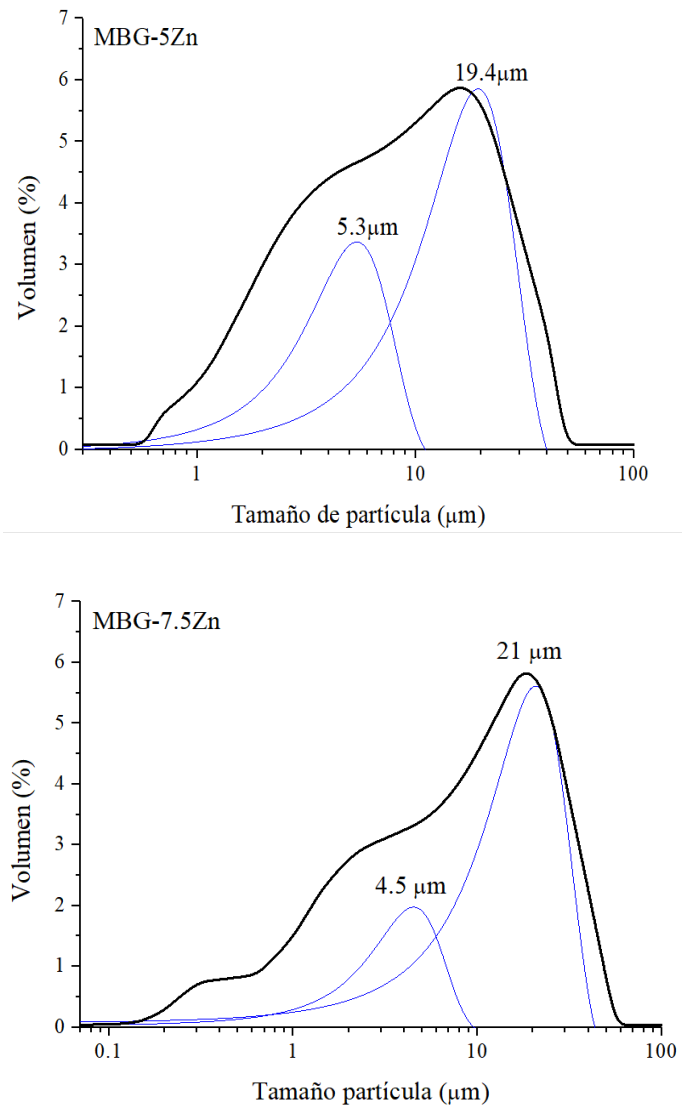
**Figura. 1.2.** Fotografía digital correspondiente a 100 mg de material MBG y MBG-7.5Zn. Columna derecha muestra los materiales antes de ser tamizados y la columna izquierda muestra los materiales tamizados por debajo de 32  $\mu\text{m}$ .

Las cantidades de reactivo para las distintas preparaciones indicadas en la Tabla 1.1.2 dan lugar a una masa de material final de 1.7; 1.8; 1.7; y 1.9 g para MBG; MBG-2.5Zn; MBG-5Zn y MBG-7.5Zn respectivamente.

El análisis de tamaño de partícula de los materiales realizado por espectrometría de difracción por láser (LS) se presenta en la Figura 1.3. Todos los materiales presentan una distribución ancha con un máximo principal en torno a los 20  $\mu\text{m}$  y otro menos intenso con máximo en el rango entre 4.2-5.3  $\mu\text{m}$ . Se observa que el

aumento en la incorporación de Zn produce un ligero desplazamiento de los valores máximos de tamaño de partícula.

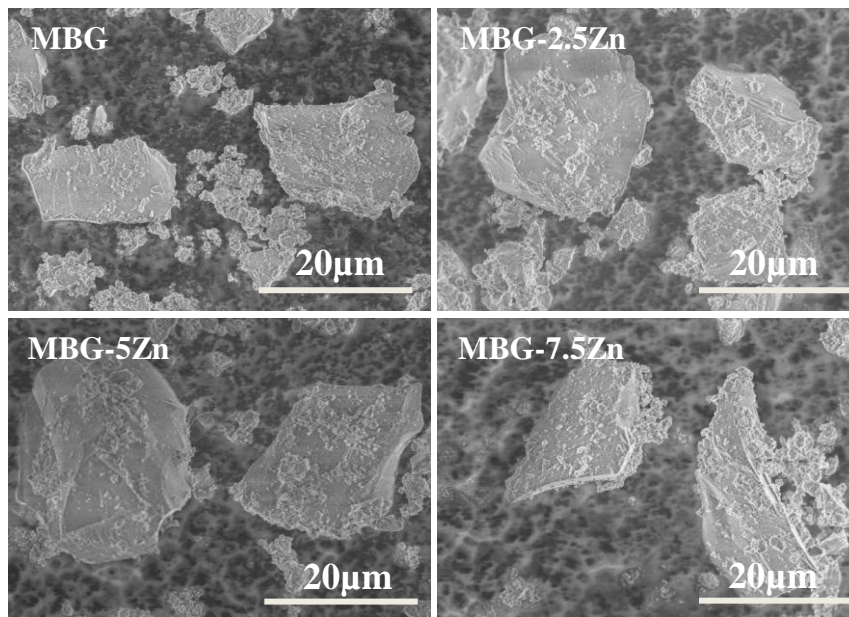




**Figura. 1.3.** Distribución LS del tamaño de partícula de los materiales MBG y MBG-Zn.

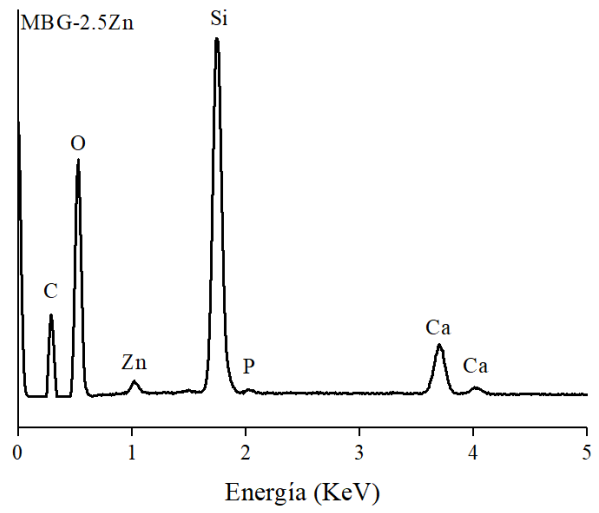
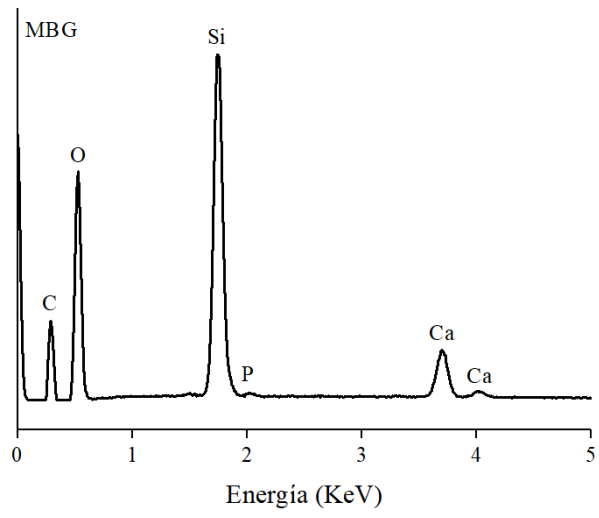


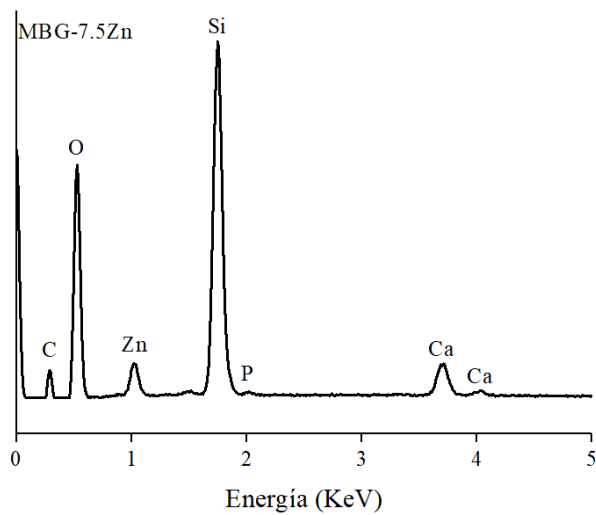
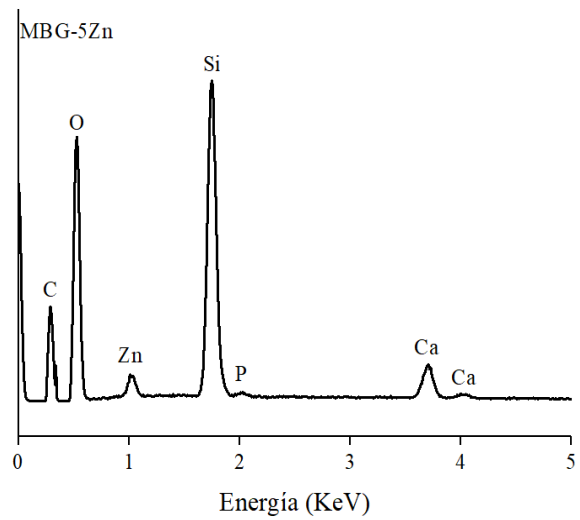
La Figura 1.4 muestra micrografías FEG-SEM de las partículas de los materiales con tamaños en el rango similar a los obtenidos por LS.



**Figura 1.4.** Imagen FE-SEM de los materiales MBG y MBG-Zn precursores en formato de partículas

En la Figura 1.5 se muestran los análisis de EDX en los que se confirma los distintos contenidos en Zn para los distintos materiales funcionalizados.





**Figura 1.5.** Análisis EDX de los materiales MBG y MBG-Zn precursores en formato de partículas

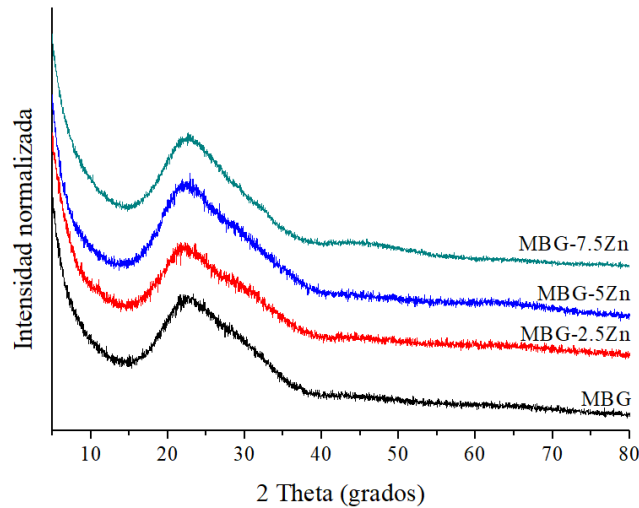
Los resultados del análisis cuantitativo por XRF de los diferentes materiales se presentan en la Tabla 1.2.

**Tabla 1.2.** Análisis cuantitativo FRX de la composición química de los materiales MBG y MBGG-Zn.

<b>Material</b>	<b>SiO<sub>2</sub>:CaO:P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>:ZnO(% molar)</b>	
	<b>Nominal</b>	<b>Experimental</b>
MBG	80.0 : 15.0:5.0:0.0	86.3±3.0 :12.5±2.0: 1.2±0.5 : 0.0±0.0
MBG-2.5Zn	80.0:12.5:5.0:2.5	76.1±1.1: 19.8±4.4: 0.9±1.0: 3.2±1.7
MBG-5Zn	80.0:10.0:5.0:5.0	75.1±3.5 :18.2±3.4: 1.1±0.0: 5.6±0.7
MBG-7.5Zn	80.0:7.5:5.0:7.5	77.3±0.5: 11.5±0.1: 1.7±1.2: 9.5±0.7

El análisis de XRF confirma la incorporación del elemento Zn con un porcentaje entre 3.2 y 9.5 %. Se observa igualmente una desviación importante en los porcentajes del resto de los elementos Si, Ca Y P respecto a la composición nominal, siendo especialmente bajo el contenido en P que oscila entre 0.9 y 1.7%.

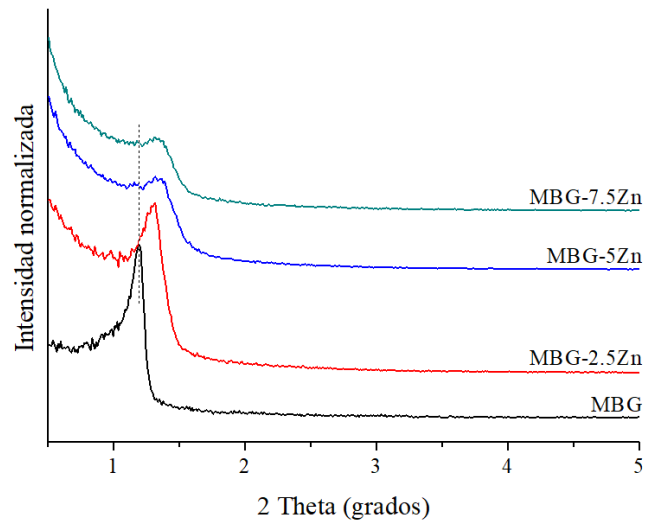
Los diagramas de difracción de rayos X en condiciones de rutina para los cuatro materiales se presentan en la Figura 1.6 y no muestran ningún pico de difracción por lo que se confirma su naturaleza vítrea.



**Figura 1.6.** Diagramas de difracción de rayos X en condiciones de rutina (WXR) de los materiales MBG y MBG-Zn.

La banda ancha con pico máximo en torno a los 22° observada es característica de los materiales vítreos (Yan et al. 2005).

La Figura 1.7 recoge los diagramas de difracción de rayos X de bajo ángulo (SAXRD) para las cuatro composiciones. En todos los casos se obtiene un pico de difracción para valores 2 Theta entre 22.0 y 22.4 que se corresponden con un espacio entre planos 0.017°, característico de una estructura nanoporosa ordenada, concretamente correspondiente a una estructura hexagonal 2D (Wang 2009; Vallet-Regi et al. 2006). Se observa que el aumento de contenido en Zn produce una disminución en la intensidad y aumento de la anchura del pico, así como un ligero desplazamiento hacia valores 2 Theta mayores.



**Figura 1.7.** Diagramas de difracción de Rayos X de bajo ángulo (SAXRD) de los materiales MBG y MBG-Zn.

En la Figura 1.8 se muestran las isothermas de adsorción y desorción de  $N_2$  para los materiales. Todas ellas presentan el perfil característico de materiales mesoporosos correspondiente a isothermas de Tipo IV. Los bucles de histéresis obtenidos para el intervalo de los nanoporos son del tipo H1, característicos de nanoporos cilíndricos. Las cuatro composiciones muestran una misma distribución de tamaño de poro BJH monodispersa. El gráfico muestra como el incremento en el contenido en Zn produce un descenso en el volumen de mesoporo así como una leve disminución en los valores del diámetro de poro.

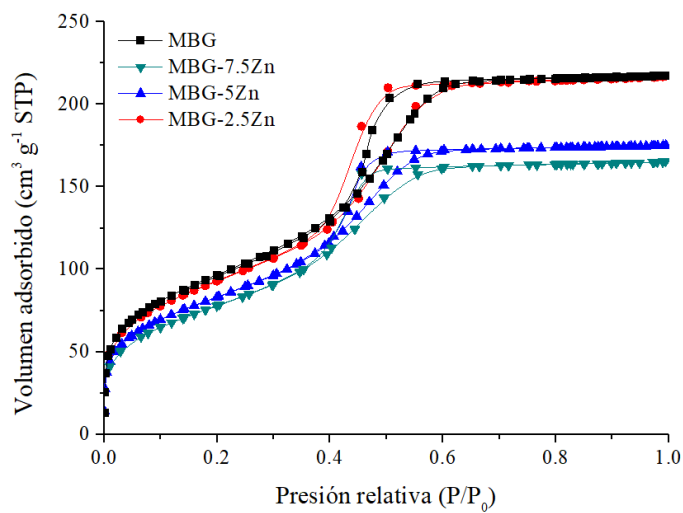


Figura 1.8. Isotermas de adsorción/desorción de  $N_2$  de los materiales MBG y MBG-Zn.

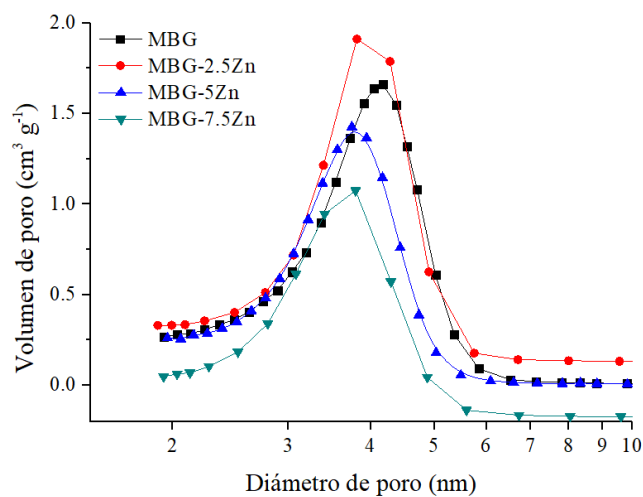


Figura 1.8. Distribuciones BJH de tamaño de poro obtenidas a partir de las isotermas de adsorción para los materiales MBG y MBG-Zn.

La Tabla 1.3 presenta un resumen de los parámetros texturales obtenidos por adsorción de N<sub>2</sub>, incluyendo los valores de superficie específica, S<sub>BET</sub>, volumen total de poro y tamaño de poro correspondiente al valor máximo de las distribuciones BJH. Como puede observarse, la incorporación de valores crecientes de Zn da lugar a una disminución de la superficie específica y el volumen total de poro.

**Tabla 1.3.** Parámetros texturales de los materiales MBG y MBG-Zn obtenidos a partir las medidas de fisisorción de N<sub>2</sub>.

<b>Muestra</b>	<b>S<sub>BET</sub><sup>a</sup> (m<sup>2</sup> g<sup>-1</sup>)</b>	<b>V<sub>T</sub> poro<sup>b</sup> (cm<sup>3</sup> g<sup>-1</sup>)</b>	<b>d<sub>p</sub> (nm)<sup>c</sup></b>
<b>MBG</b>	353	0.33	4.3
<b>MBG-2.5Zn</b>	340	0.33	3.9
<b>MBG-5Zn</b>	304	0.27	3.6
<b>MBG-7.5Zn</b>	286	0.25	3.6

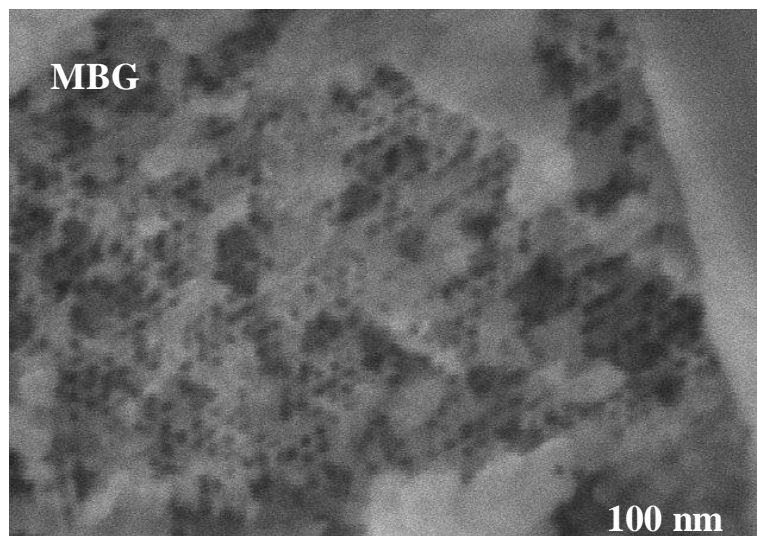
<sup>a</sup> Superficie específica calculada mediante el método BET.

<sup>b</sup> Volumen total de poro estimado a partir de la cantidad adsorbida a la presión relativa de 0.99.

<sup>c</sup> Diámetro de mesoporo obtenido a partir del máximo de las distribuciones BJH de tamaño de poro correspondiente a la isoterma de adsorción.



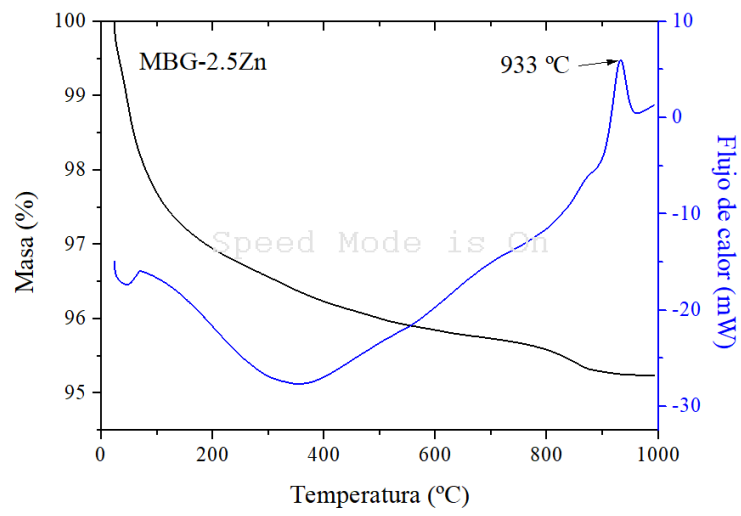
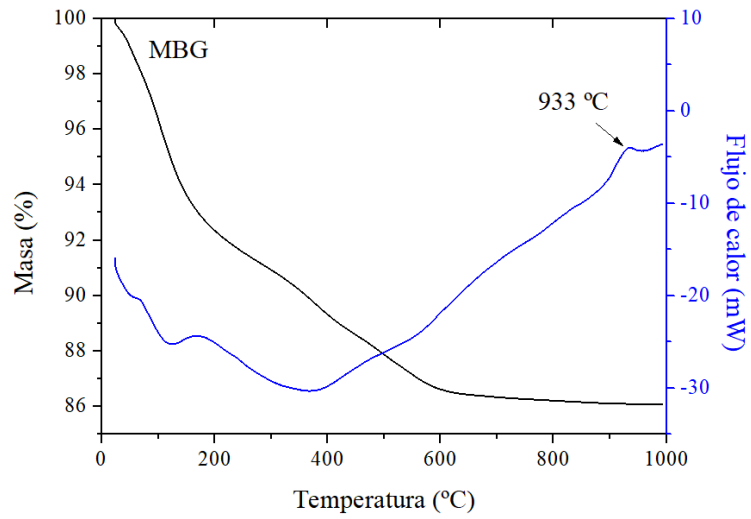
La foto FEG-SEM que se muestra en la Figura 1.9 confirma la microestructura nanoporosa ordenada y los valores de nanoporo de 4 nm para el caso del material MBG.

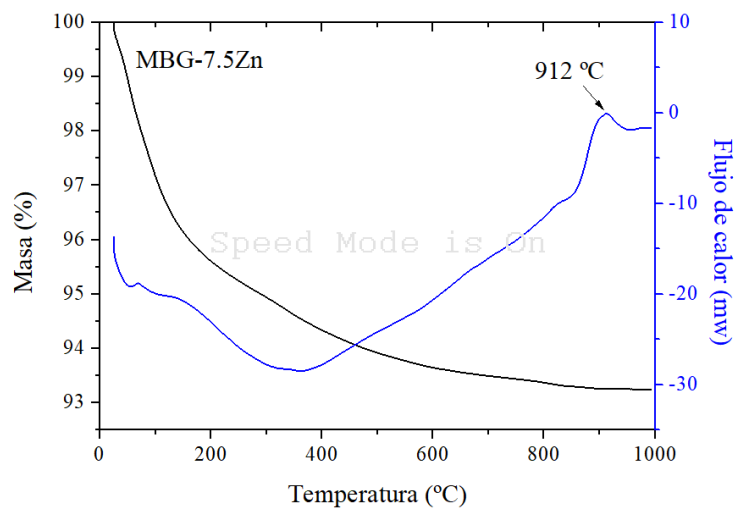
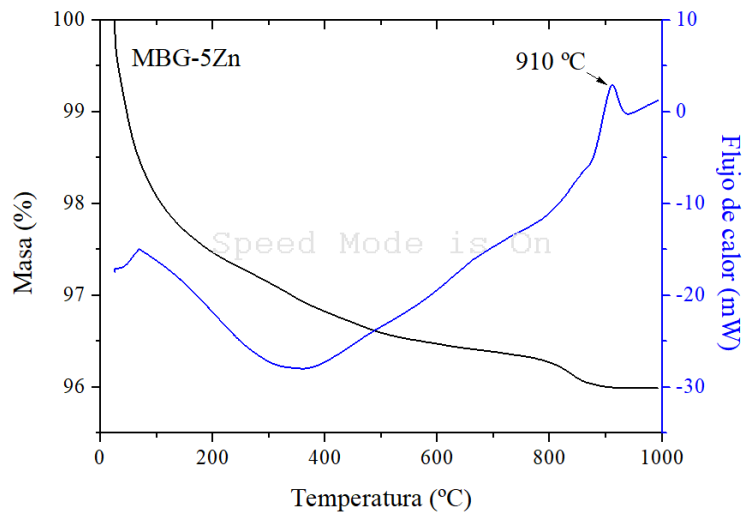


**Figura 1.9.** Micrografía FEG-SEM de alta resolución del material MBG mostrando la microestructura nanoporosa ordenada.

El análisis TG y DTA de los materiales estudiados se presenta en la Figura 1.10. En general, se observa una primera pérdida de masa más importante para temperaturas inferiores a 200 °C y por tanto correspondiente a la pérdida de humedad. Se aprecia que la pérdida de masa es más grande, en torno al 8 % para el caso del material libre de Zn, MBG. En los materiales con contenido en Zn, la pérdida de humedad medida a baja temperatura no supera el 4%.

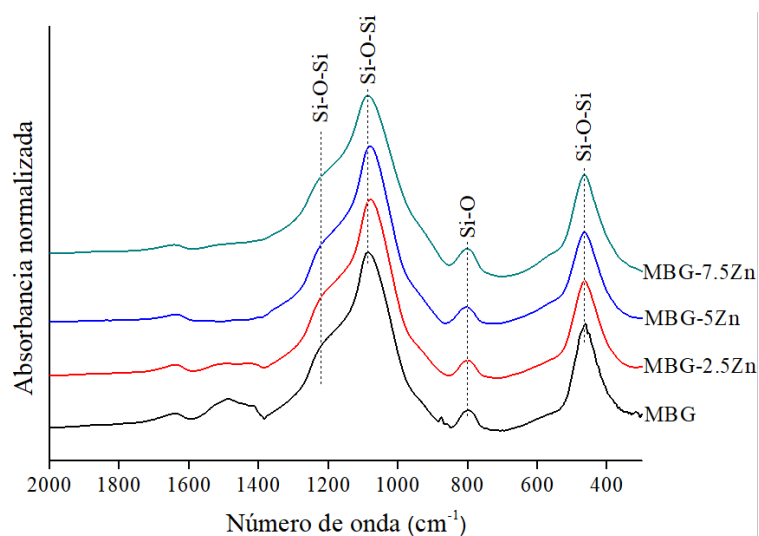
Las curvas de DTA muestran las reacciones exotérmicas con máximos a 70 °C y 170°C correspondientes a la eliminación del agua adsorbida por el material. En todos los casos, se observa una única temperaturas característica de cristalización,  $T_c$ , para el rango de temperatura analizado. El máximo varía entre los 933 °C para el material sin Zn, MBG y 912°C para el caso del MBG-7.5Zn, lo que sugiere que la temperatura de cristalización depende del contenido en Zinc (Kamitakahara et al. 2006).





**Figura 1.10.** Análisis TG (línea azul) y DTA (línea negra), en atmósfera de aire, para los materiales MBG y MBG-Zn.

El análisis de FT-IR de todos los vidrios se presenta la Figura 1.11. En todos los casos el espectro aparece dominado por las bandas características de los enlaces Si-O de la matriz vítrea. Se muestran bandas de adsorción intensas en 1080 y 460  $\text{cm}^{-1}$  que corresponden a la flexión asimétrica de vibración del enlace de Si-O-Si y una banda a 800  $\text{cm}^{-1}$  que se atribuye al estiramiento simétrico del enlace Si-O-Si (Martínez et al. 2000). Se observa un ensanchamiento y ligera disminución de intensidad de las bandas principales a 1080 y 460  $\text{cm}^{-1}$  correspondientes a los enlaces Si-O-Si con el aumento en el contenido en Zn.



**Figura 1.11.** Espectros FT-IR para para los materiales MBG y MBG-Zn.

#### **4. Discusión**

En este capítulo se ha presentado la síntesis por el método sol-gel y caracterización físico-química de un material mesoporoso ordenado al que se han añadido distintas cantidades del elemento Zinc. Tanto las cantidades como el aspecto macroscópico del material obtenido son muy similares para todos los materiales con o sin Zn, aunque se observa un ligero aumento en el tamaño de partícula con la incorporación de Zinc.

En el análisis cuantitativo de la composición química elemental se observa cierta discrepancia entre la composición nominal, calculada a partir de los reactivos precursores de la síntesis, y la composición molar real. Esto ocurre tanto para el material MBG como para los materiales con Zn, en los que los valores bajos de contenido en fósforo (P) indican que la retención del mismo en el material es poco efectiva con el proceso de síntesis utilizado.

Se observa que, el aumento en el contenido en Zn produce disminución en la intensidad, aumento de anchura y ligero desplazamiento del pico de bajo ángulo hacia valores  $2\theta$  mayores, lo cual se puede correlacionar con deterioro en el orden de la estructura mesoporosa (Sánchez et al. 2014).

Como cabría esperar para un material mesoporoso ordenado, los resultados de fisisorción de  $N_2$  para los cuatro materiales presentan isothermas de tipo IV y en todas ellas se puede apreciar la curva de histéresis tipo H1, características de canales de poros cilíndricos con una distribución de diámetro de nanoporo estrecha. Esto nos indica que la incorporación de ZnO hasta un 7.5% no provoca un colapso de la nanoestructura. En cuanto a los parámetros texturales, se observa una tendencia a disminuir de la superficie específica calculada por el método BET

( $S_{\text{BET}}$ ) y el volumen y el diámetro de poro, conforme aumenta la cantidad de Zn incorporada. Esta disminución en los parámetros texturales puede atribuirse a un deterioro del nivel de organización en la polimerización de la red de sílice por la presencia de Zn, que podría estar causando alteraciones debido a la diferencia de valencia y diámetro del átomo de Zn (Ma et al. 2017). El análisis de FT-IR también apunta en esta dirección con el aumento en la anchura de las bandas Si-O-Si.

El estudio TG / DTA permite una cuantificación comparativa de la humedad adsorbida en la superficie de los vidrios. Se observa que la estabilidad frente a la adsorción de agua del vidrio mesoporoso aumenta con el aumento del contenido de Zn, obteniéndose una variación en la pérdida de masa desde un 14% para el vidrio MBG sin Zn hasta sólo el 4% para MBG-7.5Zn (Salinas et al. 2011)

En cuanto al análisis DTA, los materiales muestran un único pico exotérmico en el rango 900-950 °C, sin pérdida de masa, que corresponde por tanto a un evento de la cristalización de la muestra (Mak et al. 2000). Los resultados han indicado que esta temperatura de cristalización disminuye con el aumento en el contenido en Zn, como también ha sido indicado previamente por Kamitakahara et al. 2006. Este comportamiento podría explicarse debido a que la incorporación de Zn puede distorsionar la estructura de los enlaces siloxanos Si-O-Si, tal y como se aprecia por el aumento en la anchura de estas bandas en el infrarrojo, lo que podría producir una mayor fluidificación del material con el aumento de temperatura que favorecería la consecución de la organización necesaria para la formación de dominios cristalinos.

## **5. Conclusiones**

Los resultados obtenidos muestran la posibilidad de incorporación del elemento Zn en un material de biovidrio mesoporoso ordenado hasta un porcentaje del 7.5%.

Si bien, se observa una disminución de un 4% (entre MBG y MBG-2.5Zn), 14% (entre MBG-MBG7.5Zn) y 19% (entre MBG y MBG-7.5Zn) en la superficie específica con el aumento en la incorporación de Zn, los valores para estos parámetros siguen siendo muy altos en comparación con los vidrios convencionales obtenidos por fundido.

Los resultados obtenidos son muy interesantes para el propósito de este trabajo, ya que proporcionan un material vítreo de composición biocompatible y con propiedades texturales avanzadas donde se ha incorporado Zn.

Estas propiedades texturales van a proporcionar “a priori” a los materiales una mayor reactividad y la capacidad de incorporar biomoléculas y agentes terapéuticos para asistir a los procesos de regeneración.

Tras comprobar que con la adición de un 7.5% de Zn las propiedades físico-químicas del material no son alteradas de forma significativa, se decide que ésta composición (MBG-7.5Zn), será la utilizada en el siguiente capítulo para la síntesis de biomateriales colágeno-cerámico.



## 6. Referencias

Aguiar H, Serra J, González P. Los vidrios bioactivos en el mundo de los biomateriales. *An Quím* 2011;107:237-42.

Arcos D; Vallet-Regí M. Sol-Gel Silica-Based Biomaterials and Bone Tissue Regeneration. *Acta Biomater* 2010;6:2874-88.

Atkinson I, Anghel EM, Predoana L, Mocioiu OC, Jecu L, Raut I, Munteanu C, Culita D, Zaharescu M. Influence of ZnO addition on the structural, in vitro behavior and antimicrobial activity of sol-gel derived CaO-P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>-SiO<sub>2</sub> bioactive glasses. *Ceram Int* 2016;42:3033-45.

Balamurugan A, Balossier G, Kannan S, Michel J, Rebelo HS, Ferreira JM. Development and in vitro characterization of sol-gel derived CaO-P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>-SiO<sub>2</sub>-ZnO bioglass. *Acta Biomater* 2007;3:255-62.

Bini M, Grandi S, Capsoni D, Mustarelli P, Saino E. SiO<sub>2</sub>-P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>-CaO glasses and glass-ceramics with and without ZnO:relationships among composition, microstructure, and bioactivity. *J Phys Chem C* 2009;113:8821-28.

Brandão-Neto J, Stefan V, Mendonça BB, Bloise W, Castro AVB. The essential role of zinc in growth. *Nutr Res* 1995;15:335-58.

