



UCAM

UNIVERSIDAD CATÓLICA
DE MURCIA

TESIS DOCTORAL

ESCUELA INTERNACIONAL DE DOCTORADO

Programa de Doctorado de Ciencias de la Salud

**Estudio del efecto del Germanio Orgánico (GE-132) in vitro y
en estudio experimental**

Autor:

Rodion Bushin Izman

Directores:

Dr. D. Dr. Jose Mate Sanchez del Val

Dr. D. Carlos Pérez -Albacete Martínez

Murcia, 19 de Febrero de 2025



UCAM

UNIVERSIDAD CATÓLICA
DE MURCIA

TESIS DOCTORAL

ESCUELA INTERNACIONAL DE DOCTORADO

Programa de Doctorado de Ciencias de la Salud

**Estudio del efecto del Germanio Orgánico (GE-132) in vitro y
en estudio experimental**

Autor:

Rodion Bushin Izman

Directores:

Dr. D. Dr. Jose Mate Sanchez del Val

Dr. D. Carlos Pérez -Albacete Martínez

Murcia, 19 de Febrero de 2025



AUTORIZACIÓN DEL DIRECTOR DE LA TESIS PARA SU PRESENTACIÓN

El Dr. D. José Eduardo Maté Sánchez de Val y el Dr. D. Carlos Pérez Albacete Martínez como Directores⁽¹⁾ de la Tesis Doctoral titulada “Estudio del efecto del Germanio Orgánico (GE-132) in vitro y en estudio” realizada por D. Rodion Bushin Izman en el Programa de Doctorado Programa de Doctorado de Ciencias de la Salud, **autoriza su presentación a trámite** dado que reúne las condiciones necesarias para su defensa.

**LO QUE FIRMO, PARA DAR CUMPLIMIENTO AL REAL DECRETO 99/2011 , EN MURCIA
A 19 DE FEBRERO DE 2025.**

AGRADECIMIENTOS

Un agradecimiento especial a mi familia, en particular a mi esposa por su constante motivación cuando sentía deseos de abandonar la tesis.

A mi madre, por su inquebrantable apoyo y comprensión en cada etapa del camino.

También quiero expresar mi gratitud a mis directores, cuyo aliento y orientación fueron fundamentales para motivarme a completar este importante capítulo académico en mi vida.

Tu vida no será limitada por la
naturaleza de tu trabajo, sino por la naturaleza
de tu pensamiento. - Sadguru

RESUMEN

La hidroxiapatita (HA) es un fosfato de calcio que constituye el principal componente mineral de los tejidos óseos y dentales. Debido a su biocompatibilidad y similitud con la estructura del hueso humano, la HA se ha utilizado ampliamente en la reparación y regeneración de tejidos mineralizados, como huesos y dientes. Este material es particularmente valioso en aplicaciones biomédicas, como la regeneración ósea en casos de atrofia de los maxilares causada por la pérdida dentaria, donde se utiliza para reconstruir el volumen óseo perdido y permitir la colocación de implantes dentales. Además, la hidroxiapatita ya se emplea en tratamientos dentales para mejorar la mineralización del esmalte, fortalecer los dientes y reducir la sensibilidad dental.

En este estudio, se buscó mejorar las propiedades de la hidroxiapatita mediante la incorporación de germanio (Ge), un elemento conocido por sus propiedades antioxidantes y por su potencial para promover la regeneración tisular. Para ello, se enriqueció la hidroxiapatita con germanio utilizando presión isostática en frío. Esta técnica permitió mejorar varias propiedades clave del biomaterial, tales como la solubilidad, la rigidez, la retención de agua y la biodegradabilidad. La mejora de estas propiedades es crucial para asegurar que el material no solo sea estructuralmente sólido, sino también que se integre y se degrade de manera controlada en el cuerpo, promoviendo así una mejor regeneración tisular.

El estudio se dividió en tres fases principales. En la primera fase, se realizó la síntesis del biomaterial enriquecido con germanio. En la segunda fase, se llevaron a cabo estudios *in vitro* para evaluar las propiedades fisicoquímicas y biológicas del material. En esta etapa, se evaluaron la liberación de fármacos, la adherencia de proteínas y la formación de capas de apatita en cultivos de células madre mesenquimales de médula ósea (BM-MSCs). Los biomateriales de HA-Ge mostraron potencial para la reparación y regeneración de tejidos mineralizados.

Finalmente, en la tercera fase, se avanzó hacia una evaluación clínica preliminar en humanos, enfocada en observar el comportamiento del material en condiciones reales, específicamente su efectividad en la reducción de la sensibilidad dentaria al utilizar hidroxiapatita enriquecida con germanio. Los resultados clínicos mostraron una mejora significativa, con una tasa de efectividad del 40% en la reducción de la hipersensibilidad dentinaria. Estos hallazgos sugieren que los biomateriales de hidroxiapatita enriquecidos con germanio podrían ser una opción prometedora para la reparación y regeneración de tejidos mineralizados, incluso en el contexto de la sensibilidad dentinaria.

PALABRAS CLAVE

Hidroxiapatita; liberación de fármacos, células madre mesenquimales, adherencia de proteínas, hipersensibilidad dentinaria, Ge-132, Germanio, tratamiento sensibilidad, sensibilidad.

ABSTRACT

Hydroxyapatite (HA) is a calcium phosphate that constitutes the main mineral component of bone and dental tissues. Due to its biocompatibility and similarity to the structure of human bone, HA has been widely used in the repair and regeneration of mineralized tissues, such as bones and teeth. This material is particularly valuable in biomedical applications, such as bone regeneration in cases of jaw atrophy caused by tooth loss, where it is used to rebuild lost bone volume and allow the placement of dental implants. Additionally, hydroxyapatite is already used in dental treatments to enhance enamel mineralization, strengthen teeth, and reduce dental sensitivity.

This study aimed to improve the properties of hydroxyapatite by incorporating germanium (Ge), an element known for its antioxidant properties and its potential to promote tissue regeneration. To achieve this, hydroxyapatite was enriched with germanium using cold isostatic pressure. This technique improved several key properties of the biomaterial, such as solubility, stiffness, water retention, and biodegradability. Enhancing these properties is crucial to ensure that the material is not only structurally solid but also integrates and degrades in a controlled manner in the body, thus promoting better tissue regeneration.

The study was divided into three main phases: In the first phase, the synthesis of the germanium-enriched biomaterial was performed; in the second phase, *in vitro* studies were conducted to evaluate the physicochemical and biological properties of the material, including drug release, protein adherence, and apatite layer formation in cultures of bone marrow mesenchymal stem cells (BM-MSCs). The HA-Ge biomaterials showed potential for the repair and regeneration of mineralized tissues.

Finally, in the third phase, a preliminary clinical evaluation in humans was carried out, focusing on observing the behavior of the material under real conditions, specifically its effectiveness in reducing dental sensitivity when using germanium-enriched hydroxyapatite. The clinical results showed significant

improvement, with a 40% effectiveness rate in reducing dentin hypersensitivity. These findings suggest that germanium-loaded hydroxyapatite biomaterials could be a promising option for the repair and regeneration of mineralized tissues, even in the context of dentin sensitivity.

Key words

Hydroxyapatite, drug release, mesenchymal stem cells, protein adhesion, dentine hypersensitivity, Ge-132, hydroxyapatite, Germanium, sensitivity treatment, sensitivity.

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN	11
ABSTRACT	13
SIGLAS Y ABREVIATURAS	21
ÍNDICE DE FIGURAS, DE TABLAS Y DE ANEXOS	23
ÍNDICE DE TABLAS	25
I. INTRODUCCIÓN	31
II. ANTECEDENTES	41
2.1. GERMANIO ORGÁNICO	41
2.2. ORIGEN Y ESTRUCTURA	43
2.1.1. Estudios toxicológicos.....	45
2.1.2. Indicaciones terapéuticas.....	46
2.3. EL GERMANIO Y SU INFLUENCIA EN LA REGENERACIÓN ÓSEA EN LA OSTEOPOROSIS.....	55
2.4. INFLUENCIA DEL GERMANIO EN LA SALUD DENTAL	59
III. CARACTERÍSTICAS REMODELACIÓN ÓSEA	63
3.1. ATROFIA ÓSEA EN MAXILIARES: CAUSA Y CONSECUENCIAS.....	63
3.1.1. Importancia de la Posición y Cantidad de Hueso en Implantes Dentales	65
3.1.2. Importancia del tejido blando en el éxito de los implantes dentales	68
3.1.3. Consideraciones clínicas	70
3.2. BIOMATERIAL DE REGENERACIÓN ÓSEA: LA HIDROXIAPATITA (HA)	72
3.2.1. Clasificación de los biomateriales.....	74
3.2.2. Clasificación de biomateriales cerámicos según el origen.....	76
IV. MECANISMOS DE LA HIPERSENSIBILIDAD DENTARIA	83

4.1. INTRODUCCIÓN.....	83
4.1.1. Definición y características de la sensibilidad dentinaria.....	83
4.2. ETIOPATOGENIA.....	85
4.3. MECANISMO Y TEORÍAS DE LA SENSIBILIDAD DENTARIA.....	89
4.3.1. Enfoques terapéuticos para la sensibilidad dental	92
4.4 PREVALENCIA.....	92
4.5. DIAGNÓSTICO.....	94
4.6. TRATAMIENTO	97
4.6.1. Hidroxiapatita en el tratamiento de la sensibilidad dentinaria	101
V. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS	109
5.1. JUSTIFICACIÓN	109
5.2. OBJETIVOS	110
5.2.1. Objetivos In Vitro.....	111
5.2.1.1. Objetivo principal In Vitro	111
5.2.1.2. Objetivos secundarios In Vitro.....	111
5.2.2. Objetivos en humanos.....	112
5.2.2.1. Objetivo principal en humanos.....	112
5.2.2.2. Objetivos secundarios en humanos.....	112
VI. MATERIAL Y METODOS	117
6.1. IN VITRO	117
6.1.1. Materias primas y composición.....	117
6.1.2. Síntesis de hidroxiapatita.....	117
6.1.3. Fabricación de compuesto HA-Ge	117
6.1.4. Caracterización compuesta.....	118
6.1.5. Propiedades mecánicas	118
6.1.6. Solubilidad	119

6.1.7. Tasa de absorción de agua.....	119
6.1.8. Tasa de hinchazón	119
6.1.9. Degradación in vitro.....	120
6.1.10. Contacto de ángulo de agua.....	120
6.1.11. Capacidad de adsorción de proteínas.....	120
6.1.12. Bioactividad	121
6.1.13. Comportamiento de liberación de drogas.....	122
6.1.14. Cultivo celular in vitro	122
6.1.15. Densidad de carga celular	123
6.1.16. Análisis estadístico	123
6.2. ESTUDIO EN HUMANOS.....	124
6.2.1. Metodología.....	124
6.2.2. Desglose de la muestra.....	125
6.2.3. Próximos pasos.....	126
6.2.4. Criterios de selección.....	126
6.2.4.1. Criterios de inclusión	126
6.2.4.2. Criterios de exclusión.....	127
6.2.5. Anexos de información al paciente	127
6.2.5.1. Anexo con las tablas de valoración del paciente	128
6.2.5.3. Anexo con el cuestionario de información al paciente.....	128
6.2.5.3. Anexo con el consentimiento informado.....	129
6.2.6. Procedimiento de recogida de datos	130
6.2.7. Variables del estudio	131
6.2.8. Análisis de los datos	131
VII. RESULTADOS	135
7.1. IN VITRO	135

7.1.1. Caracterización.....	135
7.1.2. Liberación del medicamento	140
7.1.3. Prueba de ángulo de contacto	142
7.1.4. Capacidad de adsorción de proteínas.....	143
7.1.5. Bioactividad In-Vitro.....	145
7.1.6. Efecto de Ge en las BM-MSCs	146
7.1.7. Efecto de HA en las BM-MSCs.....	148
7.1.8. Efecto del recubrimiento de HA-Ge en las BM-MSCs.....	150
7.1.9. Densidad de carga celular	152
7.2. RESULTADOS EN ESTUDIO EN HUMANOS	153
7.2.1. Análisis de la hipersensibilidad dentinaria.....	155
7.2.2. Registro de efectos no deseados	157
VIII. DISCUSIÓN.....	161
8.1. IN VITRO.....	161
8.2. EN HUMANOS	165
8.2.1. Comparación de tratamientos.....	166
8.2.1.1. El barniz de flúor	166
8.2.1.2. Tratamiento con láser	168
8.2.1.3. Láser de diodo	169
8.2.1.4. Efecto en la obstrucción de túbulos dentinarios.....	169
8.2.1.5. Eficacia clínica en la reducción de la hipersensibilidad dentinaria (HD).169	
8.2.1.6. Eficacia del láser de diodo en el tratamiento de la hipersensibilidad dentinaria (HD).....	169
8.2.1.7. Comparación del láser de diodo con otros láseres.....	170
8.2.1.8. Láseres de baja potencia GaAlAs	170
8.2.1.9. Comparación	171

8.2.1.10. Ventajas de la combinación de láser y desensibilizantes superficiales...	172
8.2.1.11. Desventajas láser	172
8.2.2 Eficiencia de productos de pasta dentífrica	173
8.2.3 Resultados del estudio actual.....	175
9. CONCLUSIONES.....	179
9.1. IN VITRO.....	179
9.2. EN HUMANOS	180
X. LIMITACIONES	185
10.1. IN VITRO.....	185
10.2. EN HUMANOS.....	187
XI. FUTURAS LINEAS DE INVESTIGACIÓN.....	191
11.2. IN VITRO.....	191
11.1. EN HUMANOS.....	192
ANEXO	
ANEXO 1. COMITÉ DE ÉTICA	197
ANEXO 2. ARTÍCULO PUBLICADO	199
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFIAS	221

SIGLAS Y ABREVIATURAS

AA: Ácido Araquidónico

ADN: Ácido Desoxirribonucleico

AESAN: Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición

BM-MSCs células madre mesenquimales de médula ósea

BTCP: Beta-Fosfato Tricálcico

COTM: Enzima Catecol-Ortometil-Transferasa

CPP-ACP: Complejos de fosfato de calcio amorfo y fosfopéptido de caseína

GE: Germanio

GE-132: Bis(carboxietilgermanio) Sesquióxido

((GeCH₂CH₂COOH)₂O₃): Sesquióxido de Germanio Carboxietilo

GeCl₄: Cloruro de Germanio

GeH₄: Germanio Hidruro

GeO₂: Dióxido de Germanio

GSH: Glutación reducido

HA: Hidroxiapatita

HD: hipersensibilidad dentinaria

MSC: células madre mesenquimales

NK: células natural killer

VIH: Virus de inmunodeficiencia humana

ÍNDICE DE FIGURAS, DE TABLAS Y DE ANEXOS**ÍNDICE DE FIGURAS**

Figura 1. Estructura del Ge-132	42
Figura 2. Mecanismos de sensibilidad dentinaria.....	90
Figura 3. Arreglo atómico en la celda unitaria hexagonal de la hidroxiapatita, mostrando las posiciones atómicas del Ca, P, O e H dentro de la celda unitaria.	104
Figura 4. Prismas del esmalte dental humano en sección transversal (A) y en sección longitudinal (B).	104
Figura 5. A) Cristales que conforman los prismas del esmalte dental humano. B) Mayor amplificación. Existencia de material orgánico rodeando los cristales de HAP.....	105
Figura 6. Solubilidad	136
Figura 7. Rigidez, capacidad de retención de agua	136
Figura 8. Degradación in vitro de los biomateriales de HA-Ge.....	137
Figura 9. Patrones de Difracción de Rayos X de los Biomateriales Compuestos HA-Ge.	138
Figura 10. Imágenes SEM del polvo compuesto de Ge (A) y HA-5% Ge (B).....	139
Figura 11. Patrón de liberación del medicamento de los biomateriales HA-Ge en diferentes niveles de pH	140
Figura 12. Patrón de liberación del medicamento de los biomateriales HA-Ge en diferentes medios.....	141
Figura 13. Comportamiento del ángulo de contacto de los biomateriales HA-Ge	142
Figura 14. Capacidad de absorción de proteínas de los biomateriales HA-Ge mediante la prueba de tinte CBB.....	143
Figura 15. Evaluación de la intensidad de tinción de compuestos HA-Ge tratados con CBB y su absorción UV a 590 nm.	144

Figura 16. Bioactividad in vitro de los biomateriales HA-Ge después del tratamiento con SBF durante 28 días con tinción de alizarina roja.	145
Figura 17. Bioactividad in vitro de los biomateriales HA-Ge—absorción UV de la tinción de alizarina roja 28 días	146
Figura 18. (A) Recuento celular y (B) Imágenes de fluorescencia (FITC, DAPI y combinadas) de las BM-MSCs cultivadas con Ge.	147
Figura 19. Recuento celular y de las BM-MSCs cultivadas con HA.	148
Figura 20. Imágenes de fluorescencia (FITC, DAPI y combinadas) de las BM-MSCs cultivadas con HA	149
Figura 21. Recuento celular de las BM-MSCs cultivadas con recubrimiento de HA-Ge.	150
Figura 22. Imágenes de fluorescencia (FITC, DAPI y combinadas) de las BM-MSCs cultivadas con recubrimiento de HA-Ge.	151
Figura 23. Capacidad total de siembra de las BM-MSCs en biomateriales HA-Ge	152
Figura 24. Seguimiento clínico	154
Figura 25. Cuestionario diario	156
Figura 26. Tasa de efectividad.....	156

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1 Contenido el Germanio en plantas medicinales (1 ppm=0,0001%)	41
Tabla 2. Microanálisis EDX de los compuestos HA-Ge.	139
Tabla 3. Comparación de medidas tras el seguimiento clínico.....	154
Tabla 4. Comparación de medidas tras el cuestionario diario	155

ÍNDICE DE ANEXOS

ANEXO 1. COMITÉ DE ÉTICA	197
ANEXO 2. ARTÍCULO PUBLICADO.....	199

CAPÍTULO I – INTRODUCCIÓN

I. INTRODUCCIÓN

En la constante búsqueda de soluciones innovadoras para mejorar la calidad de vida de los pacientes que enfrentan problemas relacionados con la cavidad bucal, se ha producido un avance significativo en el desarrollo y aplicación de diversas intervenciones odontológicas para dar soluciones a una amplia gama de problemas bucales que pueden afectar la salud funcional, estética y/o psicológica del paciente. Entre estos problemas se incluyen la caries dental, la enfermedad periodontal, la maloclusión, la sensibilidad dentinaria, la pérdida dental y como consecuencia atrofia de los maxilares y otras afecciones que pueden causar dolor, incomodidad y deterioro de la calidad de vida.

Las soluciones a estos problemas van desde procedimientos restaurativos convencionales hasta terapias más avanzadas basadas en tecnologías emergentes y biomateriales de vanguardia, el uso de biomateriales ha emergido como un campo prometedor en la odontología moderna, ofreciendo nuevas perspectivas para la restauración y regeneración de tejidos dentales y óseos.

Una de las áreas más importantes de este avance es el desarrollo de biomateriales diseñados específicamente para promover la regeneración de tejidos dentales y óseos.

La investigación en esta área ha identificado una variedad de compuestos que muestran un potencial significativo para promover la regeneración tisular. Entre estos compuestos se encuentran la hidroxiapatita, el colágeno, los polímeros biodegradables y los factores de crecimiento. Estos materiales se seleccionan y diseñan cuidadosamente para imitar las propiedades naturales de los tejidos biológicos, lo que les permite interactuar de manera efectiva con el entorno tisular y promover la regeneración celular.¹

Por ejemplo, los biomateriales de hidroxiapatita han demostrado ser altamente efectivos en la reconstrucción de defectos óseos y la regeneración de tejidos periodontales.

La hidroxiapatita (HA) es un componente mineral natural del tejido óseo, proporciona un entorno favorable para la formación de hueso nuevo al tiempo que facilita la integración con los tejidos circundantes. Estos biomateriales son capaces

de estimular la actividad celular y la deposición de matriz extracelular, lo que conduce a una regeneración tisular efectiva y duradera.²

Este biomaterial ampliamente utilizado en aplicaciones biomédicas debido a su similitud estructural con el tejido óseo humano y su capacidad para promover la regeneración tisular. Se han desarrollado diversas modalidades de materiales de hidroxiapatita, que incluyen andamios, injertos, matrices tridimensionales e hidrogeles, con el objetivo de potenciar su rendimiento biológico. Además, se ha demostrado que los andamios de hidroxiapatita son capaces de liberar de manera controlada factores de crecimiento y medicamentos, lo que los convierte en excelentes candidatos para aplicaciones de liberación de fármacos dirigidas.³

Los biomateriales de hidroxiapatita se caracterizan por su capacidad para proporcionar un entorno propicio para la adhesión celular, la proliferación y la diferenciación, lo que los hace ideales para su uso en la ingeniería de tejidos y la medicina regenerativa.⁴

Para optimizar aún más su funcionalidad y aplicabilidad, estos biomateriales frecuentemente se combinan con otros materiales biológicos o sintéticos. Entre ellos se encuentran la fibroína de seda, que aporta resistencia mecánica y flexibilidad; la celulosa, conocida por su robustez y biodegradabilidad; el alginato, que es útil por su capacidad de gelificación y su compatibilidad biológica; y el ácido poliláctico, que es valorado por su degradabilidad y su seguridad en aplicaciones médicas.

También se utilizan polímeros como la poli(ϵ -caprolactona), que se degrada lentamente y es útil en estructuras de soporte de largo plazo; el polimetilmetacrilato, ampliamente usado en odontología y ortopedia por su estabilidad y facilidad de manipulación; y combinaciones naturales de colágeno con gelatina o quitosano, que no solo mejoran la biocompatibilidad, sino que también replican aspectos críticos de la matriz extracelular natural.^{5,6,7}

Estas mejoras en los biomateriales de hidroxiapatita no solo amplían sus aplicaciones médicas, sino que también ayudan a diseñar soluciones más eficaces y personalizadas para la regeneración de tejidos, lo que supone un avance importante en el tratamiento de diversas condiciones y enfermedades que involucran daño o pérdida de tejidos.

Con los avances en germanio orgánico y nanotecnología, este material ha demostrado diversas funciones biológicas, lo que ha incrementado su potencial en

áreas como la bioquímica y la medicina, atrayendo cada vez más la atención de la comunidad científica. En los últimos años, el germanio ha cobrado importancia como material dentro de la biomedicina, mostrando perspectivas prometedoras para su aplicación. Sin embargo, la investigación sobre los efectos biológicos y los mecanismos de acción del germanio sigue siendo limitada y aún falta una evaluación más profunda y sistemática de estos aspectos.

El germanio (Ge) se destaca por ser un metaloide de origen natural relativamente raro, cuyo símbolo químico es **Ge**, perteneciente al grupo del carbono y que se encuentra en la naturaleza en forma de minerales.⁸

Químicamente, el germanio es estable y muestra similitudes estructurales y fisicoquímicas con el diamante y el silicio (**Si**), ya que ambos tienen cuatro electrones en su capa externa.⁹

Esto es particularmente relevante ya que confiere al germanio excelentes propiedades semiconductoras. Debido a estas propiedades químicas y físicas que combinan características tanto metálicas como no metálicas el Ge fue uno de los primeros elementos utilizados en la fabricación de transistores y dispositivos semiconductores, desempeñando un papel fundamental en aplicaciones en optoelectrónica, bioquímica y medicina.