Brinker, BC; Lu Y; Sellinger A; Fan H. Evaporation-Induced Self- Assembly: Nanostructures Made Easy. *Adv Mater* 1999;11:579-85.

Cho SB, Nakanishi K, Kokubo T, Soga N, Ohtsuki C, Nakamura T, Kitsugi T, Yamamuro T. Dependence of apatite formation on silica gel on its structure: effect of heat treatment. *J Am Ceram Soc* 1995;78:1769-74.

Ciriminna R, Fidalgo A, Pandarus V, Béland F, Ilharco LM, Pagliaro M. The Sol-

Gel Route to Advanced Silica-Based Materials and Recent Applications. *Chem Rev* 2013;113:6592-620.

Coleman JE. Zinc proteins: enzymes, storage proteins, transcription factors, and replication proteins. *Annu Rev Biochem* 1992; 61:897-946.

Colilla M, Vallet-Regí M. Novel insights into ordered mesoporous materials for biomedical applications. *Bioceramics: Properties, Preparation and Applications* 2009:159-96.

Gómez-Cerezo N, Casarrubios L, Morales I, Feito MJ, Vallet-Regí M, Arcos D, Portolés MT. Effects of a mesoporous bioactive glass on osteoblasts, osteoclasts and macrophages. *J Colloid Interface Sci* 2018;528:309-20.

Gupta R; Kumar A. Bioactive Materials for Biomedical Applications Using Sol-Gel Technology. *Biomed Mater* 2008;3:34005-20.

Hamadouche M; Meunier A; Greenspan DC; Blanchat C; Zhong JP; La Torre GP; Sedel L. Long-Term in Vivo Bioactivity and Degradability of Bulk Sol-Gel Bioactive Glasses. *J Biomed Mater Res* 2001;54:560-6.

Hench LL, Splinter RJ, Allen WC, Greenlee TK. Bonding mechanisms at the interface of ceramic prosthetic materials. *J Biomed Mater Res Symp* 1971;334:117-41.

Hench LL. Bioglass:10 milestones from concept to commerce. *J Non-Cryst Solids* 2016;432:2-8.

Hench LL, Wheeler D and Greenspan D. Molecular control of bioactivity in solgel glasses. *Journal of Sol-Gel Science and Technology*. 1998;13:245-250.

Hench LL; Xynos ID; Polak JM. Bioactive Glasses for in Situ Tissue Regeneration. *J Biomater Sci Polym Ed* 2004;15:543-62.

Hench LL, West JK. The sol-gel process. *Chem Rev* 1990; 90:33-72.

Hench LL. Bioceramics: From Concept to Clinic. *J Am Ceram Soc* 1991;74:1487-510.

Hench LL. The story of bioglass. *J Mater Sci Mater Med* 2006;17:967-78.

Holloway WR, Collier FM, Herbst RE, Hodge JM, Nicholson GC. Osteoblast-mediated effects of zinc on isolated rat osteoclasts: inhibition of bone resorption and enhancement of osteoclast number. *Bone* 1996;19:137-42.

Hoppe A, Güldal NS, Boccaccini AR. A review of the biological response to ionic dissolution products from bioactive glasses and glass-ceramics. *Biomaterials* 2011;32:2757-74.

Huang M, Hill RG, Rawlinson SCF. Zinc bioglasses regulate mineralization in human dental pulp stem. *Dent Mat* 2017;33:543-52.

Isobe H, Kaneko K. Porous Silica Particles Prepared from Silicon Tetrachloride Using Ultrasonic Spray Method. *J Colloid Interface Sci* 1999;212:234-41.

Jones JR. Review of bioactive glass: From Hench to hybrids. *Acta Biomater* 2013;9:4457-86.

Kamitakahara M, Ohtsuki C, Inada H, Tanihara M, Miyazaki T. Effect of ZnO addition on bioactive CaO–SiO<sub>2</sub>–P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>–CaF<sub>2</sub> glass–ceramics containing apatite and wollastonite. *Acta Biomater* 2006;2:467-71.

Kargozar S, Montazerian M, Hamzehlou S, Kim HW, Baino F. Mesoporous bioactive glasses: Promising platforms for antibacterial strategies. *Acta Biomater* 2018;81:1-19.

Karthika A, Kavitha L, Surendiran M, Kannan S, Gopi D. Fabrication of divalent ion substituted hydroxyapatite/gelatin nanocomposite coating on electron beam treated titanium: mechanical, anticorrosive, antibacterial and bioactive evaluations. *RSC Adv* 2015;5:47341-52.

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

Kwun IS, Cho YE, Lomeda RAR, Shin HI, Choi JY, Kang YH, Beattie JH. Zinc deficiency suppresses matrix mineralization and retards osteogenesis transiently with catch-up possibly through Runx 2 modulation. *Bone* 2010;46:732-41.

Lang C, Murgia C, Leong M, Tan LW, Perozzi G, Knight D, Ruffin R, Zalewski P. Anti-inflammatory effects of zinc and alterations in zinc transporter mRNA in mouse models of allergic inflammation. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2007;292:L577-84.

Lázaro GS, Santos SC, Resende CX, dosSantos EA. Individual and combined effects of the elements Zn, Mg and Sr on the surface reactivity of a SiO<sub>2</sub>-CaO-Na<sub>2</sub>O-P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> bioglass system. *J Non-Cryst Solids* 2014;386:19-28.

Li HC, Wang DG, Chen CZ. Effect of zinc oxide and zirconia on structure, degradability and in vitro bioactivity of wollastonite. *Ceram Int* 2015;41:10160-69.

Li R, Clark AE, Hench LL. An investigation of bioactive glass powders by sol-gel processing. *J Appl Biomater* 1991;2:231-9.

Linati L, Lusvardi G, Malavasi G, Menabue L, Menziani MC, Mustarelli P, Segre U. Qualitative and quantitative structure-property relationships analysis of multicomponent potential bioglasses. *J Phys Chem B* 2005;109:4989-98.

Liu W, Su P, Gonzales A 3rd, Chen S, Wang N, Wang J, Li H, Zhang Z, Webster TJ. Optimizing stem cell functions and antibacterial properties of TiO<sub>2</sub> nanotubes incorporated with ZnO nanoparticles: experiments and modeling. *Int J Nanomedicine* 2015;10:1997-2019.

Lusvardi G, Malavasi G, Menabue L, Menziani MC. Synthesis characterization, and molecular dynamics simulation of Na<sub>2</sub>O-CaO-SiO<sub>2</sub>-ZnO glasses. *J Phys Chem B* 2002;106:9753-60.

Ma J, Huang BX, Zhao XC, Ban CL, Hao XH, Wang CZ. Substitutions of zinc in mesoporous silicate-based glasses and their physicochemical and biological properties. *Journal of Non-Crystalline Solids* 2018;491:98-105.

Mak CL, Lai B, Wong KH. Fabrication and characterization of sol-gel derived potassium sodium strontium barium niobate. *J Sol-Gel Sci Technol* 2000;18:225-

33.

Maret W. Zinc in cellular regulation: the nature and significance of "Zinc Signals". *Int J Mol Sci* 2017;18:2285-96.

Oudadesse H, Dietrich E, Gal YL, Pellen P, Bureau B, Mostafa AA, Cathelineau G. Apatite forming ability and cytocompatibility of pure and Zn-doped bioactive glasses. *Biomed Mater* 2011;6:035006.

Pasquet J, Chevalier Y, Couval E, Bouvier D, Noizet G, Morlière C, Bolzinger MA. Antimicrobial activity of zinc oxide particles on five microorganisms of the Challenge Tests related to their physicochemical properties. *Int J Pharm* 2014;460:92-100.

Popp JR, Love BJ, Goldstein AS. Effect of soluble zinc on differentiation of osteoprogenitor cells. *J Biomed Mater Res A* 2007;81:766-9.

Rabiee SM, Nazparvar N, Azizian M, Vashae D, Tayebi L. Effect of ion substitution on properties of bioactive glasses: a review. *Ceram Int* 2015;41:7241-51.

Radu D, Lai CY, Jeftinija K, Rowe EW, Jeftinija S, Lin Y. A polyamidoaminedendrimer-capped mesoporous silica nanosphere-based gene transfection reagent. *J Am Chem Soc* 2004;126:13216-7.

Ramiro ML, Santos L, Borrego S, Becerra J, Díaz A. In vitro stimulation of MC3T3-E1 cells and sustained drug delivery by a hierarchical nanostructured SiO<sub>2</sub>-CaO-P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> scaffold. *Microporous and Mesoporous Materials* 2016;229:31-43.

Riaz M, Zia R, Saleemi F, Ikram H, Bashir F. In vitro antimicrobial activity of ZnO based glass–ceramics against pathogenic bacteria. *J Mater Sci Mater Med* 2015;26:268.

Rouquérol D, Avnir CW, Fairbridge DH, Everett JH, Haynes N, Pericone J DF, Ramsay KSW, Sing KK Unger. *Pure Appl. Chem* 1994;66:1739-58.

Sakka S, Yoko T. Fibers from gels. *J Non-Cryst Solids* 1992;147&148:394-403.

Sánchez-Salcedo S, Shruti S, Salinas AJ, Malavasi G, Menabue L, Vallet-Regí MV. In vitro antibacterial capacity and cytocompatibility of SiO<sub>2</sub>-CaO-P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> meso-macroporous glass scaffolds enriched with ZnO. *J Mater Chem B* 2014;2:4836-47.

Sepulveda P, Jones JR y Hench LL. Characterization of melt-derived 45S5 and sol-gel-derived 58S bioactive glasses. *J Biomed Mater Res* 2001;58:734-40.

Shruti S, Salinas AJ, Lusvardi G, Malavasi G, Menabue L, Vallet-Regi M. Mesoporous bioactive scaffolds prepared with cerium-, gallium- and zinc-containing glasses. *Acta Biomaterialia* 2013;9:4836-44.

Takatsuka T, Tanaka K, Iijima Y. Inhibition of dentine demineralization by zinc oxide: in vitro and in situ studies. *Dent Mater* 2005;21:1170-7.

Tang ZL, Wasserloos K, St. Croix CM, Pitt BR. Role of zinc in pulmonary endothelial cell response to oxidative stress. *Am J Physiol* 2001;281:243-49.

Tapiero H, Tew KD. Trace elements in human physiology and pathology: zinc and metallothioneins. *Biomed Pharmacother* 2003;57:399-411.

Toledano M, Sauro S, Cabello I, Watson T, Osorio R. A Zn-doped etch-and-rinse adhesive may improve the mechanical properties and the integrity at the bonded-dentin interface. *Dent Mater* 2013;29:e142-52.

Toledano M, Osorio R, Osorio E, García-Godoy F, Toledano-Osorio M, Aguilera FS. Advanced zinc-doped adhesives for high performance at the resin-carious dentin interface. *J Mech Behav Biomed Mater* 2016;62:247-67.

Vallet-Regi M, Salinas AJ. Role of the Short Distance Order in Glass Reactivity. *Materials (Basel)* 2018;11:11.

Wajdaa A, Goldmannb WH , Detschc R , Boccaccinic AR , Sitarza M. Influence of zinc ions on structure, bioactivity, biocompatibility and antibacterial potential of melt-derived and gel-derived glasses from CaOSiO<sub>2</sub> system. *Journal of Non-Crystalline Solids* 2019;511:86-99.

Wang YW, Cao A, Jiang Y, Zhang X, Liu JH, Liu Y, Wang H. Superior antibacterial activity of zinc oxide/graphene oxide composites originating from high zinc concentration localized around bacteria. *ACS Appl Mater Interfaces*. 2014 Feb 26;6(4):2791-8.

Williams DF. On the nature of biomaterials. *Biomaterials* 2009;30:5897-909.

Yan X, Yu C, Zhou X, Tang J, Zhao D. Highly ordered mesoporous bioactive glasses with superior in vitro bone-forming bioactivities. *Angew Chem Int Ed Engl* 2004;43:5980-4.

Yan X; Deng HX; Huang XH; Lu GQ; Qiao SZ; Zhao DY; Yu CZ. Mesoporous Bioactive Glasses. Synthesis and Structural Characterization. *J Non Cryst Solids* 2005;351:3209-17.



Yoshida K, Tanagawa M, Kamada K, Hatada R, Bada K, Inoi T, Atsuna M. Silica coatings formed on nobel dental casting alloy by the sol-gel dipping process. *J Biomed Mater Res* 1999;46:221-7.

Zhang J, Park YD, Bae WJ, El-Fiqi A, Shin SH, Lee EJ, Kim HW, Kim EC. Effects of bioactive cements incorporating zinc-bioglass nanoparticles on odontogenic and angiogenic potential of human dental pulp cells. *J Biomater Appl* 2015;29:954-64.



## CAPÍTULO 2

# **Procesado y caracterización de biomateriales compuestos de colágeno (C) y vidrio bioactivo mesoporoso (MBG): C-MBG y C-MBG-Zn**

### **1. Introducción**

Las técnicas terapéuticas de regeneración basadas en la ingeniería de tejidos incluyen el uso de biomateriales, a modo de estructuras tridimensionales (3D) que proporcionan el microambiente físico-químico adecuado para las células responsables de la regeneración de los tejidos dañados o enfermos. Estos biomateriales 3D son denominados frecuentemente en la literatura como andamios (traducción del término inglés “scaffolds”), y tanto su composición química como sus propiedades físicas son críticas para la respuesta celular.

Varias son las propiedades que deben cumplir estos biomateriales, según distintos autores (Liu and Bhatia 2004; Hollister 2005; Prescott et al. 2008; O'Brien 2011; Gathani y Raghavendra 2016; Matoug-Elwerfelli et al. 2018):

- a) Biocompatibilidad.
- b) Permitir la adhesión celular, así como promover su proliferación, transporte y diferenciación.
- c) Ser biodegradable, para poder ser sustituido por el nuevo tejido formado sin necesidad de extracción quirúrgica.
- d) La estructura debe ser altamente porosa, de poros abiertos e interconectados, de forma que permita la vascularización y la distribución uniforme de células para facilitar la formación de tejido homogéneo.
- e) Permitir el transporte efectivo de nutrientes, oxígeno y los productos de desecho.
- f) Tener la resistencia física y mecánica adecuada para su función en el lugar de implantación.
- g) Desde el punto de vista de su producción para la aplicación clínica deben ser biomateriales que se puedan obtener de forma reproducible y rentable.

Hasta el momento, como se ha expuesto en la introducción, no existen pautas de tratamiento aplicables en clínica que promuevan la regeneración del complejo dentino-pulpar de forma predecible (Diógenes et al. 2016; Altaii et al. 2017). Según los últimos avances en ingeniería de tejidos, la verdadera innovación en el desarrollo de nuevas terapias de endodoncia regenerativa aplicables en clínica involucran el uso de materiales que faciliten la regeneración de la pulpa dental a partir de cualquier resto de tejido vital, apoyando así la capacidad innata de auto reparación de dicho tejido (Colombo et al. 2014). Es por ello, que gracias a la amplia gama de biomateriales, nos debemos preguntar hasta qué punto podemos

optimizar nuestras estrategias para la regeneración del complejo de dentina y pulpa con la ayuda de los mismos, los cuales son versátiles, permitiendo su ajuste para cada enfoque terapéutico específico (Rambhia y Ma 2015).

### **1.1. Biomateriales utilizados en REPs**

Según los protocolos de actuación aceptados por la AAE y la Sociedad Europea de Endodoncia (European Society of Endodontology; ESE) (Galler et al. 2016; Staffoli et al. 2019), ante casos candidatos a REPs, está estandarizado el uso del coágulo sanguíneo, plasma rico en plaquetas (Platelet Rich Plasma, PRP) (Torabinejad y Turman 2011; Jadhav et al. 2012; Gomes et al. 2013; Jadhav et al. 2013; Lata et al. 2015; Sachdeva et al. 2015), fibrina rica en plaquetas (Platelet Rich Fibrin, PRF) (Nagaveni et al. 2016; Meza et al. 2019) o una matriz de fibrina autóloga (Autologous Fibrin Matrix, AFM), por parte de la AAE, mientras que la ESE sólo recoge en su manuscrito el uso del coágulo sanguíneo para tratamientos REPs (Galler et al. 2016). En multitud de casos clínicos, ha sido comprobado, que estas opciones de tratamiento proporcionan capacidad de desarrollo y engrosamiento de las paredes radiculares, así como resolución de signos y síntomas de patología periapical (Banchs y Trope 2004; Hargreaves et al. 2008; Shah et al. 2008; Nosrat et al. 2011; Chen et al. 2013; El Ashiry et al. 2016; Altaï et al. 2017; Ulusoy et al. 2019), refiriendo tasas de supervivencia del 100% (Jeeruphan et al. 2012).

Sin embargo, los estudios histológicos en animales tras tratamiento de revascularización, no afirman que se forme un nuevo tejido dentino-pulpar que reproduzca la arquitectura y la funcionalidad del tejido original (Wang et al. 2010; Shimizu et al. 2013). Lo que realmente se forma es un tejido compuesto de

cemento y hueso que puede interpretarse por radiografía como continuación de formación radicular, pero el verdadero objetivo de regeneración funcional del complejo dentino-pulpar puede no lograrse, no encontrándose diferencia en los resultados tras tratamientos realizados con coágulo de sangre, PRP, PRF o AFM (Torabinejad y Turman 2011; Jadhav et al. 2012; Martin et al. 2013; Zhu et al. 2013; Bezgin et al. 2014; Narang et al. 2015; Sachdeva et al. 2015; Galler 2018).

Se ha argumentado que las limitaciones de la aplicación de los anteriores biomateriales se derivan principalmente de una composición indefinida, presencia de células inmunes o biodegradación desconocida, entre otros. Esto es, los citados biomateriales carecen de control temporal y espacial específico sobre la señalización biológica necesaria para la localización y diferenciación de las células progenitoras. Además, la comprensión de los resultados logrados con la aplicación de estos biomateriales son bastante escasas (Schmalz y Smith, 2014). Es por ello, que la falta de evidencia científica impida el uso extensivo de un protocolo de tratamiento predecible en el entorno clínico (Alagl et al. 2017). En consecuencia, las últimas investigaciones en odontología regenerativa están siendo dirigidas a la fabricación de biomateriales que solventen las carencias de los ya aplicados en clínica.

Según Palma y cols. (Palma et al. 2017), hasta ahora, sólo esponjas de colágeno reticuladas insolubles se han asociado con mejores resultados en la formación de nuevo tejido (Yamahuchi et al. 2011).

Recientemente, Galler y cols. (Galler et al. 2018) han comparado hidrogeles de distintos tipos de biomateriales, naturales versus sintéticos, con o sin modificaciones funcionales, aplicados in vitro e in vivo para ingeniería de tejidos de pulpa dental. Los biomateriales naturales consistían en colágeno o fibrina y se compararon con dos grupos de biomateriales sintéticos basados en polietilenglicol (Polyethylene Glicol; PEG) y péptidos autoensamblados (Self-Assembling Peptide;

SAP). El uso de materiales naturales como el colágeno en formato hidrogel, condujo a una mayor viabilidad de las células madre de la pulpa dental y la formación de tejido similar a la pulpa en comparación con todos los materiales sintéticos.

Por otra parte, los avances más recientes están siendo centrados en la posibilidad de biomateriales compuestos en los que se incorporan una fase inorgánica en una matriz polimérica, ya sea sintética o natural (Pérez et al. 2013) con el objetivo de mejorar las propiedades del biomaterial (Baino et al. 2017). En general, cabe esperar que el empleo de biomateriales compuestos (híbridos polímero-cerámico), presenten un equilibrio entre las ventajas y desventajas de sus componentes individuales y proporcionen por tanto propiedades mejoradas (Liu y Bhatia 2004). En este sentido, los tejidos presentes en el complejo dentino-pulpar son una combinación de estructuras con distinto contenido en biopolímero (colágeno) y compuestos biocerámicos en forma de fosfatos de calcio. Por tanto, la utilización de biomateriales compuestos de biopolímero-cerámico parece la más indicada para una aproximación biomimética con la matriz extracelular natural de los tejidos del complejo dentino-pulpar.

La síntesis de biomateriales compuestos de biopolímero-cerámico está más extendida para el caso de aplicaciones en regeneración ósea. Concretamente, son numerosos los estudios recientes que desarrollan biomateriales que incluyen la integración de cerámicas bioactivas para facilitar los procesos de regeneración. Particularmente, si nos centramos en estudios con versiones avanzadas de vidrio bioactivo, como los vidrios bioactivos mesoporosos (MBGs), encontramos la combinación de MBG con PLGA (Li et al. 2009; Wu et al. 2009), alginato (Wu et al. 2010; Yun et al. 2011; Luo et al. 2013), seda (Wu et al. 2011; Chandrasekaran et al. 2016), quitosano (Jia et al. 2011; Zhu et al. 2019) o colágeno (Montalbano et al. 2018), entre otros. Estos estudios encuentran que al añadir el material MBG al

polímero, la bioactividad *in vitro* en SBF mejora, así como la versatilidad para incorporar medicamentos o factores funcionales que pueden ser liberados en el lugar de implantación.

Entre estos estudios, cabe destacar el estudio de El-Fiqui y cols. (El-Fiqui et al. 2013). Estos autores producen mezclas de una determinada cantidad de MBG que han funcionalizado con grupos aminos en su superficie (para permitir enlaces con grupos aminos del colágeno) con hidrogel de colágeno. Al comparar dicho material compuesto con el colágeno sin cerámico, encuentran que la incorporación de MBG a la matriz de colágeno mejora la estabilidad mecánica, reduce la degradación hidrolítica y enzimática, aumenta la rigidez y previene la contracción al contactar con las células. Además, en los ensayos *in vitro* con MSCs de ratas encuentran que el biomaterial con MBG aumenta la viabilidad celular y la extensión del citoesqueleto al ser visualizado con microscopía confocal de fluorescencia. Concluyen así que, los hidrogeles compuestos de colágeno y MBG, presentan una gran promesa para desarrollar biomateriales aplicables a la ingeniería de tejidos duros.

Sin embargo, hasta el momento, los estudios de este tipo de biomateriales compuestos para explorar su utilización en la regeneración del complejo dentino-pulpar son escasos. Moonsei y cols. (Moonsei et al. 2019) fabrican estructuras tridimensionales a base de gelatina con contenido en un 10-20% de vidrio bioactivo funcionalizado con boro. Las estructuras se prepararon mediante métodos de liofilización / prensado de moldes metálicos y observaron que la bioactividad *in vitro* en SBF mejoró con la adición del vidrio bioactivo modificado con boro, así como la viabilidad celular, actividad de la fosfatasa alcalina y capacidad de mineralización de hDPSCs, siendo necesario futuros estudios *in vivo*.



Por lo anterior, así como por la escasa literatura al respecto, este trabajo de Tesis pretende el desarrollo de un biomaterial avanzado para REPs, que aporte nuevas propiedades para estimular el proceso de regeneración del complejo dentino-pulpar. La aproximación es mediante el diseño y procesado de un biomaterial con características, composición, estructura y formato biomimético con el tejido dentino-pulpar. Para ello se van a ensayar varias composiciones basadas en una matriz porosa de biopolímero (colágeno de tipo I) a la que se va a integrar MBG en forma de micropartículas. Se van a estudiar distintas variables como la proporción de los componentes colágeno/MBG y la modificación de la composición del material MBG, el cual va a ser funcionalizado con un elemento con propiedades terapéuticas, como es el Zinc (Zn). Se han diseñado composiciones que incluyen un contenido de MBG en el rango entre el 5 y el 15 % en peso, que permitan obtener estructuras finales con una consistencia más bien elástica (blanda, “soft”), para que puedan ser introducidas adecuadamente en el restringido espacio de trabajo que ofrece el canal radicular.

## **2. Procedimiento experimental**

### **2.1. Procesado de biomateriales compuestos colágeno-MBG (C-MBG) y colágeno-MBG-Zn (C-MBG-Zn).**

El procesado de los distintos biomateriales requiere la realización de varias etapas. En una primera etapa se sintetiza el material biocerámico MBG y MBG modificado con Zn, MBG-Zn. El procedimiento de síntesis de las distintas composiciones MBG se ha detallado en el capítulo 1. Para las preparaciones de este capítulo se van a utilizar los materiales MBG y MBG-7.5Zn. Se decidió la elección del material MBG-7.5Zn frente al MBG-2.5Zn y MBG-5Zn también sintetizados en el capítulo anterior, porque se comprobó que a su más alto contenido en Zn se

sumaban unos parámetros de mesoestructura (area superficial y distribución ordenada de nanoporos) notables.

La siguiente etapa consiste en la síntesis del precursor de colágeno que se basa en una solución de nanofibrillas de colágeno estructurado, es decir, que presentan el patrón de contraste con escalonamiento D (Dominios; D) de 67 nm, característico del colágeno fibrilar de tipo I. Para ello, se utilizó una solución de colágeno tipo I (BD Biosciences) en una concentración de 3.1 mg mL<sup>-1</sup>. La formación de fibrillas nanoestructurada, con escalonamiento D, también referido como estructura cuaternaria (Kadler et al. 1996), se realizó siguiendo el protocolo puesto a punto por nuestro grupo (Borrego-González, 2016; Romero et al. 2018). El procedimiento consiste en la fibrillogénesis de colágeno mediante autoensamblaje de las moléculas de atelocolágeno presentes en la solución del reactivo de colágeno. Para ello, el reactivo de colágeno se mezcla con una solución tampón de composición KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (Sigma-Aldrich) / Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (Sigma-Aldrich) que se ajusta para una fuerza iónica 200 mM y pH 7.40. El tratamiento se realiza en tubos eppendorf de 2 mL que se mantienen en un termobloque a 34 °C durante 24 h. Una vez transcurridas las 24 h, la suspensión se centrifuga y se lava con agua destilada tres veces para eliminar las sales procedentes de la solución tampón.

Posteriormente, se procede a la incorporación del material MBG y MBG-7.5Zn en una proporción de 5 y 15 % en peso. Para ello se mezclan las cantidades adecuadas de la solución de fibrillas de colágeno y de micropartículas de MBG, tal y como se especifica en la Tabla 2.1.

**Tabla 2.1.** Cantidad de los distintos reactivos que constituyen los biomateriales sintetizados.

<b>Biomaterial</b>	<b>Reactivos</b>		
	Solución colágeno (mL)	MBG (mg)	MBG-7.5Zn (mg)
<b>C</b>	1	-	-
<b>C-5MBG</b>	1	0.21	-
<b>C-15MBG</b>	1	0.63	-
<b>C-5MBG-Zn</b>	1	-	0.21
<b>C-15MBG-Zn</b>	1	-	0.63

Concentración de la solución de colágeno: 3.57 mg mL<sup>-1</sup>. Este dato corresponde al análisis realizado en la Tesis Borrego-González 2016.

Las mezclas preparadas de colágeno y MBG se mantienen en agitación a 500 rpm durante 1h para asegurar la homogeneidad de la misma.

Para el conformado de las piezas de biomaterial se toman 100  $\mu$ L de la solución anterior y se añaden a pocillos de una placa de 96 pocillos de poliestireno (655161, Greiner Bio-one). A continuación, las placas se introducen en un congelador a -80 °C y se mantienen durante 24 h. Posteriormente, la placas se introducen en un equipo de liofilización con placa de control de temperatura (EPSILON 2-4 CHRIST), que permite un tratamiento de liofilización a -30 °C y 0,04 mbar durante 10 horas, y que finaliza el proceso con una rampa de temperatura hasta alcanzar la temperatura ambiente.

Finalmente, las piezas son extraídas de la placa de 96 pocillos y se disponen en placas de cerámica para realizar un tratamiento de entrecruzamiento por

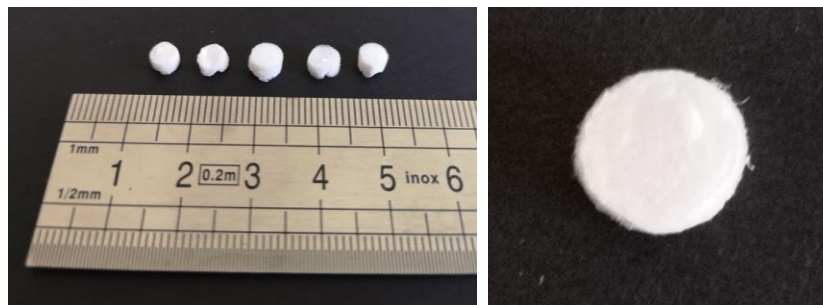
tratamiento térmico a vacío en una estufa (Mettler VO 200) utilizando 10 mbar de presión y 150 °C durante 24 horas (MG Haugh, MJ Jaasma, FJ O'Brien, J. Biomed) para estabilizar el colágeno en cuanto a sus propiedades mecánicas (Mehta et al. 2015).

## **2.2. Caracterización físico-química de los biomateriales C-MBG y C-MBG-Zn.**

Para la caracterización físico-química de los biomateriales se emplearon las técnicas de espectroscopia infrarroja (Fourier-Transform Infrared Spectroscopy, FT-IR), microscopía electrónica de barrido (Field Emission Gun-Scanning Electron Microscopy, FEG-SEM), porosimetría de Hg, medida de la capacidad de absorción de medio líquido, determinación de la biodegradación y espectroscopía de emisión atómica por plasma de acoplamiento inducido (Inductively Couple Plasma Atomic Emission Spectroscopy, ICP-AES), utilizando los procedimientos y parámetros de medida especificados en el Anexo1.

## **3. Resultados**

Las distintos biomateriales procesados se presentan en la Figura 2.1. Se trata de piezas de color blanco y consistencia esponjosa con geometría cilíndrica de  $4.70 \pm 0.15$  mm de diámetro y  $2.60 \pm 0.23$  mm de altura.



**Figura 2.1.** Fotografías digitales de los materiales sintetizados. En la imagen de la izquierda, y de izquierda a derecha se presentan los materiales: colágeno (C); colágeno con 5% MBG (C-5MBG); colágeno con 15%MBG (C-15MBG); colágeno con 5%MBG-Zn (C-5MBG-Zn) y colágeno con 15%MBG-Zn (C-15MBG-Zn). La fotografía de la derecha corresponde a una ampliación del material C.

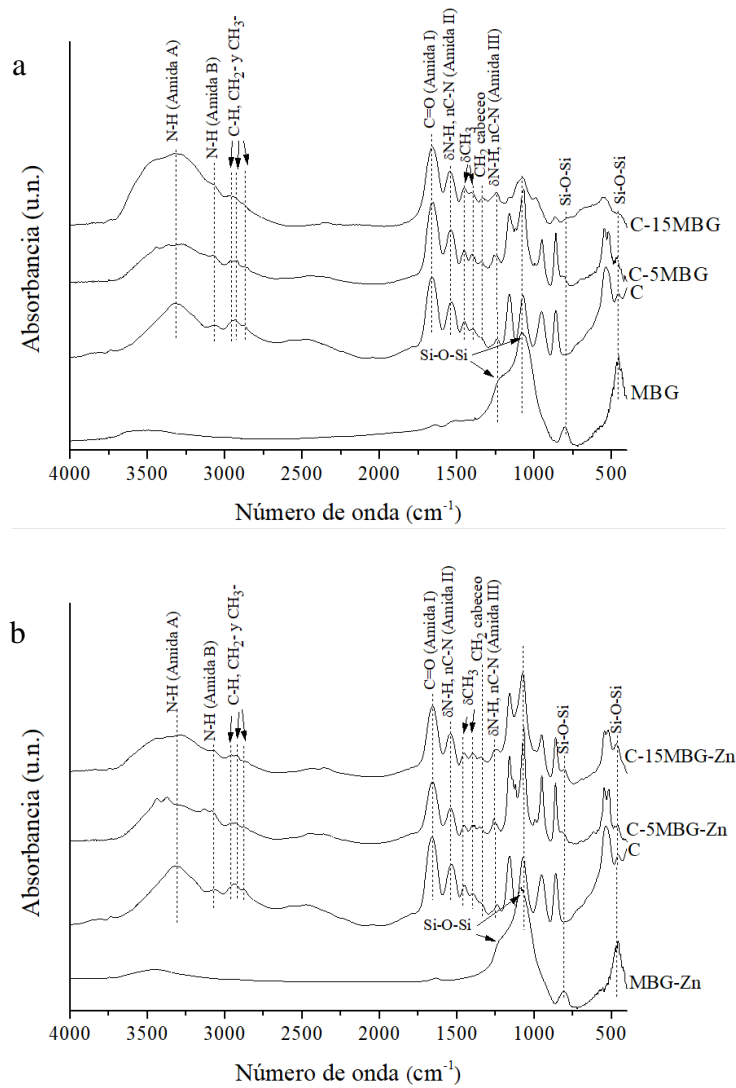
En la Tabla 2.2 se muestra el peso promedio obtenido para los distintos biomateriales.

**Tabla 2.2.** Peso promedio medido para las piezas de los biomateriales procesados.

	<b>C</b>	<b>C-5MBG</b>	<b>C-15MBG</b>	<b>C-5MBG- Zn</b>	<b>C-15MBG- Zn</b>
<b>Peso (mg)</b>	$0.88 \pm 0.00$	$1.06 \pm 0.00$	$1.11 \pm 0.00$	$0.92 \pm 0.00$	$1.05 \pm 0.00$

Se observa que el peso de las piezas de biomaterial aumenta con la incorporación de MBG y es ligeramente mayor para las composiciones que incorporan MBG libre de Zn.

La Figura 2.2 presenta los espectros FT-IR para los biomateriales C-MBG (a) y C-MBG-Zn (b).

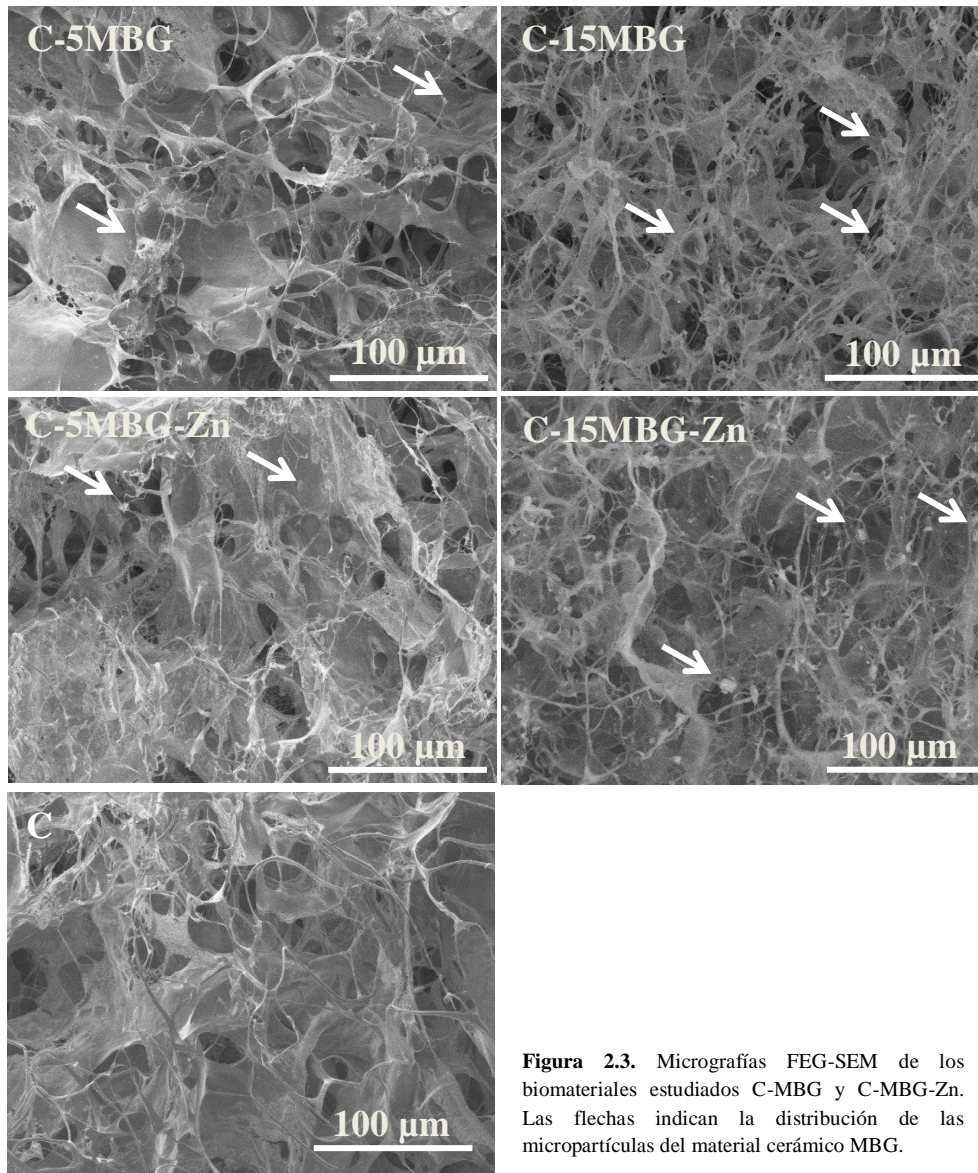


**Figura 2.2.** Espectros FT-IR de los biomateriales procesados a) C-MBG y b) C-MBG-Zn en comparación con las muestras control (biomaterial C) y los materiales en forma de partículas MBG y MBG-Zn. (u.n: unidades normalizadas).

Los biomateriales compuestos biopolímero-cerámico presentan un espectro donde dominan las bandas típicas para los materiales de colágeno (Muyonga et al. 2004;

Belbachir et al. 2009; De y Mello 2011; El-Fiqui et al. 2013). Las bandas más intensas se asignan a grupos amida,  $3400-3300\text{ cm}^{-1}$  (amida A),  $1660-1630\text{ cm}^{-1}$  (amida I),  $1560-1530\text{ cm}^{-1}$  (amida II) y  $1239\text{ cm}^{-1}$  (amida III). Además, se observa como la mezcla con MBG produce un cambio en la forma e intensidad de las bandas en  $1080$  y  $1230\text{ cm}^{-1}$  al superponerse con las vibraciones de las bandas Si-O-Si del material MBG situadas en  $1084$  y  $1224\text{ cm}^{-1}$ . También se detectan las bandas a  $800$  y  $460\text{ cm}^{-1}$  correspondientes a los enlaces de Si-O-Si del vidrio MBG.

Las observaciones FEG-SEM tomadas utilizando el detector de electrones retrodispersados se muestran en la Figura 2.3.

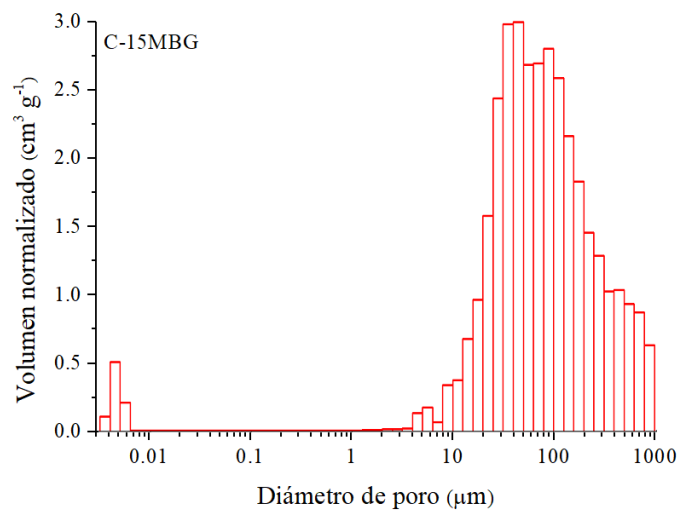
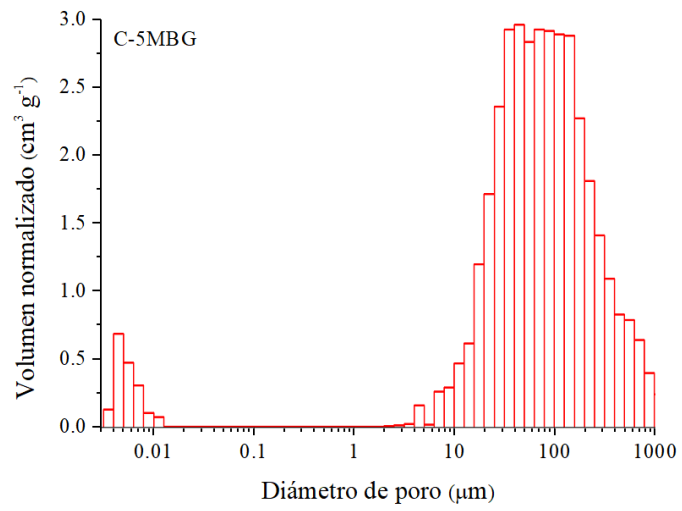


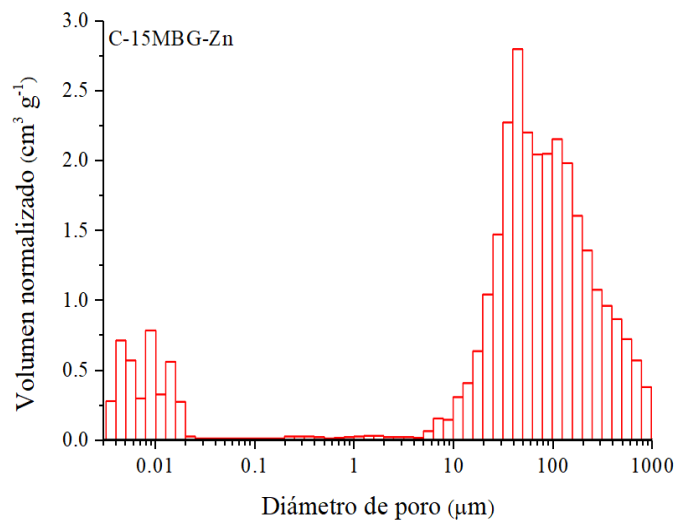
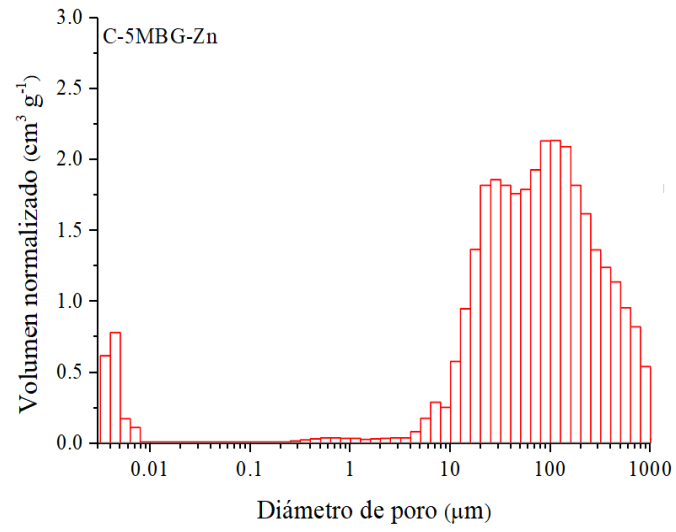
**Figura 2.3.** Micrografías FEG-SEM de los biomateriales estudiados C-MBG y C-MBG-Zn. Las flechas indican la distribución de las micropartículas del material cerámico MBG.

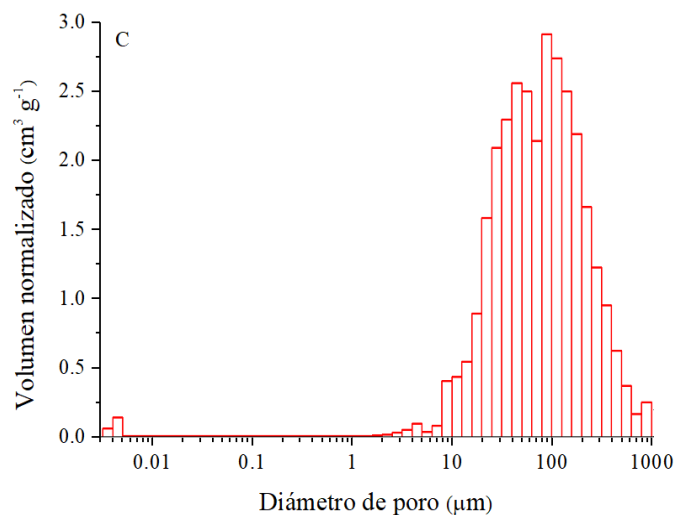


Las micrografías muestran una microestructura donde destaca un entramado fibrilar y con estructura porosa formada por el material de colágeno. Distribuidas en el entramado de colágeno se distinguen las micropartículas (señaladas en la micrografías con flechas) de MBG y MBG-Zn para los biomateriales compuestos. Estas micropartículas, se aprecian más claramente para los materiales con más contenido en cerámico C-15MBG y C-15MBG-Zn. Las partículas presentan una distribución homogénea, con un tamaño entre 2-20  $\mu\text{m}$  en buen acuerdo con los tamaños de partículas medidos por LD (ver Figura 1.3. capítulo 1).

Los histogramas de la distribución de tamaño de poro obtenidos por porosimetría de Hg se presentan en las Figura 2.3.



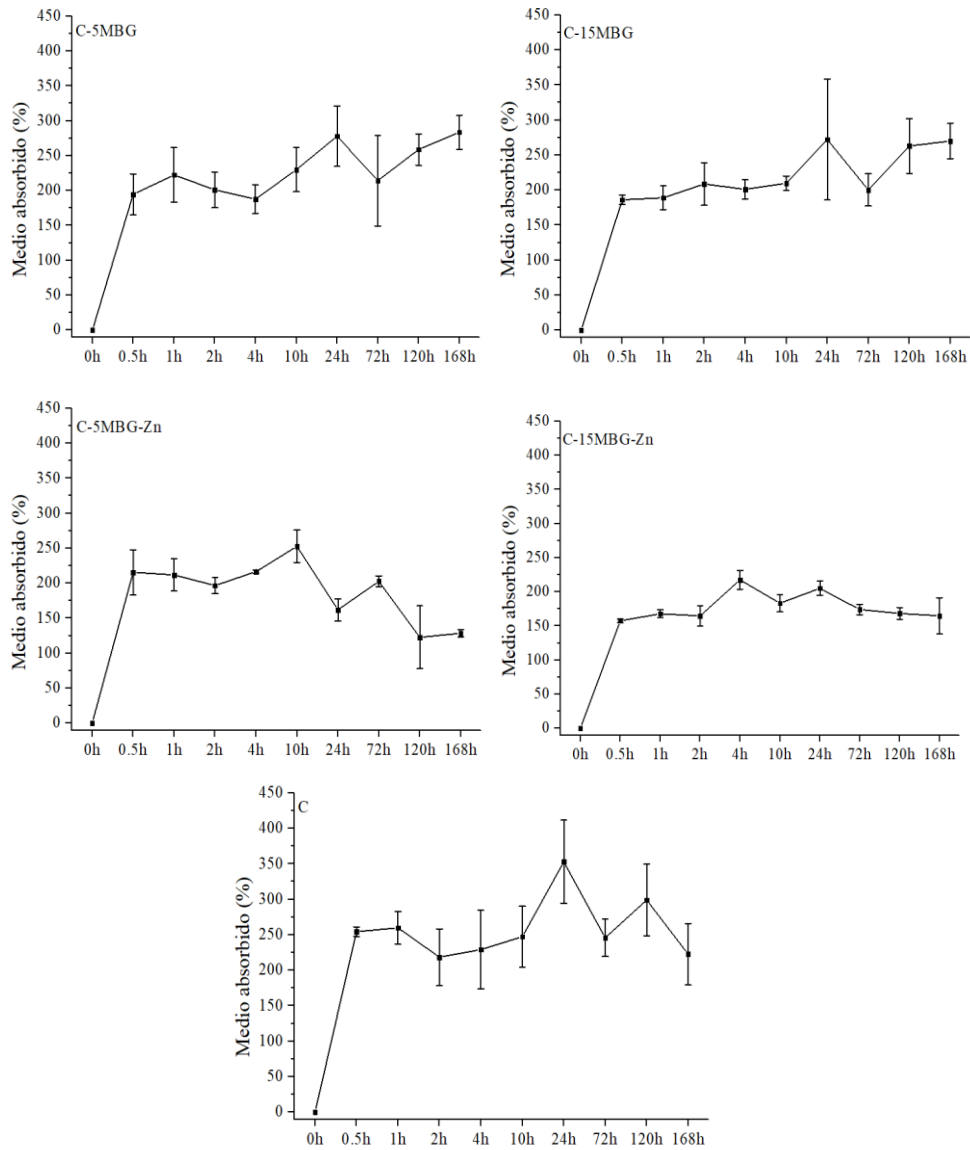




**Figura 2.3.** Distribución de tamaño de poro obtenidos por porosimetría de mercurio para los biomateriales estudiados.

Todas las gráficas muestran la existencia de dos poblaciones de poro. Una correspondiente a poros macro entre 1 y 1000  $\mu\text{m}$ , y otra de nanoporos entre 5 y 10 nm. Los resultados de la distribución de macroporos son consistentes con el tamaño de las cavidades observadas por FEG-SEM (Figura 2.2). Como cabría esperar, se observa un incremento significativo en el volumen correspondiente a poros en el rango nanométrico para los materiales con contenido en cerámico nanoporoso MBG y MBG-Zn.

Los resultados de capacidad de absorción de medio líquido por los biomateriales para distintos tiempos de ensayo, expresada en porcentaje se muestran en la Figura 2.4.

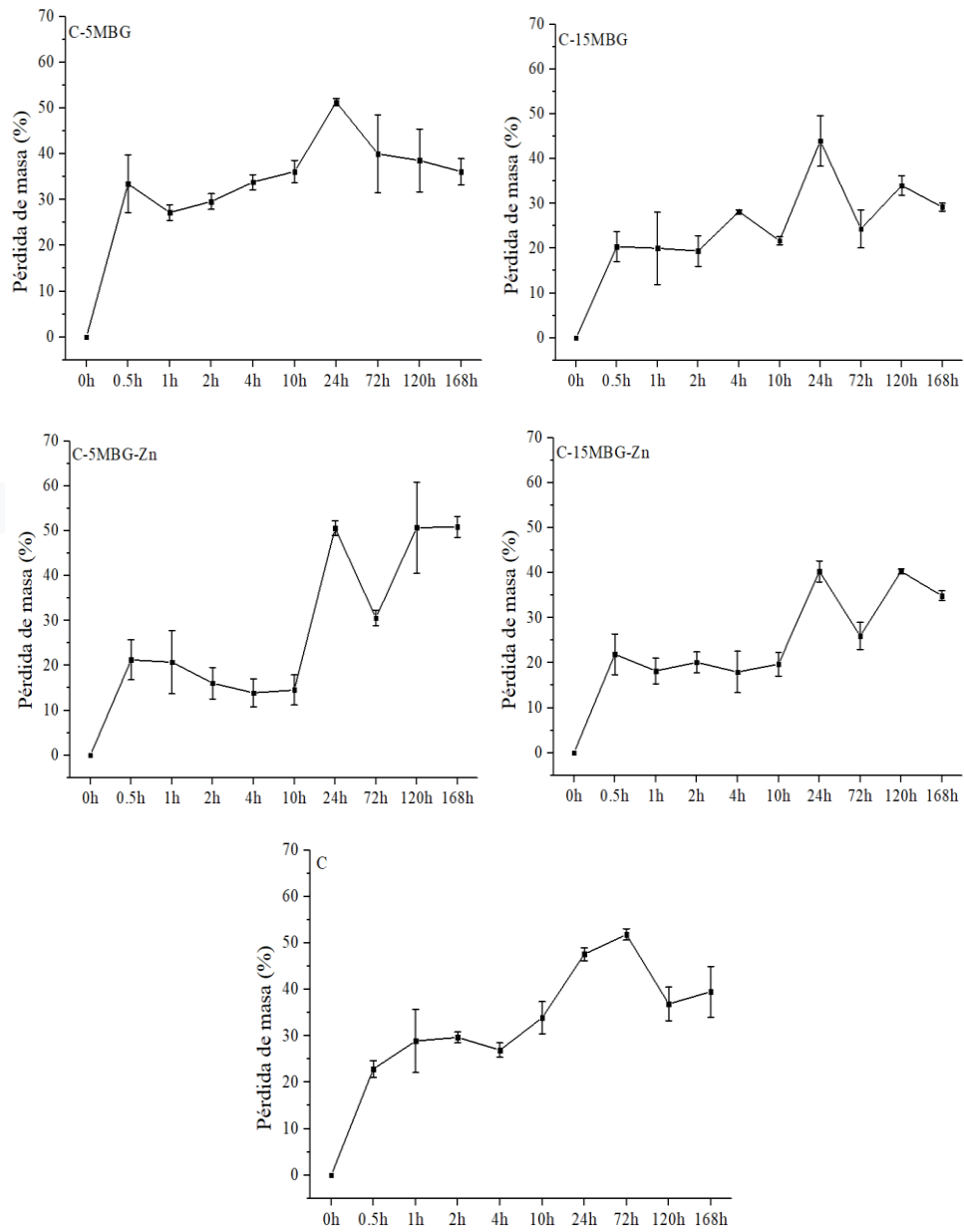


**Figura 2.4.** Capacidad de absorción de medio de cultivo por parte de los materiales C; C-5 MBG; C-15MBG; C-5MBG-Zn y C-15MBG-Zn a los tiempos 0; 0.5; 1; 2; 4; 10; 24; 72; 120 y 168 h.

Como puede observarse, la capacidad de absorción de líquido de los biomateriales está entre 200 y 350 %. Prácticamente esta capacidad de absorción se produce en

su totalidad en los 30 primeros minutos del tratamiento, aunque puede darse un incremento de hasta otro 100% hasta las 24 h. A partir de este tiempo no se observa ningún aumento, más bien una disminución que puede estar producida por la disminución de masa debida al comienzo de degradación del biomaterial. Se obtiene que el material constituido únicamente por colágeno es el que presenta mayor capacidad de absorción llegando hasta el 350 %. Así, la incorporación de MBG reduce la cantidad de masa de líquido retenida, especialmente para los biomateriales con contenido en MBG-Zn. Entre las composiciones ensayadas, destaca el comportamiento del biomaterial C-15MBG-Zn, con alto contenido en MBG-Zn, que presenta la absorción de líquido más baja y menos fluctuante durante todo el tiempo de tratamiento.

La Figura 2.5 muestra la biodegradación del biomaterial en medio de cultivo celular en los tiempos 0.5; 1; 2; 4; 10; 24; 72; 120 y 168 h.



**Figura 2.4.** Biodegradación en medio de cultivo de los materiales C; C-5MBG; C-15MBG; C-5MBG-Zn y C-15MBG-Zn a los tiempos 0; 0.5; 1; 2; 4; 10; 24; 72; 120 y 168 h.

Todos los biomateriales presentan un máximo de biodegradación con una pérdida de masa entre el 40 y 60 % a las 24 h de tratamiento. El material de colágeno alcanza el máximo, un 50 %, con más tiempo de tratamiento, 72 h. Todos los materiales presentan un patrón de degradación similar, presentando en torno a un 20% de pérdida en la primera media hora. Dicha pérdida se estabiliza hasta las 24 o 72 h, momento en el que aumenta para volver a estabilizarse hasta el final del periodo de tiempo ensayado, 168 h. Los materiales compuestos con mayor contenido en MBG son los que presentan mayor estabilidad frente a la degradación, manteniéndose en el límite más bajo, en torno al 40 % de pérdida de masa.

#### **4. Discusión**

El colágeno bovino de tipo I es quizás el material biológico más utilizado para aplicaciones terapéuticas debido a sus numerosas y exitosas aplicaciones en biomedicina (Gómez et al. 2011). Sin embargo, la rápida biodegradación a menudo requiere la estabilización de este biomaterial (Montalbano 2018). Ha sido demostrado que la combinación de colágeno y MBG presenta excelente biocompatibilidad y propiedades biomecánicas (El-Fiki et al. 2013) en estudios para regeneración de tejidos duros.

En este trabajo, la fabricación de las piezas de biomaterial se ha realizado utilizando un proceso de liofilización. Este procedimiento consigue separar el agua (u otro solvente) de una mezcla de biopolímero en agua mediante la previa congelación de la mezcla y posterior sublimación del agua en forma sólida, utilizando un tratamiento a vacío. Mediante este método, se consigue el mantenimiento de la estructura expandida del biopolímero en solución, sin que se



produzca, por el secado, el colapso o plegamiento de las fibras poliméricas para formar una película densa (Sachlos y Czernuszka 2003).

Así, los resultados de cuantificación por porosimetría de Hg muestran la generación de biomateriales porosos con un entramado fundamental de cavidades entre las 10 y las 1000 micras, y por tanto adecuado para facilitar la migración celular. Según la bibliografía, los tamaños de poro más óptimos para la osteoconducción se encuentran entre 100 y 350  $\mu\text{m}$  (Yang et al. 2001), no encontrándose una referencia concreta para los tejidos dentarios (El-Backly et al. 2008).

Como parte del procedimiento de procesado para estabilizar y mejorar las propiedades mecánicas de las piezas (Mehta et al. 2015) se ha utilizado un entrecruzamiento físico mediante tratamiento hidrotermal a vacío (Haugh et al. 2009). Esto supone una ventaja frente a otros procesos que se emplean habitualmente para este tipo de preparaciones (Fathima et al. 2004) y que conllevan la utilización de agentes químicos con distintos grado de toxicidad asociada como el glutaraldehído, la carbodiimida, formaldehído, genipina y otros (Sung et al. 2003; Angele et al. 2004)

La porosidad, el tamaño de los poros y la estructura interna juegan un papel importante en el diseño de biomateriales en la ingeniería de tejidos blandos, ya que estos factores pueden influir directamente en la absorción de agua, propiedades mecánicas y penetración celular (Yang 2017). Las observaciones FEG-SEM, y la cuantificación de la nanoporosidad de los biomateriales indican que la incorporación del material MBG y MBG-Zn en sus diferentes proporciones del 5 y el 15% no modifican sustancialmente la interconexión y estructura fibrilar de la matriz polimérica de los biomateriales. Todas las composiciones exhiben una red

macroporosa interconectada, que proporciona al material una macroporosidad altamente interconectada (abierta), tal y como se puede deducir de la comparación entre las cavidades observadas por FEG-DSEM (2D) y los datos volumétricos obtenidos por porosimetría de mercurio.

La incorporación de MBG, incluye nuevas características texturales que conllevan el aumento de superficie específica y nanoporosidad de los biomateriales (Figura 2.3). Las imágenes de FEG-SEM muestran una distribución homogénea de las micropartículas inorgánicas de MBG dentro de la matriz de colágeno. Así, no se han encontrado aglomerados importantes de partículas, lo que sugiere que se ha utilizado un procedimiento exento de efectos no deseados de precipitación o apelmazamiento del material durante el protocolo de preparación. La inclusión de las micropartículas de MBG, tiene un efecto significativo en la estabilización de las piezas de biomaterial que se traduce en una contención en la cantidad de medio líquido absorbido y en la pérdida de masa por biodegradación.

## **5. Conclusiones**

Los resultados presentados en este capítulo muestran un procedimiento reproducible para la generación de piezas de biomateriales compuestos de una matriz biopolimérica de colágeno y de material de vidrio bioactivo nanoporoso MBG.

Los resultados indican que con este método se pueden obtener piezas con un contenido en cerámico MBG de hasta un 15 % en masa manteniendo una matriz biopolimérica con una estructura de macroporosidad abierta en el rango entre 1 y 1000 micras.

La incorporación del material inorgánico MBG a la matriz de colágeno significa una aproximación biomimética en cuanto a la composición de la matriz extracelular del complejo dentino pulpar formada por colágeno y compuestos inorgánicos de fosfato de calcio. El componente MBG, aumenta las propiedades texturales de los biomateriales, superficie específica y nanoporosidad, además de resultar positivo en la estabilización de las piezas procesadas que se traduce en una contención en la cantidad de medio líquido absorbido y pérdida de masa por biodegradación.

## **6. Referencias**

Alagl A, Bedi S, Hassan K, AlHumaid J. Use of platelet-rich plasma for regeneration in non-vital immature permanent teeth: Clinical and cone-beam computed tomography evaluation. *J Int Med Res* 2017;45:583-93.

Altaii M, Cathro P, Broberg M, Richards L. Endodontic regeneration and tooth revitalization in immature infected sheep teeth. *Int Endod J* 2017;50:480-91.

Angele P, Abke J, Kujat R, Faltermeier H, Schumann D, Nerlich M, Kinner B, Englert C, Ruszczak Z, Mehrl R. Influence of Different Collagen Species on Physico-Chemical Properties of Crosslinked Collagen Matrices. *Biomaterials* 2004;25:2831-41.

Baino F, Fiorilli S, Vitale-Brovarone C. Composite Biomaterials Based on Sol-Gel Mesoporous Silicate Glasses: A Review. *Bioengineering (Basel)* 2017;23.

Banchs F, Trope M. Revascularization of immature permanent teeth with apical periodontitis: new treatment protocol? *J Endod* 2004;30:196-200.

Belbachir K, Noreen R, Gouspillou G, Petibois C. Collagen types analysis and differentiation by FTIR spectroscopy. *Anal Bioanal Chem* 2009;395:829-37.

Bezgin T, Yilmaz AD, Celik BN, et al. Concentrated platelet-rich plasma used in root canal revascularization: 2 case reports. *Int Endod J* 2014;47:41-9.

Borrego-González S. "Nanostructured Biomaterials for Application in Bone Healing: Processing, Characterisation and Properties. Tesis Doctoral. Universidad Pablo de Olavide, 2016.

Chandrasekaran A; Novajra G; Carmagnola I; Gentile P; Fiorilli S; Miola M; Boregowda M; Dakshinamoorthy A; Ciardelli G; Vitale-Brovarone C. Physico-chemical and biological studies on three-dimensional porous silk/spray-dried mesoporous bioactive glass scaffolds. *Ceram Int* 2016;42:13761-72.

Chen X, Bao ZF, Liu Y, Liu M, Jin XQ, Xu XB. Regenerative endodontic treatment of an immature permanent tooth at an early stage of root development: a case report. *J Endod* 2013;39:719-22.

Colombo J, Moore A, Hartgerink D and D'Souza R. Scaffolds to Control Inflammation and Facilitate Dental Pulp Regeneration. *J Endod* 2014;40:S6-S12.

De CV y Mello MLS. Collagen type I amide I band infrared spectroscopy. *Micron* 2011;42: 283-9.

Diogenes A, Ruparel NB, Shiloah Y, Hargreaves KM. Regenerative endodontics: a way forward. *J Am Dent Assoc* 2016;147:372-80.

El Ashiry EA, Farsi NM, Abuzeid ST, El Ashiry MM, Bahammam HA. Dental Pulp Revascularization of Necrotic Permanent Teeth with Immature Apices. *J Clin Pediatr Dent* 2016;40:361-6.

El-Fiqi A; Lee JH; Lee EJ; Kim HW. Collagen hydrogels incorporated with surface-aminated mesoporous nanobioactive glass: Improvement of

physicochemical stability and mechanical properties is effective for hard tissue engineering. *Acta Biomater* 2013;9:9508-21.

Fathima NN; Madhan B; Rao JR; Nair BU; Ramasami T. Interaction of Aldehydes with Collagen: Effect on Thermal, Enzymatic and Conformational Stability. *Intl J Biol Macromol* 2004;34:241-7.

Fujiwara S, Kumabe S, Iwai Y. Isolated rat dental pulp cell culture and transplantation with an alginate scaffold. *Okajimas Folia Anat Jpn* 2006;83:15-24.

Galler KM, Brandl FP, Kirchhof S, Widbiller M, Eidt A, Buchalla W, Schmalz G. Suitability of different natural and synthetic biomaterials for dental pulp tissue engineering. *Tissue Engineering Part A* 2018;24:234-44.

Galler KM, Krastl G, Simon S, Van Gorp G, Meschi N, Vahedi B, Lambrechts P. European Society of Endodontology position statement: Revitalization procedures. *Int Endod J* 2016;49:717-23.

Gathani KM, Raghavendra SS. Scaffolds in regenerative endodontics: A review. *Dent Res J (Isfahan)* 2016;13:379-86.

Glowacki J; Mizuno S. Collagen Scaffolds for Tissue Engineering. *Biopolymers* 2008;89:338-44.

Gomes-Filho JE, Duarte PC, Ervolino E, Mogami Bomfim SR, Xavier Abimussi CJ, Mota da Silva Santos L, Lodi CS, Penha De Oliveira SH, Dezan E Jr, Cintra

LT. Histologic characterization of engineered tissues in the canal space of closed-apex teeth with apical periodontitis. *J Endod* 2013;39:1549-56.

Gomez-Guillen MC; Gimenez B; Lopez-Caballero ME; Montero MP. Functional and Bioactive Properties of Collagen and Gelatin from Alternative Sources: A Review. *Food Hydrocoll* 2011;25:1813-27.

Inuyama Y, Kitamura C, Nishihara T, Morotomi T, Nagayoshi M, Tabata Y, Terashita M. Effects of hyaluronic acid sponge as a scaffold on odontoblastic cell line and amputated dental pulp. *Journal of Biomedical Materials Research. Part B, Applied Biomaterials* 2010;92:120-8.

Hargreaves KM, Cohen S. *Vías de la pulpa*. 2011.10ª edición. Capítulo 12;452.

Hargreaves KM, Geisler T, Henry M, et al. Regeneration potential of the young permanent tooth: what does the future hold? *J Endod* 2008;34: S51–S56.

M.G. Haugh, M.J. Jaasma, F.J. O'Brien, J. *Biomed. Mater. Res. A* 89 (2009) 363e369.

Hollister S. Porous scaffold design for tissue engineering. *Nat Mater* 2005;4:518.

Jadhav G, Shah N and Logani A. Revascularization with and without platelet rich plasma in nonvital, immature, anterior teeth: a pilot clinical study. *J Endod* 2012;38:1581-7.

Jadhav GR, Shah N, Logani A. Comparative outcome of revascularization in bilateral, non-vital, immature maxillary anterior teeth supplemented with or without platelet rich plasma: A case series. *J Conserv Dent* 2013;16:568-72.

Jeeruphan T, Jantarat J, Yanpiset K, Suwannapan L, Khewsawai P, Hargreaves KM. Mahidol study 1: comparison of radiographic and survival outcomes of immature teeth treated with either regenerative endodontic or apexification methods: a retrospective study. *J Endod* 2012;38:1330-6.

Jia TB; Chen JY; Feng XX; Chang J. Fabrication and characterization of chitosan/mesoporous bioactive glasses porous films. *J Clin Rehabil Tissue Eng Res* 2011;15:7877-80.

Kadler KE, Holmes DF, Trotter JA, Chapman JA. Collagen fibril formation. *Biochem J* 1996;316:1-11.

Lata P, Chhabra A, Jindal V, Kaur D, Thakur AK. In-vivo clinical evaluation of regenerative endodontics in immature necrotic permanent teeth with open apex. *Dent J Adv Stud* 2015;3:26-33.

Li X, Wang X, Zhang L, Chen H, Shi J. MBG/PLGA composite microspheres with prolonged drug release. *J Biomed Mater Res B* 2009;89:148-54.

Liu Tsang V, Bhatia SN. Three-dimensional tissue fabrication. *Adv Drug Deliv Rev* 2004;56:1635.

Martin G, Ricucci D, Gibbs JL, et al. Histological findings of revascularized/revitalized immature permanent molar with apical periodontitis using platelet-rich plasma. *J Endod* 2013;39:138-44.



Matoug-Elwerfelli M, Duggal MS, Nazzal H, Esteves F, Raif E. A biocompatible decellularized pulp scaffold for regenerative endodontics. *Int Endod J* 2018;51:663-73.

Mehta A, Raghava Rao J, Fathima NN. Electrostatic Forces Mediated by Choline Dihydrogen Phosphate Stabilize Collagen. *J Phys Chem B* 2015;119:12816-27.

Meza G, Urrejola D, Saint Jean N, Inostroza C, López V, Khoury M, Brizuela C. Personalized Cell Therapy for Pulpitis Using Autologous Dental Pulp Stem Cells and Leukocyte Platelet-rich Fibrin: A Case Report. *J Endod* 2019;45:144-9.

Moonesi Rad R, Pazarçeviren E, Ece Akgün E, Evis Z, Keskin D, Sahin S, Tezcaner A. In vitro performance of a nanobiocomposite scaffold containing boron modified bioactive glass nanoparticles for dentin regeneration. *J Biomater Appli* 2019;33:834-53.

Montalbano G, Fiorilli S, Caneschi A, Vitale-Brovarone C. Type I Collagen and Strontium containing mesoporous glass particles as hybrid material for 3D printing of bone-like materials. *Materials (Basel)* 2018;28:11.