El germanio se puede clasificar en dos formas diferentes: germanio inorgánico y orgánico. El germanio inorgánico se utiliza principalmente en la industria como material semiconductor y en reacciones ópticas,¹⁰ aplicaciones en campos tecnológicos avanzados, como catalizadores, vidrios ópticos y dispositivos ópticos infrarrojos.^{11, 12} Sin embargo, debido a su naturaleza hidrofóbica, el germanio inorgánico rara vez se emplea en aplicaciones biomédicas.

En el ámbito de la biomedicina, el germanio ha suscitado un interés considerable por parte de los investigadores. Este interés no solo se debe a sus propiedades fisicoquímicas, sino también a su potencial terapéutico evidenciado en diversos estudios farmacológicos.

Además, se reconoce al germanio como un oligoelemento crucial, esencial para mantener el funcionamiento normal del sistema inmunológico y desempeñando un papel clave en la prevención de enfermedades.^{13,14}

Se ha observado que los compuestos de germanio presentan una serie de efectos biológicos beneficiosos, comenzando con su actividad antimicrobiana, que

les permite combatir una amplia gama de microorganismos patógenos, contribuyendo a la protección frente a infecciones. Estos compuestos muestran propiedades antivirales, siendo útiles tanto en el tratamiento como en la prevención de enfermedades virales, al inhibir la replicación de los virus en el organismo. En el ámbito de la salud celular, los compuestos de germanio también presentan efectos antioxidantes significativos, al eliminar los radicales libres que pueden dañar las células y tejidos, contribuyendo a la reducción del estrés oxidativo. Otra de sus propiedades destacadas es la capacidad de producir lípidos hipoglucemiantes, lo que puede ayudar a regular los niveles de glucosa en sangre.

Finalmente, se ha demostrado que estos compuestos tienen efectos antitumorales, mostrando la capacidad de inhibir el crecimiento y la proliferación de ciertos tipos de células cancerosas, lo que podría ser útil en el desarrollo de tratamientos oncológicos. Finalmente, el germanio también estimula el sistema hematopoyético, promoviendo la producción de células sanguíneas, lo que puede ser beneficioso en situaciones de anemia o debilitamiento del sistema inmunológico. Estos efectos combinados resaltan el potencial terapéutico del germanio en diversas áreas de la medicina.¹⁵

Por otro lado, la falta de germanio en el organismo se ha relacionado con el desarrollo de diversas enfermedades, siendo uno de los factores importantes en la aparición de cáncer. Esta deficiencia puede alterar varios procesos biológicos clave, como la regulación del sistema inmunológico y la actividad antioxidante, lo que podría contribuir a la proliferación de células anormales y la formación de tumores. En este sentido, se ha observado que niveles bajos de germanio en el cuerpo podrían aumentar la vulnerabilidad a ciertos tipos de cáncer al interferir con mecanismos de defensa natural del organismo, como la eliminación de radicales libres y la regulación de la inflamación.¹⁶

Además, el germanio ha demostrado tener efectos inmunomoduladores, una propiedad valiosa que puede ayudar a regular o modificar las respuestas del sistema inmunológico, lo que es crucial en el tratamiento de enfermedades autoinmunes y en la mejora de la respuesta inmune general. Otro aspecto notable de sus capacidades es su función eritropoyética, es decir, su capacidad para estimular la producción de glóbulos rojos, lo cual es beneficioso en condiciones de anemia o debilidad general del organismo.¹⁷

En la oncología, diferentes derivados de germanio han demostrado tener efectos antitumorales mediante la inhibición de la proliferación de células cancerosas y la inducción de apoptosis, es decir, la muerte programada de estas células¹⁸, la hemocompatibilidad, se refiere a la capacidad de un material de interactuar favorablemente con la sangre, los compuestos de germanio han sido investigados por su potencial para ser utilizados en dispositivos médicos implantables como stents o prótesis, que requieren una integración sin complicaciones con los tejidos sanguíneos.¹⁹

La utilización de germanio en el tratamiento de la hepatitis crónica también ha sido objeto de estudio, con investigaciones que apuntan a su efectividad para mejorar las funciones hepáticas y reducir la carga viral en los pacientes.²⁰

Además, la capacidad del germanio para estimular la hematopoyesis, el proceso de producción de células sanguíneas, lo hace valioso en el manejo de enfermedades y condiciones que afectan la producción de sangre²¹, y para estimular el sistema inmunológico, los compuestos de germanio, como el sesquióxido de germanio carboxietilo, han demostrado impactar positivamente la inmunidad mediante la activación de células clave del sistema inmune, como los macrófagos y las células natural killer (NK). Estas células desempeñan un papel crucial en la respuesta inmune innata, la primera línea de defensa del cuerpo contra infecciones y tumores. La estimulación de estas células puede resultar en una respuesta inmune más robusta y efectiva.²²

La actividad biológica del Ge depende de la forma química y en la mayoría de los casos, los compuestos específicos de germanio como el sesquióxido de germanio carboxietilo ((GeCH₂CH₂COOH)₂O₃), espirogermanio, y el lactato-citrato de germanio han sido los más estudiados en este contexto. Estas moléculas varían en sus estructuras y como consecuencia, en sus interacciones con el cuerpo humano, lo que puede influir significativamente en su efectividad y seguridad.

Una de las propiedades más valoradas del germanio en las aplicaciones biomédicas es su capacidad antioxidante, acompañada de su biocompatibilidad e inmunomodulación. Estas características hacen del germanio un candidato destacado para múltiples aplicaciones terapéuticas. Sin embargo, es crucial distinguir entre sus diferentes formas químicas, ya que compuestos específicos como el germanio hidruro (GeH₄), dióxido de germanio (GeO₂), y cloruro de

germanio (GeCl_4) han demostrado niveles de toxicidad que podrían limitar su utilidad clínica. A pesar de estos desafíos, la investigación demuestra que cuando se utilizan formas seguras de germanio, sus beneficios pueden ser significativamente aprovechados sin comprometer la seguridad del paciente.¹⁸

Varios investigadores han utilizado el Ge como un fármaco potencial cargado con otros polímeros para explorar su aplicabilidad en la regeneración de tejidos.

En un estudio reciente, el Ge se incorporó como sustancia biológicamente activa con películas de grafeno para estabilizar las propiedades fisicoquímicas, la conductividad eléctrica y las propiedades superficiales. Sus resultados revelaron que el grafeno incorporado con Ge tenía una mayor actividad biológica al aumentar la expresión génica de marcadores osteogénicos en las células madre mesenquimales (MSC).²³ Los efectos beneficiosos del Ge sobre las MSC se informaron recientemente con o sin la incorporación de otros polímeros.²⁴

En los últimos años, gracias al avance de la nanotecnología, el germanio nanoestructurado ha emergido como un material biomédico prometedor con una gran variedad de aplicaciones potenciales. A diferencia de otros materiales, el nano-germanio presenta propiedades físicas y químicas muy similares al nano-silicio, lo que le otorga una gran versatilidad en el campo de la biomedicina. Además, una de sus características más destacadas es su bioafinidad, lo que significa que no contiene impurezas tóxicas, lo que lo hace seguro para su uso en aplicaciones biológicas y médicas.²⁵ También es altamente soluble en agua²⁶, lo que facilita su integración y transporte en sistemas biológicos. Estas propiedades hacen que el germanio sea una opción atractiva para una amplia gama de aplicaciones biomédicas, como en la creación de biosensores que permiten la detección precisa de biomarcadores en el cuerpo, en técnicas de imágenes biomédicas que ayudan a visualizar procesos biológicos a nivel molecular y celular, y en terapias que aprovechan sus efectos terapéuticos para tratar diversas enfermedades.^{27,28} La capacidad del nano-germanio para interactuar con tejidos biológicos de manera eficiente y sin causar efectos adversos ha hecho que despierte un interés creciente en el campo de la investigación biomédica.

Aunque el Ge ha estado disponible comercialmente durante varias décadas, recientemente ha despertado interés en el tratamiento de ciertas enfermedades. Por ejemplo, los compuestos organogermanio se han utilizado para tratar el VIH, el

cáncer, donde se ha explorado su potencial para mejorar la eficacia de los tratamientos antirretrovirales y potencialmente reducir los efectos secundarios asociados con los medicamentos convencionales.

Hasta ahora, no se ha explorado el efecto combinado de Ge y HA. El elemento Ge, como buen conductor, y la HA, como componente principal de los huesos (55%), son materiales prometedores para la regeneración de tejidos y la capacidad de auto curación al transmitir señales en células biológicas. Por lo tanto, es necesario comprender el efecto potencial de Ge combinado con HA en aplicaciones biomédicas.

Como iniciativa, este estudio tuvo como objetivo optimizar la composición adecuada de HA y Ge para la biocompatibilidad del crecimiento de las células madre mesenquimales de médula ósea (BM-MSCs). Con este propósito, se prensó en frío isotrópicamente la HA sintetizada en estado sólido con Ge para fabricar biomateriales y se investigaron su liberación de fármacos, adhesión de proteínas, deposición mineral y biocompatibilidad para el crecimiento de BM-MSCs.

CAPÍTULO II - ANTECEDENTES

II. ANTECEDENTES

2.1. GERMANIO ORGÁNICO

El Germanio (Ge), es un oligoelemento no esencial de origen natural, que había sido predicho por Mendeleev en su tabla periódica, su símbolo es Ge número atómico 32, peso atómico 72,60, densidad 5,36 y valencia 4.

Se encuentra en el suelo, rocas, agua dulce, plantas (como ginseng, aloe y ajo) y la mayoría de los alimentos, en pequeñas cantidades.²⁹

Tabla 1 Contenido el Germanio en plantas medicinales (1 ppm=0,0001%)³⁶

Medicinal plants	Germanium content, ppm	Medicinal plants	Germanium content, ppm
Ganoderma lucidum	800 ~ 2000	Lithospermum erythrorhizon root	88
Ginseng	250 ~ 320	Aloe leaves	77
Sophora subprostrata	257	Comfrey	152
Myrobalan	262	Garlic	754
Trapa japonica	239	Aralia cordata	72
Lycium chinense	124	Sulcaria sulcata	255
Wisteria floribunda	108	Schistostega pennata	15 ppm
Coix seeds	50		

Fuente: Adaptado de Kazuhiko A, Kazuo M. Organogermanium compounds. Japan Patent 46-2964. 1971.³⁶

De acuerdo con la clasificación adoptada en biogeoquímica, el germanio se refiere a los microelementos, su contenido es normalmente (10) -6% - (10) -5% del peso corporal de una persona. El germanio se encuentra en muchos órganos del cuerpo humano (bazo, hígado, estómago, páncreas, cerebro, etc.). En particular, el contenido en tejido muscular es (0.14x10) -4%, el contenido en la sangre es 0.44 mg.

Schroeder y Balassa documentaron la presencia de germanio en todas las plantas, animales y organismos vivos.³⁰

En el año 1886 el Germanio Fue descubierto por un químico alemán, llamado Clemens Winkler, quién le otorgó el nombre de "Germanio" en honor a Alemania (Germania), su país natal. En 1948, fue utilizado por sus propiedades semiconductoras por los laboratorios U.S. Bell y desempeñó un papel importante en el desarrollo de la industria de la electrónica de semiconductores.

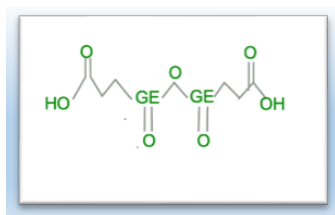


Figura 1. Estructura del Ge-132. Elaboración propia.

El desarrollo de derivados orgánicos hidrosolubles del germanio está vinculado al Instituto de Química Orgánica N.D. Zelinsky de la Academia de Ciencias de Rusia (ZIOC RAS) y sus destacados científicos. En 1965, el Profesor S.P. Kolesnikov descubrió la primera serie de derivados hidrosolubles mediante la reacción de hidrólisis del aducto $HGeCl_3$ con ciclohexanona o metacrilato de metilo.^{31 32}

Posteriormente, en 1967, el Profesor V.F. Mironov, un antiguo investigador del instituto, sintetizó otro compuesto estable hidrosoluble: el bis(carboxietilgermanio) sesquióxido (Ge-132), que sigue siendo el compuesto de germanio más reconocido hasta la fecha.^{33,34}

Desde 1976, el académico japonés Kazuhiko Asai fue el primero en identificar el potencial terapéutico del Ge-132.^{35,36,37}

El Ge-132, conocido químicamente como Sesquióxido de 2-carboxietilgermanio, destaca por ser un compuesto de germanio orgánico con propiedades únicas que facilitan su uso en diversas aplicaciones, incluyendo la suplementación dietética. Una de las características más notables del Ge-132 es su solubilidad en agua, lo que facilita su absorción y utilización en el cuerpo humano. Esta solubilidad es crucial para su eficacia como suplemento, permitiendo que se disperse rápidamente y se administre de manera eficiente a nivel celular.

Además, el Ge-132 es conocido por su baja toxicidad, lo que lo hace seguro para el consumo humano dentro de las dosis recomendadas. Diversos estudios han evaluado la toxicidad de este compuesto, encontrando que es considerablemente menor en comparación con otros compuestos de germanio, especialmente los inorgánicos. Esta baja toxicidad se debe, en parte, a su estructura química específica, que permite que el cuerpo lo procese sin acumular niveles dañinos, no se observaron toxicidad sistémica ni anomalías renales.^{38,39}

La combinación de baja toxicidad y alta solubilidad hace del Ge-132 un candidato ideal para estudios más profundos y aplicaciones en el campo de la salud y nutrición. Estas propiedades son especialmente valoradas en el contexto de suplementos dietéticos, donde la seguridad y la eficacia son de suma importancia. La investigación continua sobre el Ge-132 podría revelar aún más beneficios y usos potenciales, solidificando su posición como un suplemento valioso y seguro.

Actualmente, los compuestos orgánicos hidrosolubles de germanio han encontrado aplicaciones como suplementos o aditivos alimentarios en productos cosmético.⁴⁰ En particular, el Asaigermanio demuestra diversas actividades biológicas y muestra un gran potencial en funciones medicinales diversas. Por ejemplo, exhibe posibilidades en el tratamiento de afecciones asociadas al estrés oxidativo, trastornos autoinmunes, efectos antitumorales, así como propiedades antibacterianas y antivirales.⁴¹

2.2. ORIGEN Y ESTRUCTURA

El germanio es un elemento químico que ha sido objeto de investigación en relación con posibles efectos en la salud. Sin embargo, es importante destacar y

diferenciar el germanio orgánico (Ge-132) del germanio inorgánico ya que hay muchas diferencias y por eso existen cierta controversia y falta de consenso científico sobre sus beneficios y riesgos.

El germanio orgánico (Ge-132) y el germanio inorgánico son formas diferentes de germanio que tienen distintas propiedades y aplicaciones en la industria y la medicina.

El germanio orgánico, conocido como Ge-132, es un compuesto orgánico que ha despertado interés en la comunidad científica debido a sus posibles beneficios para la salud. Este compuesto se caracteriza por contener germanio en forma de germanio orgánico bioasimilable, lo que significa que puede ser absorbido y utilizado por el cuerpo de manera eficiente. Se ha observado que el germanio orgánico está ligado a grupos orgánicos, como metilos o carboxilos, lo que facilita su absorción en el tracto gastrointestinal y su distribución a través del torrente sanguíneo.^{42,43,44}

El germanio orgánico se ha estudiado por sus posibles efectos antioxidantes y antiinflamatorios, así como por su capacidad para modular el sistema inmunológico y mejorar la función celular. Estos efectos se atribuyen a su capacidad para actuar como donante de electrones, neutralizando los radicales libres y reduciendo el estrés oxidativo en el cuerpo.⁴⁵

Además, se ha sugerido que el germanio orgánico puede tener propiedades anticancerígenas y antimicrobianas, aunque se necesitan más estudios para confirmar estos efectos y comprender mejor los mecanismos subyacentes.^{22,46,47,48} A pesar de los posibles beneficios del germanio orgánico, es importante tener en cuenta que su seguridad y eficacia aún están siendo investigadas, y su uso debe ser supervisado por profesionales de la salud.

El germanio inorgánico se diferencia del germanio orgánico en su forma química y biodisponibilidad. A diferencia del germanio orgánico, que se encuentra en compuestos orgánicos, el germanio inorgánico está presente en forma de sales minerales, como el germanio elemental o compuestos de germanio con otros elementos inorgánicos. Estas formas son menos biodisponibles y no se asimilan tan fácilmente en el cuerpo como el germanio orgánico.⁴⁹

La biodisponibilidad limitada del germanio inorgánico se debe a su estructura química, que dificulta su absorción y utilización por parte del

organismo. Aunque el germanio inorgánico también ha sido objeto de investigación por sus posibles aplicaciones terapéuticas, se ha observado que sus efectos son menos pronunciados en comparación con el germanio orgánico.

A pesar de estas diferencias, el germanio inorgánico todavía se utiliza en algunas aplicaciones industriales y tecnológicas, así como en la investigación científica. Sin embargo, su potencial terapéutico y sus posibles efectos sobre la salud humana siguen siendo objeto de estudio y debate en la comunidad científica.

2.1.1. Estudios toxicológicos

El germanio (Ge) es un oligoelemento necesario para la nutrición y la salud, y típicamente no se almacena en tejidos u órganos específicos. El germanio puede ser consumido a través del agua potable o alimentos, o administrado por inyección. El germanio es absorbido por el ácido clorhídrico o enzimas y luego transportado a tejidos y órganos a través del torrente sanguíneo para llevar a cabo su función biológica.⁵⁰

Los estudios toxicológicos sobre el germanio y sus compuestos, especialmente el sesquióxido de carboximetilgermanio, han documentado que este elemento puede ser rápidamente absorbido y eliminado por el cuerpo humano, lo que indica un perfil de bajo riesgo toxicológico. La investigación ha demostrado consistentemente que la toxicidad aguda del germanio en estas formas es extremadamente baja, tanto en humanos como en modelos animales.

En estudios detallados, no se ha informado de toxicidad aguda significativa asociada con dosis normales de sesquióxido de carboximetilgermanio en humanos. Este compuesto, conocido por sus aplicaciones potenciales en la medicina y la nutrición, ha mostrado una muy baja incidencia de efectos adversos debido a sus características químicas que favorecen una rápida eliminación del organismo sin acumulación residual significativa.

Además, en experimentos llevados a cabo en animales, incluso la administración de dosis muy altas de estos compuestos de germanio no produjo efectos adversos significativos. Un estudio clave para evaluar la toxicidad crónica del germanio involucró la administración intravenosa a perros de dosis de 125, 250

y 500 mg/kg durante un período de seis meses. Los resultados de este estudio son particularmente significativos ya que no mostraron signos de toxicidad, incluso en las dosis más altas administradas. Esta ausencia de efectos tóxicos adversos demuestra la alta tolerabilidad y seguridad del germanio cuando se administra de manera controlada y en un marco de dosis considerable.

Estos resultados sugieren que el sesquióxido de carboximetilgermanio posee un margen de seguridad amplio, lo que lo hace adecuado para explorar su uso en aplicaciones médicas más amplias.^{47,49}

En estudios enfocados en evaluar el potencial teratogénico del germanio, ratas fueron administradas dosis de hasta 1000 mg/kg/día sin reportar incidencias de teratogenicidad. Este hallazgo es crítico al considerar la aplicación del germanio en poblaciones vulnerables y durante períodos críticos como el embarazo.

La ausencia de efectos teratogénicos en dosis tan altas proporciona evidencia adicional sobre la seguridad del germanio, particularmente en lo que respecta a su potencial de causar defectos de nacimiento o anomalías de desarrollo durante la gestación.

La administración de altas dosis de germanio sin inducir efectos teratogénicos sugiere que, bajo condiciones controladas y bien reguladas, este elemento podría ser seguro para una variedad más amplia de pacientes, incluyendo aquellos en condiciones especialmente sensibles. No obstante, es crucial continuar con estudios detallados y específicos que busquen verificar estos resultados en diferentes especies y bajo diversas condiciones experimentales para comprender completamente los límites y el alcance de la seguridad del germanio.^{51,52}

2.1.2. Indicaciones terapéuticas

Cada átomo de germanio está ligado a tres átomos de oxígeno, y es un excelente transportador de oxígeno.

En los compuestos de organogermanio, los átomos de germanio se encuentran covalentemente unidos a estructuras orgánicas, formando diversos tipos de compuestos con aplicaciones significativas en la química y la biomedicina. Uno de los aspectos más importantes de estos compuestos, como el Ge-132, es su

baja toxicidad, lo que los hace adecuados para el uso en seres humanos, especialmente en el campo de la medicina.

La estructura molecular de los compuestos de organogermanio permite que el germanio se presente en una forma más estable y menos reactivo en comparación con sus estados inorgánicos. Esta estabilidad química es crucial para minimizar la toxicidad, evita que el germanio genere productos de degradación tóxicos dentro del organismo.⁵³ Consecuentemente, estos compuestos pueden ser utilizados de forma segura en aplicaciones biomédicas, incluyendo tratamientos para mejorar el sistema inmunológico y como antioxidantes y alta actividad biológica.⁵⁴

Los compuestos de organogermanio, como el Ge-132 presentan amplia gama de efectos terapéuticos potenciales. Estos efectos incluyen propiedades antioxidantes, inmunomoduladores y antiinflamatorias, lo que los hace candidatos prometedores para el tratamiento de diversas condiciones de salud.⁵⁵

Los compuestos de germanio, especialmente en su forma orgánica como el Ge-132, actúan eficazmente como eliminadores de radicales libres. Este efecto se debe principalmente a la disponibilidad de electrones en los compuestos de germanio, que pueden interactuar y neutralizar los electrones no apareados presentes en los radicales libres. Los radicales libres son especies químicas altamente reactivas que contienen electrones no apareados, lo que los convierte en agentes oxidantes potencialmente dañinos para las células y tejidos.

La capacidad de los compuestos de germanio para donar electrones y estabilizar estos radicales libres es la base de su potente actividad antioxidante. Al interactuar con los radicales libres, los compuestos neutralizan estos agentes, previniendo así el daño celular que podría derivarse del estrés oxidativo. Este proceso no solo protege a las células de daños al ADN, proteínas, y lípidos, sino que también contribuye a mantener la integridad y funcionalidad celular.