Muyonga JH, Cole CGB, Duodu KG. Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopic study of acid soluble collagen and gelatin from skins and bones of young and adult Nile perch (*Lates niloticus*). *Food Chem* 2004;86:325-32.

Nagaveni NB, Pathak S, Poornima P, Joshi JS. Revascularization Induced Maturogenesis of Non-Vital Immature Permanent Tooth Using Platelet-Rich-Fibrin: A Case Report. *J Clin Pediatr Dent* 2016;40:26-30.

Narang I, Mittal N and Mishra N. A comparative evaluation of the blood clot, platelet-rich plasma, and platelet-rich fibrin in regeneration of necrotic immature permanent teeth: a clinical study. *Contemp Clin Dent* 2015;6:63-8.

Nosrat A, Seifi A, Asgary S. Regenerative endodontic treatment (revascularization) for necrotic immature permanent molars: a review and report of two cases with a new biomaterial. *J Endod* 2011;37:562-7.

O'Brien, F. J. Biomaterials & Scaffolds for Tissue Engineering. *Mater Today* 2011;14:88-95.

Palma PJ, Ramos JC, Martins JB, Diogenes A, Figueiredo MH, Ferreira P, Viegas C, Santos JM. Histologic Evaluation of Regenerative Endodontic Procedures with the Use of Chitosan Scaffolds in Immature Dog Teeth with Apical Periodontitis. *J Endod* 2017;43:1279-87.

Pérez RA, Won JE, Knowles JC, Kim HW. Naturally and synthetic smart composite biomaterials for tissue regeneration. *Adv Drug Deliv Rev* 2013;65:471-96.

Prescott RS, Alsanea R, Fayad MI, et al. In vivo generation of dental pulp-like tissue by using dental pulp stem cells, a collagen scaffold, and dentin matrix protein 1 after subcutaneous transplantation in mice. *J Endod* 2008;34:421-6.

Rambhia KJ, Ma PX. Controlled drug release for tissue engineering. *J Control Release* 2015;219:119-28.

Romero LB, Borrego S, Díaz A. High surface area biopolymeric-ceramic scaffolds for hard tissue engineering. *Biomedical Physics & Engineering Express* 2018;3.

Sachdeva GS, Sachdeva LT, Goel M, et al. Regenerative endodontic treatment of an immature tooth with a necrotic pulp and apical periodontitis using platelet-rich plasma (PRP) and mineral trioxide aggregate (MTA): a case report. *Int Endod J* 2015;48:902-10.

Sachlos E, Czernuszka JT. Making tissue engineering scaffolds work. Review: the application of solid freeform fabrication technology to the production of tissue engineering scaffolds. *Eur Cell Mater* 2003;5:29-39.

Schmalz G, Smith AJ. Pulp development, repair, and regeneration: Challenges of the transition from traditional dentistry to biologically based therapies. *J Endod* 2014;40:S2-S5.

Shah N, Logani A, Bhaskar U, Aggarwal V. Efficacy of revascularization to induce apexification/apexogenesis in infected, nonvital, immature teeth: a pilot clinical study. *J Endod* 2008;34:919-25.

Shimizu E, Ricucci D, Albert J, Alobaid AS, Gibbs JL, Huang GT, Lin LM. Clinical, radiographic and histological observation of a human immature permanent tooth with chronic apical abscess after revitalization treatment. *J Endod* 2013;39:1078-83.

Staffoli S, Plotino G, Nunez BG, Grande MN, Bossù M, Gambarini G, Polimeni A. Regenerative Endodontic Procedures Using Contemporary Endodontic Materials. *Materials (Basel)* 2019;12:908.

Sumita Y, Honda MJ, Ohara T, Tsuchiya S, Sagara H, Kagami H, Ueda M.

Performance of collagen sponge as a 3-D scaffold for tooth-tissue engineering. *Biomaterials* 2006;27:3238-48.

Sung H, Chang W, Ma C, Lee M. Crosslinking of Biological Tissues Using Genipin and/or Carbodiimide. *J Biomed Mater Res* 2003;64:427-38.

Torabinejad M and Turman M. Revitalization of tooth with necrotic pulp and open apex by using platelet-rich plasma: a case report. *J Endod* 2011;37:265-8.

Ulusoy AT, Turedi I, Cimen M, Cehreli ZC. Evaluation of Blood Clot, Platelet-rich Plasma, Platelet-rich Fibrin, and Platelet Pellet as Scaffolds in Regenerative Endodontic Treatment: A Prospective Randomized Trial. *J Endod* 2019;45:560-6.

Von der Mark K, Park J, Bauer S, Schmuki P. Nanoscale engineering of biomimetic surfaces: cues from the extracellular matrix. *Cell Tissue Res* 2010;339:131-53.

Wang X, Thibodeau B, Trope M, Lin LM and Huang GT. Histologic characterization of regenerated tissues in canal space after the revitalization/revascularization procedure of immature dog teeth with apical periodontitis. *J Endod* 2010;36:56-63.

Wu C; Ramaswamy Y; Zhu Y; Zheng R; Appleyard R; Howard A; Zreiqat H. The effect of mesoporous bioactive glass on the physiochemical, biological and drug-release properties of poly(DL-lactide-co-glycolide) films. *Biomaterials* 2009;30:2199-208.

Wu C; Zhu Y; Chang J; Zhang Y; Xiao Y. Bioactive inorganic-materials/alginate composite microspheres with controllable drug-delivery ability. *J Biomed Mater Res B* 2010;94:32-43.

Yamauchi N, Nagaoka H, Yamauchi S, et al. Immunohistological characterization of newly formed tissues after regenerative procedure in immature dog teeth. *J Endod* 2011;37:1636-41.

Yamauchi N, Yamauchi S, Nagaoka H, Duggan D, Zhong S, Lee SM, Teixeira FB, Yamauchi M. Tissue engineering strategies for immature teeth with apical periodontitis. *J Endod* 2011;37:390-7.

Zhu W, Zhu X, Huang GT, et al. Regeneration of dental pulp tissue in immature teeth with apical periodontitis using platelet-rich plasma and dental pulp cells. *Int Endod J* 2013;46:962-70.

Zhu W, Chen T, He R, Ding Y, Duan T, Xiao B. Understanding the interfacial interactions of bioinspired chitosan-calcite nanocomposites by first principles molecular dynamics simulations and experimental FT-IR spectroscopy. *CarbohydrPolym* 2019;223:1150.



## Capítulo 3

# **Evaluación *in vitro* de los biomateriales C-MBG y C-MBG-Zn utilizando células madre de pulpa dental (hDPSCs)**

### **1. Introducción**

Como se ha indicado en la Introducción General (Figura I.3.), la práctica actual en ingeniería de tejidos implica la combinación de células y/o moléculas de señalización con biomateriales (Chen et al. 2010; Volponi et al. 2010; Egusa et al. 2012; Zhai et al. 2019).

Según esta aproximación, la implementación de las distintas terapias de ingeniería de tejidos va a requerir la disponibilidad estandarizada y segura de células con capacidad de auto renovación y diferenciación en los múltiples tipos celulares. Es reconocido en la bibliografía que las células madre mesenquimales (Mesenchymal Stem Cells; MSC) representan una gran promesa para la medicina regenerativa, debido a su capacidad para diferenciarse en tejidos específicos (Prescott et al.

2008). Entre otros factores, los tipos celulares utilizados van a condicionar el éxito del tratamiento regenerativo (Langer y Vacanti 1993; Bakhtiar et al. 2018).

En la región maxilar de los humanos, se han descrito al menos 5 fuentes de células madre mesenquimales postnatales con capacidad de diferenciación a células similares a odontoblastos, entre las que se encuentran: células madre de la pulpa dental (human Dental Pulp Stem Cells; hDPSCs), células madre de los dientes deciduos exfoliados (Stem cells from Human Exfoliated Deciduous teeth, SHEDs), células madre de la papila apical (Stem Cells of the developing root Apical Papilla, SCAPs), células progenitoras de los folículos dentales (Dental Follicle Stem Cells, DFSCs) y células madre del ligamento periodontal (PerioDontal Ligament Stem Cells, PDLSCs) (Egusa et al. 2012). Entre ellas, las hDPSCs son las más fáciles de obtener; presentando una mayor capacidad de diferenciación a odontoblasto (Nuti et al. 2016). Estas células madre de la pulpa, identificadas por primera vez por Gronthos (Gronthos et al. 2000; Gronthos et al. 2002), se encuentran tanto en la corona como en la raíz del diente y son células multipotentes que pueden proliferar extensamente (Miura et al. 2003). Se ha visto que tienen propiedades inmunosupresoras y presentan la capacidad de diferenciarse *in vitro* en odontoblastos, osteoblastos, adipocitos, células neuronales, cardiomiocitos, miocitos y condrocitos (Volponi et al. 2010; Rodríguez et al. 2011; Egusa et al. 2012). Además, presentan la capacidad de ser criopreservadas de forma segura.

Estas células poseen capacidad de auto-renovación (Barry 2003), diferenciación multilínea y eficiencia clonogénica, además de demostrarse que, pueden regenerar ectópicamente un complejo parecido a la pulpa con una disposición similar a la de la dentina natural (Bakhtiar et al. 2018).



Por tanto, las células madre postnatales de la pulpa dental pueden diferenciarse en odontoblastos y generar dentina reparadora en el proceso de regeneración de la pulpa (Huang et al. 2010). Además, exhiben múltiples potenciales en la osteogénesis, neurogénesis, angiogénesis e incluso en la regeneración de las glándulas endocrinas (Chen et al. 2019). Algunos estudios han demostrado que las hDPSCs representan una promesa considerable para la ingeniería de tejidos dentales debido a su capacidad para diferenciarse en odontoblastos funcionales *in vitro* y para formar estructuras complejas de dentina-pulpa *in vivo* cuando se trasplantan junto con biomateriales (Zhang et al. 2006; Atalayin et al. 2016; Chamieh et al. 2016; Yu et al. 2019). Hay estudios que muestran resultados histológicos satisfactorios tras el uso de hDPSCs (Iohara et al. 2011; Ishizaka et al. 2012; Iohara et al. 2013; Chen et al. 2015) en REPs.

Por todo lo anterior, desde su descubrimiento, las hDPSCs se han investigado exhaustivamente con respecto a su potencial como fuentes celulares óptimas para la regeneración de la pulpa, ya que son distintivamente ventajosas para la aplicación clínica debido a su origen en el tejido pulpar, su fácil aislamiento, y el mantenimiento de su capacidad de regeneración después de la criopreservación (Kim et al. 2015; Sui et al. 2019), proporcionando una posibilidad clínica realista en la regeneración de la pulpa (Prescott et al. 2008; Yu et al. 2019).

Por otra parte, en los últimos años se han conseguido avances en la formación de tejido con características específicas de pulpa tras la combinación de células hDPSCs con diferentes biomateriales. Los nuevos tejidos formados presentan nueva vascularización, células similares a odontoblastos, deposición de calcio, fibrillas de colágeno y formación de tejido similar a la dentina (Ohara et al. 2010; Ravindran et al. 2014; Hayashi et al. 2015; Iohara et al. 2016).

Si la búsqueda la centramos en células hDPSCs aplicadas en REPs junto con biomateriales como matrices extracelulares descelularizadas, encontramos trabajos en los que se ha constatado la formación de nuevos depósitos de dentina con presencia en la pared de células similares a los odontoblastos (Ravindra et al. 2014; Wang et al. 2015; Hu et al. 2017; Zhang et al. 2017; Fukushima et al. 2019).

Como se ha justificado previamente, el biomaterial C-MBG-Zn es un candidato muy interesante para su utilización en REPs. En el presente capítulo, se lleva a cabo un estudio comparativo de biocompatibilidad con hDPSCs *in vitro* de la serie de biomateriales C-MBG y C-MBG-Zn procesados y denominados como se ha detallado en el Capítulo 2.

## **2. Procedimiento experimental**

Toda la experimentación celular del presente trabajo fue realizada en el centro Wellcome-Wolfson Institute for Experimental Medicine, School of Medicine, Dentistry and Biomedical Sciences de la Universidad de Queen, Belfast (Irlanda del Norte), en colaboración con la Profesora Dra. Fionnuala Lundy.

Los experimentos *in vitro* con los biomateriales C-MBG y C-MBG-Zn han consistido en dos tipos de estudios. Una primera serie de estudios fueron realizados para ensayar la biocompatibilidad celular y la influencia en la estimulación de la mineralización de los biomateriales en células hDPSCs. Esta primera serie de experimentos consistió en el estudio de la influencia de los productos iónicos de disolución de los biomateriales mediante la utilización de medios de cultivo previamente tratados con las piezas de los biomateriales en suspensión para diferentes tiempos (24 h, 72 h y 168 h) y que se van a denominar como medios

condicionados (MC). La otra serie de experimentos, se realizó sembrando las hDPSCs directamente sobre los distintos biomateriales para experimentos de actividad de fosfatasa alcalina y microscopía confocal de fluorescencia. Todos los experimentos incluyeron una muestra de biomaterial control (C), consistente en una pieza procesada con colágeno como único componente.

Las células de la pulpa dental se obtuvieron de terceros molares permanentes inmaduros extraídos en la facultad de odontología de la Universidad de Aix-Marseille de Marseille (Francia) de acuerdo con la legislación de ética francesa. Tras la extracción, los dientes fueron lavados con etanol al 70% en agua desionizada (DIH<sub>2</sub>O) (v / v) y solución salina de fosfato estéril (Phosphate-Buffered Saline, PBS, 0.01 M, pH 7.4 Dulbecco, sin Ca<sup>2+</sup>/ Mg<sup>2+</sup>; PromoCell, Reino Unido). Los dientes fueron fracturados con la ayuda de un tornillo de banco (About et al. 2000) para así poder retirar el tejido pulpar cuidadosamente con una lima K Flexofile de tamaño 40 (Dentsply, Maillefer, Suiza). Una vez separado el tejido pulpar de la estructura dentinaria, éste fue cortado en trozos pequeños y colocado en un matraz de cultivo T25 (Thermo Scientific™ Nunc™). El tejido así fraccionado se cultivó en un medio que consistían en  $\alpha$ -MEM suplementado con 10% de suero fetal bovino (Fetal Bovine Serum, FBS), 1% penicilina / estreptomicina (Invitrogen) y 1% de L-glutamina (Sigma-Aldrich, Reino Unido). Las muestras se cultivaron en una incubadora a 37 °C en 5% de CO<sub>2</sub>, cambiando el medio de cultivo cada 3 días hasta que las células primarias migraron desde los restos de tejido y llegaron a confluencia, momento en el que fueron tripsinizadas (0.2% de tripsina y 0.02% EDTA) (El-Karim et al. 2016).

Para llevar a cabo la experimentación, se utilizaron poblaciones de células madre (positivas para STRO-1) que fueron aisladas a partir del cultivo de las células

primarias anteriores, mediante separación inmunomagnética (Winning et al. 2019). Para llevar a cabo dicho procedimiento, se incubaron perlas de Inmunoglobulina M de rata unidas a cuentas magnéticas (DynaLab, Oslo, Noruega) con Inmunoglobulinas M anti-humano STRO-1 (Invitrogen). Esta solución se incubó con las células en un tampón de aislamiento (0.1% BSA) durante 1h a 4 °C. Así se obtuvieron poblaciones de células madre positivas para STRO-1 que se cultivaron en medio de cultivo  $\alpha$ -MEM complementado con 10% FBS, 1% de penicilina / estreptomicina y 1% L-glutamina. En todos los experimentos se utilizaron células entre los pasajes 3 y 5.

### **2.1. Preparación de los medios de cultivo condicionados, análisis de los productos iónicos por espectroscopía de emisión atómica por plasma de acoplamiento inducido y medida de pH.**

Los biomateriales fueron previamente esterilizados mediante la inmersión de los mismos en una placa de 96 conteniendo cada pocillo una pieza de biomaterial y 100  $\mu$ L de una solución de etanol en  $\text{DIH}_2\text{O}$  al 70% (v/v) durante 24 h. A continuación, se realizaron 2 lavados de las piezas por inmersión en PBS durante 15 min y en agitación a 30 rpm. Tras ser lavadas, las piezas fueron sumergidas en 100  $\mu$ L de medio  $\alpha$ -MEM sin suero añadido durante 24 horas. Este primer tratamiento en medio sin suero de los biomateriales es considerado como un paso preparativo previo (pre-condicionamiento) que es aplicado en una generalidad de estudios de cultivo celular con materiales de vidrio bioactivo (Cirraldo et al. 2018). La razón que se argumenta es que debido a que los vidrios obtenidos mediante el proceso sol-gel poseen una naturaleza altamente reactiva, pueden producir una muy alta concentración de iones en solución que dé lugar a saturación en un primer

contacto con el medio. Una vez finalizado el protocolo de esterilización y precondicionamiento, las piezas de biomaterial fueron colocadas individualmente en placas de cultivo de 24 pocillos y sumergidas en 0.5 mL de medio de cultivo  $\alpha$ -MEM complementado con 10% FBS, 1% de penicilina/estreptomicina y 1% de L-glutamina durante 24h, 72h y 168h en un incubador a 36.5 °C y 5% CO<sub>2</sub>. Una vez extraída la pieza de biomaterial, el medio así tratado se denomina “medio condicionado”, y constituye la muestra experimental que se va ensayar para estudiar su biocompatibilidad con el cultivo celular. Para determinar las cantidades de biomaterial y medio del tratamiento de condicionamiento se utilizó una relación de la relación 1.5 cm<sup>2</sup> mL<sup>-1</sup> entre el área superficial del material y el volumen de medio de acuerdo con la Norma de referencia 10993-5 (ISO 10993-5;2005).

Para conocer la concentración de los iones silicio (Si), calcio (Ca), fósforo (P) y zinc (Zn) liberados en los medios condicionados se utilizó el análisis mediante espectroscopía de emisión atómica por plasma de acoplamiento inducido (Inductively Couple Plasma Atomic Emission Spectroscopy; ICP-AES), utilizando el espectrómetro Horiba Jobin Yvon (Ultima 2, París, Francia). La solución control consistió en medio de cultivo celular completo con suero y antibiótico como se ha indicado anteriormente, que se preparó y almacenó simultáneamente bajo las mismas condiciones que el resto de las muestras experimentales. El pH de todas las muestras se determinó con un instrumento de medida pH & Ion-Meter GLP 22 (Crison).

## **2.2. Estudios celulares in vitro**

### **2.2. 1 Estudio de viabilidad celular *in vitro*.**

Como paso previo al ensayo de cultivo celular, las muestras de medio condicionado fueron filtradas usando filtro bacteriostático Biofil de 0.2  $\mu$ m.

La tasa de viabilidad celular de hDPSCs ante los distintos medios condicionados, se evaluó utilizando el ensayo de bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio MTT (MTT Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide Sigma Aldrich Product Number: M2128). Las células fueron sembradas a una densidad de  $1 \times 10^3$  células por pocillo en un volumen de 100  $\mu$ L en placas de 96 pocillos. Las células se mantuvieron 72 h en  $\alpha$ -MEM suplementado con 10% FBS, 1% L-glutamina y 1% de penicilina/estreptomicina. Tras las 72 h y comprobar que las células se encontraban en torno al 70% de confluencia, se retiró el medio de cultivo y durante 24 h se expuso a las células a los diferentes medios condicionados para cada biomaterial (24 h, 72 h y 168 h). Las células cultivadas en medio de cultivo sin condicionamiento fueron utilizadas como control, el cual fue considerado el 100% de viabilidad, permitiendo así el cálculo del % relativo de viabilidad de los distintos medios condicionados respecto al control. Pasadas las 24 h, se añadieron 10  $\mu$ L de una solución de 5 mg / mL de bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio al medio de cultivo que permaneció en incubación durante 3 horas a 37°C. Tras este periodo, el sobrenadante se retiró y los cristales de formazan se solubilizaron con 200  $\mu$ L por pocillo de dimetilsulfóxido (DMSO). La absorbancia a 570 nm se midió utilizando un espectrofotómetro automático de microplacas (GENios, Tecan, Suiza), y los datos se analizaron utilizando el software Prism GraphPad (GraphPad, La Jolla, CA).

### **2.2.2. Tinción rojo alizarina**

Las células mesenquimales indiferenciadas no presentan depósitos de calcio en la matriz extracelular, mientras que para las células diferenciadas en odontoblastos son característicos dichos depósitos tanto *in vitro* como *in vivo*. Por tanto, los

depósitos de calcio son un indicador de la diferenciación de las MSCs en células odontoblásticas *in vitro*, para lo cual la tinción con rojo de alizarina se usó para determinar la presencia de nódulos mineralizados formados por células de linajes odontogénicos. Las células se sembraron por triplicado en placas de cultivo de 6 pocillos a una densidad de  $5 \times 10^4$  células/mL y se cultivó hasta una confluencia del 70%. En este momento el medio de cultivo fue reemplazado por los diferentes medios condicionados (24 h, 72 h y 168 h) y la tinción con rojo de alizarina (AR) se realizó tras 10 días de exposición a los distintos medios. Células no expuestas a medio condicionados fueron utilizadas como control. Para ello, las células se enjuagaron con PBS dos veces y posteriormente se fijaron en etanol al 70% en dH<sub>2</sub>O durante 30 minutos en frío. Después de tres lavados con dH<sub>2</sub>O, las células se tiñeron durante 30 minutos con rojo de alizarina al 2%. La solución fue preparada disolviendo 2 gr de Alizarin Red (Sigma-Aldrich, UK) en 100 mL de dH<sub>2</sub>O y ajustando el pH entre 4.1-4.3 con 0.1% NH<sub>4</sub>OH. La mezcla fue filtrada y conserva protegida de la luz. Tras la tinción, los pocillos se lavaron cinco veces con dH<sub>2</sub>O. La cuantificación del tejido mineralizado total producido por pocillo se realizó agregando 2 mL de tampón de cloruro de cetilpiridinio (CPC; Sigma-Aldrich) (10%, p / v) en Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 10 mM (pH 7) durante 1 hora a 37 °C en cada pocillo, y fueron recolectados. Posteriormente, se transfirieron partes alícuotas de 100 mL a una placa de 96 pocillos y se midió la densidad óptica de la solución a 570 nm usando un lector de microplacas (Tecan GENios, MTX Lab Systems, US) (Gregory et al. 2004).

### **2.2.3. Ensayo de actividad de fosfatasa alcalina**

El ensayo de actividad de fosfatasa alcalina intracelular (Alkaline Phosphatase, ALP) es usado para evaluar el desarrollo de fenotipo odontoblástico durante la inducción de la diferenciación de las MSCs. Para realizar este ensayo las células fueron sembradas directamente sobre la superficie de los biomateriales, no haciendo uso por tanto del medio condicionado utilizado en los ensayos anteriores. Las células fueron sembradas en una placa de 12 sobre los biomateriales a una densidad de  $1 \times 10^5$  en 25  $\mu\text{L}$  de medio y se mantuvo a 37 °C durante 30 min para asegurar la adhesión celular a la superficie del material. Pasados los 30 min se añadieron 750  $\mu\text{L}$  de medio  $\alpha$ -MEM suplementado con 10% FBS, 1% L-glutamina y 1% de penicilina/estreptomicina a cada pocillo. Los resultados de actividad ALP fueron recogidos a los 3, 7 y 14 días. El medio celular fue cambiado cada dos días. El experimento fue realizado por triplicado. En cada uno de los tiempos a estudiar del experimento, el medio fue retirado y las estructuras de material fueron lavadas dos veces con PBS, para luego lisar las células utilizando 600  $\mu\text{L}$  de tampón de lisis (0,2% Triton X-100), durante un período de incubación de 15 minutos a 37 °C. Las células lisadas fueron recogidas en un eppendorf, el cual fue agitado y centrifugado a 4 °C durante 10 min. El sobrenadante de cada muestra se recogió en un nuevo eppendorf estéril y fue almacenado a -20 °C. Para llevar a cabo la cuantificación de ALP se utilizó el kit de detección de dietanolamina (Sigma-Aldrich, Reino Unido), siguiendo las instrucciones del fabricante, para lo cual las muestras fueron descongeladas a 37°C y se utilizó una solución de pNPP 0.67M que se preparó con agua Milli-Q (Merck, UK) y fue protegida de la luz. También se utilizó el ALP buffer proporcionado por el fabricante (1M diethanolamine y 0.5M cloruro de magnesio a 9.8 pH), siendo el resultado final en cada pocillo de 90  $\mu\text{L}$  de ALP buffer, 5  $\mu\text{L}$  de pNPP 0.67M y 5  $\mu\text{L}$  de muestra y fue incubada durante 15 min a 37 °C. A continuación se registraron lecturas cinéticas durante 20 ciclos midiendo la densidad óptica a 405 nm en cada punto utilizando el lector de placas



(Tecan GENios, MTX Lab Systems, US). El software Magellan fue utilizado para determinar el índice lineal máximo ( $\Delta$ Absorbancia<sub>405nm</sub>/minuto).

Los cálculos fueron realizados con la siguiente fórmula:

$$\frac{(\Delta A_{405\text{nm}}/\text{min Test} - \Delta A_{405\text{nm}}/\text{min Blanco}) (df) (V_f)}{(18.5) (V_E)}$$

df : Factor de dilución

$V_f$  : Volumen (en mililitros de ensayo)

18.5 : coeficiente milimolar de extinción de pNPP a 405 nm

$V_E$  : volumen (en mililitros) de la enzima utilizada

Los valores obtenidos fueron normalizados con el contenido total de proteínas de las muestras que fue determinado utilizando el kit de ensayo de proteínas BCA (Pierce, Rockford, IL, EE. UU.). Se preparó un estándar de concentraciones conocidas de albúmina diluidas de entre 20-2000  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . A continuación se preparó un reactivo de trabajo mezclando 50 partes del reactivo A con 1 parte del reactivo B proporcionados por el kit. Tanto las muestras como el estándar de diluciones de albúmina fueron registrados por cuadruplicado. El contenido de cada pocillo en una placa de 96 era de 200  $\mu\text{L}$  del reactivo de trabajo preparado y 25  $\mu\text{L}$  de muestra. La placa fue agitada durante 30 segundos y se incubó a 37 °C durante

30 min para favorecer la reacción. Finalmente, la densidad óptica fue medida a 562 nm utilizando el lector de placas (Tecan GENios, MTX Lab Systems, US).

Se realizó una ecuación lineal con los valores del estándar de las distintas concentraciones de albúmina que permitió la determinación de la concentración de proteínas para las muestras.

Finalmente, la actividad de ALP determinada anteriormente, se normalizó al contenido total de proteínas, por lo que los resultados fueron expresados como  $\mu\text{mol PNPP} / \text{min} / \text{mg}$  de proteína.

#### **2.2.4. Inmunofluorescencia y microscopía fluorescente.**

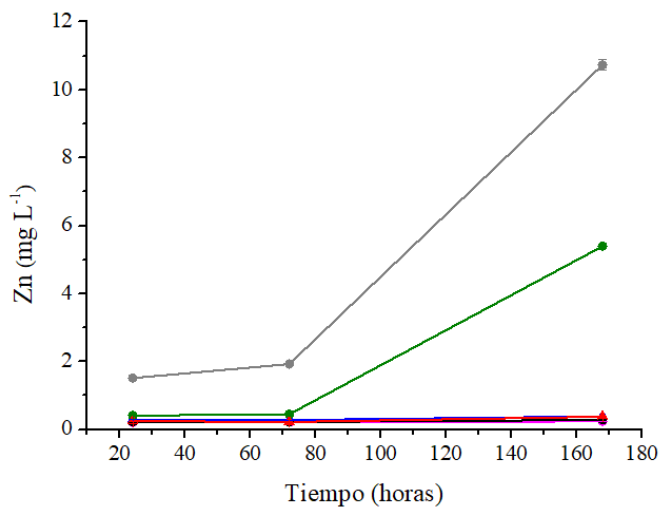
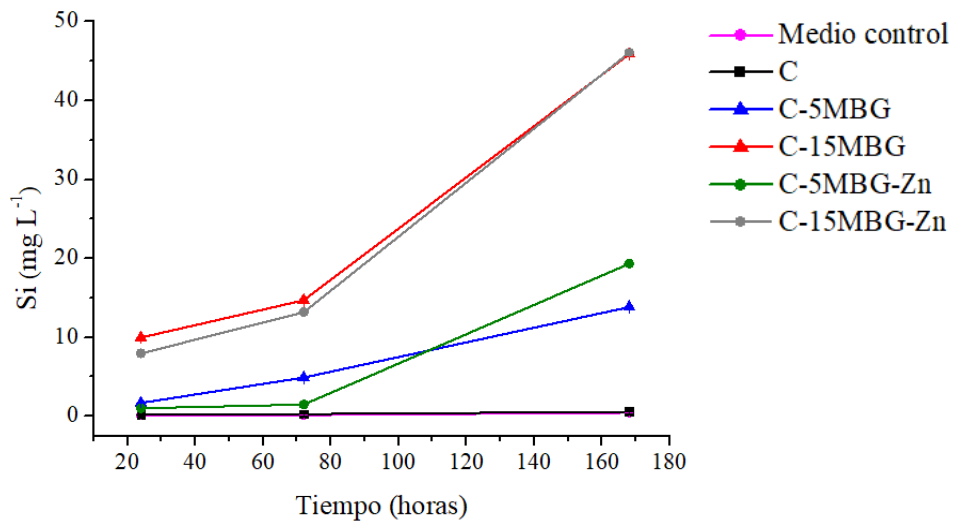
Para observar los microfilamentos de actina del citoesqueleto, las hDPSC se fijaron con paraformaldehído al 4% (30 minutos) y se permeabilizaron durante 20 minutos. Se aplicó una solución de BSA al 5% a las muestras para bloquear sitios de unión no específicos durante 15 minutos a temperatura ambiente. Microfilamentos de actina se tiñeron con Texas Red-X Phalloidin (Thermo Fisher Scientific) durante 2 horas a temperatura ambiente en una habitación sin luz. La tinción de los núcleos se visualizó usando  $0,5 \mu\text{M}$  4', 6 - diamidino - 2 - fenilindol (DAPI) durante 20 minutos a temperatura ambiente. La tinción fue realizada tras 72 h de cultivo de  $5 \times 10^4$  células/100  $\mu\text{L}$  sobre los distintos biomateriales. Las muestras tratadas para inmunocitoquímica se visualizaron con un microscopio fluorescente SP8 (Leyca) con una lente objetivo de agua 40x. Las imágenes fueron analizadas con el software LAS X Life Science 3.5.2.18963.

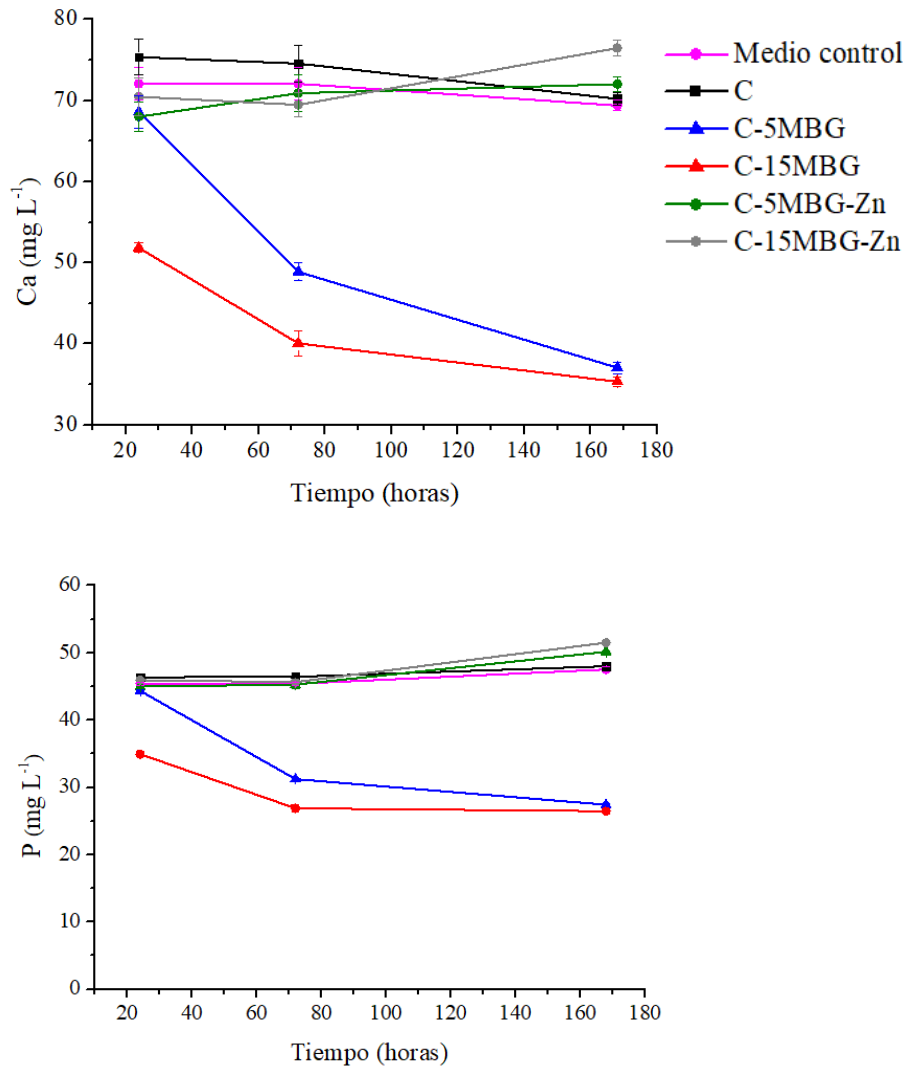
### **2.3. Análisis estadístico**

Datos de viabilidad MTT, tinción rojo de alizarina y actividad de ALP de los diferentes biomateriales en diferentes puntos de tiempo fueron analizados por un análisis de varianza de una vías (ANOVA) seguida por la prueba post hoc de Tukey para comparaciones múltiples. Los experimentos se realizaron por triplicado y fueron repetidos tres veces. El nivel de significación estadística se estableció en  $p < 0.05$ . Los gráficos se realizaron usando software OriginPro 8.

### **3. Resultados**

Los perfiles de concentración de los iones analizados en los medios condicionados en función del tiempo de tratamiento (24 h, 72 h y 168 h), fueron determinados por ICP-AES y se muestran en la Figura 3.1.





**Figura 3.1.** Perfiles de concentración de los iones Si, Ca, P y Zn liberados al medio de cultivo condicionado en función del tiempo de tratamiento 24 h, 72 h y 168 h, determinado por ICP-AES.

Como cabría esperar, los análisis realizados para el biomaterial control de colágeno C, muestran unos valores muy similares a los medidos para el medio de cultivo sin tratamiento.

La mayor liberación de iones de Si se produce para los biomateriales C-15MBG y C-15MBG-Zn, ya que son los que contienen mayor cantidad de material vítreo, yendo ésta en aumento con el tiempo de tratamiento. El Zn sólo es detectado para aquellos biomateriales que lo incorporan en su composición.

Por otra parte, la concentración liberada tanto de Ca como de P disminuye para los biomateriales que incorporan MBG, mientras que los biomateriales con contenido en Zn, hacen que los niveles de Ca y P se mantengan. Esto es, los biomateriales que presentan MBG adsorben estos iones en superficie mientras que esto no ocurre en los biomateriales con Zn.

La Figura 3.2 muestra el pH medido en el medio de cultivo tras la incubación de los distintos biomateriales a los tiempos 0.5, 1, 2, 4, 10, 24, 72, 120 y 168 horas.

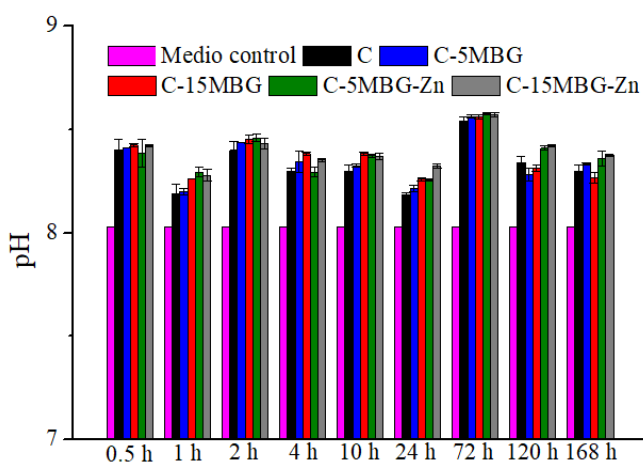
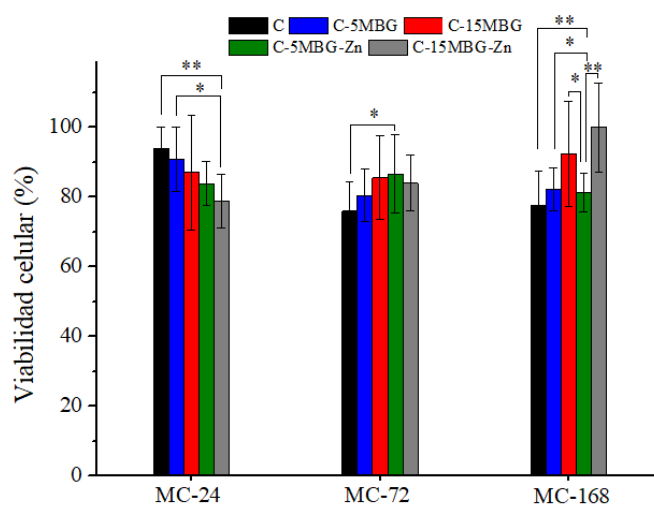


Figura 3.2. pH de los distintos medios condicionados en diferentes tiempos.

Se observa que todos los biomateriales producen un aumento del pH respecto al medio sin condicionamiento (medio control; pH = 8.0) que puede elevarse hasta un valor de 8.6. Los valores de pH medidos para las muestras condicionadas con biomateriales oscilan entre 8.3 y 8.6.

Para estudiar la influencia de los productos iónicos liberados por los distintos biomateriales, en la Figura 3.3 se representa la viabilidad de las células hDPSC tras la exposición de las mismas durante 24 h a los distintos medios condicionados (24 h, 72 h y 168 h).



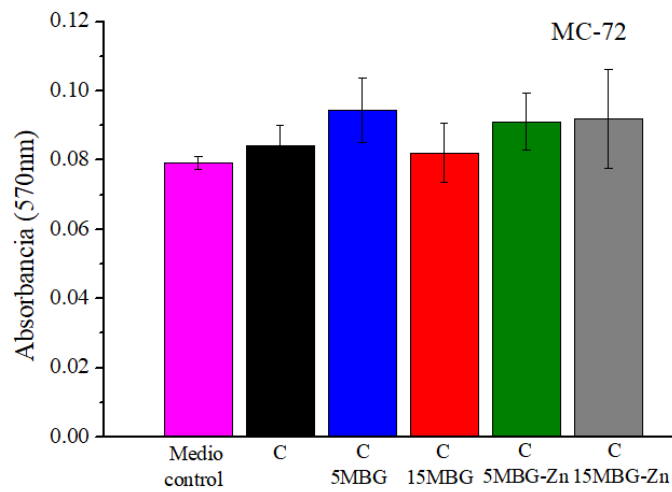
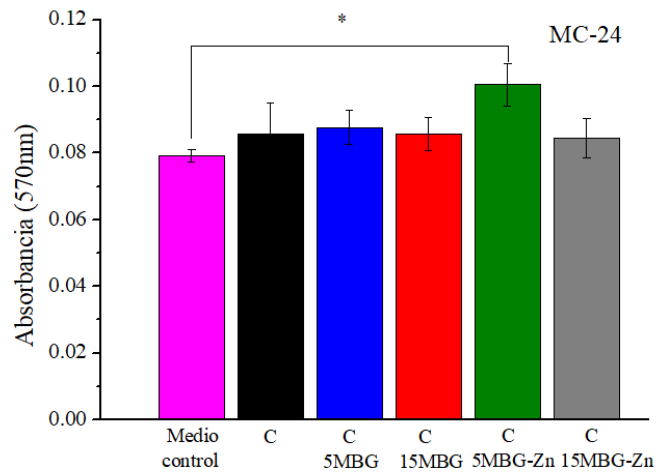
**Figura 3.3.** Viabilidad celular de hDPSCs tras exposición en cultivo durante 24 h a los medios condicionados para distintos tiempos, MC-24, MC-72 y MC-168. Se representa el porcentaje de células cuantificadas respecto al grupo de control (células expuestas a medio de cultivo sin condicionar), junto con el análisis estadístico de ANOVA de dos vías (post-hoc Turkey), \*  $p < 0.05$  y \*\*  $p < 0.001$ .

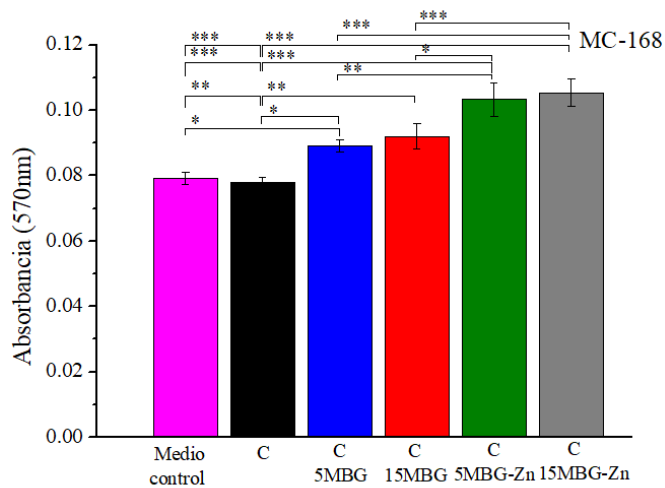
Los resultados anteriores muestran el porcentaje de viabilidad celular relativo al que muestran las células expuestas al medio sin condicionar (que se considera el 100%). Las células fueron cultivadas durante 24 h con los medios condicionados MC-24, MC-72 y MC-168 para los distintos tiempos de 24, 72 y 168 horas, respectivamente.

Para los ensayos realizados con los medios condicionados con el tratamiento más corto de 24 h la viabilidad de las células disminuye algo respecto al grupo de control, observándose que la disminución es más importante, hasta un 20 %, para el caso de los medios acondicionados con los biomateriales con mayor contenido en MBG. Se observa además que la funcionalización con Zn tiene un efecto adicional aumentando este efecto respecto al biomaterial con MBG libre de Zn. Es interesante que para el caso de las células cultivadas con los medios condicionados 72 h, la viabilidad relativa entre los diferentes grupos se invierte, observándose un efecto positivo para los medios condicionados con biomateriales compuestos con MBG y MBG-Zn respecto al biomaterial de colágeno como único componente. Esta tendencia se confirma para los ensayos de cultivo con los medios condicionados 168 h, en los que la viabilidad celular es mayor para los medios de los materiales con contenido en MBG, particularmente los de alto contenido del 15%. Además para este ensayo se observa que los medios con biomateriales compuestos de MBG promueven mayor viabilidad y que el efecto es mayor para el caso del material con alto contenido en MBG funcionalizado con Zn, C-15MBG-Zn. Los medios condicionados durante 168 h por los biomateriales C-5MBG y C-5MBG-Zn presentan tasas de viabilidad celular similares.



En la Figura 3.4 se muestran los resultados para la formación de nódulos de mineralización por las células tras ser expuestas a los distintos medios condicionados durante 10 días.

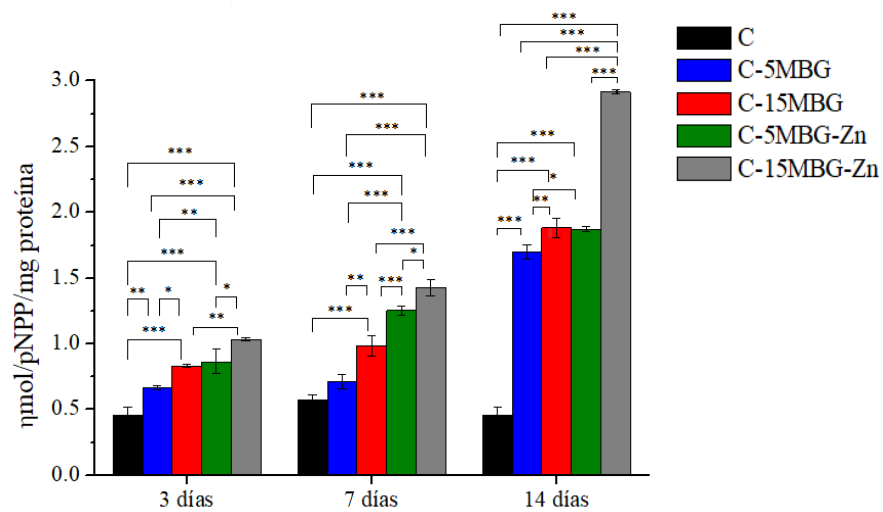




**Figura 3.4.** Ensayo de cuantificación de tinción de rojo alizarina para hDPSCs tras 10 días de exposición a los distintos medios condicionados. Los valores representados son media y desviación estándar en densidad óptica (a 570 nm) de los pocillos expuestos a los medios condicionados frente al medio de cultivo sin condicionar como control. Análisis estadístico ANOVA de dos vías (post-hoc Turkey), \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.001$  y  $p < 0.0001$ .

Los ensayos indican que aunque para los medios condicionados con los biomateriales para los tiempo más cortos de 24 y 72 horas apenas se observa alguna diferencia significativa entre los diferentes grupos, el ensayo con los medios tratados 168 h si muestra efectos interesantes. Así, todos los medios tratados con biomateriales compuestos con MBG producen un efecto de aumento en la mineralización, siendo el mayor para el caso del medio condicionado con C-15MBG-Zn.

Para detectar el potencial odontogénico de los biomateriales sintetizados, la actividad de ALP fue medida tras sembrar directamente las células sobre los materiales durante 3, 7, y 14 días como se observa en la Figura 3.5.

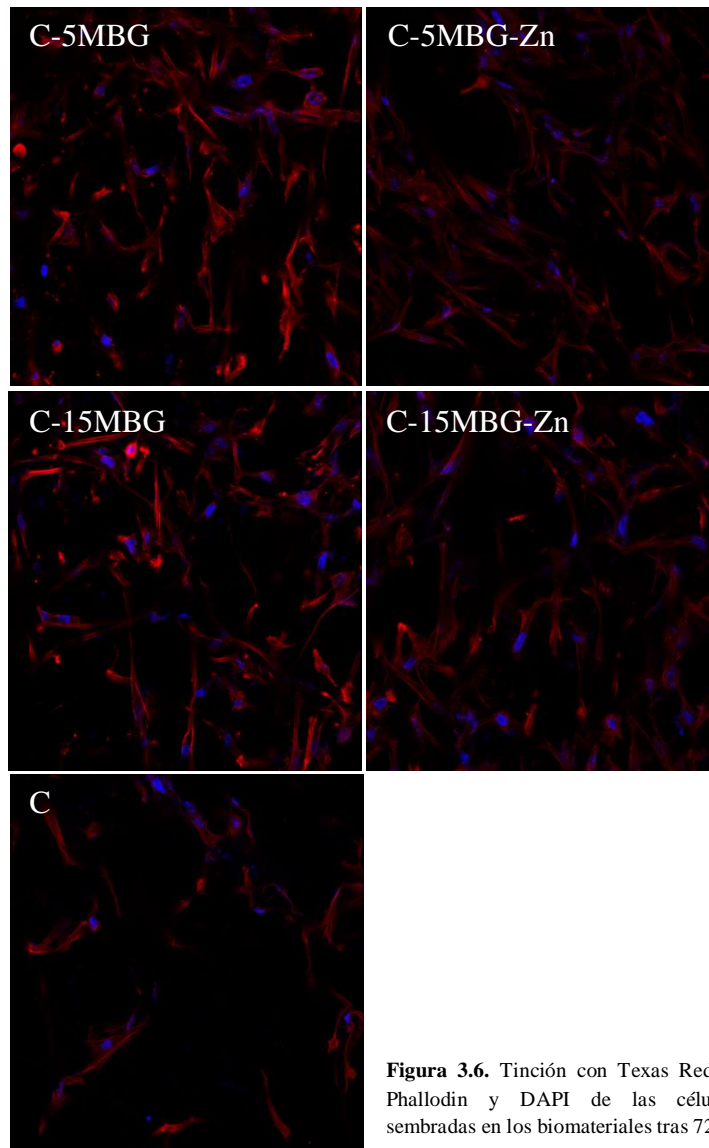


**Figura 3.5.** Actividad de fosfatasa alcalina para hDPSCs sembradas sobre material C; C-5MBG; C-15MBG; C-5MBG-Zn y C-15MBG-Zn a los días 3, 7 y 14. Los valores se normalizaron al contenido total de proteínas y fueron expresados como  $\eta\text{mol PNPP} / \text{min} / \text{mg}$  de proteína. \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.001$  y  $p < 0.0001$  (bidireccional ANOVA –Tukey).

Al día 3, se observa un aumento significativo en la actividad de ALP para todos los materiales comparados con el biomaterial de colágeno. La tendencia al aumento de la actividad ALP con el aumento de la cantidad de material biocerámico y la incorporación de Zinc continúa en el día 7, siendo la diferencia muy notable a día 14 entre el material C y C-15MBG-Zn. Los valores de actividad ALP para los

biomateriales C-5MBG; C-15MBG y C-5MBG-Zn son muy similares entre ellos en el día 14, destacando el aumento que se produce para el material C-15-MBG-Zn en dicho punto temporal.

La Figura 3.6 muestra imágenes de las células sembradas sobre los andamios, después de 3 días tras ser teñidas con tinción Texas Red-X Phalloidin y DAPI.



**Figura 3.6.** Tinción con Texas Red-X Phalloidin y DAPI de las células sembradas en los biomateriales tras 72 h.

Estas tinciones permiten la observación de los núcleos y los cuerpos celulares, confirmando así la viabilidad celular. La fluorescencia azul, para los núcleos de las células y la fluorescencia roja para la actina del citoesqueleto. La actina es la proteína de filamento interconectada más importante en el citoesqueleto que realiza funciones celulares críticas, incluido el mantenimiento de la forma celular, el movimiento celular y el tráfico intracelular (Heras et al. 2019). Las imágenes muestran que las hDPSCs presentan su morfología típica en forma de huso y se encuentran distribuidas adecuadamente en la superficie del biomaterial, lo que indica la biocompatibilidad de los biomateriales probados. Además, en los biomateriales que incorporan material MBG se observa una mejor comunicación intercelular en comparación con el material C.

#### **4. Discusión**

En este capítulo se han evaluado *in vitro* los biomateriales C; C-5MBG; C-15MBG; C-5MBG-Zn y C-15MBG-Zn, realizando dos tipos de experimentos. Los primeros experimentos para determinar la viabilidad y capacidad de mineralización celular se realizaron tras exponer a las células durante 24 h y 10 días respectivamente a los diferentes medios condicionados 24 h, 72 h y 168 h (MC-24, MC-72 y MC-168). Tras estos experimentos las células fueron sembradas directamente sobre los biomateriales para conocer la actividad de la fosfatasa alcalina así como visualizar por microscopía confocal de fluorescencia la morfología celular.

Los resultados de viabilidad medidos por MTT demuestran que todos los biomateriales son biocompatibles tras exponer a las células a los iones liberados por los mismos.

La microscopía confocal de fluorescencia ha confirmado que los biomateriales sintetizados presentan buena capacidad para la adhesión y proliferación celular, siendo ambas más notables para los biomateriales con un 15% de contenido de MBG.

Por otra parte, tanto la capacidad de mineralización medida con la tinción roja de alizarina como la actividad de la ALP fueron superiores para el biomaterial C-15MBG-Zn con respecto a los otros biomateriales sintetizados, siendo la mayor diferencia con el material C.

La monitorización de la concentración iónica del medio de cultivo, en contacto con los biomateriales durante 24 h, 72 h y 168 h ha mostrado que los biomateriales C-5MBG y C-15MBG adsorben iones Ca y P del medio, mientras que este efecto no se produce en el caso de los biomateriales con MBG funcionalizados con Zn, C-5MBG-Zn y C-15MBG-Zn. Para explicar esta diferencia entre ambos tipos de biomateriales, se puede pensar en las modificaciones producidas en la superficie del material MBG por la funcionalización con Zn como por ejemplo la disminución de la superficie específica (véase Tabla 1.3). Otra diferencia podría estar provocada por los cambios en la carga superficial que modifique las interacciones iónicas con los iones en solución (Mohammed et al. 2014). La reactividad superficial de los MBG con el medio fisiológico y su capacidad para formar una capa de HA, ha sido señalada en la bibliografía como un factor determinante para promover el proceso de regeneración. En este trabajo, los ensayos de mineralización y diferenciación celular realizados con hDPSCs, han mostrado el efecto positivo de la incorporación

de MBG a la matriz de colágeno, efecto que es potenciado con la funcionalización con Zn. Dadas las discrepancias observadas por C-MBG y C-MBG-Zn en la adsorción de los iones Ca y P, cabe pensar que la mejora singular en la respuesta observada por los materiales que incorporan un 15% de MBG-Zn sea debido fundamentalmente al efecto sinérgico de liberación al medio de los iones Si y Zn (Huang et al. 2017).

## **5. Conclusiones**

Los biomateriales compuestos de matriz biopolimérica de colágeno y de material de vidrio bioactivo mesoporoso, C-MBG y C-MBG-Zn, procesados según el procedimiento presentado en el Capítulo 2, han demostrado ser biocompatibles, con hDPSCs *in vitro* en términos de viabilidad y diferenciación celular.

Los resultados de la evaluación *in vitro* con células hDPSCs analizados en este capítulo, destacan los efectos potenciadores en la respuesta en términos de diferenciación para los biomateriales compuestos que incorporan MBG y que el efecto positivo es potenciado con la funcionalización del MBG con Zn.



## 6. Referencias

About I, MJ Bottero, P De Denato, J Camps, JC Franquin and TA Mitsiadis. Human dentin production in vitro. *Exp Cell Res* 2000;258:33-41.

Atalayin C, Tezel H, Dagci T et al. In vivo performance of different scaffolds for dental pulp stem cells induced for odontogenic differentiation. *Braz Oral Res* 2016;30:e120.

Bakhtiar H, Mazidi SA, Mohammadi Asl S, Ellini MR, Moshiri A, Nekoofar MH, Dummer PMH. The role of stem cell therapy in regeneration of dentine-pulp complex: a systematic review. *Prog Biomater* 2018;7:249-68.

Barry FP. Biology and clinical applications of mesenchymal stem cells. *Birth Defects Res C Embryo Today* 2003;69:250-6.

Chamieh F, Collignon AM, Coyac BR, et al. Accelerated craniofacial bone regeneration through dense collagen gel scaffolds seeded with dental pulp stem cells. *Sci Rep* 2016;6:38814.

Chen CA, Chen YL, Huang JS, Huang GTJ, Chuang SF. Effects of Restorative Materials on Dental Pulp Stem Cell Properties. *J Endod* 2019;45:420-6.

Chen YJ, Zhao YH, Zhao YJ et al. Potential dental pulp revascularization and odonto-/osteogenic capacity of a novel transplant combined with dental pulp stem cells and platelet-rich fibrin. *Cell Tissue Res* 2015;361:439-55.

Ciraldo FE, Boccardi E, Melli V, Westhauser F, Boccaccini AR. Tackling bioactive glass excessive in vitro bioreactivity: Preconditioning approaches for cell culture tests. *Acta Biomater* 2018;75:3-10.

Egusa H, Sonoyama W, Nishimura M, et al. Stem cells in dentistry – part I: stem cell sources. *J Prosthodont Res* 2012;56:151-65.

El Karim IA, McCrudden MT, McGahon MK, Curtis TM, Jeanneau C, Giraud T, Irwin CR, Linden GJ, Lundy FT, About I. Biodentine Reduces Tumor Necrosis Factor Alpha-induced TRPA1 Expression in Odontoblastlike Cells. *J Endod* 2016;42:589-95.

Fukushima KA, Marques MM, Tedesco TK, Carvalho GL, Gonçalves F, Caballero-Flores H, Morimoto S, Moreira MS. Screening of hydrogel-based scaffolds for dental pulp regeneration-A systematic review. *Arch Oral Biol* 2019;98:182-94.

Gregory CA, Gunn WG, Peister A, Prockop DJ. An Alizarin red based assay of mineralization by adherent cells in culture: comparison with cetylpyridinium chloride extraction. *Anal Biochem* 2004;329:77-84.

Gronthos S, Mankani M, Brahimi J, Robey PG, Shi S. Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000;97:13625-30.

Gronthos S, Brahimi J, Li W, Fisher LW, Cherman N, Boyde A, DenBesten P, Robey PG, Shi S. Stem cell properties of human dental pulp stem cells. *J Dent Res* 2002;81:531-5.

Hayashi Y, Murakami M, Kawamura R, Ishizaka R, Fukuta O, Nakashima M. CXCL14 and MCP1 are potent trophic factors associated with cell migration and angiogenesis leading to higher regenerative potential of dental pulp side population cells. *Stem Cell Res Ther* 2015;29:111.

Heras C, Sanchez-Salcedo S, Lozano D, Peña J, Esbrit P, Vallet-Regi M, Salinas AJ. Osteostatin potentiates the bioactivity of mesoporous glass scaffolds containing Zn<sup>2+</sup> ions in human mesenchymal stem cells. *Acta Biomater*. 2019 Apr 15;89:359-371.

Hu L, Gao Z, Xu J, Zhu Z, Fan Z, Zhang C, Wang J, Wang S. Decellularized Swine Dental Pulp as a Bioscaffold for Pulp Regeneration. *Biomed Res Int*. 2017;2017:9342714.

Huang GT, Yamaza T, Shea LD, et al. Stem/progenitor cell-mediated de novo regeneration of dental pulp with newly deposited continuous layer of dentin in an in vivo model. *Tissue Eng Part A* 2010;16:605-15.

Huango M, Hill RG, Rawlinson SCF. Zinc bioglasses regulate mineralization in human dental pulp stem cells. *Dent Mater* 2017;33:543-52.

Iohara K, Imabayashi K, Ishizaka R, et al. Complete pulp regeneration after pulpectomy by transplantation of CD105+ stem cells with stromal cell-derived factor-1. *Tissue Eng Part A* 2011;17:1911-20.

Iohara K, Murakami M, Takeuchi N et al. A novel combinatorial therapy with pulp stem cells and granulocyte colony-stimulating factor for total pulp regeneration. *Stem Cells Transl Med* 2013;2:521-33.

Iohara K, Fujita M, Arijji Y, Yoshikawa M, Watanabe H, et al. Assessment of pulp regeneration induced by stem cell therapy by magnetic resonance imaging. *J Endod* 2016;42:397-401.

Ishizaka R, Iohara K, Murakami M et al. Regeneration of dental pulp following pulpectomy by fractionated stem/progenitor cells from bone marrow and adipose tissue. *Biomaterials* 2012;33:2109-18.

ISO 10993-5 (2005) Biological Evaluation of Medical Devices – Part 5: Tests for In Vitro Cytotoxicity. Geneva, Switzerland: International Standards Organization, Geneva, Switzerland.

Kim S, Shin SJ, Song Y, Kim E. In Vivo Experiments with Dental Pulp Stem Cells for Pulp-Dentin Complex Regeneration. *Mediators Inflamm* 2015;2015:409347.

Langer R, Vacanti JP. Tissue engineering. *Science* 1993;260:920-6.

Ma J, Huang BX, Zhao XC, Ban CL, Hao XH, Wang CZ. Substitutions of zinc in mesoporous silicate-based glasses and their physicochemical and biological properties. *Journal of Non-Crystalline Solids* 2018;491:98-105.

Miura M, Gronthos S, Zhao M, Lu B, Fisher LW, Robey PG et al. SHED: Stem cells from human exfoliated deciduous teeth. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;100:5807-12.

Mohammed NR, Mneimne M, Hill RG, Al-Jawad M, Lynch RJ, Anderson P. Physical chemical effects of zinc on in vitro enamel desmineralization. *J Dent* 2014;42:1096-104.

Nuti N, Corallo C, Chan BM, Ferrari M, Gerami-Naini B. Multipotent Differentiation of Human Dental Pulp Stem Cells: a Literature Review. *Stem Cell Rev* 2016;12:511-23.

Ohara T, Itaya T, Usami K, Ando Y, Sakurai H et al. Evaluation of scaffold materials for tooth tissue engineering. *J Biomed Mater Res A* 2010;94:800-5.

Prescott RS, Alsanea R, Fayad MI, et al. In vivo generation of dental pulp-like tissue by using dental pulp stem cells, a collagen scaffold, and dentin matrix protein 1 after subcutaneous transplantation in mice. *J Endod* 2008;34:421-6.

Ravindran S, Zhang Y, Huang CC, George A. Odontogenic induction of dental stem cells by extracellular matrix-inspired three-dimensional scaffold. *Tissue Eng Part A* 2014;20:92-102.

Rodríguez-Lozano FJ, Bueno C, Insausti CL, Meseguer L, Ramírez MC, Blanquer M, Marín N, Martínez S, Moraleda JM. Mesenchymal stem cells derived from dental tissues. *Inter Endod J* 2011;44:800-6.

Sui B, Chen C, Kou X, Li B, Xuan K, Shi S, Jin Y. Pulp Stem Cell-Mediated Functional Pulp Regeneration. *J Dent Res* 2019;98:27-35.

Volponi AA, Pang Y, Sharpe PT. Stem cell-based biological tooth repair and regeneration. *Trends Cell Biol* 2010;20:715-22.

Wang YY, Chatzistavrou X, Faulk D, Badylak S, Zheng L et al. Biological and bactericidal properties of Ag-doped bioactive glass natural extracellular matrix hydrogel with potential application in dentistry. *Eur Cell Mater* 2015;29:342-55.

Winning L, El Karim IA, Lundy FT. A Comparative Analysis of the Osteogenic Potential of Dental Mesenchymal Stem Cells. *Stem Cells Dev* 2019;28:1050-8.

Yu H, Zhang X, Song W, Pan T, Wang H, Ning T, Wei Q, Xu HHK, Wu B, Ma D. Effects of 3-dimensional Bioprinting Alginate/Gelatin Hydrogel Scaffold Extract on Proliferation and Differentiation of Human Dental Pulp Stem Cells. *J Endod* 2019;45:706-15.

Zhang W, Vazquez B, Oreadi D, Yelick PC. Decellularized Tooth Bud Scaffolds for Tooth Regeneration. *J Dent Res* 2017;96:516-23.

Zhang W, Walboomers XF, Van Kuppevelt TH et al. The performance of human dental pulp stem cells on different three-dimensional scaffold materials. *Biomaterials* 2006;27:5658-68.

Zhai Q, Dong Z, Wang W, Li B, Jin Y. Dental stem cell and dental tissue regeneration. *Front Med* 2019;13:152-9.



# CAPÍTULO 4

## **Procesado de nuevas formulaciones de cemento endodóncico bioactivo (BEC) compuestas de Agregado Trióxido Mineral (MTA) y MBG-Zn: MTA-MBG-Zn**

### **1. Introducción**

Los cementos endodóncicos del tipo agregado trióxido mineral (Mineral Trioxide Aggregate, MTA) y otras formulaciones cerámicas de composición similar, han demostrado que estimulan el proceso de remineralización natural en la interfaz material-tejido dentario (Torabinejab y Chivian 1999; Min et al. 2008). Esta propiedad les ha proporcionado las características necesarias para que en la actualidad se consideren cementos endodóncicos bioactivos (Bioactive Endodontic Cements, BECs) (Parirokh et al. 2018; Jiménez et al. 2019). La bioactividad está



producida por su reactividad química superficial en contacto con los fluidos fisiológicos, que produce la formación de una capa de hidroxiapatito carbonatado biomimética con el tejido natural, que es reconocida como tal por el entorno biológico y celular (Hench 1991).

La formulación del MTA está basada en silicatos de calcio,  $\text{Ca}_3\text{SiO}_5$  y  $\text{Ca}_2\text{SiO}_4$ , a los que se añade un elemento radiopacificador como el óxido de bismuto, zirconio, tántalo o tungsteno, entre otros, según el producto comercial (Tomás-Catalá et al. 2017; Parirokh et al. 2018). Se desarrolló a principios de la década de 1990 por Torabinejad (Lee et al. 1993) y fue aprobado por el organismo regulador de medicamentos y alimentos estadounidense (Food and Drug Administration, FDA) en 1998. Como producto comercial, se lanzó al mercado con el nombre ProRoot® MTA (Dentsply Tulsa Dental, Johnson City, TN, EE. UU.).

Los múltiples estudios pre-clínicos (Sanz et al. 2019) y clínicos (Parinyaprom et al. 2018) realizados con este material hasta la fecha, han confirmado sus propiedades de biocompatibilidad, su acción para promover la formación de tejidos duros y su capacidad de sellado marginal (de Oliveira et al. 2018; Küçükkaya et al. 2019) junto con otras propiedades, incluyendo sus efectos antibacterianos (Lovato et al. 2011). Sin embargo, pese a sus excelentes propiedades, existen algunos problemas en su aplicación clínica que requieren su mejora. Entre los principales inconvenientes que presenta su utilización destaca, largo tiempo de fraguado, dificultad para su manipulación en el acto clínico y su comportamiento de envejecimiento o biodegradación una vez aplicado, produciendo decoloraciones dentales no deseadas. En los últimos años, los fabricantes han intentado solventar estos problemas, encontrándose disponibles nuevos productos en el mercado (Hosoya et al. 2019).

Entre las indicaciones del MTA, se encuentran que este material dental es utilizado ampliamente en terapias de pulpa vital, sellado coronal durante los procedimientos endodóncicos regenerativos aislando el tratamiento intraconducto de la restauración coronal, barreras apicales en los dientes inmaduros con pulpas necróticas, sellados de perforaciones o cirugías apicales entre otras (Torabinejad et al. 2018). Si nos centramos en los procedimientos REPs, estos materiales son utilizados como material de sellado coronal. Existen varias publicaciones sobre estudios en animales en las que su aplicación aumenta la tasa de éxito en términos de aumento de la longitud y anchura de la raíz, así como la curación de patología de los tejidos periapicales (Zhu et al. 2012; Torabinejad et al. 2014; Rodríguez et al. 2015; Torabinejad et al. 2015; Moradi et al. 2016; Altaï et al. 2017; Dianat et al. 2017). Estos resultados pueden ser atribuidos a que los materiales de sellado muestran biocompatibilidad, evitan la penetración de bacterias o toxinas al interior del conducto, no se reabsorben ni son afectados por la contaminación de sangre (Ma et al. 2011), además de mejorar la proliferación y diferenciación celular (Wongwatanasanti et al. 2018).

Por otra parte, los estudios biológicos indican que los BECs poseen el potencial de interactuar con células madre cuando se aplican como biomateriales en REPs debido a su capacidad conductiva (Torabinejad y Parirokh 2010, Kontakiotis et al. 2015), requisito previo de un material que actúe como barrera coronal. Entre las propiedades biológicas del MTA, se encuentran que éste actúa modulando la proliferación, migración y diferenciación de células en dientes y tejidos adyacentes (odontoblastos, osteoblastos, células madre de pulpa dental, fibroblastos) (Schneider et al. 2014).

Moghaddame-Jafari y cols. mostraron que MTA ProRoot White promueve la proliferación de células de pulpa dental (Moghaddame et al. 2005). D'Antò y cols. evaluaron la capacidad de MTA para apoyar la adhesión, proliferación y migración de células madre mesenquimales humanas (human Mesenchymal Stem Cells; hMSC), mostrando los resultados que MTA fue capaz de mejorar la adhesión, el crecimiento y la migración de hMSC (D'Antò et al. 2010).

En condiciones patológicas, la reacción más característica que induce el MTA es la reducción de la inflamación de los tejidos conectivos mediante la regulación de la producción de citoquinas y de las células inmunes (Camilleri y Pitt Ford 2006). El MTA es un cemento que presenta un alto pH alcalino cuando entra en contacto con el líquido tisular y libera lentamente los iones de calcio después de la hidratación. Además, crea un contacto íntimo con la dentina de la cámara pulpar y estimula la producción y / o liberación de moléculas de señalización, que son necesarias para la formación de nuevo tejido en el espacio pulpar (Torabinejad et al. 2017).

Debido a estas excelentes propiedades, el MTA ProRoot así como nuevos BECs disponibles en el mercado, como MTA Angelus, Endo Sequence Bioceramic putty, Biodentine y CEM cement han sido utilizados en tratamientos REPs como material de sellado coronal (Liu et al. 2015; Tran et al. 2012; Zhu et al. 2014), aunque es necesario indicar que el MTA ProRoot es el más utilizado para este tipo de indicaciones debido a su biocompatibilidad, capacidad de sellado y adaptación marginal (Kontakiotis et al. 2015). No hay estudios a largo plazo de procedimientos REPs en humanos (Torabinejad y Turman 2011; Saoud et al. 2015; Torabinejad et al. 2017), sin embargo, se acepta que los procedimientos de regeneración pueden resolver la periodontitis apical, con la mayoría de las investigaciones utilizando MTA ProRoot como barrera coronal. Es por ello que, actualmente el MTA ProRoot sea el material de elección para uso como barrera de

sellado coronal durante los protocolos de regeneración endodóncica, debido a que tiene una base de evidencia científica mayor en comparación con otros BECs (Wigler et al. 2013; Kontakiotis et al. 2015). Aunque es necesario puntualizar que, actualmente aún existen pocas investigaciones basadas en la evidencia sobre la efectividad e influencia del material utilizado como barrera coronal en procedimientos REPs en la resolución de la patología.