La eficacia antioxidante de los compuestos de germanio los convierte en candidatos prometedores para el desarrollo de terapias dirigidas a combatir el estrés oxidativo asociado con numerosas enfermedades.^{56,57,58}

Estudios recientes han propuesto la hipótesis de que los derivados del germanio catalizan la descomposición del peróxido de hidrógeno.⁵⁴ El germanio en trazas puede mantener el peróxido de hidrógeno a un nivel bajo, inhibiendo el estrés oxidativo. Se ha observado que el germanio es parte de los centros activos de

algunas enzimas y participa en la oxidación, principalmente con el peróxido de hidrógeno, sin producir especies reactivas de oxígeno perjudiciales.⁵⁹

Una de las funciones significativas de los compuestos de germanio, cuando se administran en dosis bajas, es su capacidad para aumentar los niveles de glutatión reducido (GSH) en las células. El glutatión es un tripéptido que juega un papel clave como antioxidante endógeno, crucial para proteger a las células contra el daño oxidativo provocado por radicales libres que se generan dentro del organismo es producido endógenamente.

El GSH es esencial para mantener un estado redox celular saludable y para la detoxificación celular. Actúa directamente neutralizando radicales libres y moléculas de oxígeno reactivo, además de regenerar otros antioxidantes, como las vitaminas C y E. Por lo tanto, el incremento de GSH a través de la administración de germanio contribuye significativamente a la capacidad celular para manejar el estrés oxidativo.

Este efecto del germanio puede ser particularmente beneficioso en condiciones de estrés oxidativo elevado, como en enfermedades crónicas, inflamación prolongada o exposición a toxinas ambientales, donde la demanda de antioxidantes es alta y los sistemas endógenos de defensa podrían estar comprometidos. Al elevar los niveles de GSH, el germanio no solo amplifica la defensa antioxidante directa, sino que también mejora la capacidad global del organismo para reparar y prevenir el daño celular asociado con los radicales libres.

Los compuestos de germanio poseen una notable capacidad para interactuar con átomos de oxígeno y jugar un papel fundamental en procesos biológicos como el enriquecimiento de oxígeno y la purificación de la sangre. Esta capacidad se asocia principalmente a la estructura química del germanio, que permite una unión eficiente con átomos de oxígeno cargados negativamente. Estos átomos de oxígeno, una vez unidos a los compuestos de germanio, pueden actuar como agentes capturadores de iones de hidrógeno cargados positivamente y de metales pesados, como el mercurio y el cadmio, que son perjudiciales para la salud humana.

El proceso de captura de iones de hidrógeno y metales pesados es crucial, no solo porque contribuye a la neutralización de estas sustancias tóxicas en la sangre, sino también porque facilita su eliminación del cuerpo. Al hacerlo, los compuestos de germanio ayudan a reducir la carga tóxica en los órganos vitales, previniendo

posibles daños a nivel celular y tisular que podrían derivar en condiciones médicas graves.

Además, el enriquecimiento de oxígeno en la sangre es otro efecto beneficioso significativo de los compuestos de germanio. Al mejorar la capacidad de la sangre para transportar oxígeno, estos compuestos pueden aumentar la eficiencia de la oxidación celular, un factor esencial para la producción de energía y la función general del cuerpo. Esta capacidad puede ser especialmente beneficiosa para mejorar el rendimiento físico y mental, así como para apoyar la recuperación y la regeneración celular en condiciones de estrés físico o enfermedad.⁶⁰

Dado que el compuesto de germanio se une y descarga iones de hidrógeno (H^+), libera el suministro de oxígeno existente del cuerpo, y por lo tanto enriquece de manera efectiva el suministro de oxígeno del cuerpo. El Germanio 132 facilita el movimiento del oxígeno a través de las membranas celulares a fin de introducir el oxígeno en la célula.

La actividad catalizadora de oxígeno de germanio-132 es debida a que activa la producción de eritrocitos, consiguiendo un mayor transporte de oxígeno a las células, mejora la funcionalidad celular.⁶¹

La incorporación de suplementos de Ge-132 ha demostrado ser eficaz en mejorar el proceso de maduración citoplásmica de ovocitos porcinos. Este avance se logra a través de una regulación positiva de genes vinculados con la oxidación y una regulación negativa de genes asociados a la apoptosis. Este beneficioso efecto en la regulación génica sugiere que el Ge-132 puede influir positivamente en la calidad y viabilidad de los ovocitos, lo cual es fundamental para la reproducción exitosa y el desarrollo embriológico saludable.⁶²

El Ge-132 ha demostrado poseer propiedades protectoras contra la hipoxia tisular, regulando la circulación periférica y fortaleciendo los tejidos cutáneos y musculares, lo cual resulta en una mayor elasticidad. Este compuesto podría desempeñar un papel efectivo en la curación de heridas dérmicas, ofreciendo beneficios significativos para la salud de la piel y la capacidad de recuperación del organismo.

Un reciente estudio investigó el efecto del compuesto orgánico de germanio (Ge-132) en lesiones cutáneas experimentales tanto en ratas como en células de fibroblastos dérmicos humanos. Los resultados revelaron que el Ge-132 no solo

redujo significativamente el área de la herida y disminuyó el edema, sino que también promovió la proliferación de fibroblastos y la formación de fibras de colágeno en el área afectada.

Además, se observó que el Ge-132 indujo la necrosis, la infiltración de neutrófilos y macrófagos en la lesión cutánea experimental en ratas, lo que sugiere una respuesta inmunológica activada y una limpieza eficiente del área dañada. Estos hallazgos respaldan la capacidad del Ge-132 para favorecer un proceso de curación más efectivo y completo en heridas dérmicas, promoviendo la regeneración tisular y la restauración de la integridad de la piel de forma más rápida y eficiente.⁶³

Debido a su capacidad como catalizador de oxígeno, el Ge-132 posee atributos terapéuticos que abarcan desde ser inmunoestimulante hasta estimular la producción de interferones, y activar tanto a las células Natural Killer como a los macrófagos. Este amplio espectro de funciones inmunitarias lo convierte en un agente prometedor para fortalecer la respuesta del sistema inmunológico del cuerpo contra agentes patógenos y enfermedades. El Ge-132 actúa como un catalizador dinámico en el proceso de oxigenación de las células, lo que puede desempeñar un papel crucial en el fortalecimiento de las defensas naturales del organismo. Al estimular la producción de interferones, el Ge-132 contribuye a la activación de respuestas antivirales y antitumorales, lo que es fundamental en la defensa contra agentes infecciosos y células anómalas.

Además, la capacidad del Ge-132 para activar las células Natural Killer y los macrófagos potencia la respuesta inmunitaria innata del cuerpo, facilitando la identificación y eliminación eficiente de células infectadas o anómalas. Estos efectos combinados pueden ayudar a mejorar la capacidad del sistema inmunológico para combatir diversos tipos de enfermedades y mantener un equilibrio óptimo en la respuesta inmune.²²

En el campo de la investigación científica, un paso significativo se alcanzó en 2010 cuando un grupo de científicos coreanos logró obtener experimentalmente la versión soluble en agua de Germanio-132. Este logro representó un avance notable en la síntesis y aplicación de compuestos de germanio, abriendo nuevas posibilidades en términos de biodisponibilidad y potenciales aplicaciones médicas y terapéuticas. La capacidad de disolver el Germanio-132 en agua permitió

explorar de manera más efectiva sus propiedades y beneficios, allanando el camino para investigaciones más detalladas sobre sus efectos fisiológicos y mecanismos de acción. Este importante desarrollo no solo resaltó el continuo progreso en la investigación científica, sino que también subrayó el creciente interés en el uso de compuestos de germanio en el contexto de la salud y la medicina.⁶⁴

La investigación adicional demostró que, en su forma líquida, el cuerpo humano absorbe el Germanio-132 de manera más eficiente, lo que potencia sus efectos terapéuticos. Esta mayor biodisponibilidad permite una absorción óptima en el organismo y una eliminación más rápida, lo que maximiza su eficacia en la inducción de sus diversos beneficios. Además, se encontró que el Germanio-132 es insoluble en la mayoría de los disolventes orgánicos, con la notable excepción del agua con un pH fisiológico de 7,4. Esta solubilidad en agua a un pH específico resalta su compatibilidad con el entorno biológico humano, lo que facilita su uso en aplicaciones médicas y terapéuticas. Asimismo, cuando se disuelve en agua destilada, el Germanio-132 conserva su pureza, asegurando que sus propiedades terapéuticas se mantengan intactas, lo que subraya su potencial como un agente efectivo y confiable en diversas áreas de la salud y la medicina.

El compuesto de germanio orgánico soluble en agua (Ge-132) destaca por sus propiedades relacionadas con respuestas inmunitarias e inducción antioxidante. Se ha demostrado que Ge-132 aumenta de manera significativa la concentración plasmática de alfa-tocoferol (α -tocoferol), un importante antioxidante. Además, presenta una sólida actividad antioxidante, contribuyendo al aumento de la proteína de transferencia de α -tocoferol. Esta capacidad antioxidante del Ge-132 es fundamental para contrarrestar el estrés oxidativo y proteger las células de posibles daños.

Por otra parte, se ha observado que el Ge-132 tiene efectos en la activación inmunitaria, vinculados con la producción de ATP, el metabolismo lipídico y la apoptosis. Estos hallazgos sugieren que el Ge-132 podría modular el sistema inmunológico al tiempo que influye en procesos celulares clave, como la generación de energía a través del ATP, el metabolismo de lípidos y la regulación de la apoptosis. Esta interacción multifacética con diversos procesos biológicos destaca el potencial terapéutico del Ge-132 en la mejora de la respuesta inmunitaria y la promoción de la salud celular.⁴⁵

En los estudios preclínicos realizados en modelos animales, se ha observado que el Ge-132 presenta un notable potencial en la inhibición del desarrollo tumoral. Estos hallazgos científicos han despertado un considerable interés en la comunidad científica, ya que sugieren que el Ge-132 podría desempeñar un papel importante en la prevención y tratamiento del cáncer. La capacidad del Ge-132 para inhibir eficazmente tanto los tumores alogénicos como los singénicos en ratones representa un avance significativo en la investigación oncológica. Este compuesto orgánico de germanio ha demostrado su prometedora actividad antitumoral al demostrar una supresión efectiva del crecimiento tumoral en modelos experimentales. Estos resultados alentadores respaldan la posibilidad de que el Ge-132 pueda ser utilizado como una herramienta terapéutica potencial en la lucha contra el cáncer.

La precisa inhibición del desarrollo tumoral observada en estos estudios ofrece nuevas perspectivas en la búsqueda de tratamientos contra el cáncer. Esta capacidad del Ge-132 de interferir con el crecimiento y la propagación de tumores sugiere posibles mecanismos de acción específicos que podrían explorarse más a fondo en investigaciones futuras.

Además, la eficacia demostrada en modelos animales establece una base sólida para investigaciones clínicas adicionales que puedan validar aún más el potencial terapéutico del Ge-132 en pacientes humanos con diversas formas de cáncer.²⁸

Varios estudios clínicos realizados de forma independiente han revelado que el Ge-132 ha demostrado su capacidad para inhibir el crecimiento de diversos tipos de tumores. Entre los tumores afectados se incluyen el Walker 256, el Ehrlich Ascites, el BC47, el Lewis Lung y el Carcinoma IMC. Además de la inhibición del crecimiento tumoral, se ha observado que el Ge-132 ha logrado extender significativamente el tiempo de supervivencia en modelos experimentales, lo que resalta su potencial como un agente terapéutico efectivo en la lucha contra el cáncer.^{65 66}

La actividad antitumoral del ge-132 parece estar mediada por el estímulo de diversos componentes del sistema inmune. Los mecanismos de acción de Ge-132 incluyen la inducción de interferón (IFN), la activación de macrófagos, células supresoras T, el aumento de la actividad de las células asesinas naturales (NK) y la restauración de la respuesta inmunitaria deteriorada. Normaliza la producción de

anticuerpos en casos de hipersensibilidad. De esta manera, el germanio-132 posee un efecto inmunoregulador. Regula el sistema inmunitario en caso de enfermedad autoinmune, como la artritis, y lo potencia en caso de inmunodeficiencia, como en los tratamientos de quimioterapia y radioterapia.^{22,46,47,48,66}

Los resultados de ensayos clínicos en humanos por vía oral han demostrado que el Ge-132 mejora significativamente el funcionamiento del interferón y la actividad de las células asesinas naturales (NK). Además, se ha observado que el Ge-132 contribuye a la recuperación de la reacción inmune en general, lo que sugiere un efecto positivo en la respuesta inmunológica del organismo. Un hallazgo clave de estos estudios es que el Ge-132 exhibe baja toxicidad, lo que lo convierte en una opción terapéutica prometedora para mejorar la función inmunológica sin presentar efectos adversos significativos.^{47,67,68}

Los efectos anticipados derivados del uso de Ge-132 en combinación con otras terapias de inmunoterapia incluyen la supresión del crecimiento tumoral, la disminución de la diseminación de las metástasis y la capacidad de aumentar la esperanza de vida de los pacientes afectados. Asimismo, se ha observado que Ge-132 contribuye a la recuperación de la pérdida de peso ocasionada por los tratamientos de quimioterapia, lo que sugiere su potencial para mitigar los efectos secundarios asociados a estos tratamientos y mejorar la calidad de vida de los pacientes en proceso de tratamiento oncológico.⁶⁹

En pacientes, se ha observado que el Ge-132 ejerce una influencia positiva en la eficacia de la analgesia cuando se administra en combinación con la morfina, tanto por vía oral como a través de inyección intraperitoneal. Este hallazgo sugiere que la interacción entre el Ge-132 y la morfina puede resultar en una mayor potenciación de los efectos analgésicos, lo que podría traducirse en un alivio del dolor más efectivo para los pacientes.³⁸

Los estudios revelaron un aumento significativo en la actividad de las células T asesinas, y la activación de macrófagos en ratones después de la administración oral de Ge-132, que conduce a marcado efecto antiviral del fármaco (objetos estudios fueron varios virus diferentes, incluyendo varias cepas de virus de la gripe). En este caso, efecto depresivo directo de germanio en la actividad vital del virus no se ha encontrado, todos los efectos estaban mediados por la amplificación de la respuesta inmune.⁷⁰

El estudio realizado en patas de ratas que investigó la actividad antiinflamatoria del Ge-132 es sumamente revelador. Se encontró que este compuesto no solo demostró efectos antiinflamatorios, sino que también se identificó una posible relación con la inhibición de la liberación de ácido araquidónico y la producción de PGE2 en células RBL 2H3. Estos hallazgos sugieren un mecanismo de acción preciso, mediante el cual el Ge-132 podría modular las vías inflamatorias y contribuir a la reducción de la respuesta inflamatoria. La inhibición de la liberación de ácido araquidónico, un precursor clave en la cascada de la inflamación, y la reducción de la producción de PGE2, un mediador proinflamatorio, apuntan a la capacidad potencial del Ge-132 para atenuar la inflamación y sus efectos nocivos en el organismo.⁷¹

Según el estudio, el uso de la sal de sodio del germanio-132 aumenta la concentración de glóbulos rojos, lo que permite atribuir compuestos de germanio a estimulantes biológicos.⁷²

Se ha informado que los compuestos orgánicos de germanio tienen un efecto inhibitorio sobre la amiloidosis que significa que el germanio puede desempeñar un papel en prevenir o reducir la formación de estos depósitos de proteínas anormales, lo que podría ser beneficioso para enfermedades relacionadas con la acumulación de amiloides, la amiloidosis cardíaca o la amiloidosis renal.⁷³

La cooperación de las citoquinas y los macrófagos en la expresión de la actividad antitumoral del sesquióxido de carboxietilgermanio (Ge-132) es un tema relevante en el ámbito de la investigación anticancerígena. Se ha demostrado que la interacción entre las citoquinas, como las lymphokines, y los macrófagos juega un papel crucial en la activación de la respuesta antitumoral del Ge-132. Este compuesto ha mostrado efectos prometedores en la inhibición del crecimiento tumoral y en la potenciación de la respuesta inmunitaria contra las células cancerosas. La sinergia entre las citoquinas y los macrófagos en la expresión de la actividad antitumoral del Ge-132 resalta su potencial como agente terapéutico en la lucha contra el cáncer.⁴⁸

Se ha planteado la hipótesis de que la deficiencia de germanio podría estar asociada con la enfermedad de Kashin-Beck.

La enfermedad ósea de Kashin-Beck (KBD) es una afección osteoarticular crónica y endémica que afecta principalmente a niños y adolescentes en áreas

geográficas específicas, como China, Corea y Rusia. Se caracteriza por deformidades y cambios degenerativos en las articulaciones y los huesos, lo que puede llevar a discapacidad física y limitación funcional.

Esta enfermedad se caracteriza por una alteración del desarrollo del cartílago articular y óseo, lo que resulta en una osteoartropatía secundaria. En este contexto, los condrocitos, células especializadas en el cartílago, experimentan necrosis, lo que conlleva a la pérdida de sus funciones para sintetizar colágeno y proteoglicanos, componentes esenciales para la estructura y función del cartílago. Esta interrupción en la capacidad de los condrocitos para sintetizar estos elementos clave contribuye al deterioro del cartílago y los tejidos óseos, lo que puede verse reflejado en trastornos como la enfermedad de Kashin-Beck.⁷⁴

Se ha observado que los niños afectados por KBD tienen niveles elevados de peróxidos lipídicos en su organismo. Los peróxidos lipídicos son compuestos químicos derivados de los lípidos que pueden causar estrés oxidativo en las células y contribuir al desarrollo de diversas enfermedades, incluidas las enfermedades óseas.

Sin embargo, se ha encontrado que los niveles de peróxidos lipídicos se mejoran en niños con KBD mediante intervenciones específicas. Estas intervenciones suelen incluir tratamientos que abordan tanto los aspectos médicos como los nutricionales de la enfermedad. Por ejemplo, la administración de suplementos antioxidantes, puede ayudar a reducir los niveles de peróxidos lipídicos al neutralizar los radicales libres y prevenir el daño oxidativo en el cuerpo. Dado que los niveles de peróxidos lipídicos se mejoran en niños con KBD,⁷⁵ se puede plantear la hipótesis de que un bajo contenido de Ge de tejido puede agravar aún más el daño causado por los radicales libres de oxígeno.³⁶

2.3. EL GERMANIO Y SU INFLUENCIA EN LA REGENERACIÓN ÓSEA EN LA OSTEOPOROSIS

El germanio ha sido objeto de estudios e investigaciones a lo largo de más de una década, tanto en ensayos clínicos como en su uso en consultorios privados, lo que ha arrojado resultados prometedores sobre su eficacia en el tratamiento de diversas afecciones graves. Entre las áreas en las que se ha demostrado su eficacia

se incluyen el tratamiento del cáncer, la artritis y la osteoporosis senil. Estos hallazgos respaldan la creciente percepción de que el germanio posee propiedades terapéuticas significativas y puede ser una opción valiosa en el campo de la medicina para abordar estas patologías.⁵⁶

Los estudios en humanos y animales han sugerido que el Ge-132, una forma de germanio orgánico, podría desempeñar un papel importante en la prevención y el tratamiento de la osteoporosis. Estas investigaciones han arrojado resultados prometedores que apuntan a las potenciales propiedades beneficiosas del Ge-132 en la salud ósea.

La osteoporosis es una enfermedad metabólica generalizada caracterizada por la disminución progresiva de masa y la resistencia ósea. La reducción de la resistencia ósea es un fenómeno que ocurre como consecuencia de la pérdida de tejido óseo en el cuerpo humano. El hueso es un tejido vivo y dinámico que está constantemente siendo remodelado mediante un proceso conocido como remodelación ósea, el cual implica la eliminación de hueso viejo o dañado y la formación de hueso nuevo. Este proceso está regulado por células especializadas llamadas osteoblastos, que forman nuevo tejido óseo, y osteoclastos, que lo degradan. Cuando hay una pérdida neta de tejido óseo debido a una tasa de degradación mayor que la tasa de formación, la densidad ósea disminuye y la resistencia del hueso se ve comprometida. Esto puede deberse a una variedad de factores, como el envejecimiento, la falta de ejercicio, deficiencias nutricionales, desequilibrios hormonales, enfermedades crónicas o el uso prolongado de ciertos medicamentos.⁷⁶

La reducción de la resistencia ósea puede aumentar significativamente el riesgo de fracturas y otros problemas de salud ósea, como la osteoporosis. Esta condición médica, caracterizada por una disminución de la densidad y la calidad del hueso, hace que los huesos se vuelvan más frágiles y susceptibles a las fracturas, incluso con mínimos traumas o caídas. Las fracturas óseas pueden tener consecuencias graves, especialmente en personas de edad avanzada. En esta población, las fracturas, como las de cadera, pueden ser particularmente peligrosas, ya que no solo pueden causar dolor intenso y la necesidad de cirugía, sino que también pueden llevar a discapacidad prolongada. La recuperación a menudo

implica largos periodos de rehabilitación y, en muchos casos, los pacientes no recuperan completamente su nivel previo de actividad y movilidad.⁷⁷

Recientemente, ha habido un creciente reconocimiento sobre la participación del sistema inmune en la patogénesis de la osteoporosis, lo cual ha precipitado la aparición y expansión del campo de la osteoinmunología. Este campo interdisciplinario de estudio examina las interacciones entre los sistemas óseo e inmune, explorando cómo las células y las moléculas del sistema inmune influyen en la salud y la enfermedad ósea.⁷⁸

La osteoporosis, tradicionalmente considerada como una enfermedad metabólica del hueso, ahora se entiende mejor a través del lente de la osteoinmunología. Se ha descubierto que las células inmunitarias, como los linfocitos T y B, juegan roles cruciales en el equilibrio entre la formación y la reabsorción ósea. Las citocinas y otros mediadores inflamatorios liberados por estas células pueden influir en la actividad tanto de los osteoclastos (células que resorben el hueso) como de los osteoblastos (células que forman el hueso), alterando este equilibrio.⁷⁹

Por ejemplo, la producción de la citocina RANKL por parte de los linfocitos T activa a los osteoclastos, promoviendo la resorción ósea. En condiciones inflamatorias crónicas, que suelen acompañar a enfermedades autoinmunes y otras disfunciones del sistema inmune, hay un aumento sostenido en estos mediadores inflamatorios, lo que puede acelerar la pérdida ósea y contribuir significativamente al desarrollo de osteoporosis.⁸⁰

El campo de la osteoinmunología también ha hecho avances en comprender cómo las terapias inmunomoduladoras, usadas comúnmente en enfermedades autoinmunes, pueden impactar la salud ósea. Por ejemplo, ciertos medicamentos que suprimen el sistema inmune pueden reducir la inflamación y la actividad de los osteoclastos, ofreciendo beneficios secundarios para la densidad ósea.⁸¹

La integración de la inmunología con la biología ósea no solo amplía nuestra comprensión fundamental de las enfermedades óseas, sino que también abre nuevas vías para intervenciones terapéuticas. Por ejemplo, el desarrollo de fármacos que modulen específicamente la acción de citocinas o células inmunes implicadas en la resorción ósea podría ofrecer nuevos tratamientos efectivos contra la osteoporosis.⁸²

Se postula que el sistema inmune desempeña un papel crucial en la etiología de la enfermedad ósea, impactando significativamente en el equilibrio de la actividad entre los osteoblastos y los osteoclastos. Los osteoblastos son células encargadas de la formación de nuevo tejido óseo, mientras que los osteoclastos son responsables de la resorción o descomposición del hueso viejo. En condiciones normales, existe un delicado equilibrio entre estas dos funciones, lo que asegura el mantenimiento estructural y funcional del esqueleto. Sin embargo, diversas alteraciones en el sistema inmune pueden desequilibrar esta relación. Por ejemplo, en enfermedades autoinmunes como la artritis reumatoide, el sistema inmune ataca las propias células del cuerpo, incluyendo aquellas del hueso y de las articulaciones. Esto provoca un aumento en la actividad de los osteoclastos, lo que lleva a una resorción excesiva del hueso y, consecuentemente, a su debilitamiento.