Retomando los objetivos planteados en este trabajo de Tesis, y concretamente el desarrollo de biomateriales de MBG para REPs, una posibilidad interesante es su utilización para optimizar las propiedades de los BECs. En este contexto, si realizamos una búsqueda en la bibliografía, encontramos los estudios de Sauro y cols. (Sauro et al. 2013; Sauro et al. 2018), en los que se sintetiza un material BG por fundido funcionalizado con Zinc (Zn) y modifica un cemento Portland tipo I al añadir fosfato de calcio. Ambos materiales son incorporados en forma de partículas en un 33% en peso a una resina fotopolimerizable. El autor concluye que los materiales que incorporan el BG con Zn aumentan su longevidad al mantener las propiedades mecánicas estables en el tiempo, al igual que aumentaron el potencial de remineralización celular y la expresión de los genes osteogénicos Runx2 y ALP, siendo los materiales con contenido en Zn los más prometedores materiales alternativos de protección pulpar para uso clínico. Un estudio similar realiza Sasaki y cols. (Sasaki et al. 2019) los cuales, fabricaron un BG dopado con Sr también por fundido que incorporaron a un cemento de ionómero de vidrio en una proporción en peso de 4:1, observando como el cemento modificado promovía la actividad de la fosfatasa alcalina en la diferenciación osteoblástica.

Sólo se ha encontrado un estudio de Corral y cols. (Corral et al. 2017) en el que mezclan un BG sintetizado por sol-gel con composición  $58\text{SiO}_2:40\text{CaO}:\text{P}_2\text{O}_5$  con el cemento bioactivo Biodentine<sup>TM</sup> (Septodont, Francia), encontrando que la incorporación del material vítreo aumenta la bioactividad *in vitro*, además de una

mayor formación de área interfacial al ser incorporado en un disco de dentina y sumergidos en SBF (Simulated Body Fluid; SBF), con precipitación de Si en interior de los túbulos dentinarios.

El objetivo del presente capítulo, es el estudio de la utilización del material MBG-Zn para mejorar las propiedades de los BECs. Para ello, se ha estudiado una formulación basada en un cemento MTA comercial. Así, se ha estudiado el método de preparación y la influencia de la incorporación de MBG-Zn en las propiedades físico-químicas finales del material, en el tiempo de fraguado, en la respuesta bioactiva y de biocompatibilidad celular *in vitro*.

## **2. Procedimiento experimental**

### **2.1. Preparación de la formulación MTA-MBG-Zn**

Para llevar a cabo la preparación del material MTA-MBG-Zn se seleccionó el material comercial MTA ProRoot White (DENTSPLY Tulsa Dental Specialties, DENTSPLY International, Inc. 5100 E. Skelly Drive, Suite 300, Tulsa, OK – lot n. 0000163567) y el material MBG sintetizado en el Capítulo 1, funcionalizado con 7.5% de Zinc, MBG-7.5Zn. La formulación denominada, MTA-MBG-Zn, fue preparada utilizando la proporción en peso, 85.0 % MTA ProRoot y 15.0 % MBG-7.5Zn (tamizado por debajo de 32 $\mu$ m). Estas proporciones de los dos materiales en formato de partículas se mezclaron, molieron manualmente en un mortero de ágata y se tamizaron con un tamiz de 32 $\mu$ m para asegurar una mezcla homogénea de ambos materiales.

Como material control para evaluar el efecto de la incorporación del componente MBG-7.5Zn en todos los experimentos, se utilizan muestras preparadas con el

producto comercial MTA ProRoot White (Dentsply) únicamente, y que se denominará como MTA.

## **2.2. Caracterización físico-química de las formulaciones**

### **2.2.1. Caracterización de las formulaciones en formato partículas**

El análisis de la composición química y la distribución de tamaño de partícula de los materiales precursores (en formato de partículas), MTA ProRoot y MBG-7.5Zn fue realizado respectivamente utilizando fluorescencia de rayos X (XRF) y difracción láser (LD).

Además, los parámetros texturales fueron determinados por fisisorción de N<sub>2</sub> para el material MTA ProRoot y para la formulación mezcla estudiada MTA-MBG-Zn.

Los diferentes procedimientos y técnicas de caracterización están recogidos con mayor detalle en el Anexo 1.

### **2.2.2. Proceso de hidratación y caracterización de las formulaciones fraguadas**

Los materiales MTA y MTA-MBG-Zn en formato de partículas fueron hidratados de acuerdo con la cantidad de volumen de líquido recomendada por el fabricante, en nuestro caso usamos 180 µL de agua Milli-Q para 0.5 mg de MTA.

Para el caso de la formulación MTA-MBG-Zn, se debe tener en cuenta que una cantidad elevada de agua va a ser absorbida por el material mesoporoso, MBG-Zn

(alto volumen de poro). Por tanto, para normalizar las condiciones del fabricante a la formulación estudiada, MTA-MBG-Zn, se tuvo en cuenta este volumen adicional. Para ello se consideró el volumen de nanoporo de MBG-7.5Zn,  $0.25 \text{ cm}^3 \text{ g}^{-1}$ , obtenido por fisisorción de  $\text{N}_2$  (véase Tabla 1.3). A partir de este dato se calculó la cantidad de agua adicional absorbida por los nanoporos del material MBG-7.5Zn.

Se realizó la mezcla manual utilizando una espátula de metal, agregando el líquido al polvo en una placa de vidrio. Se obtuvo una pasta de consistencia homogénea, que fue compactada en un molde de silicona de 10 mm de diámetro y 7 mm de alto. Los moldes con el material fueron introducidos en un incubador a  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  y 95% de humedad relativa durante 24 h para que se produjera la reacción de fraguado.

El tiempo de fraguado se determinó según el manual de la Sociedad Americana para Pruebas y Especificación de Materiales C 266. Para llevar a cabo esta medida, se utilizó el sistema de agujas de Gillmore, en el cual para determinar el tiempo de fraguado inicial y final se utilizan agujas de  $113.4 \pm 0.5\text{gr}$  y  $453.6 \pm 0.5\text{gr}$  respectivamente. Este procedimiento se repitió a intervalos de 60 s, y el tiempo se midió utilizando un cronómetro digital. Los tiempos de fraguado se midieron desde el inicio de la mezcla hasta el momento en que la huella de la aguja en la superficie del material dejaba de ser visible. Las mediciones se realizaron por triplicado.

Los materiales, tanto en formato de partículas como fraguadas se analizaron por difracción de rayos X (DRX) y espectroscopia infrarroja de transformada de Fourier (FTIR).

Los diferentes procedimientos y técnicas de caracterización están recogidos en el Anexo 1.

### **2.3. Ensayo de bioactividad *in vitro* en SBF**

El ensayo de bioactividad se llevó a cabo por inmersión en SBF (Kokubo y Takadama 2006) de piezas procesadas (fraguadas) con las dimensiones 10 mm de diámetro y 7 mm de altura, siguiendo el mismo protocolo descrito anteriormente en el apartado 2.2.2. El protocolo para la preparación del SBF se puede consultar en la sección 1.12 del Anexo 1. Antes de comenzar el ensayo, las piezas se esterilizaron siendo expuestas durante 10 min a radiación ultravioleta (UV) por cada lado, en una campana de flujo laminar, y las soluciones de SBF fueron filtradas usando un filtro bacteriostático de 0.2  $\mu\text{m}$  (Biofil). Después de la esterilización, las piezas se sumergieron en 13 mL de SBF contenido en un Falcon de 50 mL, y se incubaron durante 4, 24, 72 y 168 horas a 36.5 °C y con una velocidad de agitación de 60 rpm. Después del tratamiento en SBF, las piezas se secaron en una estufa a 50 °C y se almacenaron en un desecador. Las concentraciones de los iones liberados al SBF (Si, Ca, P, Zn, Bi y Al) fueron monitorizadas después de 4, 24, 72 y 168h mediante espectroscopia de emisión atómica de plasma acoplado inductivamente (ICP-AES). La solución control consistió en SBF puro que se preparó y almacenó simultáneamente bajo las mismas condiciones.

La microestructura de las formulaciones en formato particulado, fraguado y tras tratamiento con SBF fueron analizadas por microscopía electrónica de barrido de emisión de campo (FEG-SEM), análisis de dispersión de energía de rayos X de dispersión de energía (EDX), y espectroscopía infrarroja de transformada de Fourier (FTIR).



Los diferentes procedimientos y técnicas de caracterización están recogidos en el Anexo 1.

#### **2.4. Estudio *in vitro* de biocompatibilidad de las formulaciones MTA y MTA-MBG-Zn utilizando células madre pulpaes (hDPSCs)**

Para llevar a cabo los estudios *in vitro* las piezas de MTA y MTA-MBG-Zn se confeccionaron siguiendo las mismas condiciones anteriormente descritas para el estudio de bioactividad en SBF (apartado 2.3), con la única diferencia en el tamaño de los moldes que fue de 7 mm de diámetro y 4 mm de altura en este caso. Para el fraguado del material, los moldes fueron introducidos en un incubador a 37 °C y 95% de humedad relativa durante 24h para posteriormente ser esterilizados usando radiación ultravioleta durante 10 minutos por cada lado. Para realizar los experimentos de biocompatibilidad *in vitro* se decidió utilizar el medio de cultivo  $\alpha$ -MEM como vehículo de extracción de los elementos procedentes de los materiales a estudiar, al cual se hará referencia como en el anterior capítulo como medio condicionado. Antes de realizar los distintos medios condicionados, las piezas de MTA y MTA-MBG-Zn fraguadas, fueron lavadas dos veces con PBS estéril durante 15 min e incubados en medio de cultivo sin FBS durante 24h como pre-condicionamiento. Para obtener los medios condicionados, las piezas de ñps materiales fueron incubados en medio de cultivo en una placa de 12 pocillos durante 24, 72 y 168 horas a 37 ° C en una atmósfera húmeda que contenía un 5% de CO<sub>2</sub>. La relación entre el área de la superficie del material y el volumen de medio se estableció en aproximadamente 1,5 cm<sup>2</sup> mL<sup>-1</sup> en conformidad con la Organización Internacional para la Normalización 10993-5. Una vez completado el tiempo de incubación, el medio fue extraído y filtrado usando un filtro bacteriostático de 0.2  $\mu$ m (Biofil). Por último, se midió el pH de los diferentes medios condicionados.

#### **2.4.1. Ensayo de viabilidad celular**

La tasa de viabilidad celular de hDPSCs ante los distintos medios condicionados, se evaluó utilizando el ensayo de bromuro de 3- (4,5-dimetiltiazol-2-il) - 2,5-difeniltetrazolio MTT (MTT Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide Sigma Aldrich Product Number: M2128). Las células fueron sembradas a una densidad de  $1 \times 10^3$  células por pocillo en un volumen de 100  $\mu$ l en placas de 96 pocillos. Las células se mantuvieron 72h en  $\alpha$ -MEM suplementado con 10% FBS, 1% L-glutamina y 1% de penicilina/estreptomicina. Tras las 72h, se retiró el medio de cultivo y durante 24h se expuso a las células a los diferentes medios condicionados. Las células cultivadas en medio de cultivo sin condicionamiento fueron utilizadas como control. Pasadas las 24h, se añadieron 10  $\mu$ l de una solución de 5 mg / ml de bromuro de 3- (4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazolio al medio de cultivo que permaneció en incubación durante 3 horas a 37°C. Tras este periodo, el sobrenadante se retiró y los cristales de formazan se solubilizaron con 200  $\mu$ l por pocillo de dimetilsulfóxido (DMSO). La absorbancia a 570 nm se midió utilizando un espectrofotómetro automático de microplacas (GENios, Tecan, Suiza), y los datos se analizaron utilizando el software Prism GraphPad (GraphPad, La Jolla, CA).

#### **2.3.2. Ensayo de actividad de fosfatasa alcalina**

Para realizar este ensayo las células fueron sembradas directamente sobre las piezas de los materiales, no haciendo uso por tanto del medio condicionado. Las células fueron sembradas en una placa de 12 sobre las piezas de material a una densidad de  $1 \times 10^5$  en 25  $\mu$ l de medio y se mantuvo a 37°C durante 30 min para asegurar la adhesión celular a la superficie del material. Pasados los 30 min se

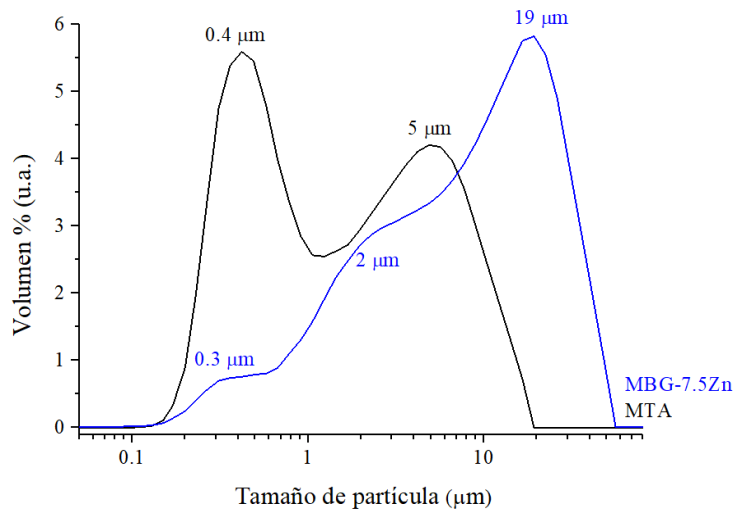
añadieron 750  $\mu$ l de medio a cada pocillo. Los resultados de actividad ALP fueron recogidos a los 3 y 7 días. El medio de cultivo celular fue cambiado cada dos días. El experimento fue realizado por triplicado. En cada punto temporal del experimento, el medio fue retirado y las piezas de material fueron lavadas dos veces con PBS, para luego ser lisar las células utilizando 600  $\mu$ l de tampón de lisis (0,2% Triton X-100), seguido de un período de incubación de 15 minutos a 37°C. Las células lisadas fueron recogidas en un eppendorf, el cual fue agitado y centrifugado a 4°C durante 10 min. El sobrenadante de cada muestra se recogió en un nuevo eppendorf estéril y fue almacenado a -20°C. Para llevar a cabo la cuantificación de ALP se utilizó el kit de detección de dietanolamina (Sigma-Aldrich, Reino Unido). La actividad de ALP se normalizó al contenido total de proteínas, el cual se midió utilizando un kit de ensayo de proteínas BCA (Pierce, Rockford, IL, EE. UU.), por lo que los resultados fueron expresados como  $\mu$ mol PNPP / min / mg de proteína. El procedimiento realizado fue igual al realizado en el anterior capítulo.

### **3. Resultados**

#### **3.1. Caracterización físico-química**

##### **3.1.1. Caracterización de los materiales en formato de partículas**

Las medidas de tamaño de partícula se muestran en la Figura 4.1.



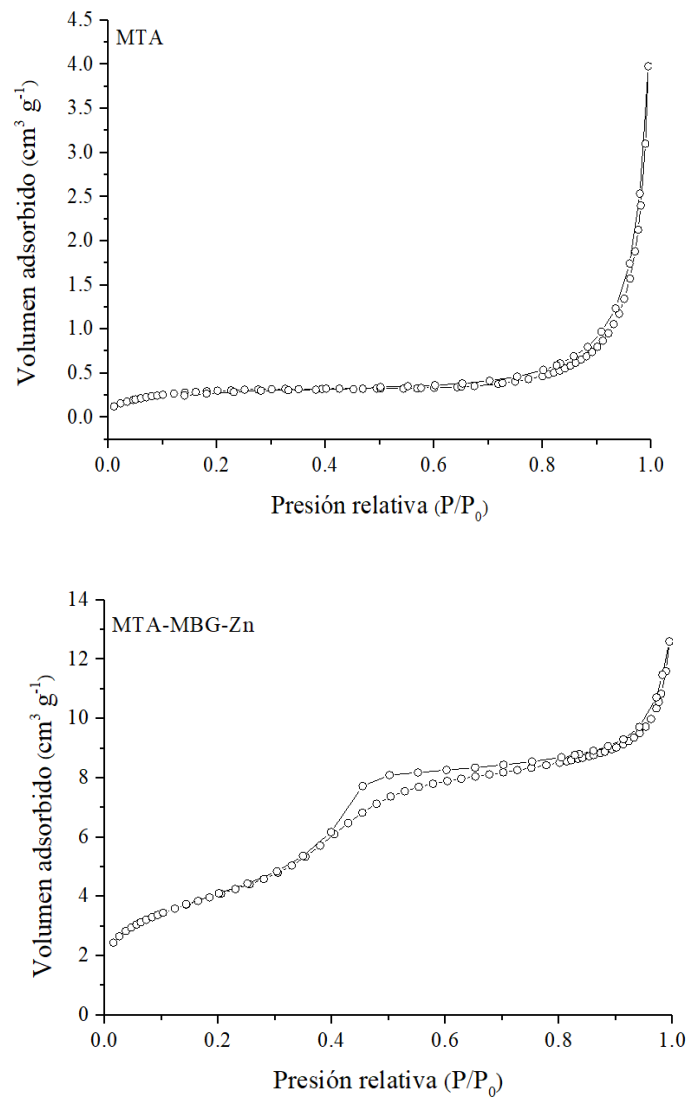
**Figura 4.1.** Distribución LS del tamaño de partícula de los materiales MTA y MBG-7.5Zn. (u.a.): unidades arbitrarias.

La distribución de tamaño de partícula para el MTA es bimodal, mientras que en MBG-7.5Zn se puede observar una ancha distribución con máximo destacado en 19 µm. El material MBG-7.5Zn presenta por tanto un tamaño de partícula mayor que el MTA (19-5 µm), presentando un pequeño hombro para el tamaño de 0.3 µm.

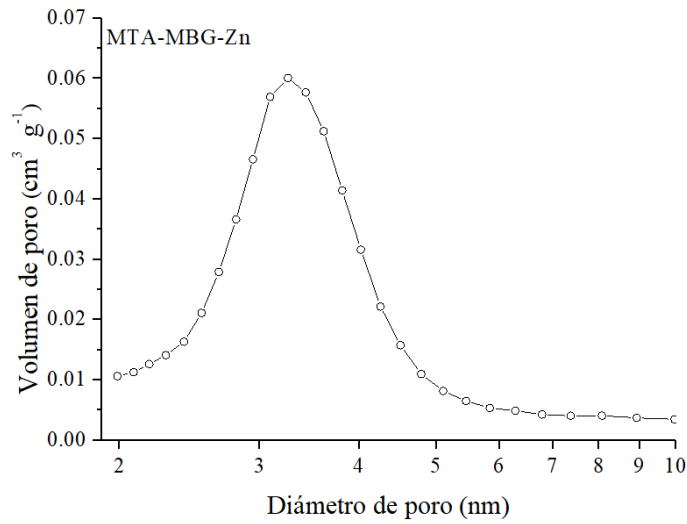
Las isothermas y la distribución BJH de tamaño de poro obtenido a partir de la isoterma de adsorción para los materiales MTA y MTA-MBG-Zn se muestran en la Figura 4.2.

EL MTA muestra una isoterma de adsorción-desorción tipo IIb, exhibiendo una curva de hysteresis tipo H3 correspondiente a un material no nanoporoso. Para el material MTA-MBG-Zn se muestra una isoterma de tipo IV con curva de

hysteresis tipo H1, característica de materiales mesoporosos, así como una estrecha distribución de poro (Figura 4.3) (Rouquerol et al. 1999).



**Figura 4.2.** Isotherma de adsorción/desorción de N<sub>2</sub> de MTA y MTA-MBG-Zn.



**Figura 4.3.** Distribución BJH de tamaño de poro obtenida a partir de la isoterma de adsorción para el material MTA-MBG-Zn.

La Tabla 4.1 presenta un resumen de los parámetros texturales obtenidos por adsorción de N<sub>2</sub>, incluyendo los valores de superficie específica  $S_{BET}$ , volumen total de poro y tamaño de poro correspondiente al valor máximo de las distribuciones BJH.

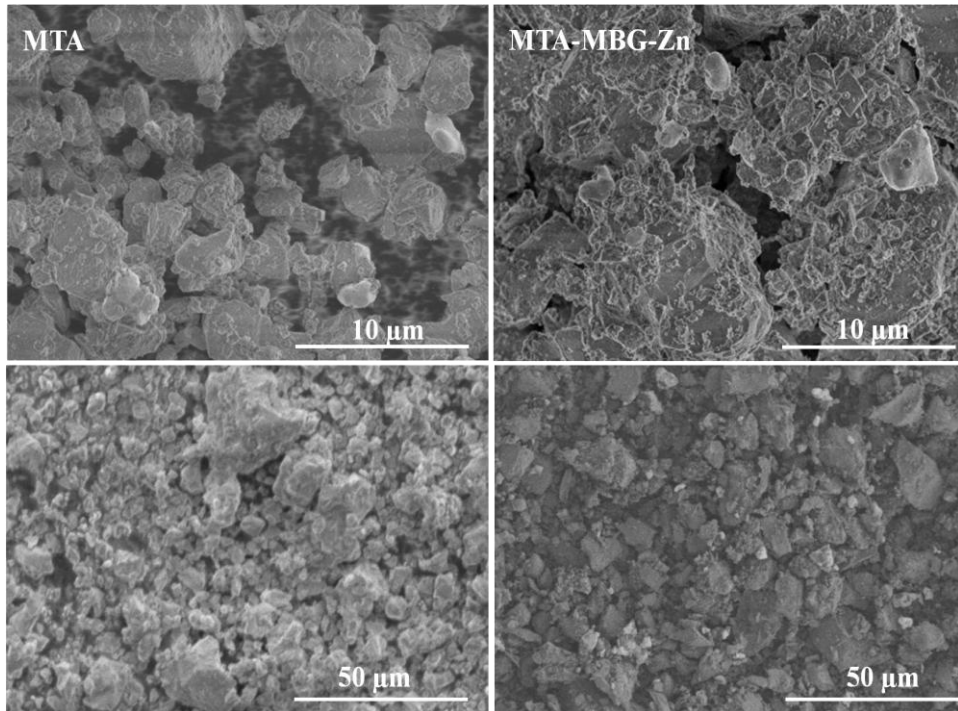
**Tabla 4.1.** Resumen parámetros texturales de los materiales MTA y MTA-MBG-Zn obtenidos a partir de las medidas de fisisorción de N<sub>2</sub>.

<b>Materiales</b>	<b>S<sub>BET</sub><sup>a</sup> (m<sup>2</sup> g<sup>-1</sup>)</b>	<b>V<sub>T</sub><sup>b</sup> (cm<sup>3</sup> g<sup>-1</sup>)</b>
<b>MTA</b>	1.4 ± 0.0	0.003 ± 0.000
<b>MTA-MBG-Zn</b>	14.8 ± 0.0	0.016 ± 0.000

± desviación estándar

Asimismo, la superficie específica calculada por BET (Tabla 4.1) confirma una superficie significativamente mayor ( $14.8 \pm 0.0 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$ ) ( $p < 0.0001$ ) y volumen de poro total ( $0.016 \pm 0.000 \text{ cm}^3 \text{ g}^{-1}$ ) ( $p < 0.0001$ ) para MTA-MBG-Zn.

El estudio de la microestructura mediante micrografías FEG-SEM (Figura 4.4) confirma la presencia de partículas con tamaños que se corresponden con los indicados por LD.

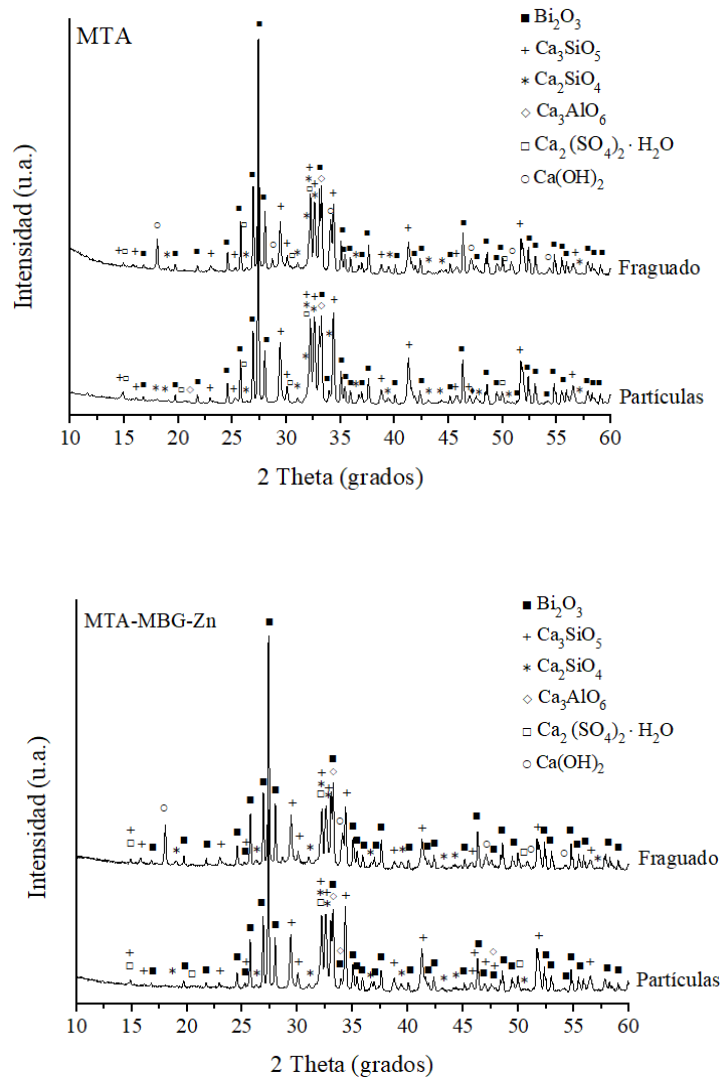


**Figura 4.4.** Micrografías de microscopía electrónica de barrido (FEG-SEM) en diferentes aumentos de los materiales sin hidratar que muestran la microestructura de las partículas del material en formato de partículas para MTA (columna de la izquierda) y MTA-MBG-Zn (columna derecha).

### **3.1.2. Proceso de hidratación y caracterización de las formulaciones fraguadas**

La Figura 4.5 muestra el análisis de DRX para las formulaciones en formato de partículas y fraguados (de forma conjunta en la misma gráfica), de MTA y MTA-MBG-Zn.





**Figura 4.5.** Diagrama de difracción de rayos X en condiciones de rutina (WXR) de los materiales MTA y MTA-MBG-Zn.

Tanto para los materiales en formato particulado como fraguados tras la hidratación, los picos más intensos fueron identificados con el  $\text{Bi}_2\text{O}_3$  (PDF 01-071-0465), material utilizado en el MTA comercial para proporcionar radiopacidad. En ambos materiales también son detectados picos que se corresponden con  $\text{Ca}_3\text{SiO}_5$  (PDF 01-086-0402),  $\text{Ca}_2\text{SiO}_4$  (PDF 01-077-0409) y  $\text{Ca}_3\text{Al}_2\text{O}_6$  (PDF 00-032-0148). De forma minoritaria se identifica la fase de sulfato, como  $\text{Ca}_2(\text{SO}_4) \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (PDF 00-024-1067). Tras la hidratación, los picos en  $2\theta = 18.0; 28.6; 34.1; 47.1; 50.8$  y  $54.3$  se utilizan para identificar la formación de  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  (PDF 00-044-1481). Los espectros de difracción muestran que la mezcla física de ambos materiales no produce cambios de cristalinidad.

La Figura 4.6 muestra los resultados de la espectroscopia infrarroja utilizada para estudiar la formación de fases tanto cristalinas como amorfas.

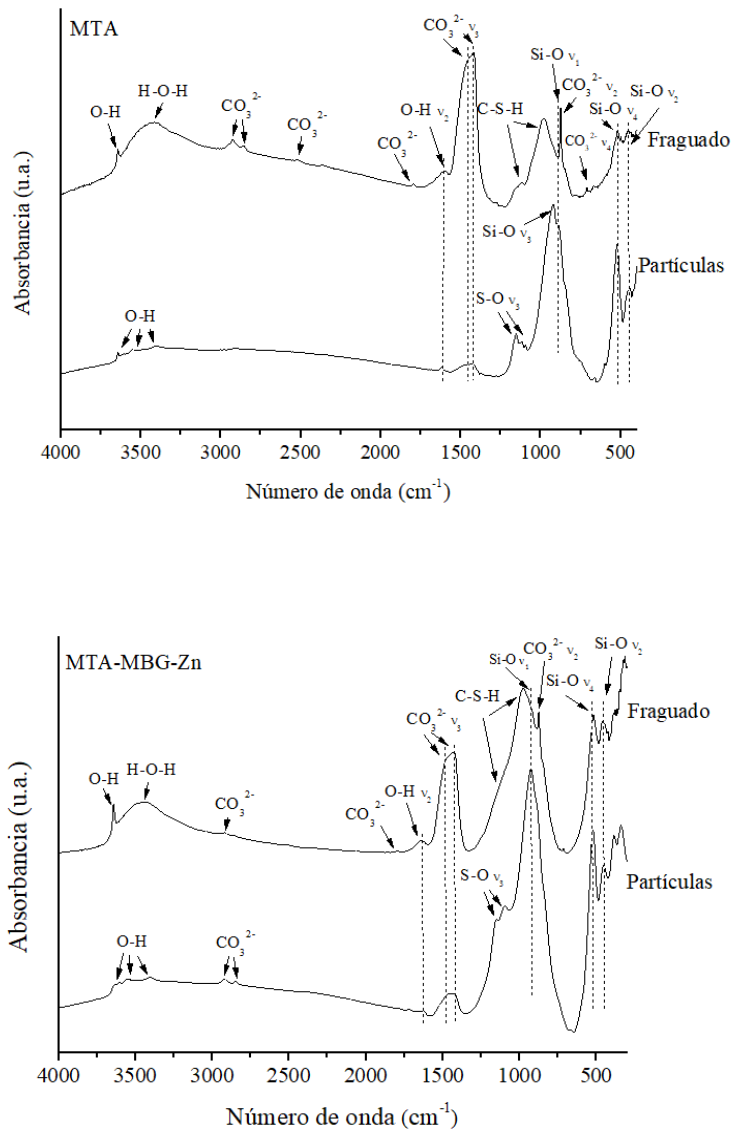


Figura 4.6. Espectros FT-IR para los materiales MTA y MTA-MBG-Zn no hidratados e hidratados.

Las principales bandas vibratorias identificadas para los espectros de los materiales en formato partícula corresponden a la flexión asimétrica de vibración del enlace de Si – O ( $\nu_1$ ), y flexión Si – O ( $\nu_4$  y  $\nu_2$ ) de los componentes mayoritarios de silicato de calcio centradas en 925, 525 y 446  $\text{cm}^{-1}$ , respectivamente (Mollah et al. 2000; Ylmén et al. 2009). Las bandas triples definidas en el rango 1155–1096  $\text{cm}^{-1}$ , se identifican con estiramientos del enlace S – O ( $\nu_3$ ) de  $\text{SO}_4^{2-}$  (Mollah et al. 2000). Bandas en 3640, 3550 y 3405  $\text{cm}^{-1}$  están adscritas a las vibraciones de estiramiento O – H de compuestos de sulfato (Hughes et al. 1995).

Al hidratarse los materiales, se observan importantes cambios en los espectros. Los cambios de intensidad de las bandas de Si – O son observados desde 900  $\text{cm}^{-1}$  hacia 1000–1100  $\text{cm}^{-1}$ , lo que sugiere, un reordenamiento en el subsistema de silicatos como resultado de la disolución de los silicatos de calcio y simultánea polimerización de la sílice para formar C-S-H (Yu et al. 1999; Ylmén et al. 2009).

La banda de estiramiento de Si – O cambia debido a la polimerización de la banda  $\text{SO}_4^{2-}$  (Mollah et al. 2000). Para ambos materiales, las bandas de carbonato en 714, 872 y 855  $\text{cm}^{-1}$ , 1420–1470  $\text{cm}^{-1}$  y 2950–2500  $\text{cm}^{-1}$  son debidas a la reacción del  $\text{CO}_2$  atmosférico con el hidróxido de calcio (Hughes et al. 1995; Mollah et al. 2000;). La banda ancha centrada en 3400  $\text{cm}^{-1}$  se debe a vibraciones de estiramiento simétricas y asimétricas de moléculas de agua adsorbidas O – H.

El tiempo de fraguado de los materiales se presenta en la Tabla 4.2.

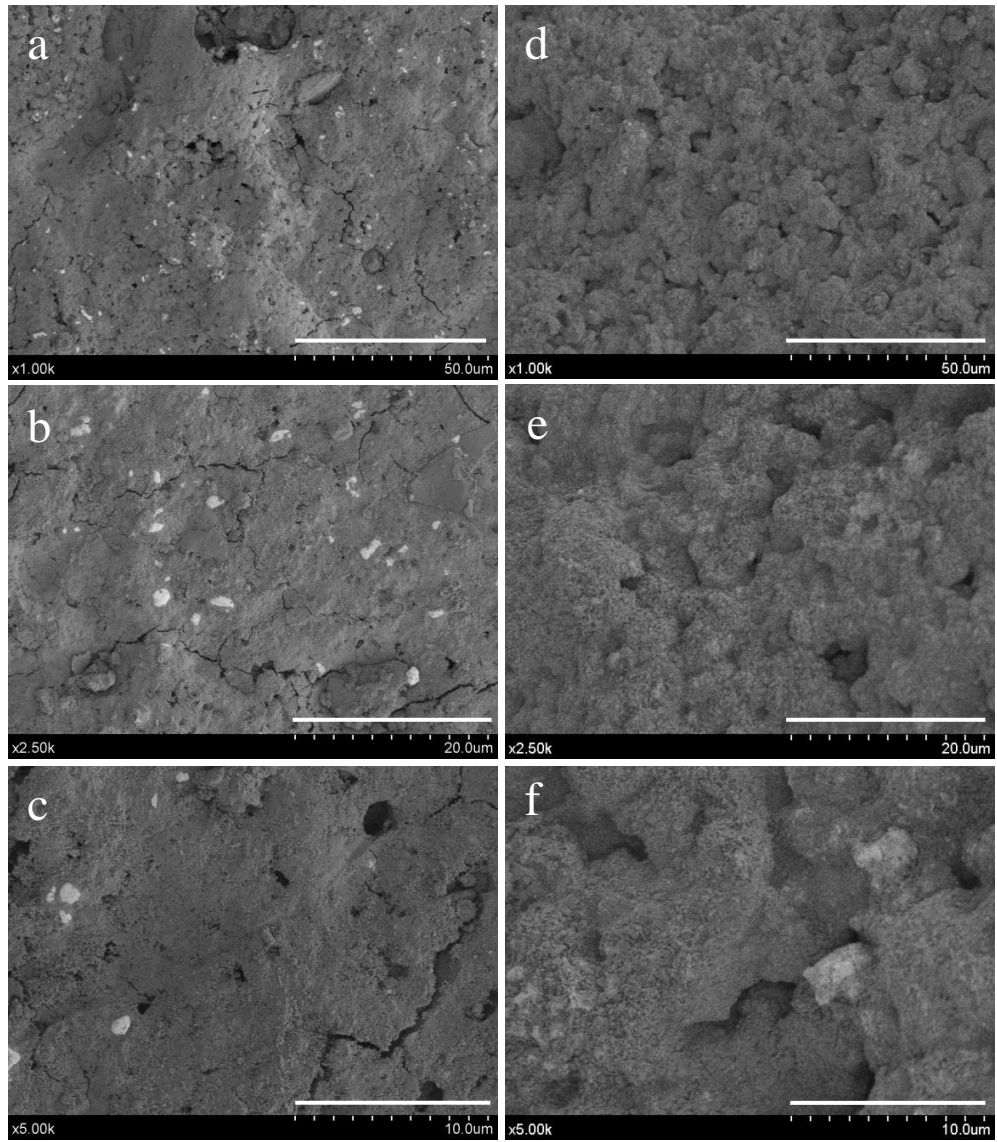
**Tabla 4.2.** Tiempo de fraguado inicial y final de los materiales MTA y MTA-MBG-Zn.

<b>Materiales</b>	<b>Fraguado inicial (min)</b>	<b>Fraguado final (min)</b>
<b>MTA</b>	$17 \pm 2$	$241 \pm 6$
<b>MTA-MBG-Zn</b>	$35 \pm 1$	$119 \pm 5$

$\pm$  desviación estándar

Como se puede observar el tiempo de fraguado inicial para el material que incorpora el vidrio mesoporoso es el doble mientras que curiosamente el tiempo final se reduce a la mitad.

Imágenes electrónicas en back-scatter FEG-SEM de las superficies de los materiales fraguados se muestran en la Figura 4.7.

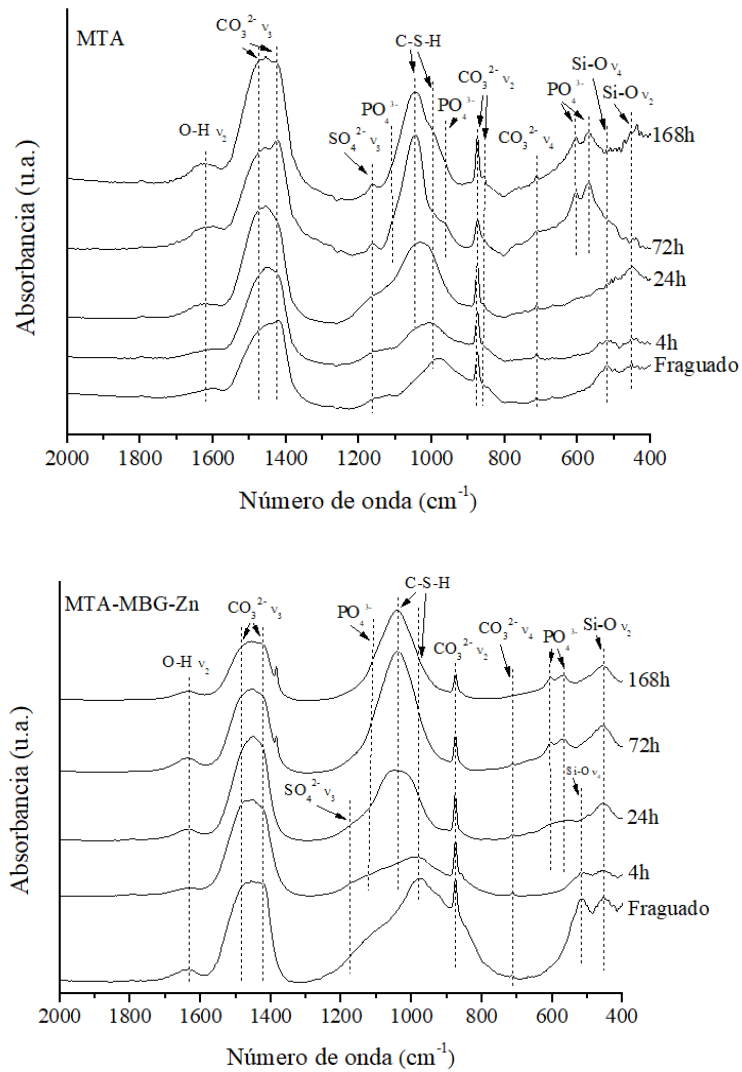


**Figura 4.7.** Imágenes FEG-SEM back-scatter de las superficies de los materiales fraguados a diferentes magnificaciones para MTA (a, b, c) y MTA-MBG-Zn (d, e, f).

Las imágenes muestran diferencias entre las superficies de los materiales. Para MTA se observa una superficie porosa irregular con presencia de grietas. Las partículas brillantes con tamaños  $\leq 1 \mu\text{m}$  se corresponden con el óxido de bismuto, apareciendo distribuidos homogéneamente sobre la superficie. Para MTA-MBG-Zn también se observa una superficie porosa pero la misma es más irregular que la del MTA. En este caso, es más complicada la observación de las partículas brillantes de  $\text{BiO}_2$ .

### **3.2. Evaluación de la bioactividad *in vitro* en SBF**

La Figura 4.8 muestra los espectros de absorbancia FT-IR de las formulaciones tras los distintos tiempos de tratamiento en SBF en comparación con los espectros de las formulaciones fraguadas, esto es, sin tratamiento en SBF.



**Figura 4.8.** Espectros FTIR para MTA y MTA-MBG-Zn tras los distintos tiempos de tratamiento en SBF, junto con el espectro del material fraguado, esto es, sin tratamiento SBF (u.a: unidades arbitrarias).

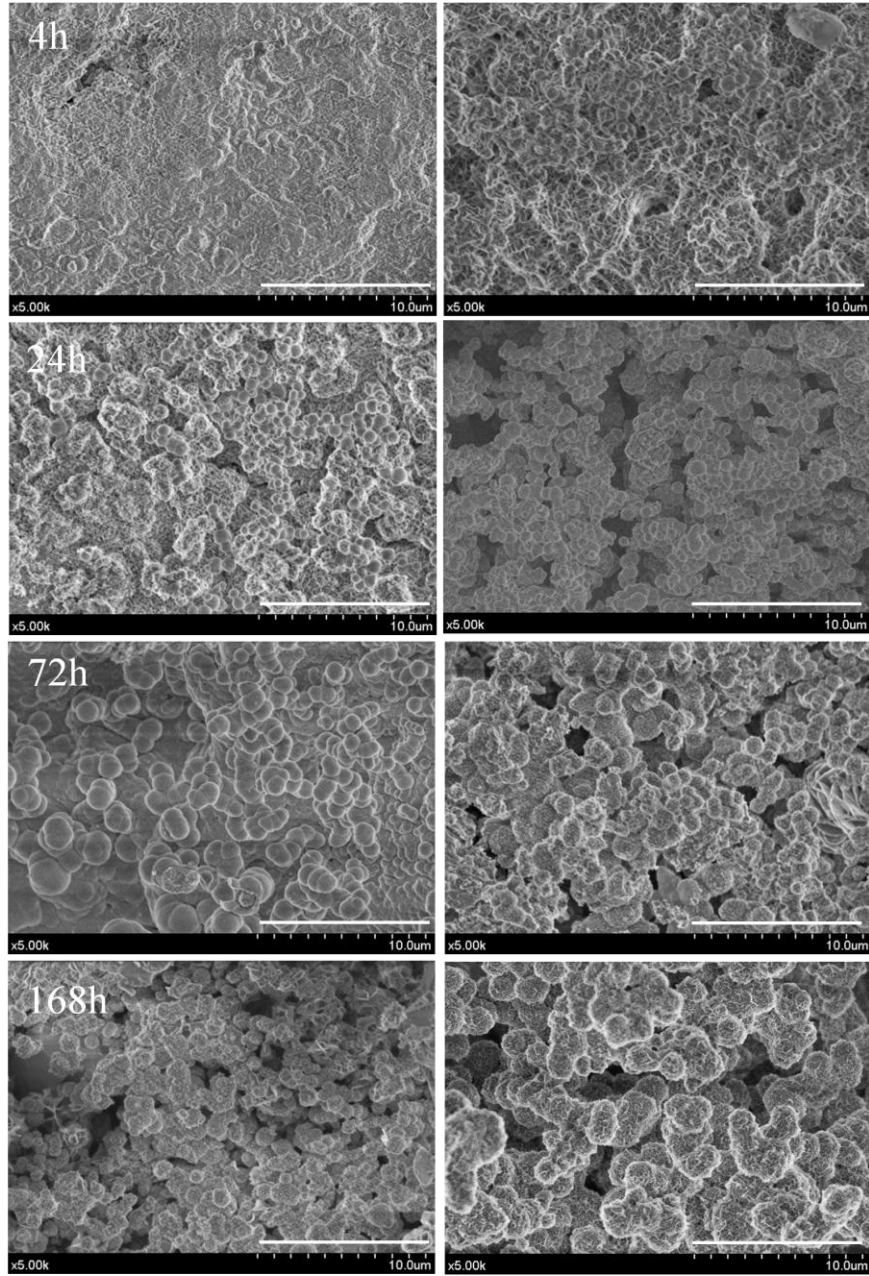


A mayor tiempo de tratamiento en SBF, para ambas formulaciones se observa un aumento en la intensidad de la ancha banda identificada con CSH, en el rango de 1000–1100  $\text{cm}^{-1}$ .

Del mismo modo, se observa un aumento en la formación de las bandas de la fase fosfato localizadas a 1097, 960, 607 y 570  $\text{cm}^{-1}$  (Tay et al. 2007).

A las 72 h de tratamiento en ambos materiales se observan bandas bien definidas a 570 y 607  $\text{cm}^{-1}$  características del fosfato en un ambiente cristalino (Salinas et al. 2013). Estas bandas son particularmente observadas sólo para MTA-MBG-Zn a las 24 h de tratamiento.

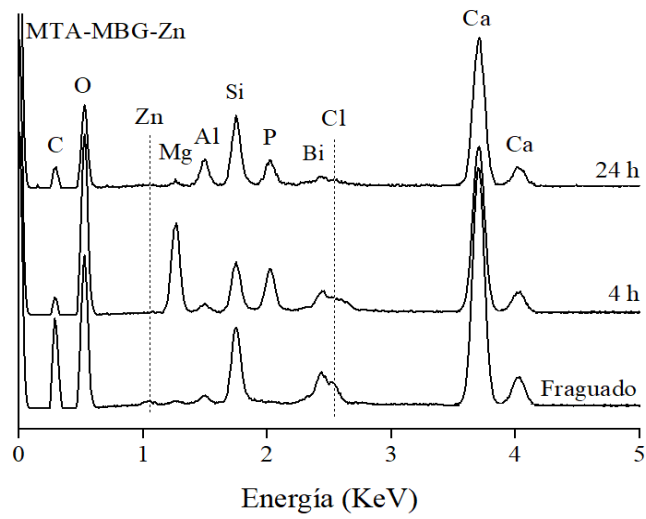
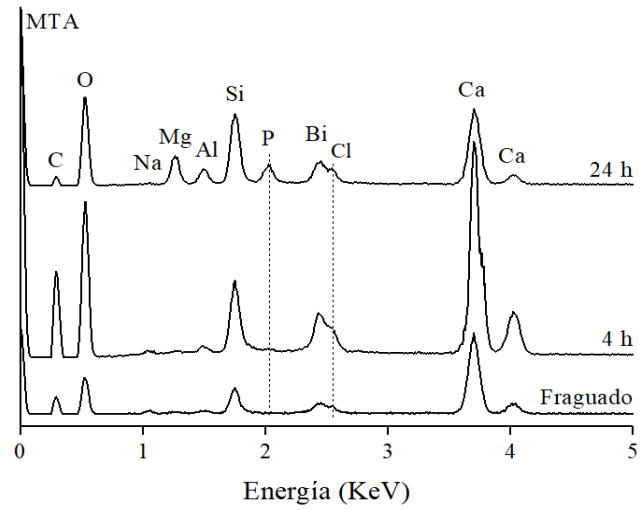
Imágenes electrónicas FEG-SEM después de 4, 24, 72 y 168 h de tratamiento con SBF para MTA y MTA-MBG-Zn se presentan en la Figura 4.9.



**Figura 4.9.** Imágenes de micrografías FEG-SEM tras 4h, 24h, 72h y 168h de tratamiento en SBF para MTA (columna de imágenes izquierda) y MTA-MBG-Zn (columna de imágenes derecha).

Se observa la formación de un nuevo agregado de partículas que cubren la superficie de los materiales tras el tratamiento en SBF. A las 4h para el MTA, se observa que el nuevo precipitado no se ha formado mientras que si lo ha hecho para este tiempo en el caso del MTA-MBG-Zn, quedando aún bastante superficie el material sin cubrir. A las 24h, se observan formación de esferas con diámetro promedio en el rango de 0.5 a 1 $\mu$ m para ambos materiales, encontrándose más cubierta por las mismas la superficie del material MTA-MBG-Zn.

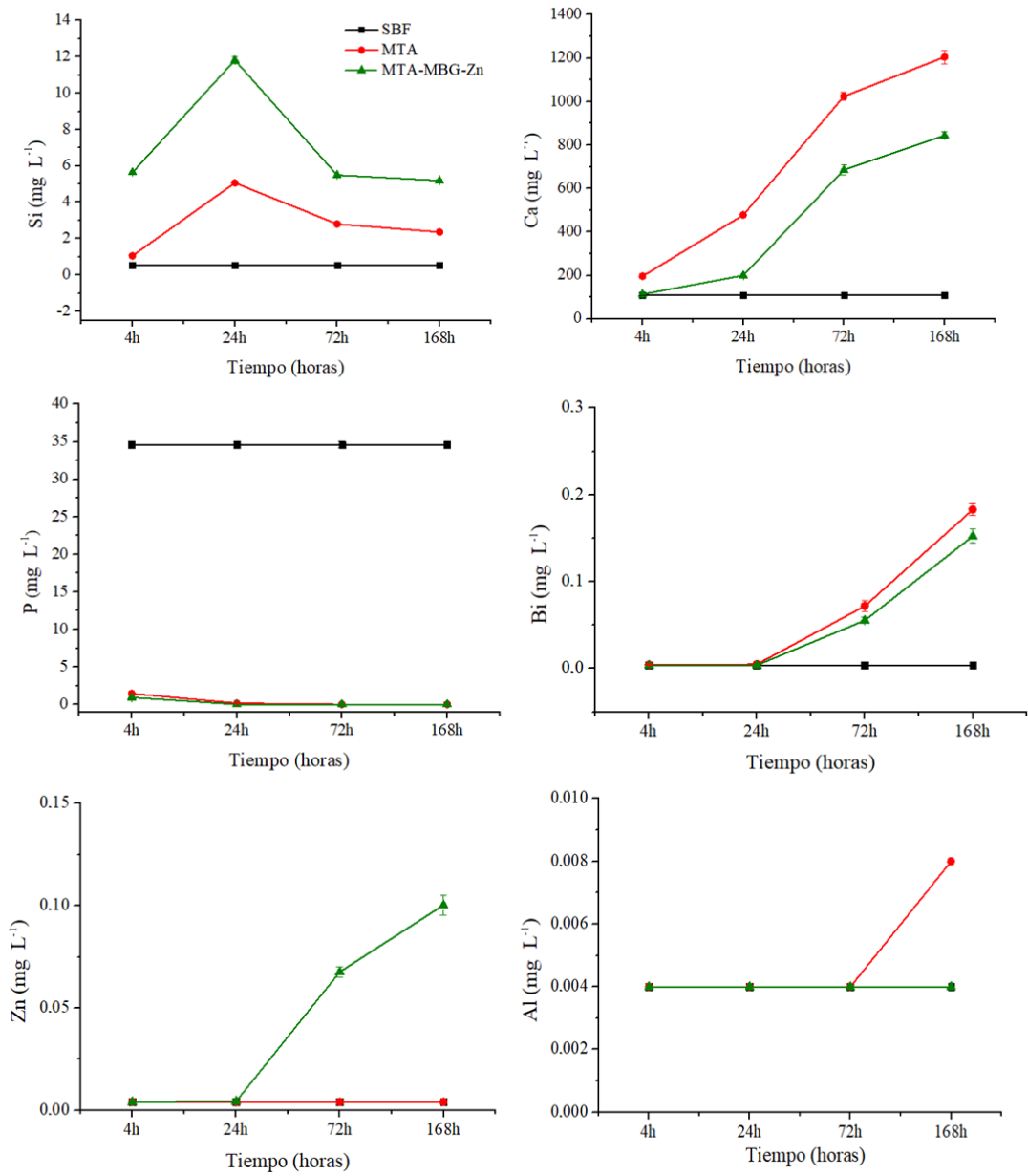
En la Figura 4.10 se muestran los resultados de EDX para los materiales MTA y MTA-MBG-Zn fraguados y después de 4 y 24 h de tratamiento en SBF.



**Figura 4.10.** Análisis de energía dispersa de rayos X (EDX) de las superficies de los materiales MTA y MTA-MBG-Zn fraguados y tras 4 y 24 h de tratamiento en SBF.

El análisis de EDX revela la deposición de P en ambos materiales tras 24 h de tratamiento en SBF. En el material MTA-MBG-Zn la señal de P ya es detectada a las 4h, coincidiendo dichos resultados con los observados en las imágenes FEG-SEM. Tras analizar los resultados de EDX, se realizó la relación relativa de las intensidades de la señal de P/Bi, ya que el EDX no es un análisis cuantitativo. A las 4 h de tratamiento en SBF la relación de intensidades P/Bi es de  $0.09 \pm 0.02$  para MTA y de  $2.13 \pm 0.05$  ( $p < 0.001$ ) para MTA-MBG-Zn, mientras que esta relación a las 24 h es de  $1 \pm 0.01$  para MTA y  $2.61 \pm 0.03$  para MTA-MBG-Zn ( $p < 0.001$ ) indicándose por tanto mayor deposición de P para MTA-MBG-Zn tanto a las 4 como 24 h de tratamiento.

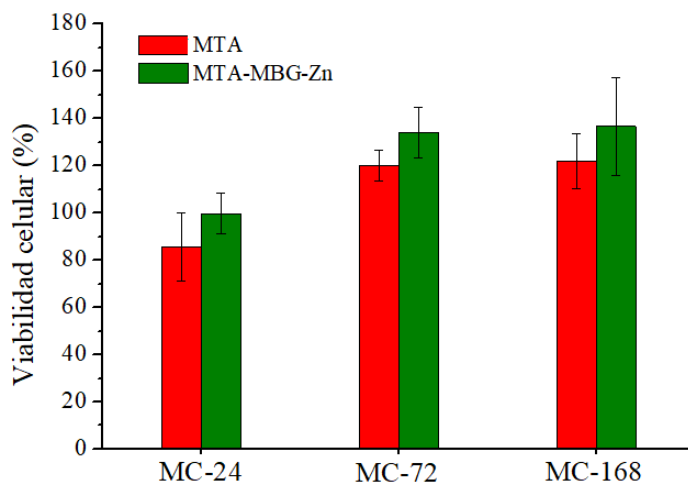
La liberación al medio de los productos iónicos en disolución Si, Ca, P, Bi, Zn y Al fueron monitorizados mediante ICP-AES, tras 4h, 24h, 72h y 168h de tratamiento en SBF. La solución de SBF pura fue utilizada como control. Los resultados son mostrados en la Figura 4.11.



**Figura 4.11.** Concentración de iones de Si, Ca y P, Bi, Zn y Al liberados al SBF como productos de degradación de los materiales MTA y MTA-MBG-Zn monitorizados por ICP-AES.

La liberación de Si al medio por parte de los materiales es mayor para el material MTA-MBG-Zn, ya que el material biovidrio incorporado es en un 80% de su composición Si, aumentando por tanto bastante la cantidad de Si en estos materiales. La elución tanto de Ca como P fue mayor para MTA en todos los tiempos comparado con MTA-MBG-Zn. Se puede apreciar que al incorporar el material mesoporoso al MTA, la liberación de Bi disminuye y la de Al se elimina completamente, siendo ésta muy pequeña para el MTA.

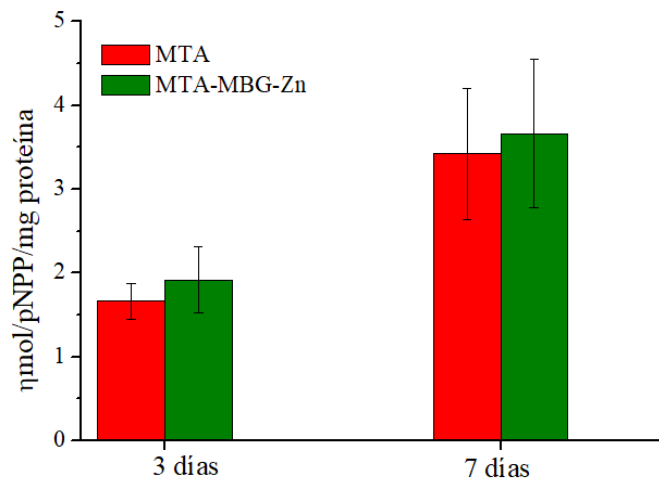
En la Figura 4.12 se representa el porcentaje de viabilidad celular tras exposición durante 24 h de las células a los distintos medios condicionados durante 24 h, 72 h y 168 h (MC-24, MC-72 y MC-168).



**Figura 4.12.** Viabilidad celular de hDPSCs tras exposición en cultivo durante 24 h a los medios condicionados para distintos tiempos, MC-24, MC-72 y MC-168. Se representa el porcentaje de células cuantificadas respecto al grupo de control (células expuestas a medio de cultivo sin condicionar), junto con el análisis estadístico de ANOVA de dos vías (post-hoc Turkey), \*  $p < 0.05$  y \*\*  $p < 0.001$ .

Los porcentajes de viabilidad celular tras 24 h de exposición a los medios condicionados MC-72 y MC-168 superan el 100% de viabilidad considerado para el control (células expuestas a medio de cultivo sin condicionar). Ambos materiales aumentan la viabilidad de las células, siendo ésta mayor para el material MTA-MBG-Zn, aunque no se encuentran diferencias significativas entre ambos.

La Figura 4.13 muestra la actividad de la fosfatasa alcalina a los 3 y 7 días tras ser las células sembradas directamente sobre los materiales.



**Figura 4.13.** Actividad de fosfatasa alcalina para hDPSCs sembradas sobre los materiales MTA y MTA-MBG-Zn a los 3 y 7 días. Los valores fueron normalizados al contenido total de proteínas y fueron expresados como  $\eta\text{mol/pNPP/mg proteína}$

La actividad de la fosfatasa alcalina aumenta con el tiempo de exposición a los materiales, no encontrándose diferencias significativas entre ambos.



#### 4. Discusión

El cemento bioactivo endodóncico comercial MTA ProRoot White y una nueva formulación formada al mezclar el mismo con el material MBG-7.5Zn sintetizado en el presente trabajo, tanto en forma de precursor particulado como fraguado tras ser mezclado con agua, se han caracterizado en términos de composición química y microestructura. Además, en el presente capítulo también se estudia la bioactividad de ambos materiales, así como la biocompatibilidad de sus productos iónicos de disolución y actividad de ALP tras sembrar las células directamente sobre el material.

Los resultados del FTIR revelan que las principales fases producidas durante la reacción de hidratación, que conducen al fraguado y endurecimiento del cemento, son CSH e hidróxido de calcio  $\text{Ca(OH)}_2$ . En XRD, el pico en  $2\theta = 18^\circ$  se usa para identificar la producción de  $\text{Ca(OH)}_2$  (Lee et al. 2017). Sin embargo, los picos correspondientes al principal producto hidratado, CSH, no fueron observados por análisis XRD. Este hallazgo puede explicarse debido no sólo a la formación de silicato de calcio mal cristalizado sino también a la estructura cristalina a nanoescala de CSH, lo que hace que aparezca como amorfo en XRD (Nonat et al. 2004; Lee et al. 2017). La formación de CSH se confirma para ambos materiales mediante análisis FTIR mostrando una banda más pronunciada para MTA-MBG-Zn con respecto a la banda de carbonato a  $1490\text{-}1420\text{ cm}^{-1}$  formadas por la reacción del  $\text{CO}_2$  atmosférico con el hidróxido de calcio (Hughes et al. 1995; Mollah et al. 2000).

Los resultados de fisorción muestran cómo con la incorporación del material vítreo, las isothermas obtenidas son características de material mesoporoso, así como una distribución de poros en la escala nanométrica. La incorporación de

dicho material convierte al material cerámico MTA en un material con unas características adicionales como material mesoporoso con una alta área de superficie.

El tiempo de fraguado más rápido observado para MTA-MBG-Zn podría deberse a un área superficial significativamente mayor de  $14.8 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$  medido para este material (Ha et al. 2015). Se observa que la incorporación de dicho material no interrumpe o retrasa la reacción de fraguado, si no que produce el efecto contrario al acelerar la reacción.

El ensayo de bioactividad in vitro indica que ambos materiales forman una capa de recubrimiento superficial de hidroxiapatita de calcio (HA) después de 24 h de tratamiento. Sin embargo, las observaciones FEG-SEM de las superficies después de sólo 4 h de tratamiento con SBF muestran que MTA-MBG-Zn comienza a producir un revestimiento de fase de fosfato formado por esferas homogéneas con un diámetro medio en el rango de  $0.5\text{--}1.0 \text{ }\mu\text{m}$ . El comienzo de la cobertura de la superficie del material por esta nueva fase a las 4 h es observada para MTA-MBG-Zn pero no para MTA. Esta mayor respuesta de bioactividad de MTA-MBG-Zn podría estar asociada a una mayor degradación de la superficie medida por la liberación del producto de ion Si detectada por ICP-AES. La acumulación de los productos de disolución de biomateriales a base de sílice causan un cambio tanto en la composición química, como en el pH de la solución proporcionando sitios de superficie, así como un pH propicio para la nucleación de HA (Hench 1991). Particularmente, la repolimerización de una capa porosa rica en sílice a través de la condensación de grupos silanol de la sílice soluble en la forma de  $\text{Si}(\text{OH})_4$ , seguida de la migración de  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{PO}_4$  forma una película rica en  $\text{CaO} - \text{P}_2\text{O}_5$  amorfo en la capa de sílice. Además, se observa la disminución en la liberación de Bi así como la no liberación de Al por parte del material MTA-MBG-Zn.

Tanto la viabilidad como la actividad de la ALP aumentan al exponer a las hDPSCs a los materiales, tanto en forma de productos iónicos de disolución como tras el contacto directo con el material. En ambos casos los resultados son mayores para el material MTA-MBG-Zn, aunque no existen diferencias significativas entre ambos. Añadir nuestro material al material comercial MTA no afecta a las células.

## **5. Conclusiones**

En este capítulo se ha preparado una nueva formulación BEC consistente en la incorporación de un 15% en peso del material MBG-7.5Zn a un cemento endodónico comercial MTA ProRoot. Los resultados indican la consecución de un material con un comportamiento de hidratación satisfactorio que reduce sensiblemente el tiempo final de fraguado y presenta una respuesta bioactiva más rápida. Ambos resultados se correlacionan con el aumento del área superficial del precursor en formato de partículas con la incorporación del material MBG-7.5Zn.

Los ensayos de biocompatibilidad con células hDPSCs indican excelente viabilidad y actividad de ALP para la formulación MTA-MBG-Zn ensayada.

Los experimentos de biodegradación en las condiciones experimentales utilizadas, indican que la formulación ensayada, MTA-MBG-Zn, elimina la liberación de Al y disminuye la liberación de Bi al medio respecto al material comercial, MTA ProRoot.

Por tanto, en este capítulo se demuestran unas propiedades físico-químicas y biológicas mejoradas de MTA-MBG-Zn con respecto a MTA que destacan a dicho material como candidato muy interesante para investigar más a fondo, con el fin de mejorar los resultados de los tratamientos REPs en términos de aumento de la biomineralización por parte del material utilizado como sellado coronal.



## 6. Referencias

Altaii M, Cathro P, Broberg M, Richards L. Endodontic regeneration and tooth revitalisation in immatureinfected sheep teeth. *Inter Endod J* 2017;50:480-91.

Camilleri J, Pitt Ford TR. Mineral trioxide aggregate: A review of the constituents and biological properties of the material. *Int Endod J* 2006;39:747-54.

Corral Nuñez C, Covarrubias C, Fernandez E, Oliveira OB Junior. Enhanced bioactive properties of Biodentie TM modified with bioactive glass nanoparticles. *J Appl Oral Sci* 2017;25:117-85.

D'Antò V, Di Caprio MP, Ametrano G, et al. Effect of mineral trioxide aggregate on mesenchymal stem cells. *J Endod* 2010;36:1839-43.

de Oliveira NG, de Souza Araújo PR, da Silveira MT, Veras Sobral AP, Carvalho MV. Comparison of the biocompatibility of calcium silicate-based materials to mineral trioxide aggregate: Systematic review. *Eur J Dent* 2018;12:317-26.

Dianat O, Mashhadi Abas F, Paymanpour P, Eghbal MJ, Haddadpour S, Bahrololumi N. Endodontic repairin immature dogs' teeth with apical periodontitis: bloodclot vs plasma rich in growth factors scaffold. *Dent Traumatol* 2017;33:84-90.

Ha WN, Bentz DP, Kahler B, Walsh LJ. D90: The strongest contributor to setting time in mineral trioxide aggregate and Portland cement. *J Endod* 2015;41:1146-1150.

Hench LL. Bioceramics and the origin of life. *J Biomed Mater Res* 1989;23:685-93.

Hench LL. Bioceramics – From concept to clinic. *J Am Ceram Soc* 1991;74:1487–1510.

Hosoya N, Takigawa T, Horie T, Maeda H, Yamamoto Y, Momoi Y, Yamamoto K, Okiji T. A review of the literature on the efficacy of mineral trioxide aggregate in conservative dentistry. *Dent Mater J* 2019;13.

Hughes TL, Methven CM, Jones TGJ, Pelham SE, Fletcher P, Hall C. Determining cement composition by Fourier transform infrared spectroscopy. *Adv Cement Base Mater* 1995;2:91-104.

Jiménez-Sánchez MDC, Segura-Egea JJ, Díaz-Cuenca A. Higher hydration performance and bioactive response of the new endodontic bioactive cement MTA HP repair compared with ProRoot MTA white and NeoMTA plus. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2019 Aug;107(6):2109-2120.

Kontakiotis EG, Filippatos CG, Tzanetakakis GN, Agrafioti A. Regenerative endodontic therapy: a data analysis of clinical protocols. *J Endod* 2015; 41:146-54.

Küçükkaya Eren S, Parashos P. Adaptation of mineral trioxide aggregate to dentine walls compared with other root-end filling materials: A systematic review. *Aust Endod J* 2019;45:111-21.

Lee SJ, Monse FM, Torabinejad M. Sealing ability of a mineral trioxide aggregate for repair of lateral root perforations. *J Endod* 1993;19:541-4.

Lee YL, Wang WH, Lin FH, Lin CP. Hydration behaviors of calcium silicate-based biomaterials. *J Formos Med Assoc* 2017;116:424-31.

Liu SY, Wang SN, Dong YM. Evaluation of a bioceramic as a pulp capping agent in vitro and in vivo. *J Endod* 2015;41:652-7.

Lovato KF, Sedgley CM. Antibacterial activity of endosequence root repair material and proroot MTA against clinical isolates of *Enterococcus faecalis*. *J Endod* 2011;37:1542-6.

Ma J, Shen Y, Stojicic S, Haapasalo M. Biocompatibility of two novel root repair materials. *J Endod* 2011;37:793-8.

Min KS, Park HJ, Lee SK et al. Effect of mineral trioxide aggregate on dentin bridge formation and expression of dentin sialoprotein and heme oxygenase-1 in human dental pulp. *J Endod* 2008;34:666-70.

Moghaddame-Jafari S, Mantellini MG, Botero TM, et al. Effect of ProRoot MTA on pulp cell apoptosis and proliferation in vitro. *J Endod* 2005;31:387-91.

Mollah MYA, Yu W, Schennach R, Cocke DL. A Fourier transform infrared spectroscopic investigation of the early hydration of Portland cement and the influence of sodium lignosulfonate. *Cement Concrete Res* 2000;30:267-73.

Moradi S, Talati A, Forghani M, Jafarian AH, Naseri M, Sho-jaeian S. Immunohistological evaluation of revascularized immature permanent necrotic teeth treated by platelet-rich plasma: an animal investigation. *Cell Journal* 2016;18:389-96.

Nonat A. The structure and stoichiometry of C-S-H. *Cement Concrete Res* 2004;34:1521-8.

Parinyaprom N, Nirunsittirat A, Chuveera P, Na Lampang S, Srisuwan T, Sastraruji T, Bua-On P, Simprasert S, Khoipanich I, Sutharaphan T, Theppimarn S, Ue-Srichai N, Tangtrakooljaroen W, Chompu-Inwai P. Outcomes of Direct Pulp Capping by Using Either ProRoot Mineral Trioxide Aggregate or Biodentine in Permanent Teeth with Carious Pulp Exposure in 6- to 18-Year-Old Patients: A Randomized Controlled Trial. *J Endod*. 2018;44:341-8.

Parirokh M, Torabinejad M, Dummer PMH. Mineral trioxide aggregate and other bioactive endodontic cements: An updated overview – part I: Vital pulp therapy. *Int Endod J* 2018;51:177-205.