Además, la inflamación crónica, mediada por la proliferación de citoquinas proinflamatorias como el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) y la interleucina-6 (IL-6), puede inhibir la actividad de los osteoblastos y a la vez estimular la acción de los osteoclastos. Esta situación no solo contribuye a la pérdida ósea, sino que también puede derivar en enfermedades como la osteoporosis, caracterizada por huesos frágiles y propensos a fracturas.⁸³

Los experimentos realizados en animales han revelado que el compuesto de germanio, específicamente el Ge-132, tiene la capacidad de incrementar la actividad de los osteoblastos. Este hallazgo es de gran importancia, ya que los osteoblastos son células fundamentales en la formación y regeneración del tejido óseo. El aumento de la actividad de estos osteoblastos sugiere que el germanio podría desempeñar un papel crucial en el proceso de mantenimiento y fortalecimiento de la densidad ósea, lo que respalda aún más su potencial utilidad en el tratamiento y la prevención de condiciones como la osteoporosis.^{84,85}

Ge-132 también se puede utilizar para prevenir la osteoporosis senil, ya que el mayor aporte de oxígeno a las células aumenta la producción de la calcitonina, que es la encargada de la concentración sérica del calcio y estimula la mineralización ósea, y disminuye los niveles de hormona paratiroidea (PTH), evitando el decrecimiento de la masa ósea. Así mismo, se ha probado que el germanio puede sustituir al silicio en la formación de los huesos y en el metabolismo de los minerales. También que previene la debilitación ósea y la

disminución del índice del hueso cortical y la masa mineral del hueso, producidos por la osteoporosis. En este mismo sentido, se demostró que afecta directamente la secreción o actividad de la calcitonina y la hormona paratiroidea.⁸⁶

2.4. INFLUENCIA DEL GERMANIO EN LA SALUD DENTAL

El germanio, un elemento traza que se encuentra en diversas formas en la naturaleza, ha demostrado tener efectos beneficiosos en el cuerpo humano, especialmente en la cavidad bucal. Investigaciones recientes han revelado que la concentración de germanio en el cabello puede estar significativamente asociada con condiciones periodontales. En un estudio con 109 participantes, se encontró que niveles elevados de germanio en el cabello estaban positivamente relacionados con la presencia de periodontitis, lo que sugiere un papel potencial del germanio en la salud periodontal. Este efecto positivo podría atribuirse a la capacidad del germanio para influir en el metabolismo celular y promover la regeneración de tejidos.

El estudio investigó la relación entre los niveles de elementos traza en el cabello y la periodontitis en 109 participantes, de los cuales 25 tenían periodontitis y 84 no. Se evaluaron las condiciones periodontales mediante la pérdida de inserción clínica y la profundidad de las bolsas en todos los dientes. Las muestras de cabello fueron analizadas mediante espectrometría de masas. Los resultados mostraron que niveles elevados de germanio en el cabello estaban significativamente asociados con la periodontitis (OR 7.12; IC 95% 2.03-25.00), mientras que niveles altos de estaño estaban negativamente asociados (OR 0.27; IC 95% 0.08-0.94). Estos hallazgos indican una relación significativa entre la periodontitis y las concentraciones de germanio y estaño en el cabello.⁸⁷

Además, el germanio ha mostrado propiedades beneficiosas en la mejora de la recuperación de lesiones mucosas en la cavidad bucal, aliviando síntomas de afecciones como el síndrome de "boca seca".

En un estudio clínico que incluyó a 44 pacientes con edades entre 61 y 82 años, se observó el tratamiento de la estomatitis protésica traumática en individuos que sufrían el síndrome de "boca seca" debido a sialoadenopatías

provocadas por radiación y/o medicamentos, desarrolladas tras el tratamiento combinado de neoplasias malignas en los órganos de la zona orofaríngea. Se comparó la eficacia de un nuevo medicamento basado en un complejo de germanio orgánico quelado con guanina, junto con alginato de sodio y xilitol (grupo principal de estudio), con un medicamento previamente utilizado (grupo de control) para la terapia local de lesiones traumáticas de la mucosa oral. Los resultados mostraron que, al noveno día de tratamiento, el grupo tratado con el medicamento que contenía germanio demostró una eficacia significativamente superior (95.0%) en comparación con el grupo de control (80.8%). Estos hallazgos destacan el potencial positivo del germanio en la cavidad bucal, sugiriendo que su uso en tratamientos locales puede mejorar notablemente la recuperación de las lesiones mucosas y aliviar los síntomas del síndrome de "boca seca".⁸⁸

El uso de productos dentales que contienen germanio, como ciertos geles y pastas dentales, ha demostrado ser eficaz en la reducción de la hipersensibilidad dentinaria y la promoción de la salud oral. Estos hallazgos subrayan la importancia del germanio como un componente potencialmente útil en el tratamiento y la prevención de enfermedades bucales, mejorando la calidad de vida de los pacientes con trastornos orales y periodontales.

En un estudio reciente, se evaluó la adición de germanio a una pasta dental y se observó que esta modificación tiene un efecto notable en la reducción de la hipersensibilidad dentinaria. El estudio demostró que la pasta dental enriquecida con un Complejo de Germanio Polioliol que contiene treonina no solo es efectiva para mantener una buena higiene oral, sino que también reduce significativamente la sensibilidad dentinaria. Los resultados mostraron una disminución progresiva en las puntuaciones de sensibilidad dental a lo largo del tratamiento, sugiriendo que la incorporación de germanio en la formulación de la pasta dental contribuye de manera eficaz a la mejora de la calidad de vida de los pacientes afectados por hipersensibilidad dentinaria.⁸⁹

**CAPÍTULO III –
CARACTERÍSTICAS
REMODELACIÓN ÓSEA**

III. CARACTERÍSTICAS REMODELACIÓN ÓSEA

3.1. ATROFIA ÓSEA EN MAXILIARES: CAUSA Y CONSECUENCIAS

Actualmente existe una demanda en buscar soluciones para los tratamientos centrados en injertos óseos por las atrofia de los huesos maxilares.

Es debido al envejecimiento progresivo de la población mundial conjuntamente con las lesiones en el tejido óseo causadas por trauma o enfermedades y el proceso fisiológico que se produce tras la pérdida de los dientes.

Esto va acompañado con cambios significativos que ocurren en el hueso alveolar, lo que lleva a la reabsorción fisiológica del reborde alveolar, disminución del volumen óseo tanto vertical como horizontal. Los cambios más significativos ocurren dentro de los primeros tres meses siendo 2/3 de la atrofia ósea y continua con el tiempo, durante el primer año un 50% de la pérdida de volumen.^{90,91}

La atrofia del tejido óseo se produce como resultado de una disminución de la carga, si las raíces de los dientes están ausentes, las células del hueso no reciben la presión adecuada y dejan de recibir estímulos mecánicos necesarios para su mantenimiento. Esto se debe a que los estímulos mecánicos son cruciales para el equilibrio del recambio óseo, ya que promueven la actividad de los osteoblastos y osteoclastos, facilitando la construcción y resorción del hueso, respectivamente.⁹²

Sin estos estímulos, se produce un desequilibrio en el recambio óseo, resultando en una mayor resorción ósea y una disminución en la formación de hueso nuevo, lo cual puede llevar a una atrofia progresiva del tejido óseo.⁹³

Este fenómeno es especialmente relevante en el contexto de la pérdida dental, donde la ausencia de raíces dentales elimina las cargas habituales que el hueso alveolar experimenta, aumentando así la resorción ósea. Es, por tanto, esencial considerar estrategias terapéuticas que reemplacen estos estímulos mecánicos en pacientes con edentulismo para prevenir la atrofia del tejido óseo.

El hueso es un tejido dinámico que se vuelve más duradero en aquellas áreas que están sometidas a un alto estrés mecánico, y cuando no hay carga, se debilita.

En presencia de todos los dientes, proporcionan transferencia de carga al hueso y estimulan el proceso de adaptación.⁹⁴

La pérdida de dientes conlleva la disminución de la estimulación que los dientes proporcionan al hueso circundante a través de la masticación y la oclusión. Esta estimulación es crucial para mantener la salud ósea, ya que activa los osteoblastos, células responsables de la formación de nuevo hueso. Cuando se pierden los dientes, esta estimulación disminuye significativamente, lo que resulta en un proceso gradual de reabsorción ósea. Sin la presión y la carga adecuadas ejercidas sobre el hueso al masticar y ocluir, los osteoclastos, células encargadas de la absorción y remodelación del hueso, superan a los osteoblastos, lo que lleva a una pérdida neta de tejido óseo.⁹⁵

La atrofia es una consecuencia inevitable de la pérdida dentaria y otras causas: enfermedades inflamatorias de la cavidad oral, periodontitis, quistes maxilares, granulomas y otros tumores, lesiones de la mandíbula, enfermedades hereditarias, y cambios relacionados con la edad.⁹⁶

Como consecuencias de la atrofia del tejido óseo hay un cambio en las características estéticas de la cara, incluido el envejecimiento prematuro, la aparición de arrugas, deterioro de la función masticatoria y como consecuencia el desarrollo de enfermedades del tracto gastrointestinal, defectos en el habla, desplazamiento de los dientes adyacentes y antagonistas.

La atrofia del tejido óseo conlleva importantes implicaciones clínicas, siendo una de las más significativas la imposibilidad o dificultad para la colocación exitosa de implantes dentales. Los implantes dentales es una opción efectiva para reemplazar dientes perdidos, ya que sustituyen la raíz del diente natural y proporcionan una base sólida para soportar una corona o prótesis dental.

En casos de atrofia severa, la falta de volumen óseo puede llevar a la necesidad de realizar procedimientos de aumento óseo, como injertos de hueso o técnicas de regeneración ósea, para crear un lecho óseo adecuado para el implante dental. Estos procedimientos añaden complejidad, tiempo y costos adicionales al tratamiento de implantes dentales.

Además de las muchas ventajas funcionales y estéticas de las restauraciones basadas en implantes que han mejorado la calidad de vida de muchos pacientes

también proporcionan la transferencia de la presión masticatoria al hueso y así aseguran la preservación del tejido óseo.^{97 98}

3.1.1. Importancia de la Posición y Cantidad de Hueso en Implantes Dentales

Al principio, el mayor reto de la odontología de implantes se centraba principalmente en la colocación quirúrgica de implantes dentales y su osteointegración. Sin embargo, pronto se reconoció la importancia de insertar los implantes dentales intraóseos en la posición óptima tridimensional para garantizar el éxito a largo plazo de la restauración dental.⁹⁹

La posición exacta del implante dental no solo afecta la estabilidad inicial y la osteointegración, sino que también influye en la estética, la función masticatoria y la salud de los tejidos peri-implantarios a largo plazo. La adecuada planificación de la posición tridimensional del implante, considerando factores como la cantidad y calidad del hueso disponible, la estética facial y dental, así como la oclusión, es fundamental para lograr resultados predecibles y satisfactorios en la terapia con implantes dentales.¹⁰⁰

Esta evolución en la comprensión de la importancia de la posición adecuada de los implantes ha llevado a un enfoque más integral y personalizado en la planificación y colocación de implantes dentales en la odontología contemporánea

En las últimas décadas, ha quedado claro que el éxito de la implantología y la supervivencia de los implantes dentales depende de tres factores.

PRIMERO: la colocación tridimensional correcta del implante, para su posterior rehabilitación.

La posición tridimensional de un implante dental se refiere a su ubicación en el espacio en términos de tres dimensiones: longitud (mesiodistal), anchura (vestibulolingual) y profundidad (coronal-apical). Lograr una posición precisa es crucial para el éxito del tratamiento dental con implantes. Aquí hay algunos aspectos clave:

- Longitud (Mesiodistal): Se refiere a la posición del implante a lo largo del eje horizontal de los dientes. Debe estar ubicado de manera que permita una correcta función masticatoria y estabilidad.

- Anchura (Vestibulolingual): Representa la posición del implante en el plano horizontal, es decir, su distancia desde la superficie exterior de la mandíbula o maxilar. La colocación adecuada evita la interferencia con estructuras adyacentes y asegura un soporte adecuado para las restauraciones dentales.
- Profundidad (Coronal-Apical): Indica la posición del implante a lo largo del eje vertical. Un implante correctamente posicionado en profundidad garantiza una adecuada estabilidad primaria y permite la carga funcional adecuada durante la oclusión.

Para lograr una posición tridimensional precisa, los profesionales de la odontología utilizan tecnologías avanzadas como la tomografía computarizada de haz cónico (CBCT) y la planificación virtual. Estas herramientas permiten una visualización detallada de la anatomía oral, lo que facilita la planificación precisa de la posición del implante antes de la cirugía. Además, el uso de guías quirúrgicas puede ayudar a transferir la planificación virtual al paciente durante la cirugía real, mejorando la precisión y reduciendo los riesgos.

La precisión en la posición tridimensional del implante dental es esencial para lograr una integración ósea exitosa (osteointegración) y un resultado estético y funcional satisfactorio en la rehabilitación oral del paciente, evitar o disminuir a medida de lo posible la pérdida ósea marginal, la mucositis y la periimplantitis. La colaboración entre el cirujano oral, el paciente, el implantólogo y el técnico dental es fundamental en este proceso.¹⁰¹

SEGUNDO: La importancia del suficiente tejido óseo en la colocación de implantes dentales es un factor crítico que influye directamente en el éxito a corto y largo plazo de estos procedimientos odontológicos. El tejido óseo circundante juega un papel fundamental en la estabilidad, la integración y la funcionalidad de los implantes dentales, impactando tanto la salud bucal como la calidad de vida del paciente.

La estabilidad inicial o también llamada estabilidad primaria o mecánica del implante es esencial para asegurar una correcta osteointegración, un proceso mediante el cual el implante se une estructural y funcionalmente con el hueso

circundante. Un volumen adecuado de tejido óseo proporciona un lecho sólido para el implante, facilitando el anclaje inicial y la posterior integración, también llamada estabilidad secundaria, lo que contribuye a la resistencia y durabilidad del tratamiento a largo plazo.¹⁰²

Además, el suficiente tejido óseo asegura un soporte adecuado para las cargas masticatorias. Durante la función normal, los implantes dentales están sometidos a fuerzas significativas durante la masticación. Un hueso insuficiente en anchura y/o en altura podría resultar en una distribución desigual de estas fuerzas, lo que podría generar estrés excesivo en el implante y sus estructuras circundantes, comprometiendo la estabilidad a largo plazo.¹⁰³

La falta de tejido óseo también puede afectar la estética dental. En áreas visibles, la insuficiencia de hueso puede dar lugar a recesiones de encías, comprometiendo la apariencia estética de las restauraciones dentales y afectando la sonrisa del paciente.

Cuando se enfrenta a la deficiencia de tejido óseo, los profesionales de la odontología pueden recurrir a técnicas avanzadas de regeneración ósea, como los injertos óseos, la elevación del seno maxilar o la distracción osteogénica. Estas intervenciones buscan mejorar la cantidad y calidad del hueso disponible para la colocación de implantes, abriendo oportunidades para restauraciones dentales exitosas y duraderas.

En resumen, la importancia de contar con suficiente tejido óseo para la colocación de implantes dentales no solo radica en la estabilidad y la funcionalidad, sino que también afecta la estética y la calidad de vida del paciente. La evaluación cuidadosa del volumen óseo y la aplicación de enfoques adecuados son esenciales para garantizar resultados óptimos en los procedimientos de implantología dental.

Se considera que un espesor mínimo de 1.5 a 2 milímetros de hueso alrededor del implante es necesario para garantizar la estabilidad y prevenir complicaciones. Se necesita al menos 2 mm de tabla ósea vestibular y 1 mm por la pared lingual o palatina.¹⁰⁴

Para que el margen gingival no presente cambios es necesario que la tabla ósea vestibular alrededor del implante tenga un diámetro ≥ 2 mm de grosor en toda su extensión, especialmente en la zona del hombro que es considerada como la zona crítica. La existencia de una cortical vestibular gruesa garantiza el mantenimiento

del perfil de emergencia gracias a la estabilidad de tejidos blandos alrededor del mismo.¹⁰⁵

En la mayoría de los casos, la anchura de la tabla vestibular, la parte del hueso que se encuentra en la parte frontal de los dientes superiores, suele ser insuficiente. Según la literatura especializada, el espesor promedio de esta tabla ósea vestibular en los dientes anteriores superiores es de aproximadamente 0.77 mm. Esta falta de anchura puede plantear desafíos significativos durante los procedimientos dentales, especialmente en la colocación de implantes dentales o la realización de injertos óseos para mejorar la estructura ósea en esa área. La comprensión de esta limitación anatómica es crucial para los profesionales de la odontología, ya que les permite planificar y ejecutar tratamientos de manera más efectiva y segura, minimizando así el riesgo de complicaciones y maximizando los resultados estéticos y funcionales para los pacientes.¹⁰⁶

TERCERO: la presencia de suficiente tejido blando queratinizado peri-implantario.

Este tipo de tejido, conocido también como mucosa queratinizada, desempeña un papel fundamental en la higiene oral y el cuidado apropiado del implante. Su presencia se considera esencial para promover la salud bucal y la estabilidad a largo plazo de los implantes.

La presencia de suficiente tejido blando queratinizado peri-implantario es un aspecto esencial en la planificación y colocación de implantes dentales. Este tejido, se refiere a la capa de tejido que rodea el implante y se caracteriza por su grosor y la presencia de queratina, lo que le confiere una mayor resistencia y protección. La mucosa queratinizada proporciona una barrera física y biológica que asegura la integridad del tejido peri-implantario y contribuye a la prevención de complicaciones como la inflamación peri-implantaria.¹⁰⁷

3.1.2. Importancia del tejido blando en el éxito de los implantes dentales

A continuación, se exploran algunos aspectos clave relacionados con la importancia del tejido blando queratinizado peri-implantario:

Protección del implante: el tejido queratinizado actúa como una barrera protectora alrededor del implante dental. Proporciona una capa adicional de

resistencia contra las fuerzas masticatorias y previene la exposición del cuello del implante, lo que puede reducir el riesgo de complicaciones a largo plazo.¹⁰⁸

Estabilidad a largo plazo: la presencia de un anillo de tejido blando queratinizado alrededor del implante contribuye a la estabilidad a largo plazo de la prótesis dental. Esta estabilidad es crucial para prevenir la recesión gingival y mantener la salud de los tejidos peri-implantarios.¹⁰⁹

Estética y armonía gingival: la mucosa queratinizada desempeña un papel significativo en la estética gingival. Un adecuado ancho de tejido queratinizado contribuye a la armonía estética entre los tejidos blandos y duros, mejorando la apariencia visual de la rehabilitación implantosoportada. La presencia de mucosa queratinizada alrededor de los implantes dentales no solo mejora la estética de la sonrisa, sino que también facilita la adaptación de las encías a la prótesis, brindando un contorno gingival natural y una apariencia estéticamente agradable.¹¹⁰

Un margen adecuado de tejido queratinizado alrededor de los implantes no solo es crucial para la salud peri-implantaria, sino que también contribuye a la satisfacción estética del paciente y la aceptación de la prótesis dental. Esta armonía estética entre los tejidos blandos y duros en la zona peri-implantaria es fundamental para lograr resultados estéticos óptimos y una integración exitosa de la rehabilitación dental, impactando positivamente en la calidad de vida y la autoconfianza del paciente a lo largo del tiempo.¹¹¹

Mejora de la higiene oral: la presencia de tejido queratinizado facilita la higiene oral del paciente alrededor del implante. Un margen gingival definido y saludable permite un acceso más fácil para el cepillado y la limpieza interdental, ayudando así a prevenir la acumulación de placa y la inflamación gingival. Este tejido proporciona una barrera física que protege los tejidos peri-implantarios y favorece la eliminación efectiva de biofilm dental, reduciendo el riesgo de enfermedades peri-implantarias y mejorando la salud gingival a largo plazo.¹¹²

3.1.3. Consideraciones clínicas

Durante la planificación del tratamiento, los profesionales de la odontología evalúan la cantidad de tejido queratinizado disponible. En algunos casos, puede ser necesario realizar procedimientos de aumento de tejido blando para optimizar las condiciones peri-implantarias. Los procedimientos de aumento de tejido blando pueden implicar técnicas como trasplantes de tejido conectivo, injertos de tejido blando o cirugías de aumento de encía para crear una zona de encía más gruesa y resistente alrededor de los implantes. Estos procedimientos pueden realizarse antes, durante o después de la colocación de los implantes, según las necesidades individuales de cada paciente y el plan de tratamiento establecido.

En resumen, la presencia adecuada de tejido blando queratinizado peri-implantario no solo influye en la estabilidad y la salud a largo plazo del implante dental, sino que también desempeña un papel vital en la estética y el bienestar del paciente. La consideración cuidadosa de este aspecto durante la planificación y ejecución del tratamiento contribuye significativamente al éxito de los implantes dentales.^{113,114,115}

En el contexto de las restauraciones con implantes dentales, se ha observado que el biotipo gingival del paciente juega un papel crucial en el resultado estético y el éxito a largo plazo del tratamiento. Un biotipo gingival grueso se caracteriza por tener una cantidad significativa de tejido gingival denso y fibroso.

Este tipo de biotipo gingival tiende a proporcionar una mejor estabilidad de los tejidos blandos alrededor del implante, lo que contribuye a una apariencia más natural y estética de la restauración dental.

Además, el biotipo grueso y aplanado suele asociarse con una mayor resistencia a las fuerzas biomecánicas, lo que reduce el riesgo de recesiones gingivales y pérdida ósea alrededor del implante. Esto es especialmente beneficioso en áreas estéticamente sensibles, como los dientes frontales, donde la estabilidad de los tejidos blandos es crucial para lograr resultados estéticos satisfactorios.

Los pacientes con un biotipo gingival grueso y aplanado también tienden a tener una mayor cantidad de tejido blando en la zona del surco gingival, lo que facilita la manipulación y el modelado de los tejidos blandos durante el

procedimiento de restauración con implantes. Esto puede ayudar a mejorar aún más la estética del resultado final.¹¹⁶

En la actualidad, en gran número casos de colocación de implantes, se requiere un aumento óseo previo o simultáneo para garantizar las condiciones óptimas de implantación.

La frecuencia de regeneración ósea en implantología dental ha experimentado un aumento notable en las últimas décadas debido a diversos factores.