Rodriguez-Benitez S, Stambolsky C, Gutierrez-Perez JL, Torres-Lagares D, Segura-Egea JJ. Pulp revascularization of immature dog teeth with apical periodontitis using triantibiotic paste and platelet-rich plasma: a radiographic study. *J Endod* 2015;41:1299-304.

Rouquérol D, Avnir CW, Fairbridge DH, Everett JH, Haynes N, Pericone J DF, Ramsay KSW, Sing KK Unger. *Pure Appl. Chem* 1994;66:1739-58.



Sanz JL, Rodríguez-Lozano FJ, Llena C, Sauro S, Forner L. Bioactivity of Bioceramic Materials Used in the Dentin-Pulp Complex Therapy: A Systematic Review. *Materials* (Basel) 2019;12.

Saoud TM, Huang GT, Gibbs JL, Sigurdsson A, Lin LM. Management of teeth with persistent apical peri-odontitis after root canal treatment using regenerative endodontic therapy. *J Endod* 2015;41:1743-8.

Sasaki JI, Kiba W, Abe GL, Katata C, Hashimoto M, Kitagawa H, Imazato S. Fabrication of strontium-releasable inorganic cement by incorporation of bioactive glass. *Dent Mater* 2019;35:780-8.

Sauro S, Babbar A, Gharibi B, Feitosa VP, Carvalho RM, Azevedo Rodrigues LK, Banerjee A, Watson T. Cellular differentiation, bioactive and mechanical properties of experimental light-curing pulp protection materials. *Dent Mater* 2018;34:868-78.

Sauro S, Osorio R, Fulgencio R, Watson TF, Cama G, Thompson I, Toledano M. Remineralisation properties of innovative light-curable resin-based dental materials containing bioactive micro-fillers. *J Mater Chem B* 2013;1:2624-38.

Sauro S, Thompson I, Watson TF. Effects of common dental materials used in preventive or operative dentistry on dentin permeability and remineralization. *Oper Dent* 2011;36:222-30.

Schneider R, Holland GR, Chiego D Jr, Hu JC, Nor JE, Botero TM. White mineral trioxide aggregate induces migration and proliferation of stem cells from the apical papilla. *J Endod* 2014;40:931e936.

Tomás-Catalá CL, Collado-Gozález M, García-Bernal D, Oñate- Sánchez FL,

Llena C, Lozano A, Castelo-Baz P, Moraleda JM, Rodríguez-Lozano FJ. Comparative analysis of the biological effects of the endodontic bioactive cements MTA-angelus, MTA repair HP and NeoMTA plus on human dental pulp stem cells. *Int Endod J* 2017;50:e63–e72.

Torabinejad M, Chivian N. Clinical applications of mineral trioxide aggregate. *J Endod* 1999;25:197-205.

Torabinejad M, Milan M, Shabahang S, Wright KR, Faras H. Histologic examination of teeth with necrotic pulps and periapical lesions treated with 2 scaffolds: an animal investigation. *J Endod* 2015;41:846-52.

Torabinejad M, Nosrat A, Udochukwu O. Regenerative endodontic treatment or mineral trioxide aggregate apical plug in teeth with necrotic pulps and open apices: a systematic review and meta-analysis. *J Endod* 2017;43:1806-20.

Torabinejad M, Parirokh M. Mineral trioxide aggregate: a comprehensive literature review—part II: leakage and biocompatibility investigations. *J Endod* 2010;36:190-202.

Torabinejad M; Parirokh M; Dummer PMH. Mineral trioxide aggregate and other bioactive endodontic cements: An updated overview—part II: Other clinical applications and complications. *Int Endod J* 2018;51:284-317.

Torabinejad M, Turman M. Revitalization of tooth with necrotic pulp and open apex by using platelet-rich plasma: a case report. *J Endod* 2011;37:265-8.

Tran XV, Gorin C, Willig C, et al. Effect of a calcium-silicate-based restorative cement on pulp repair. *J Dent Res* 2012;91:1166-71.

Washio A, Nakagawa A, Nishihara T, Maeda H, Kitamura C. Physicochemical properties of newly developed bioactive glass cement and its effects on various cells. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 2015;103:373-80.

Wigler R, Kaufman AY, Lin S, Steinbock N, Hazan-Molina H, Torneck CD. Revascularization: a treatment for permanent teeth with necrotic pulp and incomplete root development. *J Endod* 2013;39:319-26.

Wongwatanasanti N, Jantarat J, Sritanaudomchai H, Hargreaves KM. Effect of Bioceramic Materials on Proliferation and Odontoblast Differentiation of Human Stem Cells from the Apical Papilla. *J Endod* 2018;44:1270-5.

Ylmén R, Jäglid U, Steenari BM, Panas I. Early hydration and setting of Portland cement monitored by IR, SEM and Vicat techniques. *Cement Concrete Res* 2009;39:433-9.

Yu P, Kirkpatrick RJ, Poe B, McMillan PF, Cong X. Structure of calcium silicate hydrate (C-S-H): Near-, mid-, and far-infrared spectroscopy. *J Am Ceram Soc* 1999;82:742-8.

Zhu L, Yang J, Zhang J, et al. In vitro and in vivo evaluation of a nanoparticulate bioceramic paste for dental pulp repair. *Acta Biomater* 2014;10:5156-68.

Zhu X, Zhang C, Huang GT, Cheung GS, Dissanayaka WL, Zhu W. Transplantation of dental pulp stem cells and platelet-rich plasma for pulp regeneration. *J Endod* 2012;38:1604-9.



# Conclusiones generales

Los resultados obtenidos en el presente trabajo de Tesis Doctoral se pueden resumir en las siguientes conclusiones generales:

- Se ha conseguido la preparación de materiales de naturaleza vítrea en el sistema composicional  $\text{SiO}_2\text{-CaO-P}_2\text{O}_5\text{-ZnO}$  con la incorporación del elemento Zn, con contenido de hasta un 9.5% molar, manteniendo las características estructurales de los materiales mesoporosos y propiedades texturales avanzadas (superficie específica de hasta  $286 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$  y volumen total de poro de  $0.25 \text{ cm}^3 \text{ g}^{-1}$ ). La incorporación de Zn en los materiales MBG se ha realizado mediante la ruta de síntesis sol-gel.
- Se ha conseguido el procesado de piezas de biomaterial compuestas de biopolímero de colágeno y biocerámico MBG, tras la incorporación de entre 5 y 15% del material vítreo MBG y MBG-Zn en la matriz biopolimérica de colágeno. La caracterización realizada muestra la consecución de piezas compuestas en las que resulta una distribución homogénea del material vítreo en forma de micropartículas sin que se modifique el entramado poroso del polímero de colágeno, respecto a un material control producido únicamente por colágeno. Tanto la capacidad de absorción de medio líquido, como la biodegradación se reducen con la incorporación del material vítreo MBG, sobre todo al incorporar el vidrio funcionalizado con Zn, C-15MBG-Zn, lo que se traduce en una mayor estabilidad del material.

- La viabilidad y capacidad de mineralización, se comprobó tras exponer a las células hDPSCs durante 24 h y 10 días respectivamente, a los medios de cultivo condicionados durante 24 h, 72 h y 168 h por los distintos biomateriales ensayados. Los resultados han mostrado, que los biomateriales que incorporan MBG son biocompatibles, siendo el medio condicionado con C-15MBG-Zn durante 168h el medio que presenta el mayor porcentaje de viabilidad, así como de capacidad de mineralización respecto al control C. El citado material también mostró la mayor actividad de ALP tras el cultivo durante 14 días con células hDPSCs. Estos resultados han indicado que la incorporación de MBG-Zn a una matriz de colágeno mejora la respuesta celular, y da lugar a un biomaterial con unas propiedades superiores a las de la matriz de colágeno propiamente dicha.
- El material MBG-7.5Zn también fue incorporado en un 15% en peso, mediante la mezcla de los materiales precursores particulados, al cemento bioactivo endodónico comercial MTA ProRoot White (Dentsply). Los resultados de caracterización físico-química indicaron el aumento del área superficial, disminución del tiempo final de fraguado así como aceleración de la respuesta bioactiva tras tratamiento en SBF, mostrándose depósitos de fosfato de calcio a las 4 h. Además, se observó la disminución de liberación de Bi y Al al SBF con respecto al MTA. En cuanto a los ensayos de biocompatibilidad y actividad de ALP con células hDPSCs, mostraron excelentes resultados de viabilidad y actividad de ALP para la formulación MTA-MBG-Zn ensayada.
- Por último, se puede concluir que los resultados presentados en este trabajo de Tesis han mostrado la posibilidad de obtener dos tipos de biomateriales compuestos con características potencialmente avanzadas para su aplicación en los tratamientos endodónicos regenerativos.



# ANEXO I

## TÉCNICAS DE CARACTERIZACIÓN Y MÉTODOS UTILIZADOS

En este Anexo se detallan las diferentes técnicas experimentales y los métodos utilizados para la caracterización de los materiales sintetizados y procesados en el presente trabajo. Se especifican los equipos y las condiciones generales para la realización de las medidas. Esta información se ha ampliado en algunos apartados de los capítulos de esta Tesis donde se han precisado algunas condiciones experimentales particulares.

### **1.1. Difracción de Rayos X**

Se han realizado medidas de difracción de Rayos X de Bajo Ángulo y difracción de Rayos X en condiciones de rutina.

#### **1.1.1. Difracción de Rayos X de Bajo Ángulo (Small Angle X-Ray Diffraction, SAXRD)**

Los diagramas SAXRD se registraron en un difractómetro PANalytical X'Pert Pro equipado con un detector PIXcel, que opera a un voltaje de 45 kV y una intensidad de 40 mA, utilizando radiación  $\text{CuK}\alpha$ . Los difractogramas se registraron en el rango  $2\theta$  de 0.5 a 5°, con un paso de 0.01° y un tiempo de exposición de 1 segundo. Para la realización de las medidas, los materiales en forma de partículas se dispersaron con etanol (96 °) sobre un portamuestras de Si



monocristalino crecido en una familia de planos que no presentan difracción dentro del rango registrado.

### **1.1.2. Difracción de Rayos X en condiciones de rutina (Wide Angle X-Ray Diffraction, WXR)**

Los diagramas WXR se registraron en un difractómetro PANalytical X'Pert Pro equipado con un detector X'Celerator y monocromador de grafito, que opera a un voltaje de 45 kV y una intensidad de 40mA, utilizando radiación  $\text{CuK}\alpha$ . Los difractogramas se registraron en el rango  $2\Theta$  de 5 a 80°, con un paso de 0.02° y con un tiempo de exposición de 500 segundos.

Para las medidas, los materiales en forma de partículas se acomodaron en una pequeña hendidura que posee el portamuestras de Si monocristalino (crecido en una familia de planos que no presenta difracción dentro del rango registrado) y se enrasaron con la ayuda de una pieza de vidrio.

## **1.2. Fisisorción de nitrógeno**

Las medidas de fisisorción de nitrógeno se obtuvieron en un analizador automático de gases Micromeritics Tristar 3020, después de desgasificar 100 mg de muestra (en forma de partículas) la muestra a 250 °C (523 K) durante 2 horas en corriente de nitrógeno.

En la determinación de la superficie específica,  $S_{\text{BET}}$ , se utilizó la parte lineal de la ecuación de Brunauer, Emmett y Teller (BET) (Sing et al. 1985) usando los valores de la isoterma de adsorción en el intervalo de presión relativa de 0.05 a 0.2, donde es válida dicha ecuación. El volumen total de poro, se estimó a partir

de la cantidad de gas nitrógeno adsorbido a una presión relativa de aproximadamente 0.99. El error de las medidas se encuentra por debajo del 5 %. La distribución de tamaño de poro se calculó utilizando la rama de adsorción de la isoterma de adsorción-desorción de nitrógeno y la ecuación de Barrett-Joyner-Hallenda (BJH) (Barrett et al. 1951). El diámetro de mesoporo,  $d_p$ , corresponde con el máximo de la distribución BJH de tamaño de poro, obtenida a partir de la rama de adsorción.

### **1.3. Espectroscopía Infrarroja (Fourier-Transform Infrared Spectroscopy, FT-IR).**

Las medidas de espectroscopía Infrarroja (IR) por transformada de Fourier se realizaron utilizando el espectrómetro JASCO FT/IR-6200 IRT-5000. Las muestras se analizaron mediante la configuración de transmisión y para ello se requirió la elaboración de pastillas.

La preparación de las pastillas consistió en la mezcla de 99.5 mg de bromuro potásico (KBr, 60090, Fluka) y 0.5 mg de la muestra a analizar. La mezcla de los sólidos se molió en un mortero de ágata y se prensó en una matriz con 7 toneladas. Como blanco se tomó una pastilla constituida únicamente por KBr. Las medidas se registraron con las siguientes condiciones: 200 barridos con una resolución de  $4\text{ cm}^{-1}$ .

### **1.4. Espectroscopía de Fluorescencia de Rayos X (X-Ray Fluorescence spectroscopy, XRF)**

El análisis cuantitativo de los materiales se realizó en un espectrómetro secuencial de fluorescencia de rayos X por dispersión de longitud de onda de la marca PANalytical, modelo AXIOS.

La preparación de la muestra consiste en la mezcla de 100 mg de muestra con 6 mg de cera que se molerán y homogenizarán en un mortero de ágata. Posteriormente la mezcla se coloca en el centro de un soporte de ácido bórico, preparado con anticipación, y se prensa a 160 MPa.

### **1.5. Microscopia electrónica de barrido (Field Emission Gun-Scanning Electron Microscopy, FEG-SEM) y espectroscopía de dispersión de energías de rayos X (Energy Dispersive X-ray spectroscopy, EDX)**

Se utilizó un microscopio modelo HITACHI S-4800 de alta resolución dotado con un cañón de emisión de campo. Además, el equipo cuenta con un detector para electrones transmitidos con un sistema de microanálisis químico por dispersión de energías de rayos X, Bruker X Flash Detector 4010, con una resolución de 133 eV, que permite un acercamiento a la composición estructural. Las micrografías se realizaron a un potencial de 2 kV, mientras que el análisis químico mediante EDX, el haz electrónico incidió sobre las muestras a un potencial de 10 kV durante 5 min. Para los análisis las muestras se colocaron directamente sobre una cinta adhesiva de doble cara de carbono para fijarlos en el portamuestra del equipo. Para el caso de los materiales que contenían material orgánico (Capítulo 2), además de la fijación física, se recubrieron con una capa de carbono, para disminuir la carga eléctrica que se genera. La capa se realizó con un evaporador de carbono EMITECH K950 usando 60 A de voltaje.

### **1.6. Espectroscopía de Emisión Atómica por Plasma de Acoplamiento Inducido (Inductively Couple Plasma Atomic Emission Spectroscopy, ICP-AES)**

Los análisis se llevaron a cabo en el equipo Horiba Jobin Yvon, modelo última 2, equipado con un generador de estado sólido de 40.68 MHz, un monocromador

Czerny-Turner y un detector con tubo fotomultiplicador. La entrada de la muestra (líquida) a través de una bomba peristáltica fue de  $1 \text{ mL min}^{-1}$ , el potencial del plasma fue de 1000 w y el flujo de Argón fue de  $12 \text{ L min}^{-1}$ . El volumen de muestra requerido para realizar la medida fue de 5 mL.

### **1.7. Análisis termogravimétrico (ThermoGravimetric Analysis, TGA) y calorimetría diferencial de barrido (Differential Thermal Analysis, DTA)**

Los análisis térmicos TGA y DTA se llevaron a cabo simultáneamente utilizando un sistema automático de análisis térmico TA Instruments SDT Q600 (TA Instruments, Crawley, UK), que está conectado a un sistema de flujo de aire de  $100 \text{ cm}^3 \cdot \text{min}^{-1}$ . Se trabajó en atmosfera de aire y la velocidad de calentamiento fue de  $10 \text{ }^\circ\text{C} \cdot \text{min}^{-1}$  en un soporte de platino con 0.6 cm de diámetro. El intervalo de temperatura de medida estuvo comprendido entre 25 y  $1000 \text{ }^\circ\text{C}$ .

### **1.8. Análisis de tamaño de partícula por espectrometría de difracción por rayos láser (Laser Diffraction, LD)**

La distribución del tamaño de partícula de los materiales en formato de partículas se obtuvo empleando un analizador de pulso láser de Malvern, modelo Mastersizer S (Reino Unido). Este equipo utiliza una longitud de haz activa de 2,4 mm y una lente de 300-RF y evalúa tamaños medios de partícula comprendidos entre 0.20–880  $\mu\text{m}$ .

### **1.9. Porosimetría de mercurio**

Fue realizado utilizando el equipo Poremaster 60GT (Quantachrome). El equipo analiza la distribución de tamaño de poro por el método de intrusión de mercurio

en la muestra. El rango de tamaño medido es de 3.5 nm a 900µm. Los ensayos se realizaron mediante medidas consecutivas utilizando dos intervalos de presión, baja 0.2-50 PSIA y alta 20-58000 PSIA, representándose en los resultados la superposición de ambas.

### **1.10. Determinación de la capacidad de absorción de medio líquido de los biomateriales.**

Se siguió el método utilizado por Moonesi y cols. (Moonesi et al. 19). La medida se realizó por triplicado para cada biomaterial. Para cada determinación se utilizó 1 piezas de  $4.70 \pm 0.15$  mm de diámetro y  $2.60 \pm 0.23$  mm de altura. Las piezas de los biomateriales se pesaron y se incubaron en tubos Ependorf en 1 mL de medio de cultivo celular  $\alpha$ -MEM complementado con 10% de suero fetal bovino, 1% de penicilina/estreptomina y 1% de L-glutamina a 36.5°C y 60 rpm de agitación. Las muestras fueron extraídas a diferentes tiempos (0.5h, 1h, 2h, 4h, 10h, 24h, 72h, 120h y 168h), se retiró el exceso de medio con papel de filtro e inmediatamente se volvió a registrar el peso de las muestras húmedas (Moonesi et al. 2019). El porcentaje de capacidad de absorción de medio líquido se determinó utilizando la siguiente fórmula:

% capacidad absorción =

$$\frac{\text{Peso mojado} - \text{peso seco}}{\text{Peso seco}} \times 100$$

### **1.11. Ensayo de biodegradación de los biomateriales**

La medida se realizó por triplicado para cada biomaterial. Para cada determinación se utilizaron 1 pieza de  $4.70 \pm 0.15$  mm de diámetro y  $2.60 \pm 0.23$  mm de altura. Las piezas de los biomateriales se pesaron y se incubaron en tubos Eppendorf en 1 mL medio de cultivo celular  $\alpha$ -MEM complementado con 10% de suero fetal bovino, 1% de penicilina/estreptomicina y 1% de L-glutamina, a  $36.5^{\circ}\text{C}$  y 60 rpm. de agitación. A los diferentes tiempos de ensayo (0.5h, 1h, 2h, 4h, 10h, 24h, 72h, 120h y 168h) las muestras fueron extraídas del medio de cultivo, se retiró el exceso de medio con papel de filtro y se lavaron en agua destilada durante 15 min a 60 r.p.m. Tras el lavado el exceso de agua fue retirado con papel de filtro y las estructuras fueron colocadas en una placa de poliestireno de 96 (655161, Greiner Bio-one) y se congelaron a  $-80^{\circ}\text{C}$ . Las muestras se colocaron en un liofilizador (EPSILON 2-4 CRISTO) a  $-30^{\circ}\text{C}$  y 0.04 mbar durante 10 horas, para luego elevar la temperatura gradualmente hasta temperatura ambiente, asegurando así la eliminación de todo líquido. Tras el proceso de liofilización inmediatamente se volvió a registrar el peso de las estructuras secas (Moonesi et al. 2019). La biodegradación del material se determinó mediante el porcentaje de pérdida de masa se determinó utilizando la siguiente fórmula:

% pérdida de masa =

$$\frac{\text{Peso inicial seco} - \text{peso seco tras liofilización}}{\text{Peso inicial seco}} \times 100$$

### **1.12. Ensayo de bioactividad *in vitro* utilizando una disolución salina simulando condiciones fisiológicas (Simulated Body Fluid, SBF)**

La evaluación de la bioactividad *in vitro* de los materiales compuestos MTA y MTA-MBG-Zn, se llevó a cabo utilizando una disolución salina simulando condiciones fisiológicas, Simulated Body Fluid (SBF), preparada según el método estandarizado y descrito por Kokubo y cols (Kokubo et al. 2006). Según lo descrito por kokubo y cols., el volumen de SBF que se debe utilizar para hacer el ensayo de bioactividad de materiales densos, viene dado por la siguiente ecuación:

$$V_s = \frac{S_a}{10}$$

dónde  $V_s$  es el volumen de SBF (ml) y  $S_a$  es el área de superficie aparente de la muestra ( $\text{mm}_2$ ).

En el estudio *in vitro*, las piezas de MTA y MTA-MBG-Zn de 10mm de diámetro y 7mm de altura se colocaron en posición horizontal sobre un portamuestras de Teflón y se introdujeron en un Falcon de 50 ml. Todos los experimentos se realizaron por duplicado.

En los periodos de tratamiento, las muestras se sumergieron en SBF y se mantuvieron a una temperatura constante a 36.5 °C, similar a la del cuerpo humano, utilizando un incubador Selecta. Después de los tiempos establecidos (4, 24, 72 y 168 horas), las muestras se retiraron del fluido, se lavaron cuidadosamente con agua destilada y se secaron en la estufa.

El SBF es una solución que contiene concentraciones de iones análogas a las del plasma sanguíneo humano, su formulación ha sido estandarizada por Kokubo y col. (Kokubo y Takadama 2006) y es un ensayo admitido para determinar la bioactividad *in vitro* según el concepto del Prof. Hench de los biomateriales.

A continuación se detalla el procedimiento empleado para la preparación de esta formulación SBF:

La solución se preparó a partir de los siguientes reactivos:

1. Cloruro de sodio (NaCl, S7653 Sigma-Aldrich), 8.035 g
2. Bicarbonato sódico (NaHCO<sub>3</sub>, 31437 Sigma-Aldrich), 0.355 g
3. Cloruro de sodio (KCl, 60129 Fluka), 0.225 g
4. Fosfato potásico dibásico trihidratado (K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>H<sub>2</sub>O, P5504 Sigma-Aldrich), 0.231 g
5. Cloruro de magnesio hexahidratado (MgCl<sub>2</sub>6H<sub>2</sub>O, M2670 Sigma-Aldrich), 0.311 g
6. HCl 1 M, 39 mL
7. Cloruro de calcio (CaCl<sub>2</sub>, 12095 Riedel-de Haën), 0.292 g
8. Sulfato de sodio (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 23859-7 Sigma-Aldrich), 0.072 g

La solución SBF se preparó en un baso de precipitados de 1L de plástico, disolviendo las cantidades indicadas de los reactivos en agua Milli-Q, se añadieron uno por uno, hasta que cada reactivo se disolvió completamente y en el orden en que aparecen numerados en la lista.

Dado que la solución SBF es una solución supersaturada, cualquier método de preparación inapropiado puede generar una precipitación en la solución. Por tal razón, en todo momento durante la preparación se debe distinguir una solución transparente, libre de cualquier indicio de precipitación.

Para preparar 1 L de solución, primeramente los reactivos se disolvieron en 700mL de agua Milli-Q, la cual se ajusta previamente a  $36.5 \pm 1.5$  °C en una placa calefactora, baño de aceite y con agitación constante a 500 rpm. Después de añadir todos los reactivos se añade 200 mL de agua Milli-Q se añade 6.118 g de



tris-(hidroximetil)-aminometano (TRIS, C<sub>4</sub>H<sub>11</sub>NO<sub>3</sub>, T87602 Sigma-Aldrich). La adición se hace poco a poco esperando a que se disolviera completamente y observando el aumento gradual de pH en la solución. Una vez que alcanza un valor de pH = 7.45, se le añade HCl 1M hasta bajar el pH a 7.42, repitiendo la operación hasta que se termine de añadir el TRIS. Posteriormente, se estabiliza la temperatura en  $36.5 \pm 0.02$  °C y se ajusta el pH a  $7.42 \pm 0.01$ . Finalmente, la solución se transfiere a un matraz de vidrio aforado de 1 L, se espera el tiempo necesario para que alcance la temperatura ambiente, se afora y se guarda a 5-10 °C en el frigorífico. La solución se puede conservar  $\leq 30$  días.

### 1.13. Referencias

Athanasio KA; Zhu C; Lanctot DR; Agrawal CM; Wang X. Fundamentals of Biomechanics in Tissue Engineering of Bone. *Tissue Eng* 2000;6:361-81.

Barrett EP; Joyner LG; Halenda PP. The Determination of Pore Volume and Area Distributions in Porous Substances. I. Computations from Nitrogen Isotherms. *J. Am Chem Soc* 1951;73: 373-80.

Dulbecco R; Vogt M. Plaque Formation and Isolation of Pure Lines with Poliomyelitis Viruses. *J Exp Med* 1954;99:167-82.

Klug HP; Alexander LE. X-Ray Diffraction Procedures for Polycrystal-Line and Amorphous Materials. *Acta Metall* 1956;4: 102.

Kokubo T; Takadama H. How Useful Is SBF in Predicting in Vivo Bone Bioactivity? *Biomaterials* 2006;27: 2907-15.

Kruk M; Jaroniec M; Sayari A. Application of Large Pore MCM-41 Molecular Sieves To Improve Pore Size Analysis Using Nitrogen Adsorption Measurements. *Langmuir* 1997;13: 6267-73.

Lide, D. R. Hardness of Minerals and Ceramics. *CRC Handb Chem Phys* 2005;2313-4.

Moonesi Rad R, Pazarçeviren E, Ece Akgün E, Evis Z, Keskin D, Sahin S, Tezcaner A. In vitro performance of a nanobiocomposite scaffold containing boron modified bioactive glass nanoparticles for dentin regeneration. *J Biomater Appl* 2019;33:834-53.

Oyane A; Kim H; Furuya T; Kokubo T; Miyazaki T; Nakamura T. Preparation and Assessment of Revised Simulated Body Fluids. *J Biomed Mater Res* 2003; 65:188-95.

Ricci RW; Ditzler M; Nestor LP. Discovering the Beer-Lambert Law. J Chem Educ 1994;71:983.

Roshi A; Barjami S; Iannacchione GS; Paterson D; McNulty I. Structure and Dynamics of a Nanocolloidal Silica Gel Dispersion. Phys Rev E - Stat Nonlinear, Soft Matter Phys 2006;74:1-8.

Sing KSW. Reporting Physisorption Data for Gas/solid Systems with Special Reference to the Determination of Surface Area and Porosity. Pure Appl Chem 1985;57: 603-19.



# ANEXO II

## ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

### A

$\alpha$ : Alfa

a: parámetro de red de la estructura hexagonal de orden de los mesoporos en el material mesoporoso ordenado

AAE: American association of endodontists, asociación americana de endodoncistas

ADN: Deoxyribonucleic acid, ácido desoxirribonucleico

AFM: Autologous fibrin matrix, matriz de fibrina autóloga

Al: Aluminio

ALP: Alkaline phosphatase, fosfatasa alcalina

ANOVA: Analysis of variance, análisis de varianza

AR: Alizarin red, alizarina roja

ARN: Ribonucleic acid, ácido ribonucleico

ATD: Análisis térmico diferencial

### B

bp: espesor de la pared entre poros adyacentes en la estructura hexagonal de orden de los mesoporos en el material mesoporoso ordenado

BEC: Bioactive endodontic cements; cementos endodónticos bioactivos

BET: Brunauer-Emmett-Teller

BG: Bioactive glass, vidrio bioactivo

Bi: Bismuto

BJH: Barrett-Joyner-Hallenda

BMP: Bone morphogenetic protein, proteína morfogenética ósea

BMP-2: Bone morphogenetic protein-2, proteína morfogenética ósea-2

BMP-4: Bone morphogenetic protein-4, proteína morfogenética ósea-4

$\beta$ -TCP:  $\beta$ -tricalcium phosphate,  $\beta$ -fosfato tricálcico

## C

°C: Grado Celsius

Ca: calcio

Ca(OH)<sub>2</sub>: calcium hydroxide, hidróxido de calcio

CEM: Calcium enriched mixture, mezcla enriquecida con calcio

C-H: Enlace carbono-hidrógeno

CHX: Chlorhexidine, clorhexidina

cm: Centímetro

col.: Colaboradores

CPC: Cetylpyridine chloride, cloruro de cetilpiridino

CS: Calcium silicate, silicato cálcico

## **D**

d<sub>50</sub>: Percentil 50

DAP: Double antibiotic paste; doble pasta antibiótica

DAPI: Diamidino-phenylindole, diamidino-fenilindol

DFSCs : Dental follicle stem cells, células progenitoras de los folículos dentales

DHT: Dehydrothermal treatment, tratamiento dehidrotermal

DIH<sub>2</sub>O: Agua desionizada

DMEM: Dulbecco's modified Eagle's médium, medio de cultivo Eagle modificado de Dulbecco

DMSO: dimetilsulfóxido

dp: mesoporous diameter, diámetro de mesoporo

DPSCs: Dental pulp stem cells, células madre de pulpa dental

hDPSCs: Human dental pulp stem cells; células madre de la pulpa dental humana

DRX: Difracción de Rayos X

DRXBA: Difracción de Rayos X de Bajo Ángulo

DSC: Differential scanning calorimetry, calorimetría diferencial de barrido

DTA: Differential thermal analysis, análisis térmico diferencial

## **E**

ECM: Extracellular matrix, matriz extracelular

EDTA: Ethylenediaminetetraacetic Acid, ácido etilendiaminotetraacético

EDX: Energy-dispersive X-ray spectroscopy, espectroscopia de dispersión de energía por rayos

X

EGF: Epidermal growth factor, factor de crecimiento epidérmico

EISA: Evaporation induced self assembly, autoensamblaje inducido por evaporación

ESE: European society of endodontology, sociedad europea de endodoncia

etc.: Etcétera

## **F**

FBS: Fetal bovine serum, suero fetal bovino

FDA: Food and drug administration, administración de alimentos y medicamentos de los Estados Unidos

FEG-SEM: Field emission gun-scanning electron microscopy, microscopía electrónica de barrido con emisión de campo

FGF-2: Fibroblast growth factor-2, factor de crecimiento de fibroblastos-2

FT-IR: Fourier transform infrared spectroscopy, espectroscopia infrarroja con transformada de Fourier

## **G**



g: Gramo

## **H**

h: Hora

HA: Hidroxiapatito

HAC: Hidroxiapatito carbonatado

HCl: Hydrochloric acid, ácido clorhídrico

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: Hydrogen peroxide, peróxido de hidrógeno

## **I**

ICP-AES: Inductively coupled plasma-mass spectrometry, espectrometría de masas de plasma de acoplamiento inducido

IUPAC: International union of pure and applied chemistry, union internacional de química pura y aplicada

## **K**

K: Potasio

## **L**

LD: Laser diffraction, difracción láser

## **M**

m: Metro

M: Molar

MAnaOr: MAcporosidad interconectada y nanoporosidad Ordenada

MBG: Mesoporous bioactive glass, vidrio mesoporoso bioactivo

$\alpha$ -MEM: Minimum Essential Medium, medio mínimo esencial  $\alpha$

Mg: magnesio

mg: Miligramo

min: Minuto

$\mu$ L: Microlitro

mL: Mililitro

$\mu$ m: Micrometro

mm: Milimetro

mM: Milimolar

MMP: Matrix metalloproteinases, metaloproteinasas de la matriz

MSCs: Mesenchymal Stem Cell, células madre mesenquimales

MTA: Mineral Trioxide Aggregate, agregado de trióxido mineral

**N**

N<sub>2</sub>: Nitrógeno

Na: Sodio

NaOCl: sodium hypochlorite, hipoclorito de sodio

nm: Nanómetro

**P**

P: fósforo

P: porosidad total

p: probabilidad

P-123: Pluronic® P123

PDGF: platelet derived growth factor, factor de crecimiento derivado de plaquetas

PDLSCs: Periodontal ligament stem cells, células madre del ligamento periodontal

PEG: Polyethylene glycol, glicol de polietileno

PEO: Poly(Ethylene Oxide), óxido de polietileno

macro p-NPP: p-NitroPhenyl Phosphate, p-nitrofenil-fosfato

pH: Medida de acidez

PLA: Polylactic acid, ácido poliláctico

PLGA: Poly lactic-co-glycolic acid, ácido poliláctico-co-glicólico

PRF: Platelet-rich fibrin, fibrina rica en plaquetas

PRP: Platelet-rich plasma, plasma rico en plaquetas

PSD: Particle-size distribution, distribución de tamaño de poro

## **R**

REP: Regenerative Endodontic Procedures, procedimientos de regeneración endodóncica

rpm: Revoluciones por minuto

RT-PCR: Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction, retrotranscripción y reacción en cadena de la polimerasa

## **S**

SAP: Self-assembling peptide, péptidos autoensamblados

SAXRD: Small angle x-ray diffraction, difracción de rayos X de bajo ángulo

SBF: Simulated body fluid, disolución salina simulando condiciones fisiológicas

$S_{BET}$ : BET surface, superficie específica BET

SCAPs : Stem cells of the developing root apical papilla, células madre de la papila apical

SEM: Scanning electron microscope, microscopía electrónica de barrido

SG: Sol-gel

SHEDs: Stem cells from human exfoliated deciduous teeth, células madre de los dientes deciduos exfoliados

Si: Silicio

STEM: Scanning transmission electron microscopy, microscopía electrónica de transmisión de barrido

## **T**

TAP: Triple Antibiotic Paste, pasta triple antibiótico

TCP: Tricalcium phosphate, fosfato tricálcico

TEOS: Tetraethylorthosilicate, tetraetilortosilicato

TEP: trietil fosfato

TGA: Thermogravimetric analysis, análisis termogravimétrico

TGF- $\beta$ : Transforming Growth Factor Beta, factor de crecimiento transformante beta

## **U**

UV: Ultravioleta

## **V**

v/v: Relación volumen-volumen

VEGF: Vascular endothelial growth factor, factor de crecimiento endotelial vascular

VME: volumen de mesoporo

VMI: volumen de microporo

V<sub>T</sub>: Total pore volume, volumen total de poro

## **W**

WAXRD: Wide angle X-ray diffraction, difracción de rayos X en condiciones de rutina

## **X**

XRD: X-ray diffraction, difracción de rayos X

XRF: X-ray fluorescence, fluorescencia de rayos X

## **Z**

Zn: Zinc