La necesidad de abordar deficiencias óseas para lograr resultados estéticos óptimos ha aumentado la frecuencia de estos procedimientos, la regeneración ósea se utiliza no solo para abordar deficiencias óseas existentes, sino también como medida preventiva para evitar complicaciones a largo plazo, como la recesión gingival y la pérdida de tejido blando alrededor de los implantes.

Los avances tecnológicos, como la introducción de biomateriales más efectivos y versátiles han ampliado las opciones disponibles para la regeneración ósea. La diversidad de injertos óseos autólogos, alógenos, xenoinjertos y sustitutos sintéticos permite a los profesionales adaptar los tratamientos a las necesidades específicas de cada paciente, aumentando así la frecuencia de la regeneración ósea.

3.2. BIOMATERIAL DE REGENERACIÓN ÓSEA: LA HIDROXIAPATITA (HA)

Respecto los biomateriales utilizados en procedimientos de aumento de hueso deben cumplir con unos requisitos para lograr resultados exitosos y prevenir complicaciones postoperatorias.

1. **Biocompatibilidad.** Los sustitutos óseos deben ser compatibles con el cuerpo humano y no provocar reacciones inmunológicas adversas, evitando respuestas negativas del sistema inmunológico.

Estos sustitutos deben ser biocompatibles, es decir, no causar reacciones adversas en el cuerpo humano y ser aceptados por los tejidos circundantes.¹¹⁷ Además, deben ser osteoconductivos, lo que significa que proporcionan un entorno tridimensional adecuado para el crecimiento y la migración de células óseas precursoras, facilitando así la formación de nuevo tejido óseo.¹¹⁸

2. **Osteoconductores.** La osteoinducción es otro criterio importante a considerar. Los sustitutos óseos deben ser capaces de inducir la diferenciación de células mesenquimales en osteoblastos, promoviendo así la formación de hueso nuevo de manera activa.¹¹⁹ Asimismo, la estabilidad a largo plazo del implante es esencial para garantizar una integración óptima con el hueso circundante y evitar la migración o el desplazamiento del material implantado.¹²⁰

3 **Biodegradabilidad.** Los materiales utilizados deben ser biodegradables, descomponiéndose con el tiempo sin causar efectos perjudiciales en el organismo.

La capacidad de los sustitutos óseos para degradarse y ser reemplazados por hueso propio del paciente es crucial para permitir una regeneración ósea completa y natural.

4. **Facilidad de manejo.** Los materiales deben ser fáciles de usar y adecuados para procedimientos quirúrgicos efectivos.

5. **Economía.** Los sustitutos óseos deben ser asequibles y disponibles a un costo razonable.

6. **Seguridad frente a enfermedades y reacciones inmunológicas.** Es esencial que no presenten riesgo de transmisión de enfermedades ni provoquen reacciones inmunológicas adversas en el paciente.

En cuanto a la variedad de biomateriales utilizados en odontología, es crucial clasificarlos en diferentes categorías según su composición, estructura y función. Estas clasificaciones pueden incluir:

1. **Biomateriales cerámicos.** Incluyen materiales como la hidroxiapatita, fosfato tricálcico y vidrio bioactivo. Estos biomateriales se caracterizan por su alta biocompatibilidad y capacidad para integrarse con los tejidos biológicos.

2. **Biomateriales poliméricos.** Comprenden una amplia gama de materiales, como polimetilmetacrilato (PMMA), polietileno de ultra alto peso molecular (UHMWPE) y poliésteres. Estos materiales son conocidos por su versatilidad y capacidad para ser moldeados en diversas formas para su uso en restauraciones dentales y dispositivos protésicos.

3. **Biomateriales metálicos.** Incluyen aleaciones de titanio, acero inoxidable y cobalto-cromo. Estos materiales son apreciados por su resistencia mecánica y durabilidad, lo que los hace ideales para implantes dentales y dispositivos ortopédicos.

4. **Biomateriales compuestos.** Combinan diferentes materiales para aprovechar las ventajas de cada uno. Por ejemplo, los compuestos de matriz cerámica reforzados con fibras de polímero ofrecen una combinación única de resistencia y biocompatibilidad.

Estas categorías proporcionan una base sólida para comprender la diversidad de biomateriales disponibles y su aplicación en odontología. Sin embargo, es importante tener en cuenta que la selección del biomaterial adecuado depende de las necesidades específicas del paciente y las características del tratamiento dental.

Los biomateriales cerámicos son componentes inorgánicos ampliamente utilizados en odontología debido a su versatilidad, biocompatibilidad y diversas aplicaciones clínicas.

3.2.1. Clasificación de los biomateriales

La clasificación de los biomateriales cerámicos para uso odontológico según su origen puede dividirse en tres categorías principales:

1. Cerámicas naturales.

Estos biomateriales cerámicos se derivan de fuentes naturales y se utilizan en odontología debido a su biocompatibilidad y similitud con los tejidos dentales. La hidroxiapatita (HA) es un biomaterial cerámico ampliamente utilizado en odontología debido a su similitud con la estructura del tejido óseo y dental natural. Se puede obtener de diversas fuentes, como huesos bovinos, porcinos, algas marinas y síntesis química, y se utiliza en una variedad de aplicaciones odontológicas, para recubrimientos de implantes, injertos óseos y materiales de relleno dental debido a su capacidad para promover la regeneración ósea y la osteointegración.

A continuación, se describen algunas de las formas comunes de hidroxiapatita utilizadas en odontología:

⇒ **Hidroxiapatita bovina**

Esta forma de HA se obtiene a partir de huesos bovinos y se utiliza en odontología para aumentar el volumen óseo en procedimientos de injerto y promover la regeneración ósea en defectos alveolares y periodontales.¹²¹

Ejemplo: Bio-Oss® (Geistlich Pharma AG) es un producto comercial de hidroxiapatita bovina ampliamente utilizado en odontología para la regeneración ósea en implantes dentales y procedimientos de elevación de seno maxilar (Geistlich Pharma AG, 2021).

⇒ **Hidroxiapatita porcina**

La HA porcina se deriva de huesos de cerdo y se utiliza en odontología de manera similar a la HA bovina, para aumentar el volumen óseo y promover la regeneración en defectos alveolares y periodontales.¹²²

Ejemplo: ELLAGEN® (Osteobiol) es un producto comercial de hidroxiapatita porcina utilizado en odontología para la regeneración ósea en procedimientos de injerto (Osteobiol, 2021).

⇒ **Hidroxiapatita de algas marinas**

La HA derivada de algas marinas ofrece una alternativa biocompatible y sostenible a las fuentes animales de HA. Se utiliza en odontología para la regeneración ósea y como material de relleno en procedimientos de implantes dentales

Ejemplo: Ostim® (Botiss Biomaterials) es un producto comercial de hidroxiapatita de algas marinas utilizado en odontología para la regeneración ósea en procedimientos de elevación de seno maxilar y aumentos de cresta (Botiss Biomaterials, 2021).

2. Cerámicas Sintéticas

Estos biomateriales cerámicos se fabrican en laboratorio mediante procesos de síntesis química controlada. Son diseñados para ofrecer propiedades específicas y se utilizan en una variedad de aplicaciones odontológicas, como:

2.1. Alúmina (óxido de aluminio) y Zirconia (óxido de circonio). Utilizados en odontología como materiales de restauración dental debido a su resistencia mecánica, biocompatibilidad y estética.

2.2. Fosfato de calcio sintético: incluye materiales como fosfato tricálcico y fosfato dicálcico, que se utilizan en odontología para promover la regeneración ósea en defectos alveolares y periodontales, así como en procedimientos de elevación de seno maxilar.

3. Cerámicas Compuestas

Estos biomateriales cerámicos se componen de una combinación de cerámicas y otros materiales, como polímeros o metales, para mejorar sus propiedades mecánicas y biológicas. Algunos ejemplos incluyen: cerámicas reforzadas con fibras. Como el disilicato de litio reforzado con cristales de vidrio, que se utiliza en odontología para restauraciones dentales indirectas debido a su resistencia y estética mejoradas.

Esta clasificación proporciona una visión general de los biomateriales cerámicos utilizados en odontología según su origen, destacando su importancia en una variedad de procedimientos dentales y de regeneración ósea.

3.2.2. Clasificación de biomateriales cerámicos según el origen

Los biomateriales cerámicos se clasifican en dos categorías principales según su origen: sintéticos y naturales.

1. **Materiales autógenos.** En esta categoría, el donante de tejido es el propio paciente. Los injertos óseos autólogos se consideran el "estándar de oro" debido a su capacidad única de osteogénesis.^{123,124}

No obstante, estos injertos pueden presentar desafíos significativos que afectan su viabilidad y eficacia a largo plazo. La invasión quirúrgica del sitio donante, aunque necesaria para obtener el tejido, puede causar molestias y complicaciones postoperatorias para el paciente, como dolor, inflamación y riesgo de infección.¹²⁵

Además, la recuperación del sitio donante puede requerir un tiempo prolongado, lo que puede prolongar el período de recuperación del paciente y afectar su calidad de vida durante el proceso de cicatrización.

Otro desafío importante es la posible resorción del tejido trasplantado. Aunque los injertos autólogos tienen la capacidad de osteogénesis, es decir, la capacidad de formar nuevo tejido óseo, existe la posibilidad de que parte del injerto se reabsorba con el tiempo.¹²⁶

La resorción del injerto puede comprometer la estabilidad y la integridad estructural del hueso, lo que puede requerir procedimientos adicionales de reparación o refuerzo para mantener la función y la forma ósea adecuadas.

Aloinjertos: consisten en tejido óseo obtenido de un donante de la misma especie, aunque no genéticamente idéntico al receptor.

El aloinjerto óseo liofilizado desmineralizado ha demostrado propiedades osteoconductoras y un posible efecto osteoinductivo.¹²⁷ Los aloinjertos son ampliamente utilizados en los EE. UU.^{128 129 130}, aunque en Europa las regulaciones locales limitan la recolección de tejido óseo en humanos, lo que reduce su popularidad entre los médicos. A diferencia de los autoinjertos, no plantean problemas de dolor y daño a los sitios donantes, y están disponibles en grandes cantidades.

Xenoinjertos: conocidos como sustitutos óseos xenogénicos, son materiales utilizados en procedimientos de trasplante óseo que implican el trasplante de tejido óseo de una especie a otra. Estos sustitutos óseos consisten en minerales óseos obtenidos de animales o minerales osteoarticulares, que se obtienen de corales calcificados o algas. Para eliminar el riesgo de reacciones inmunogénicas o la transmisión de enfermedades, se elimina el componente orgánico de estos materiales, lo que los convierte en materiales osteoconductivos.¹³¹

Los xenoinjertos más comunes se derivan del hueso bovino y porcino, y se procesan para preservar la estructura original de la sustancia esponjosa y las características naturales de la superficie. La eliminación del componente orgánico garantiza que no haya riesgos relacionados con enfermedades transmitidas.

Es importante destacar que la producción de hueso bovino desproteínizado influye significativamente en su comportamiento biológico. Además, se ha demostrado en diversos estudios la capacidad de osteointegración y biocompatibilidad de la hidroxiapatita.^{132,133,134}

Los resultados de investigaciones también han confirmado la capacidad osteoconductiva de los xenoinjertos porcinos y bovinos. Estos materiales actúan como andamiaje para la generación de células óseas, lo que los hace valiosos en procedimientos de regeneración ósea.^{135,136,137}

Aloplásticos: los sustitutos óseos aloplásticos, o materiales sintéticos, han ganado un amplio uso en la reconstrucción ósea, desde la corrección de pequeñas dehiscencias o fenestraciones óseas hasta procedimientos de aumento óseo a gran escala. Estos biomateriales ofrecen la ventaja de no conllevar riesgos de transmisión de enfermedades, ya que son de naturaleza sintética.

Un aspecto fundamental que ha impulsado el interés científico y clínico en los sustitutos óseos aloplásticos en las últimas cuatro décadas es su capacidad de personalización. Los investigadores tienen la capacidad de adaptar las características de estos biomateriales, como la velocidad de degradación, las propiedades mecánicas, la porosidad y la composición, para satisfacer las necesidades específicas de cada caso clínico.¹³⁸

Hasta la fecha, se ha logrado un control preciso de la composición química de estos materiales, llegando incluso al nivel molecular. Se ha optimizado el

tamaño y la interconexión de los macroporos para mejorar la vascularización y la integración en el tejido circundante.

No obstante, no todas las características de un sustituto óseo aloplástico ideal se han establecido de manera definitiva. Un ejemplo es la importancia de la adsorción inicial de proteínas y otras macromoléculas del suero en la unión de células osteogénicas y sus precursores. Esta consideración se aplica a otros tipos de sustitutos óseos.

Un aspecto crítico es la estructura del material, que debe fomentar el crecimiento de los vasos sanguíneos, un factor clave en la formación de tejido óseo en el interior del sustituto. Esto implica que el material no solo debe ser poroso, sino también debe contar con macroporos conectados para permitir la vascularización efectiva.¹³⁹

Se enfatiza la relevancia de otros parámetros, como la morfología de los poros, el porcentaje de porosidad y la interconexión entre los poros.¹⁴⁰

Las características superficiales de los materiales utilizados en sustitutos óseos, que reemplazan el tejido óseo, están determinadas por su composición química, microporosidad, rugosidad superficial, cristalización y tamaño de los cristales. Estos atributos superficiales desempeñan un papel crucial en la adsorción inicial de proteínas, la unión de osteoblastos y osteoclastos, así como la deposición de osteoide. Por consiguiente, es imperativo considerar estas características al fabricar biomateriales.¹³²

Uno de los tipos de biomateriales aloplásticos más ampliamente empleados son los basados en materiales biocerámicos de calcio con base de fosfato (Ca-P).

Los materiales biocerámicos a base de fosfato de calcio son esenciales en el campo de la regeneración ósea y la odontología debido a su similitud con la composición mineral del tejido óseo natural. Entre los biocerámicos de calcio, dos compuestos destacan por su aplicación en odontología y cirugía ortopédica: la hidroxiapatita (HA) y el fosfato tricálcico (TCP).

A. Hidroxiapatita (HA):

1. **Composición y estructura.** La hidroxiapatita es la forma más común de fosfato de calcio presente en los tejidos duros del cuerpo humano. Su composición química es $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$. La estructura cristalina de la

HA es similar a la del esmalte dental y el tejido óseo. Su estructura y composición se asemejan más a los componentes inorgánicos del hueso.

El fosfato tricálcico (TCP), es un compuesto que puede presentarse en varias formas, siendo la forma alfa (α -TCP) y la forma beta (β -TCP) las más comunes. Su fórmula química es $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$.

2. Degradación y resorción:

- α -TCP. Tiende a degradarse más rápidamente que la HA y puede proporcionar un suministro de iones de calcio y fosfato, estimulando la formación de hueso.
 - β -TCP. Se degrada más lentamente que α -TCP y se utiliza en situaciones donde se busca una liberación controlada de iones calcio y fosfato para promover la regeneración ósea.
3. **Aplicaciones:** el TCP se utiliza en la fabricación de injertos óseos, materiales de relleno, y recubrimientos de superficies de implantes.

B. Biphasic Calcium Phosphate (BCP):

- **Combinación de HA y TCP:** BCP es una combinación de hidroxiapatita y fosfato tricálcico en diferentes proporciones. Esta combinación busca combinar las propiedades osteoconductoras de la HA con la degradación controlada del TCP.
- **Versatilidad:** BCP se utiliza en diversas aplicaciones, desde recubrimientos de implantes hasta materiales de relleno óseo, permitiendo ajustar las propiedades del material según las necesidades específicas de la aplicación clínica. En particular, ha sido objeto de una intensa investigación y ha arrojado resultados prometedores.

Los sustitutos óseos sintéticos que contienen fosfato cálcico, como la hidroxiapatita (HA), el fosfato tricálcico (TCP) y el fosfato cálcico bifásico, una mezcla de HA y β -TCP, son biocompatibles y osteoconductoras, y se utilizan ampliamente en sustitución de injertos óseos autólogos.^{141 142 143 144}

En los últimos años, ha habido un considerable esfuerzo en la investigación de la modificación de la composición y estructura de los biomateriales utilizados en rellenos e injertos óseos.

En la interfaz entre el injerto óseo y el huésped, existe una compleja relación en la que múltiples factores pueden influir en la correcta osteointegración del injerto. Entre estos factores se destacan la ubicación del implante, la vascularización del injerto, la compatibilidad inmunológica entre el donante y el huésped, diversos factores locales y sistémicos (como hormonales, el uso de medicamentos, la calidad ósea y enfermedades crónicas degenerativas) y las propiedades mecánicas que dependen del tamaño, la forma y el tipo de injerto utilizado.¹⁴⁵ Por lo tanto, se ha centrado en el desarrollo y la modificación de los injertos ya existentes, como la HA o el fosfato tricálcico (TCP).

En la actualidad, se están realizando investigaciones intensivas para modificar los sustitutos óseos aloplásticos mediante la incorporación de diferentes elementos, como el estroncio (Sr), calcio (Ca), magnesio (Mg), fósforo (P) y silicio (Si), que han demostrado mejoras en las propiedades de los biomateriales aloplásticos en varios estudios.

El silicio, que comparte el grupo 14 de la tabla periódica con el germanio, ha sido objeto de numerosos estudios y se ha demostrado que tiene efectos beneficiosos en el tejido conectivo, especialmente en el hueso y el cartílago. La adición de silicio mejora las condiciones osteoconductoras del injerto y ha demostrado estimular la neoformación ósea en estudios realizados en animales.¹⁴⁶
¹⁴⁷ ¹⁴⁸ ¹⁴⁹ Además, es importante destacar que no se ha observado toxicidad alguna en concentraciones elevadas.¹⁵⁰ ¹⁵¹

**CAPÍTULO IV –
MECANISMO DE LA
HIPERSENSIBILIDAD
DENTARIA**

IV. MECANISMOS DE LA HIPERSENSIBILIDAD DENTARIA

4.1. INTRODUCCIÓN

La sensibilidad dental es un problema común que afecta a muchas personas en todo el mundo. Se refiere a esa sensación de dolor agudo que se experimenta al consumir alimentos fríos, calientes o dulces, especialmente cuando los dientes están expuestos debido a la pérdida de esmalte o la recesión de las encías. Esta sensibilidad no solo puede ser molesta, sino que también afecta la manera en que las personas comen y cuidan sus dientes, lo cual puede tener un impacto significativo en su vida diaria.

Existen varias razones por las cuales alguien puede desarrollar sensibilidad dental, desde el desgaste del esmalte debido a ciertos alimentos o enfermedades, hasta tratamientos dentales como limpiezas profundas o la colocación de empastes. Entender por qué ocurre y cómo manejarla de manera efectiva es crucial para los dentistas y para las personas que la sufren. Especialmente ahora, con más personas conservando sus dientes naturales por más tiempo, es importante encontrar formas de protegerlos y mantenerlos saludables a lo largo de la vida.

En este capítulo, se describe en detalle qué causa la sensibilidad dental, los mecanismos subyacentes y las estrategias actuales de manejo clínico de la sensibilidad dental, cómo afecta a las personas y cuáles son las mejores formas de tratarla.

4.1.1. Definición y características de la sensibilidad dentinaria

Buscar un tratamiento contra la sensibilidad dentaria es un tema fundamental por varias razones.

Primero, la sensibilidad dentaria puede afectar significativamente la calidad de vida de una persona, ya que puede generar molestias y dolor agudo al comer,

beber o incluso al respirar aire frío. Esto impacta negativamente en las rutinas diarias y en la elección de alimentos y bebidas.

La sensibilidad dentinaria, también conocida como hipersensibilidad dentinaria, es una condición frecuente que afecta a un gran número de personas en todo el mundo. Se caracteriza por la presencia de dolor agudo y repentino en los dientes, que suele desencadenarse por estímulos externos como cambios de temperatura, alimentos y bebidas ácidas, cepillado dental vigoroso o incluso simplemente al respirar aire frío. Este dolor puede ser breve pero intenso, y puede interferir significativamente en la calidad de vida del individuo, afectando sus hábitos alimenticios, su higiene oral e incluso su bienestar emocional.¹⁵²

Generalmente no se produce en un diente sano y puede ser un síntoma de problemas dentales subyacentes, como caries, desgaste del esmalte o retracción de encías. La sensibilidad dentinaria ocurre cuando la dentina, la capa de tejido duro que se encuentra debajo del esmalte dental, se expone debido a la pérdida de la capa protectora de esmalte o encía.¹⁵³

Una de las características distintivas de la sensibilidad dentinaria es que el dolor cesa inmediatamente después de eliminar el estímulo desencadenante. Esta respuesta rápida y directa es una de las formas en que los individuos pueden identificar y distinguir la sensibilidad dentinaria de otros tipos de dolor dental. Una vez que se elimina el estímulo, ya sea retirando el alimento o la bebida ácida, cesando el cepillado vigoroso o simplemente alejándose de la fuente de temperatura extrema, el dolor disminuye o desaparece por completo, lo que proporciona un alivio momentáneo al paciente.

Sin embargo, es importante tener en cuenta que esta interrupción del dolor es temporal y no aborda la causa subyacente de la sensibilidad dentinaria, que debe ser evaluada y tratada adecuadamente por un profesional dental para prevenir su recurrencia una de las características que el dolor cesa con la eliminación del estímulo.¹⁵⁴

Este dolor ejerce un impacto significativo en diversos aspectos de la vida diaria de quienes la padecen. Afecta los hábitos alimentarios, ya que los pacientes suelen evitar ciertos alimentos y bebidas que desencadenan el dolor, limitando así su dieta y nutrición.

Además, el dolor asociado puede afectar el estado funcional del paciente, dificultando actividades cotidianas como hablar, masticar y beber. El simple acto de cepillarse los dientes puede convertirse en una tarea desafiante y dolorosa, lo que lleva a una higiene oral deficiente y aumenta el riesgo de problemas dentales adicionales. Las interacciones sociales también se ven afectadas, ya que el dolor repentino e intenso puede causar incomodidad y malestar en situaciones sociales.

155

Es fundamental abordar y tratar adecuadamente la sensibilidad dentinaria para mejorar la calidad de vida y el bienestar general del paciente.

4.2. ETIOPATOGENIA

La dentina, que constituye la capa principal debajo del esmalte dental, no está directamente expuesta a estímulos externos debido a la presencia del esmalte. Sin embargo, la sensibilidad dentinaria ocurre cuando las terminaciones nerviosas periféricas de los túbulos dentinarios se ven expuestas debido a la pérdida de esmalte o al desgaste de la capa protectora, lo que permite la estimulación directa de los nervios. Esta exposición provoca una respuesta dolorosa y aguda, característica de la hipersensibilidad dentinaria.

El dolor es causado por dentina expuesta, esta situación se puede dar después de que el esmalte o cemento de la raíz se haya perdido por tratamientos, enfermedades dentales y gingivales subyacentes, desgaste fisiológico de los dientes, y la retracción de tejidos periodontales de soporte.¹⁵²

Factores predisponentes de la hipersensibilidad dentinaria:

1. Exposición de la dentina:

Recesión gingival: la retracción de las encías puede exponer la dentina, lo que la hace susceptible a estímulos externos.

Desgaste dental: el desgaste del esmalte dental debido a la abrasión, la erosión o la abfracción puede liberar la dentina subyacente.

Abrasión: desgaste físico como resultado de procesos mecánicos (cepillado).

Erosión: desgaste químico como resultado del ácido extrínseco, intrínseco (jugos gástricos) o de los quelantes que actúan sobre superficies dentales libres de placa.

Abfracción: pérdida de tejido dentario, como resultado de fuerzas biomecánicas; como la sobrecarga oclusal.¹⁵⁶

Bruxismo: el hábito de rechinar o apretar los dientes puede contribuir al desgaste del esmalte y, eventualmente, a la exposición dentinaria.

2. Higiene bucal inadecuada:

Cepillado agresivo: el uso de una técnica de cepillado inadecuada o de un cepillo de cerdas duras puede causar desgaste mecánico del esmalte y recesión gingival.

Uso de dentífricos abrasivos: algunos dentífricos contienen ingredientes que pueden ser demasiado abrasivos para el esmalte dental

3. Alimentación y dieta:

Consumo de ácidos: alimentos y bebidas ácidas (como frutas cítricas, jugos, refrescos y vino) pueden erosionar el esmalte, exponiendo la dentina.

4. Procedimientos odontológicos:

Blanqueamiento dental: el uso de agentes blanqueadores puede causar una desmineralización temporal de la dentina, aumentando la sensibilidad.

Limpiezas profesionales: en algunos casos, la eliminación de sarro y placa puede dejar áreas de dentina previamente recubiertas expuestas y más sensibles.

Tratamiento ortodóntico: durante el proceso de ortodoncia, los dientes pueden experimentar movimientos y cambios en su posición, lo que puede causar estrés en las estructuras circundantes, incluidas las encías y el tejido periodontal.

5. Factores sistémicos y genéticos:

Enfermedades sistémicas: algunas enfermedades como la diabetes pueden influir en la salud de las encías, llevando a la recesión gingival y la exposición dentinaria.

Factores genéticos: la predisposición genética puede influir en la estructura del esmalte y la reacción de la dentina a los estímulos externos.

6. Deshidratación y flujo salivar:

Saliva insuficiente: la saliva juega un papel crucial en la protección contra la desmineralización. La disminución del flujo salivar puede aumentar el riesgo de erosión y caries.

7. Hábitos de vida:

Tabaquismo: fumar puede afectar negativamente la salud de las encías, contribuyendo a la recesión gingival y la exposición dentinaria.

Una de las causas más frecuentes es la recesión gingival, caracterizada por la exposición de la raíz del diente debido a la retracción de las encías, es una de las causas más comunes de sensibilidad dental. Este problema puede ser especialmente relevante para los pacientes que sufren de enfermedad periodontal, ya que la recesión gingival es una manifestación común de esta condición.

Cuando las encías se retraen, la raíz del diente queda expuesta, dejando los túbulos dentinarios vulnerables a estímulos externos, como cambios de temperatura, alimentos y bebidas ácidas, o el cepillado dental vigoroso.¹⁵⁷

La exposición de la dentina radicular debido a la recesión gingival se ha asociado con un cepillado agresivo. Cuando la encía retrocede, deja expuesta la superficie radicular del diente. Un cepillado vigoroso o agresivo puede eliminar aún más el tejido gingival restante y desgastar la dentina radicular expuesta, lo que aumenta la sensibilidad dental. El cepillado excesivo puede también dañar el tejido periodontal circundante y provocar inflamación, lo que agrava aún más la sensibilidad.

Por lo tanto, es importante que los pacientes con recesión gingival utilicen técnicas de cepillado suaves y adecuadas, como cepillos de cerdas suaves y movimientos suaves, para prevenir el empeoramiento de la sensibilidad dental. Además, es recomendable utilizar productos dentales diseñados específicamente para la sensibilidad, que pueden ayudar a fortalecer el esmalte y reducir la sensibilidad en la dentina expuesta.¹⁵⁸

La hipersensibilidad dental puede estar asociada con algunos tratamientos dentales, uno de estos tratamientos que se realizan con bastante frecuencia son los tratamientos periodontales que provocan la hipersensibilidad debido a la exposición de los túbulos dentinarios después de la eliminación de cálculo supragingivales y/o subgingivales. Otro factor es la eliminación del cemento

dental que recubre la raíz o la propia dentina de la raíz durante el raspado periodontal.¹⁵⁹

La sensibilidad post-blanqueamiento dental es un efecto adverso común que puede experimentar un paciente después de someterse a un tratamiento de blanqueamiento dental. Este fenómeno se caracteriza por la sensibilidad dental transitoria o aguda, que puede manifestarse como dolor o molestias en los dientes durante o después del procedimiento de blanqueamiento.

La sensibilidad post-blanqueamiento dental puede ocurrir debido a varios factores. Uno de los principales es el aumento temporal de la permeabilidad dentinaria causado por el blanqueamiento químico. Durante el proceso de blanqueamiento, los agentes blanqueadores, como el peróxido de hidrógeno o el peróxido de carbamida, pueden penetrar en los túbulos dentinarios y desencadenar una respuesta inflamatoria en la pulpa dental, lo que resulta en sensibilidad.

Además, la deshidratación temporal del esmalte durante el procedimiento de blanqueamiento también puede contribuir a la sensibilidad dental. La deshidratación puede provocar cambios en la estructura del esmalte y aumentar la sensibilidad al frío, calor u otros estímulos.

Es importante tener en cuenta que la sensibilidad post-blanqueamiento dental suele ser transitoria y tiende a disminuir con el tiempo. Sin embargo, puede resultar incómoda para el paciente y afectar su calidad de vida temporalmente.¹⁶⁰

La hipersensibilidad dental puede estar asociada con tratamientos de ortodoncia debido a varios factores. Durante el proceso de ortodoncia, los dientes pueden experimentar movimientos y cambios en su posición, lo que puede causar estrés en las estructuras circundantes, incluidas las encías y el tejido periodontal. Este estrés puede provocar la exposición de la raíz dental y la consiguiente sensibilidad debido a la recesión gingival o la pérdida de esmalte dental.

Además, algunos procedimientos ortodóncicos, como la colocación de brackets y alambres, pueden causar irritación en las encías y los tejidos circundantes, lo que puede provocar sensibilidad dental temporal. El contacto directo de los brackets y alambres con los tejidos gingivales puede causar inflamación y molestias, especialmente durante los primeros días después de la colocación o los ajustes de los aparatos ortodóncicos.

El uso de fuerzas ortodóncicas para mover los dientes puede alterar la posición de los tejidos blandos circundantes, lo que puede contribuir a la sensibilidad dental. Es importante que los ortodoncistas y pacientes sean conscientes de estos posibles efectos secundarios y tomen medidas para minimizar la sensibilidad dental, como el uso de productos desensibilizantes, enjuagues bucales especiales y técnicas de higiene bucal adecuadas.¹⁶¹

La hipersensibilidad dentinaria tiene un inicio que se puede dividir en dos fases distintas:

Localización de la lesión: esta fase comienza con la exposición de la dentina debido a la pérdida de esmalte y/o recesión gingival.

Es importante destacar que no toda la dentina expuesta es necesariamente sensible. Sin embargo, la capa de frotis calcificada en la dentina expuesta sensible es más delgada en comparación con la dentina no sensible. Esta delgadez provoca un aumento en el movimiento del líquido dentro de los túbulos dentinarios, lo que conduce a una mayor sensibilidad al dolor.^{162,163}

Inicio de la lesión: durante esta fase, los tapones tubulares y la capa de frotis que protegen los túbulos dentinarios y la pulpa desaparecen, dejando estos elementos expuestos al medio externo. La apertura de los túbulos dentinarios permeables desde la pulpa hasta la cavidad oral es esencial para activar el mecanismo hidrodinámico que desencadena la sensibilidad dentinaria. El inicio de la lesión ocurre después de que se elimina esta cubierta protectora, exponiendo así los túbulos dentinarios y permitiendo que se produzca la sensibilidad.¹⁶⁴

Ambas condiciones deben estar presentes para que el individuo experimente dolor debido a la hipersensibilidad dentinaria.¹⁵⁵

4.3. MECANISMO Y TEORÍAS DE LA SENSIBILIDAD DENTARIA

El mecanismo subyacente a la sensibilidad dental implica la comunicación de estímulos externos a través de pequeños túbulos dentinarios que conectan la superficie del diente con los nervios sensibles al dolor en la pulpa dental. La exposición de estos túbulos puede ser el resultado de varios factores, incluyendo la

erosión del esmalte por el consumo de alimentos ácidos, el cepillado dental vigoroso o la enfermedad periodontal.

En esta sección, se explorará detalladamente cómo se desencadena y perpetúa la sensibilidad dental a nivel fisiológico. Se revisarán los estudios y teorías actuales que explican cómo los estímulos externos activan los nervios dentales y desencadenan la respuesta de dolor.

A continuación, se explican las teorías de mecanismos.

Los mecanismos de la sensibilidad dentinaria que se ha propuesto son los siguientes:

- A) Teoría de la inervación directo
- B) Teoría del receptor de odontoblastos
- C) Movimiento de fluidos / Teoría hidrodinámica

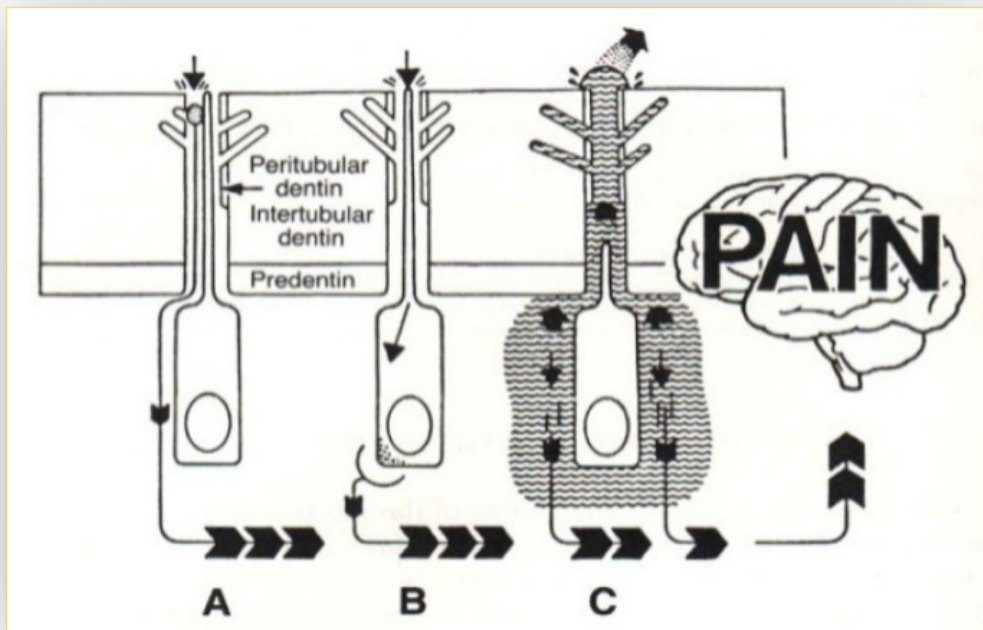


Figura 2. Mecanismos de sensibilidad dentinaria. Adaptado de Miglani et al.¹⁸⁹

La Teoría de la inervación directa es una explicación propuesta para entender la sensibilidad dentinaria. Según esta teoría, se sugiere que las terminaciones nerviosas penetran la dentina desde la pulpa dental y se extienden hasta la unión amelodentinaria, donde pueden transmitir directamente el dolor generado por estímulos mecánicos.

Sin embargo, es importante destacar que esta teoría carece de evidencia sólida que la respalde. De hecho, hasta la fecha, no se ha encontrado evidencia concluyente que demuestre la presencia de nervios en la dentina superficial. Esta falta de evidencia ha llevado a cuestionar la validez de la Teoría de la Inervación Directa como una explicación completa para la sensibilidad dentinaria.

En la segunda teoría, los odontoblastos actúan como receptores del dolor y transmiten señales a los nervios pulpares. Pero esta teoría también ha sido rechazada ya que la matriz celular de los odontoblastos no es capaz de excitar y producir impulsos neuronales. Además, no se ha encontrado una sinopsis entre los odontoblastos y los nervios pulpares.¹⁵⁷

La teoría hidrodinámica de Brannstrom (1964) del desplazamiento de líquido dentro de los túbulos dentinarios es la teoría más aceptada de la hipersensibilidad dentinaria.¹⁶⁴

Dentro de la dentina, los túbulos dentinarios van desde la pulpa hasta la superficie dentinaria externa. Explica la relación entre el dolor de la hipersensibilidad dentinaria y el desplazamiento del líquido biológico de los túbulos dentinarios y la consiguiente activación de los nociceptores. El desplazamiento de este líquido es provocado estímulos (químicos, térmicos y táctiles). El movimiento del líquido dentro de los túbulos dentinarios estimula las fibras A-delta, excitando el nervio pulpar, produciendo un dolor agudo y bien localizado que se percibe como hipersensibilidad dentinaria.^{153,165,166,167}

La hipersensibilidad dentinaria es el resultado de la activación de las fibras nerviosas A- δ ubicadas en los túbulos dentinarios. Por tanto, las fibras A- δ se activan mediante el mecanismo hidrodinámico. Su activación está directamente asociada a la presencia de túbulos abiertos.¹⁵³

4.3.1. Enfoques terapéuticos para la sensibilidad dental

Por lo tanto, los tratamientos desensibilizantes se basan en la reducción del movimiento del líquido dentro de los túbulos dentinarios o en la disminución de la permeabilidad de la dentina.

Al bloquear o disminuir el flujo de líquido en los túbulos dentinarios, se reduce la estimulación de las terminaciones nerviosas que se encuentran en la dentina, lo cual, a su vez, disminuye la percepción del dolor. Estos tratamientos pueden lograr sus efectos de diversas maneras, incluyendo la aplicación de agentes que forman barreras físicas que ocluyen los túbulos o el uso de compuestos químicos que reducen la permeabilidad de la dentina. Al controlar estos factores, se logra regular eficazmente la respuesta dolorosa que caracteriza la hipersensibilidad dentaria, ofreciendo un alivio significativo a los pacientes que sufren de esta condición.¹⁵⁵

Una de las estrategias más efectivas para tratar la hipersensibilidad dentaria consiste en disminuir el movimiento del líquido dentro de los túbulos dentinarios, lo cual se logra mediante el estrechamiento y la oclusión de estos túbulos. Este proceso implica la aplicación de agentes desensibilizantes que actúan formando precipitados en los túbulos dentinarios, lo que reduce su diámetro y, en algunos casos, los bloquea por completo. Como resultado, se minimiza la transmisión de estímulos externos hacia las terminaciones nerviosas localizadas en la dentina, impidiendo que estas envíen señales de dolor al cerebro. De esta manera, se logra un alivio efectivo de la hipersensibilidad dentaria, mejorando la calidad de vida del paciente al reducir la percepción de dolor en respuesta a estímulos térmicos, táctiles o químicos.¹⁶⁸

4.4 PREVALENCIA

La sensibilidad dentinaria es un problema común que afecta a una amplia gama de la población, con estudios clínicos que indican una prevalencia que varía significativamente, desde un 4% hasta un 74%.^{169,170}

Esta variabilidad en la prevalencia puede atribuirse a múltiples factores, incluyendo diferencias en la edad, la higiene oral, la presencia de enfermedades periodontales y la exposición a ciertos tratamientos dentales. La edad es un factor significativo, ya que la hipersensibilidad dentaria tiende a aumentar con la edad debido al desgaste del esmalte y la recesión gingival que expone la dentina subyacente. La higiene oral también juega un papel crucial; prácticas inadecuadas de cepillado o el uso de cepillos de cerdas duras pueden llevar a la abrasión del esmalte y la exposición de la dentina.

Además, las enfermedades periodontales que resultan en la pérdida de hueso y encía son factores de riesgo para la exposición de la raíz dentinaria, aumentando la susceptibilidad a la hipersensibilidad dentaria. Por último, ciertos procedimientos dentales, como el blanqueamiento dental, pueden provocar o exacerbar la hipersensibilidad al alterar la estructura del esmalte y exponer la dentina. Todos estos factores, individuales o combinados, contribuyen significativamente a la variabilidad observada en la prevalencia de la hipersensibilidad dentaria.^{171,172}

La sensibilidad dentinaria se manifiesta como un dolor agudo y repentino en respuesta a estímulos térmicos, osmóticos, químicos o táctiles, y puede tener un impacto significativo en la calidad de vida del paciente.^{173 174}

Es fundamental comprender las causas subyacentes y los mecanismos involucrados en la sensibilidad dentinaria para poder desarrollar estrategias efectivas de prevención y tratamiento que mejoren el bienestar y la comodidad de los pacientes.¹⁷⁵

La sensibilidad dentinaria, caracterizada por una sensación dolorosa aguda en respuesta a estímulos externos, se encuentra con mayor frecuencia en pacientes que sufren de enfermedad periodontal. Estudios han demostrado que la prevalencia de sensibilidad dentinaria en pacientes con enfermedad periodontal varía significativamente, con cifras que oscilan entre el 72,5% y el 98%.¹⁷⁶

Además, se ha observado que los tratamientos periodontales, como el raspado y alisado radicular, así como la cirugía gingival, pueden desencadenar o exacerbar la sensibilidad dentinaria en los pacientes. En particular, después de estas intervenciones, se ha informado de un aumento en la incidencia de sensibilidad dentinaria en los pacientes afectados.¹⁶⁰ Estos hallazgos sugieren una

estrecha relación entre la enfermedad periodontal y la sensibilidad dentinaria, lo que resalta la importancia de abordar adecuadamente esta condición en el manejo clínico de los pacientes con enfermedad periodontal.

Factores que aumentan el riesgo de padecer hipersensibilidad dentinaria incluyen el cepillado agresivo, tratamientos periodontales, bulimia, xerostomía, consumo de alimentos o bebidas con alto contenido ácido, recesión gingival en personas mayores, y el consumo de tabaco sin humo o rapé.^{177 178}

La hipersensibilidad dentinaria ocurre con mayor frecuencia entre los 20 y 50 años y es más común en mujeres, posiblemente debido a sus hábitos de higiene dental y dietéticos. El rango de edad menos común para la hipersensibilidad dentinaria es de 60 a 69 años. Esto puede estar relacionado con la formación de dentina esclerótica.^{179,180}

Se observa con mayor frecuencia en los dientes caninos y premolares en la zona vestibular cervical, pero puede afectar a cualquier diente y en cualquier área de la boca. La prevalencia en los caninos y premolares se debe a su ubicación en la arcada dental, lo que los hace más susceptibles al desgaste mecánico durante el cepillado y a la exposición a estímulos térmicos y químicos. La zona vestibular cervical es particularmente vulnerable debido a la delgada capa de esmalte y la proximidad de la dentina a la superficie, lo que facilita la transmisión de estímulos dolorosos. Sin embargo, es importante notar que la hipersensibilidad dentinaria no está restringida a estas áreas específicas. Cualquier diente que experimente recesión gingival, erosión, abrasión o restauraciones deficientes puede desarrollar sensibilidad.¹⁸¹

4.5. DIAGNÓSTICO

El diagnóstico de la hipersensibilidad dentinaria comienza realizando un historial médico exhaustivo del paciente, seguido de una exploración clínica detallada. Es fundamental considerar varios aspectos del dolor que el paciente experimenta, tales como la naturaleza del dolor, si es agudo, sordo o punzante.¹⁸²

También se debe evaluar la cantidad de dientes afectados y su ubicación en la boca, ya que esto puede proporcionar información clave sobre los factores etiológicos que contribuyen a la hipersensibilidad.

La intensidad del dolor es otro factor crítico que debe ser evaluado, ya que puede variar considerablemente entre los pacientes y puede influir en la elección del tratamiento. Además, es importante identificar los estímulos que desencadenan el dolor, como alimentos fríos, calientes, ácidos o azucarados, así como actividades cotidianas como el cepillado de dientes.

El diagnóstico de la hipersensibilidad dentinaria se complica significativamente cuando el paciente presenta simultáneamente pulpitis reversible y dentina expuesta. Tanto los dientes hipersensibles como las pulpas inflamadas exhiben muchos de los mismos síntomas, incluyendo sensibilidad al frío, al aire y al calor, lo que dificulta la diferenciación entre ambas condiciones.

No obstante, existen algunas diferencias clave que pueden ayudar en el diagnóstico diferencial. Por ejemplo, el dolor asociado con pulpitis reversible tiende a ser más prolongado, sordo y doloroso, además de estar mal localizado, en comparación con el dolor agudo y bien localizado de la hipersensibilidad dentinaria.

Este dolor pulpar suele durar más tiempo que el estímulo aplicado, persistiendo incluso después de la eliminación del estímulo que lo desencadenó.¹⁶⁴

Al realizar la historia clínica para diagnosticar la hipersensibilidad dentinaria, es fundamental plantear una serie de preguntas específicas para obtener una comprensión completa de la condición del paciente. Se debe indagar sobre el momento del inicio de la sensibilidad, lo cual puede ofrecer pistas sobre la causa subyacente de la hipersensibilidad. La intensidad del dolor es otro aspecto crucial a considerar, ya que puede variar significativamente de un paciente a otro y afecta directamente la calidad de vida.

Evaluar la estabilidad del dolor si es intermitente o constante también proporciona información valiosa sobre la naturaleza del problema dental. Además, es esencial identificar aquellos factores que reducen o aumentan la intensidad del dolor, como la exposición a ciertos alimentos o cambios en la temperatura, ya que esto puede ayudar a personalizar las estrategias de tratamiento

Para evaluar la sensibilidad, se utilizan estímulos térmicos potencialmente dolorosos aplicados al diente y ráfagas de aire. Estos estímulos son útiles para provocar una respuesta que puede ser medida y registrada de diversas maneras. Se puede utilizar la escala de Schiff, que cuantifica la respuesta de sensibilidad del paciente a los estímulos, o emplear descriptores verbales informados por el paciente, lo que proporciona una evaluación cualitativa del dolor percibido.¹⁸⁴

Esta evaluación detallada no solo ayuda en el diagnóstico preciso de la hipersensibilidad dentinaria, sino que también permite monitorizar la efectividad de los tratamientos aplicados y ajustar las intervenciones según sea necesario.

La escala de Schiff es una herramienta utilizada para cuantificar la respuesta del paciente a estímulos térmicos y aéreos aplicados a los dientes, ayudando a evaluar la hipersensibilidad dentinaria. Esta escala consta de cuatro grados que describen diferentes niveles de sensibilidad del paciente:

Grado 0: El sujeto no responde al estímulo aéreo, indicando la ausencia de sensibilidad detectable.

Grado 1: El sujeto responde al estímulo aéreo, pero no solicita la interrupción del estímulo. Esto sugiere una leve sensibilidad, pero tolerable para el paciente.

Grado 2: El sujeto responde al estímulo aéreo y pide su interrupción o se aleja de él. Este nivel refleja una sensibilidad moderada, donde el estímulo causa suficiente incomodidad para que el paciente desee que cese.

Grado 3: El sujeto responde al estímulo aéreo, considera que es doloroso, y pide la interrupción del estímulo. Este grado representa una alta sensibilidad, en la que el estímulo es percibido como doloroso y el paciente busca evitarlo de inmediato.

Se ha informado que el estímulo frío tiene mayor eficacia para activar los nervios dentinarios en comparación con el calor y el sondaje. Los estudios han demostrado que los nervios dentro de la dentina responden más rápidamente y con mayor intensidad a los estímulos fríos debido a la rápida conducción del frío a través de los túbulos dentinarios.

Esta respuesta aumentada al frío se debe a diversos factores, incluyendo la mayor capacidad del frío para inducir cambios rápidos en el flujo del fluido dentro

de los túbulos dentinarios, lo que activa las terminaciones nerviosas de manera más efectiva.

En contraste, los estímulos de calor y el sondaje tienden a provocar respuestas más lentas o menos intensas debido a la diferente dinámica de transmisión del estímulo en la dentina. Esta diferencia en la activación de los nervios es clave para diagnosticar y evaluar la hipersensibilidad dentinaria. El uso de estímulos fríos es, por lo tanto, una herramienta diagnóstica crucial en la práctica odontológica para identificar áreas de hipersensibilidad y determinar la severidad de la condición, permitiendo así una mejor planificación del tratamiento y manejo del dolor.¹⁸²

4.6. TRATAMIENTO

El tratamiento de la hipersensibilidad dentinaria tiene dos enfoques; ocluir túbulos dentinarios o bloquear la transmisión de impulsos en los nervios dentinarios.^{181,182}

- ❖ El primero se basa en colocar sustancias que formen depósitos y así ocluyan el túbulo.
- * El segundo enfoque se basa en ocluir de manera parcial los túbulos evitando que los estímulos externos produzcan cambios en el movimiento de los fluidos.¹⁶³

El tratamiento de la hipersensibilidad dentinaria tiene dos enfoques principales: la oclusión de los túbulos dentinarios y el bloqueo de la transmisión de impulsos en los nervios dentinarios.^{167,183}

El primer enfoque se basa en la aplicación de sustancias que forman depósitos en los túbulos dentinarios, logrando así su oclusión completa. Estos depósitos pueden estar compuestos por materiales como el fluoruro de sodio, el oxalato de potasio, o derivados de la arginina, los cuales precipitan dentro de los túbulos, dificultando el movimiento del fluido y aliviando el dolor.¹⁸⁵

El segundo enfoque se basa en ocluir de manera parcial los túbulos dentinarios, lo que evita que los estímulos externos provoquen cambios significativos en el movimiento de los fluidos dentro de los túbulos. Esto se puede lograr mediante el uso de agentes desensibilizantes como el nitrato de potasio, que reduce la excitabilidad de las terminaciones nerviosas intradentinarias, o

materiales adhesivos y selladores dentinarios que forman una barrera protectora a nivel de la superficie dentinaria.¹⁸⁶

Ambos enfoques tienen como objetivo final disminuir la respuesta dolorosa del paciente, mejorando su calidad de vida y facilitando el manejo clínico de la hipersensibilidad dentinaria.

Se han desarrollado varios tratamientos de la hipersensibilidad dentinaria:

-Terapia láser: el láser estimula funciones celulares normales, por tanto, estimula la producción de dentina esclerótica, obliterando de manera interna los túbulos.¹³⁷ En medios húmedos, provoca la deposición de sales insolubles de los túbulos expuestos por la evaporación del líquido dentinario. Este depósito es responsable de la obturación de los túbulos dentinarios, reduciendo la hipersensibilidad dentinaria.¹⁸⁷

-Cloruro de potasio: el uso de productos dentales que contienen estas sales resulta en una reducción notable de la sensibilidad en los dientes de los pacientes. Estos productos incluyen pastas dentales, enjuagues bucales y geles desensibilizantes, los cuales, al ser utilizados regularmente, ayudan a bloquear la transmisión de señales de dolor a través de los túbulos dentinarios, mejorando la calidad de vida de las personas afectadas por la sensibilidad dental.

Hoy en día, la mayoría de las pastas dentales desensibilizantes llevan sales de potasio como cloruro de potasio, citrato de potasio y nitrato de potasio.¹⁶³

Los estudios han revelado que las sales de potasio se mueven a lo largo de los túbulos dentinarios y bloquean la acción axónica de las fibras nerviosas, disminuyendo la excitabilidad del diente. Esta investigación ha demostrado que las sales de potasio, como el nitrato de potasio, son capaces de penetrar los túbulos dentinarios, que son pequeños canales presentes en la dentina, la estructura situada debajo del esmalte dental.

Estos túbulos dentinarios contienen fluido y terminaciones nerviosas que son responsables de transmitir sensaciones, incluyendo el dolor, cuando el diente es estimulado por factores externos como el frío, el calor o la presión. Cuando las sales de potasio ingresan en estos túbulos, provocan una despolarización sostenida de las membranas de las fibras nerviosas.

Este proceso de despolarización reduce significativamente la capacidad de las fibras nerviosas para generar y transmitir potenciales de acción, que son las señales eléctricas responsables de la percepción del dolor. Al mantener un estado de despolarización constante, las sales de potasio hacen que las fibras nerviosas se vuelvan menos sensibles a los estímulos externos, disminuyendo así la excitabilidad del diente.¹⁵⁷

-Los cementos de ionómero. Los cementos de ionómero de vidrio son materiales dentales ampliamente utilizados debido a sus propiedades beneficiosas, entre las cuales se destaca su capacidad para cubrir la dentina expuesta. Este mecanismo es fundamental en la reducción de la hipersensibilidad dentinaria, un problema común que afecta a muchos pacientes.

Cuando se aplica sobre la dentina expuesta, el cemento de ionómero de vidrio forma una capa protectora que cubre los túbulos dentinarios abiertos. Esta barrera física bloquea el paso de estímulos externos, como cambios de temperatura y sustancias químicas, hacia las terminaciones nerviosas.

Adhesión química a la dentina: a diferencia de otros materiales restaurativos, los cementos de ionómero de vidrio se adhieren químicamente a la dentina mediante la formación de enlaces iónicos entre los grupos carboxílicos del ácido poliacrílico y los iones de calcio de la dentina. Esta fuerte adhesión asegura que el sellado de los túbulos dentinarios sea duradero y efectivo.

Liberación de Flúor: una propiedad adicional de los cementos de ionómero de vidrio es su capacidad para liberar flúor de manera continua. El flúor ayuda a remineralizar la dentina y el esmalte circundante, fortaleciendo la estructura dental y potenciando la resistencia del diente a la caries y la sensibilidad.¹⁶⁶

-Fluoruro de Estaño (SnF₂). El fluoruro de estaño es un compuesto que se utiliza comúnmente en productos de higiene dental, como pastas dentales, debido a sus propiedades beneficiosas para la salud bucal. Uno de sus mecanismos de acción más destacados es su capacidad para ocluir los túbulos dentinarios, lo cual ha sido demostrado *in vitro* y es fundamental en la reducción de la hipersensibilidad dentinaria.

Precipitación de compuestos de estaño:

Al entrar en contacto con la superficie de la dentina, el fluoruro de estaño reacciona con los iones de fosfato y calcio presentes en el ambiente oral para formar

compuestos insolubles de estaño, como el fosfato de estaño. Estos compuestos se precipitan y depositan dentro de los túbulos dentinarios, bloqueándolos físicamente y evitando la transmisión de estímulos dolorosos.

Formación de una capa protectora: el fluoruro de estaño también puede formar una capa protectora en la superficie de la dentina. Esta capa actúa como una barrera adicional que previene la exposición de los túbulos dentinarios a factores externos.

Remineralización: el flúor en el fluoruro de estaño promueve la remineralización de la dentina y el esmalte dental, fortaleciendo la estructura del diente y reduciendo su susceptibilidad a la sensibilidad y a la caries.

Estudios *in vitro* han demostrado la efectividad del fluoruro de estaño en la oclusión de los túbulos dentinarios. Por ejemplo, investigaciones han mostrado que la aplicación de pastas dentales que contienen fluoruro de estaño resulta en una significativa reducción del diámetro de los túbulos dentinarios expuestos. Estas observaciones se basan en análisis microscópicos que revelan la formación de depósitos dentro de los túbulos después del tratamiento con fluoruro de estaño.¹⁸⁸

Aplicación de flúor; el barniz de fluoruro tópico es uno de los agentes más utilizados para tratar la hipersensibilidad dentinaria. Su efectividad se atribuye a la reacción producida entre el fluoruro de sodio y los iones calcio del líquido dentinario, formando cristales de fluoruro de calcio, que se depositan en la abertura de los túbulos dentinarios. Sin embargo, sus efectos son a corto plazo ya que se elimina por factores mecánicos y químicos.¹⁸⁸

Adhesivos dentinarios; gracias a los avances de agentes adhesivos dentinarios y la introducción de nuevas generaciones de estos adhesivos, se utilizan cada vez más para el tratamiento de la hipersensibilidad dentinaria; sellan los túbulos por la formación de la capa híbrida. Se debe a la alta humectabilidad de los agentes adhesivos de dentina, permitiendo la correcta penetración del agente en los túbulos y el sellado.¹⁸⁷ Los agentes adhesivos dentinarios ofrecen una desensibilización mejorada y más duradera que el flúor.¹⁸⁷

El estudio de Sabir et al. concluye que enjuagarse con 30 ml de leche a temperatura ambiente cinco veces al día puede ser utilizado como un agente desensibilizante eficaz para reducir la hipersensibilidad dentinaria. Los resultados demostraron que este método natural disminuye significativamente el dolor

asociado a la exposición de los túbulos dentinarios. La efectividad de la leche se atribuye a su contenido de calcio y fósforo, que ayudan a remineralizar y fortalecer la dentina, y a la caseína, que forma una capa protectora sobre la superficie dental. Este enfoque ofrece una alternativa accesible y de bajo costo a los tratamientos desensibilizantes tradicionales, con el beneficio adicional de no presentar efectos secundarios adversos.¹⁶⁸

Agentes desensibilizantes, la caseína de proteína de leche se ha utilizado para desarrollar GC Tooth Mouse (Recaldent GC). Esta proteína láctea caseína fósforo péptido (CPP) se une con fosfato de calcio amorfo (ACP) de los dientes formando CPP-ACP estabilizado. Este CPP-ACP estabilizado puede remineralizar eficazmente las lesiones del esmalte del subsuelo, también puede ayudar a la prevención y tratamiento de la hipersensibilidad.¹⁸⁹

4.6.1. Hidroxiapatita en el tratamiento de la sensibilidad dentinaria

La hidroxiapatita (HA) juega un papel crucial en el tratamiento de la sensibilidad dentinaria debido a su capacidad para promover la regeneración y mineralización de los tejidos dentales.

Como un componente principal de la estructura ósea y dental, proporciona dureza y resistencia a estas estructuras. Está compuesta por átomos de calcio, fósforo e hidrógeno, con la fórmula química $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$. Resulta indispensable en la mineralización ósea y dental, contribuyendo a la integridad y durabilidad de los tejidos esqueléticos y dentales.¹⁹⁰

Regeneración ósea y dental: la HA no solo contribuye a la reparación dental, sino que también juega un papel fundamental en la regeneración ósea. En aplicaciones clínicas, los biomateriales basados en HA se utilizan para tratar defectos óseos y promover la formación de nuevo tejido óseo en áreas dañadas. Este proceso de regeneración ósea es esencial para la estabilidad dental, especialmente en casos de pérdida ósea debido a enfermedades periodontales o lesiones.

Mineralización de tejidos: la capacidad de la HA para facilitar la mineralización de tejidos es clave para su eficacia en el tratamiento de la sensibilidad dentinaria. La HA proporciona un entorno favorable para la deposición de minerales como el calcio y el fósforo, que son cruciales para la formación y mantenimiento de estructuras dentales y óseas saludables. Esta mineralización no solo ayuda a reparar el esmalte y la dentina, sino que también contribuye a la salud general de los tejidos dentales y óseos.

La HA se ha utilizado extensamente en odontología debido a su capacidad para promover la reparación y remineralización del esmalte dental, se aplica en diversas formas, como pastas dentales, geles y recubrimientos, con el fin de restaurar el esmalte dañado y proteger los dientes contra factores externos que pueden causar sensibilidad dental, actúa depositando minerales que reemplazan los que se han perdido debido al desgaste o erosión, fortaleciendo así la estructura dental y mejorando su resistencia a agresiones químicas y mecánicas.

Ha demostrado ser efectiva en el tratamiento de la sensibilidad dental debido a su capacidad para remineralizar y fortalecer el esmalte dental. Cuando los túbulos dentinarios quedan expuestos, ya sea por erosión del esmalte, recesión gingival u otros factores, los estímulos externos pueden llegar directamente a las terminaciones nerviosas dentro de la dentina, causando dolor. La hidroxiapatita actúa llenando y sellando estos túbulos, creando una barrera física que bloquea la transmisión de los estímulos dolorosos.

Además de su capacidad para bloquear los túbulos dentinarios, la hidroxiapatita también ayuda a remineralizar y fortalecer el esmalte dental. Al proporcionar una fuente de calcio y fosfato, los componentes principales de la hidroxiapatita, este compuesto promueve la formación de cristales de apatita en la superficie del esmalte, restaurando su estructura y resistencia.

Este proceso de remineralización no solo ayuda a reducir la sensibilidad dental, sino que también previene la formación de caries y la pérdida de tejido dental.¹⁹¹

Los productos desensibilizantes que contienen hidroxiapatita se pueden aplicar en consultorios dentales o usar en el hogar en forma de pastas dentales, enjuagues bucales o geles. Estos productos proporcionan un alivio rápido y duradero de la sensibilidad dental, permitiendo a los pacientes disfrutar de

alimentos y bebidas fríos o calientes sin experimentar dolor. Además, la hidroxiapatita es un compuesto biocompatible y seguro, lo que la convierte en una opción de tratamiento adecuada para la mayoría de las personas.

Integración con tratamientos avanzados: la combinación de HA con otros elementos bioactivos, como el germanio, puede potenciar aún más estos efectos beneficiosos. El germanio podría mejorar la capacidad de la HA para promover la remineralización y la regeneración de tejidos, ofreciendo una solución más eficaz para la sensibilidad dentinaria y la reparación ósea.

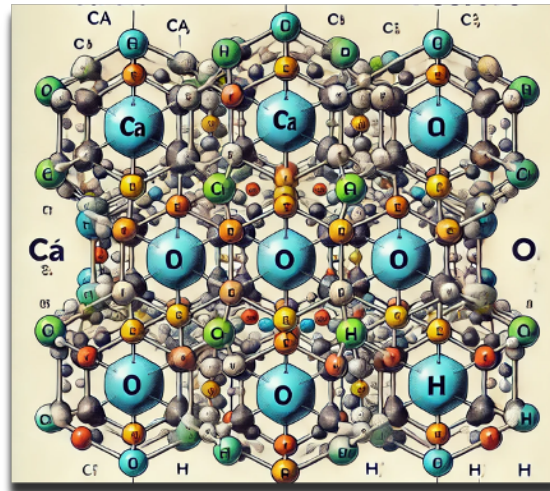


Figura 3. Arreglo atómico en la celda unitaria hexagonal de la hidroxiapatita, mostrando las posiciones atómicas del Ca, P, O e H dentro de la celda unitaria. Elaboración propia.

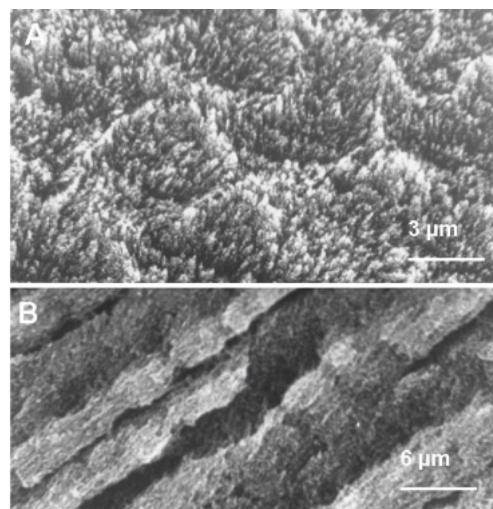


Figura 4. Prismas del esmalte dental humano en sección transversal (A) y en sección longitudinal (B). Adaptado de García-Garduño y Reyes- Gasga.²⁷⁸

Su uso en combinación con otros compuestos bioactivos puede ofrecer enfoques avanzados para mejorar la salud dental y ósea, y es esencial para una comprensión integral de su papel en la medicina regenerativa.

Si observamos longitudinalmente entre la unión amelodentinaria vemos estructuras longitudinales en forma de varillas micrométricas, denominadas prismas (Fig. 4).

Con observaciones a mayor amplificación usando microscopía electrónica de transmisión (MET), se observan cristales nanométricos correspondientes a la HAP (Fig. 4).

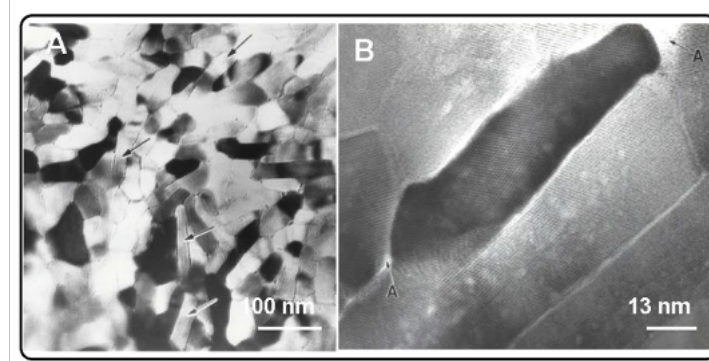


Figura 5. A) Cristales que conforman los prismas del esmalte dental humano. B) Mayor amplificación. Existencia de material orgánico rodeando los cristales de HAP. Adaptado de García-Garduño y Gasga.²⁷⁸

CAPÍTULO V – JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

V. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

5.1. JUSTIFICACIÓN

Al enriquecer la hidroxiapatita (HA) con germanio orgánico, se busca mejorar aún más las propiedades de la HA y potenciar la capacidad del material para imitar las características del hueso natural. La adición de germanio orgánico a la HA puede conferirle propiedades adicionales, como una mayor bioactividad y capacidad antioxidante, que son beneficiosas para la regeneración ósea y la salud dental en general.

El germanio orgánico ha demostrado tener efectos positivos en la promoción de la regeneración tisular y la cicatrización de heridas, lo que lo convierte en un candidato prometedor para mejorar las propiedades de la HA en aplicaciones biomédicas. Al combinar el germanio con la HA, se puede aprovechar su capacidad para estimular la actividad celular y mejorar la integración del material con los tejidos circundantes.

Además, la inclusión de germanio orgánico en la HA puede ayudar a fortalecer la estructura del material y mejorar su estabilidad a largo plazo. Esto es especialmente importante en aplicaciones dentales y ortopédicas, donde se requiere una alta resistencia mecánica y una integración adecuada con el tejido circundante para garantizar el éxito del tratamiento.

El presente estudio tiene como objetivo principal analizar los efectos de la adición de germanio orgánico a la hidroxiapatita (HA) en el contexto de aplicaciones biomédicas, específicamente en odontología y regeneración ósea.

El diseño experimental abordará aspectos cruciales, incluyendo la modificación de la superficie de la HA mediante la adición de germanio orgánico, la caracterización de las propiedades resultantes, y la evaluación de la biocompatibilidad y respuesta celular. Se emplearán técnicas analíticas avanzadas, como microscopía electrónica, espectroscopía, y pruebas de biocompatibilidad in

vitro, para obtener datos detallados sobre las interacciones entre la HA y el germanio orgánico.

El estudio se fundamenta en la exploración de posibles beneficios en términos de osteointegración, resistencia mecánica y propiedades bioactivas. Además, se prestará especial atención a la seguridad y toxicidad potencial asociada con la adición de germanio orgánico, considerando experiencias previas en este campo.

Se espera que los resultados de este estudio contribuyan al conocimiento actual sobre la ingeniería de biomateriales y la regeneración ósea, proporcionando información valiosa para el desarrollo de terapias mejoradas en el ámbito odontológico. La comprensión detallada de las interacciones entre la HA y el germanio orgánico podría abrir nuevas perspectivas en la mejora de los biomateriales utilizados en procedimientos de regeneración ósea, promoviendo avances significativos en el campo de la salud oral y la cirugía maxilofacial.

5.2. OBJETIVOS

Los objetivos de presente estudio se dividirán en dos partes, una centrada en estudios in vitro y otra en estudios con humanos.

Este trabajo comprende dos estudios distintos centrados en la evaluación de los efectos de la hidroxiapatita (HA) en combinación con germanio orgánico.

El primer estudio se enfoca en investigar los efectos in vitro de esta combinación sobre la regeneración ósea, explorando cómo la presencia de germanio puede influir en las propiedades y capacidad regenerativa de la HA en un entorno controlado de laboratorio.

Por otro lado, el segundo estudio se dirige a analizar cómo esta misma combinación puede afectar la sensibilidad dentinaria, explorando su potencial para reducir la respuesta dolorosa asociada a la exposición de los túbulos dentinarios.

5.2.1. Objetivos In Vitro

5.2.1.1. *Objetivo principal In Vitro*

Evaluar las propiedades estructurales, morfológicas y composicionales de la hidroxiapatita antes y después de la adición de germanio orgánico mediante técnicas avanzadas de análisis, como microscopía electrónica, espectroscopía y difracción de rayos X.

5.2.1.2. *Objetivos secundarios In Vitro*

1. Evaluar la biocompatibilidad de la combinación de hidroxiapatita y germanio para el crecimiento de células madre mesenquimales derivadas de médula ósea (BM-MSC).
2. Investigar la capacidad de la hidroxiapatita y el germanio para la liberación controlada de fármacos.
3. Analizar la adhesión de proteínas y el depósito de minerales en la superficie de la combinación de hidroxiapatita y germanio.
4. Analizar la bioactividad y respuesta celular: para lograr dicho propósito se va a investigar la capacidad de la HA modificada para favorecer la adhesión, proliferación y diferenciación celular in vitro, mediante ensayos específicos y observación microscópica.
5. Evaluar la liberación de factores bioactivos.
6. Cuantificar la liberación controlada de factores bioactivos por parte de la HA enriquecida con germanio orgánico en entornos in vitro simulados.
7. Investigar la Bioactividad y Respuesta Celular en Ambientes In Vitro. Realizar ensayos in vitro para evaluar la bioactividad de la HA enriquecida con

germanio orgánico, examinando la respuesta celular, la viabilidad y la liberación de factores de crecimiento en entornos simulados.

8. Estudiar la biocompatibilidad y toxicidad. Realizar ensayos in vitro para determinar la biocompatibilidad de la HA con germanio orgánico, investigando posibles efectos adversos y toxicidad celular.
9. Optimizar los procedimientos de fabricación y síntesis. Identificar y optimizar los métodos de síntesis y fabricación para garantizar la uniformidad y reproducibilidad de la HA enriquecida con germanio orgánico.

5.2.2. Objetivos en humanos

5.2.2.1. Objetivo principal en humanos

Evaluar la eficacia de una crema formulada con hidroxiapatita y germanio orgánico (Ge-132) en el tratamiento de la sensibilidad dentinaria en pacientes.

5.2.2.2. Objetivos secundarios en humanos

1. Estudiar la aplicabilidad clínica en humanos. Investigar la viabilidad y aplicabilidad clínica de la HA con germanio orgánico en procedimientos odontológicos en pacientes humanos.
2. Contribuir al Conocimiento Científico y Clínico. Aportar a la literatura científica y clínica con resultados sólidos y conclusiones respaldadas por estudios clínicos, contribuyendo al conocimiento en el campo de biomateriales para regeneración ósea en la práctica clínica.

Estos objetivos buscan abordar aspectos cruciales relacionados con la modificación de la HA con germanio orgánico, desde la caracterización de propiedades hasta la evaluación de su potencial aplicación clínica. Cada objetivo contribuirá a la comprensión global de cómo esta combinación podría influir

positivamente en la regeneración ósea y la aplicación en procedimientos odontológicos.

CAPÍTULO VI – MATERIAL Y METODOS

VI. MATERIAL Y METODOS

6.1. IN VITRO

6.1.1. Materias primas y composición

Las materias primas para el presente estudio fueron germanio comercial, sesquióxido de 2-carboxietil germanio ($(\text{GeCH}_2\text{CH}_2\text{COOH})_2\text{O}_3$) (Cat No. 21030164 Japan algae Co., Ltd., Tokio, Japón) y HA sintetizado.

6.1.2. Síntesis de hidroxiapatita

El HA se sintetizó mediante una reacción en estado sólido a partir de una mezcla estequiométrica de hidrógeno fosfato de calcio anhidro (CaHPO_4 , Sigma, St. Louis, MO, EE. UU.) y carbonato de calcio (CaCO_3 , Sigma, St. Louis, MO, EE. UU.) con un promedio tamaño de partícula $< 15 \mu\text{m}$ y relación Ca/P de 1,72. La mezcla de CaHPO_4 y CaCO_3 se calentó en un platino crisol a 1200°C durante 6 h a una velocidad de calentamiento de $10^\circ\text{C}/\text{min}$ seguido de una velocidad de enfriamiento de $6,5^\circ\text{C}/\text{min}$ hasta temperatura ambiente. El material obtenido se molió hasta un tamaño medio de partícula de $4,8 \mu\text{m}$ (Mastersizer APA 2000 E Ver. 5.20, número de serie: MAL1013724, Malvern Instruments Ltd., Malvern, Reino Unido).

6.1.3. Fabricación de compuesto HA-Ge

Los respectivos componentes se pesaron y secaron completamente en un molino mezclador con bolas de PSZ-zirconia. Después del proceso de molienda, la mezcla de polvo se prensó isostáticamente en frío a 200 MPa. La presión se

mantuvo durante 30 min, después de lo cual se despresurizó lentamente a 1 atmósfera. En total, se fabricaron cuatro tipos de muestras: control (100 % HA), HA-1 % Ge (99 % HA con 1 % Ge), HA-3 % Ge (99 % HA con 3 % Ge) y HA-5 % Ge (99 % HA con 5 % Ge).

6.1.4. Caracterización compuesta

Los materiales se caracterizaron mediante difractómetro de rayos X (XRD) (Bruker-AXS D8Advance, Karlsruhe, Alemania), se realizaron análisis de las materias primas y los compuestos cerámicos para determinar la cristalografía y la identificación de fases utilizando radiación Cu-Ka a 40 kV y 30mA. Las exploraciones se realizaron con valores de 2θ que varían de 5° a 65° a una velocidad de $0,05^\circ/\text{min}$.

El tamaño de partícula promedio de HA se estimó mediante una prueba de distribución de tamaño de partícula utilizando granulometría (Mastersizer APA 2000 E). La morfología compuesta de HA-Ge se realizó mediante microscopía electrónica de barrido en un dispositivo SEM-Hitachi S-3500N con espectroscopía de rayos X de dispersión de energía (EDS-INCA, Oxford Instruments Analytical, Wycombe, Reino Unido).

6.1.5. Propiedades mecánicas

La resistencia a la compresión del biomaterial HA-Ge se determinó utilizando un analizador de textura (Modelo: Brookfield, Modelo CT3 50K, Middleborough, MA, EE. UU.).

Brevemente, los biomateriales con $10\text{ mm} \times 9\text{ mm}$ se colocaron en el soporte de la muestra y se aplicó fuerza potencial utilizando un émbolo conectado a los instrumentos y se midió la resistencia a la compresión de HA-Ge mediante el cálculo de las curvas de tensión-deformación.

6.1.6. Solubilidad

La solubilidad del biomaterial HA-Ge se evaluó en diferentes medios, como agua, medios de cultivo PBS y DMEM. Se midió el peso inicial (W_0) de las muestras después de secarlas a 60 °C durante 5 h y las muestras se sumergieron en el medio anterior durante 7 días.

Luego, las muestras se secaron a 60 °C durante 5 h y se midieron los pesos finales (W_7). El porcentaje de solubilidad de la muestra se midió mediante la siguiente fórmula. Todos los pesos de las muestras se normalizaron a 1 g para comparación.

$W_s = ((W_0 - W_7)/W_0) \times 100$, donde W_s -porcentaje de solubilidad en agua, W_0 y W_7 - peso inicial y final de las muestras, respectivamente.

6.1.7. Tasa de absorción de agua

La tasa de absorción de agua del biomaterial HA-Ge se midió siguiendo el método anterior.¹³¹ Brevemente, las muestras se secaron a 37 °C durante 36 h y se pesaron antes de sumergirlas en agua destilada. Las muestras se sumergieron en agua destilada durante 2 horas a 37 °C y se pesaron en húmedo después de eliminar suavemente el exceso de agua adherido a la superficie con papel de filtro. La tasa de absorción de agua se calculó de acuerdo con la siguiente ecuación.

$WAR = (W_w - W_d)/W_d \times 100 \%$, donde W_w y W_d son los pesos húmedo y seco de las muestras, respectivamente.

6.1.8. Tasa de hinchazón

La tasa de hinchamiento del biomaterial HA-Ge se midió calculando el área superficial de los biomateriales antes y después de sumergirlos en solución salina tamponada con fosfato (PBS) (Labclinics, Barcelona, España). El porcentaje de tasa de hinchamiento se calculó utilizando la fórmula:

$SR = ((Aa - Ab)/Ab) \times 100$, donde Ab y Aa son el área de los biomateriales antes y después de la inmersión, respectivamente.

6.1.9. Degradación in vitro

La tasa de degradación del biomaterial HA-Ge se midió siguiendo el método anterior¹⁴⁰ con una ligera modificación.

Brevemente, las muestras de biomaterial se sumergieron en 3 mL de Tripsina (Labclinics, Barcelona, España) y se inició la digestión enzimática incubando a 37 °C. El peso inicial de la muestra (Wi) se midió después de la inmersión en solución de tripsina y el peso de las muestras degradadas (Wd) se midió periódicamente para calcular el porcentaje de degradación.

$$\text{Tasa de degradación} = ((Wi - Wd)/Wi) \times 100$$

6.1.10. Contacto de ángulo de agua

La humectabilidad de la muestra se midió por los ángulos de contacto con el agua usando análisis de forma de gota a temperatura ambiente.

Brevemente, se dejaron caer 5 µL de agua desionizada sobre la superficie de las muestras y se calcularon los ángulos de contacto en ambos lados de la gota. Previo al experimento, las muestras fueron aclimatadas a temperatura ambiente (con una HR del 60%) para el equilibrio de humedad.

6.1.11. Capacidad de adsorción de proteínas

La capacidad de los biomateriales para absorber proteínas funcionales en su superficie se evaluó mediante la prueba del azul brillante de Coomassie (CBB) siguiendo el método anterior.¹⁹²

Brevemente, los biomateriales se trataron con etanol concentrado durante la noche para modificar la caracterización de la superficie y los biomateriales tratados

con etanol y sin tratar se incubaron en 1 ml de suero bovino fetal (Lote No. 2445724RP, Gibco, Carlsbad, CA, EE. UU.) a 37 ° C durante la noche, se lavó con PBS tres veces, se fijó con paraformaldehído al 4 % durante 15 min y las proteínas absorbidas en la superficie se tiñeron con CBB G-250 (0,25 % CBB G-250 en metanol/agua/ácido acético, relación de volumen 40:50:10 mezcla) durante 30 min.

Después de la tinción, los biomateriales se destiñeron con una mezcla de metanol/agua/ácido acético durante la noche. Luego, las muestras se trituraron en PBS y el sobrenadante se midió a 590 nm. La cantidad de proteína absorbida en la superficie del biomaterial HA-Ge se calculó en función de la curva de absorción de la proteína estándar con diferentes concentraciones, como se informó anteriormente.¹⁹³

6.1.12. Bioactividad

La eficiencia de HA-Ge en la mineralización se evaluó mediante el método de Kokubo et al. usando fluido corporal simulado (SBF).¹⁹¹ El SBF (pH 7.4) se preparó siguiendo exactamente los mismos pasos y recetas, tal como lo recomiendan Kokubo et al.¹⁹⁴ Las muestras se incubaron verticalmente en tubos falcon de 50 mL con SBF durante 28 días a 37 °C con cambio de medio cada 3 días una vez.

Luego, las muestras se lavaron suavemente con agua destilada tres veces y se tiñeron con rojo de alizarina para visualizar la deposición mineral en la superficie. La cantidad de tasa de tinción se midió ópticamente mediante espectrofotometría UV-Vis (Bio Tek Instruments Inc., Winooski, VT, EE. UU.) a 450 nm restando el valor de control (muestras sin tratamiento con SBF).

Para la cuantificación, la tinción de rojo de alizarina se disolvió en una mezcla de metanol (20 %) y ácido acético (10 %) en agua durante 20 min.¹⁹⁵

6.1.13. Comportamiento de liberación de drogas

El patrón de liberación del fármaco del biomaterial HA-Ge se realizó variando parámetros como el pH y los disolventes. Brevemente, los biomateriales se sumergieron en una solución con diferentes pHs 1, 3, 5, 7 y 9, respectivamente, durante 5, 20, 40, 60, 80 y 100 min.

Además, el patrón de liberación de fármaco del biomaterial se determinó en un sistema de solvente diferente, como PBS, medio de cultivo DMEM y fluido corporal simulado durante 5, 15, 30, 45, 60, 75 y 90 min. El fluido corporal simulado se preparó según las instrucciones de Kokubo et al.¹⁹⁴ En cada punto de tiempo, la tasa de liberación de germanio en el sobrenadante se midió a 215 nm (según lo determinado por la absorción espectral del polvo de germanio, figura complementaria S1).

La cantidad de germanio liberado en el sobrenadante se calculó a partir de la curva estándar (Figura complementaria S2) obtenida con diferentes concentraciones de germanio 0,3125, 0,625, 1,25, 2,5, 5 y 10 mg/ml, respectivamente.

6.1.14. Cultivo celular in vitro

La biocompatibilidad de los biomateriales de HA-Ge se evaluó mediante cultivos celulares in vitro de BM-MSC. Las células se aislaron de tres pacientes sanos programados para cirugía ortopédica electiva de acuerdo con los criterios establecidos por la Sociedad Internacional de Terapia Celular.

La caracterización de la superficie de las células utilizando los marcadores CD73, CD90, CD105, CD44 y CD14/19/34/45 ya se informó en nuestro trabajo anterior.¹⁹⁶

Las BM-MSC se cultivaron según el protocolo de cultivo celular estándar utilizando medio DMEM complementado con FBS al 10 % y antibióticos al 1 % (P/S) a 37 °C en una incubadora con CO₂ al 5 %. En primer lugar, las células se trataron con germanio (0,001, 0,01, 0,25, 0,5, 1, 5 y 10 mg/mL) e hidroxiapatita (0,01, 0,1, 0,25,

0,5, 1, 5 y 10 mg/mL) en diferentes concentraciones. a 37 °C durante 7 d en placas de 48 pocillos.

Al mismo tiempo, las células se cultivaron con recubrimiento de HA-Ge disc o composites (1 mg/mL) en placas de 24 pocillos a 37 °C durante 7 d. La proliferación y la morfología de las BM-MSC se evaluaron según el protocolo estándar utilizando métodos automatizados de contador de células Invitrogen (Countess 3 FL, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EE. UU.) y tinción (H&E y FITC-DAPI), respectivamente.

6.1.15. Densidad de carga celular

Las BM-MSC con una densidad celular de 5×10^4 se sembraron encima de los biomateriales para evaluar la cantidad máxima de capacidad de carga celular del compuesto HA-Ge. Después de 6 h de incubación en una incubadora de CO₂ a 37 °C, los biomateriales se trasladaron a un nuevo pozo y las células adherentes se contaron después de la tripsinización utilizando un contador de células automatizado. Los valores porcentuales se calcularon a partir de la densidad de siembra de BM-MSC.

6.1.16. Análisis estadístico

Todos los experimentos se repitieron al menos tres veces y los datos se representaron como media y desviación estándar. El análisis estadístico se realizó mediante ANOVA utilizando GraphPrism 9.0.1 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, EE. UU.). Se consideró significación estadística un valor de p inferior a 0,05.

6.2. ESTUDIO EN HUMANOS

El estudio ha sido aprobado por el comité de ética de la Universidad Católica San Antonio de Murcia (UCAM), cumpliendo con todos los requisitos y procedimientos necesarios para asegurar el bienestar y la integridad de los participantes. Número de referencia CE042006. (Viese **Anexo 1**)

La investigación se efectuó en la clínica universitaria odontológica de la Universidad Católica de san Antonio Murcia (UCAM) en el periodo comprendido de enero de 2021 a mayo de 2021.

Evaluación Clínica Piloto de la Eficacia de una Nueva Formulación con HA y Germanio Orgánico en el Tratamiento de la Hipersensibilidad Dentinaria: estudio con Muestra de 10 Pacientes

No existen trabajos previos y no hay aplicaciones comerciales.

La hipersensibilidad dentinaria es una condición común que afecta la calidad de vida de muchos individuos. Este estudio clínico piloto se enfoca en la evaluación de una nueva formulación de pasta dental enriquecida con hidroxiapatita (HA) y germanio orgánico como posible tratamiento para la hipersensibilidad dentinaria.

La muestra incluye a 10 pacientes, cuya hipersensibilidad se evalúa mediante pruebas de respuesta a estímulos térmicos. Los participantes califican el dolor en una escala visual analógica (EVA) de 0 a 3, proporcionando una medida cuantitativa del nivel de hipersensibilidad experimentado.

6.2.1. Metodología

1. Para llevar a cabo este estudio, se seleccionaron 17 pacientes de la Clínica Universitaria de la Universidad Católica San Antonio de Murcia (UCAM) con un diagnóstico clínico confirmado de sensibilidad dentinaria, evaluado mediante la aplicación de estímulos térmicos y táctiles, y corroborado por el Índice de Schiff.

2. Pruebas: Se realizan pruebas de respuesta a estímulos térmicos antes de la aplicación de la pasta dental y en intervalos definidos después del tratamiento.

3. Registro de dolor. Los participantes registran el nivel de dolor en la escala visual analógica (EVA) en respuesta a estímulos térmicos específicos.

4. Recolección de datos. Se recopilan datos cuantitativos y cualitativos a lo largo del estudio.

5. Mediciones. Las mediciones se realizan el día de la primera visita, y luego a los 7, 14 y 30 días, obteniendo un total de 4 mediciones.

6.2.2. Desglose de la muestra

En el estudio, se comenzó con un total de 17 pacientes, quienes fueron seleccionados para participar en la investigación. No obstante, a lo largo del estudio se produjo un total de 7 deserciones. De estas deserciones, 6 pacientes abandonaron el estudio de manera voluntaria por diversas razones personales no especificadas en el registro.

Además, un paciente experimentó disnea en la primera semana de participación, lo que condujo a su retiro del estudio por motivos de salud. Como resultado, la muestra final para el análisis quedó constituida por 9 pacientes que completaron satisfactoriamente todas las etapas del estudio.

Para evaluar la efectividad del tratamiento, se llevaron a cabo mediciones de hipersensibilidad dentinaria en momentos específicos. Estas mediciones se realizaron en cuatro puntos temporales: inicialmente antes del tratamiento, lo que sirvió como línea base para futuras comparaciones; posteriormente, a los 7 días, para evaluar los efectos a corto plazo; a los 14 días, para observar la evolución intermedia; y finalmente, a los 30 días, con el objetivo de analizar los resultados a mediano plazo.

Este diseño de medición permitió una evaluación detallada de los cambios en la hipersensibilidad dentinaria a lo largo del tiempo, proporcionando una visión comprensiva de la efectividad del tratamiento aplicado.

6.2.3. Próximos pasos

Los datos recopilados de los 9 pacientes que completan el estudio se analizan en detalle para evaluar la efectividad de la nueva formulación con hidroxiapatita y germanio orgánico en la reducción de la hipersensibilidad dentinaria. El seguimiento a lo largo del tiempo permite observar posibles tendencias y cambios en la percepción del dolor, proporcionando información valiosa sobre la durabilidad y eficacia a largo plazo del tratamiento propuesto.

Es importante tener en cuenta que la información preliminar ofrece una visión general de la situación del estudio, y los análisis más detallados se llevan a cabo en fases posteriores para garantizar la validez y la robustez de los resultados obtenidos.

6.2.4. Criterios de selección

6.2.4.1. Criterios de inclusión

Los criterios de inclusión para el estudio fueron claramente definidos para garantizar la selección de participantes adecuados. En primer lugar, se aceptaron pacientes con hipersensibilidad dentinaria sin importar su edad o sexo, lo que permitió una muestra diversa y representativa de la población afectada por esta condición. Además, era esencial que los pacientes tuvieran la disponibilidad necesaria para asistir a todas las revisiones programadas durante el estudio, asegurando así un seguimiento continuo y coherente de su condición.

Se buscó también que los pacientes mostraran un interés genuino y un alto nivel de implicación en el estudio, lo que se consideró crucial para la adherencia al protocolo de investigación y para la obtención de datos fiables y consistentes. Un requisito fundamental fue la firma del consentimiento informado, asegurando que todos los participantes estuvieran plenamente conscientes de los objetivos, procedimientos, beneficios y posibles riesgos del estudio, cumpliendo con los estándares éticos y legales necesarios.

Por último, se especificó que los pacientes debían presentar hipersensibilidad dentinaria en al menos dos dientes. Este criterio garantizó que los efectos del tratamiento pudieran ser evaluados de manera significativa en más de una ubicación dental, proporcionando una mayor robustez a los resultados obtenidos. Estos criterios de inclusión fueron diseñados para seleccionar una muestra que pudiera proporcionar datos valiosos y relevantes para la investigación sobre el tratamiento de la hipersensibilidad dentinaria.

6.2.4.2. Criterios de exclusión

Los criterios de exclusión fueron establecidos para asegurar que únicamente los pacientes que cumplían con los requisitos necesarios y que no presentaban condiciones que pudieran interferir con los resultados del estudio fueran incluidos. En primer lugar, se excluyeron aquellos pacientes que no presentaban hipersensibilidad dentinaria, ya que la condición específica que se estudiaba era esencial para la relevancia del tratamiento aplicado.

Asimismo, se excluyeron pacientes que no pudieran desplazarse o asistir a la secuencia de revisiones programadas, ya que la incapacidad de cumplir con el calendario de evaluaciones afectaría la consistencia del seguimiento y la recolección de datos. Además, los pacientes que no mostraban interés o implicación en el uso del gel utilizado en el estudio también fueron excluidos, dado que su falta de compromiso podría comprometer la adherencia al protocolo del estudio y la validez de los resultados.

Los pacientes que estaban sometidos a tratamiento de ortodoncia fueron excluidos para evitar cualquier interferencia de los aparatos ortodónticos con la evaluación de la hipersensibilidad dentinaria y el efecto del gel. Finalmente, se excluyeron mujeres embarazadas o en periodo de lactancia para prevenir cualquier posible riesgo asociado con el uso del gel durante estos periodos sensibles.

6.2.5. Anexos de información al paciente

En esta sección se incluyeron todos los anexos de información proporcionados a los pacientes. Estos documentos contuvieron detalles sobre el

estudio, incluyendo los objetivos, procedimientos, beneficios potenciales, y posibles riesgos asociados. Los anexos fueron diseñados para asegurar que los pacientes tuvieran una comprensión clara y completa del estudio antes de dar su consentimiento informado.

La información proporcionada también incluyó las instrucciones detalladas sobre el uso del gel y las pautas a seguir durante el estudio, garantizando así la adherencia al protocolo establecido y la seguridad de los participantes.

6.2.5.1. Anexo con las tablas de valoración del paciente

Cada paciente deberá completar diariamente un cuestionario proporcionado por los investigadores, el cual deberá ser entregado semanalmente. Este cuestionario incluye la escala visual analógica del dolor (VAS), que consta de 10 grados, donde 0 representa la ausencia de dolor y 10 el nivel de dolor más elevado. Además, los pacientes deberán indicar la causa del dolor (frío, calor, dulce, aire, táctil) y su localización específica.

6.2.5.3. Anexo con el cuestionario de información al paciente

Se proporciona una hoja informativa que contiene la siguiente información detallada:

-¿En qué consiste y para qué sirve?_Se trata de un estudio en el que se aplicará un gel para mejorar la sensibilidad dental, que contiene germanio. No se han registrado efectos adversos previos.

- ¿Cómo se realiza?_El gel se aplicará diariamente durante 30 días en la zona indicada por el odontólogo. Se realizarán evaluaciones a los 7, 14 y 30 días por parte del odontólogo.

- ¿Qué efectos le producirá? El gel tiene como objetivo mejorar o potenciar el efecto de la hidroxiapatita y el colágeno, componentes presentes en su formulación.

- ¿En qué le beneficiará?: Se espera mejorar la hipersensibilidad dentinaria.

- ¿Qué riesgos tiene?: No se han documentado efectos adversos ni riesgos significativos al aplicar el gel de germanio en seres humanos.

- ¿Situaciones especiales que deben ser tenidas en cuenta? El estudio no se realizará en pacientes embarazadas ni en aquellos que estén bajo tratamiento de ortodoncia.

- Otras informaciones de interés. El germanio también se utiliza para mejorar el funcionamiento del sistema inmune y posee propiedades antivirales y antiinflamatorias.

- Otras cuestiones para las que se solicita su consentimiento. Valorar el estado de los tejidos blandos y duros después de la aplicación del gel, así como el uso de los datos clínicos personales.

Este documento tiene como objetivo proporcionarle toda la información relevante sobre el estudio y solicitar su consentimiento informado para participar en el mismo.

6.2.5.3. Anexo con el consentimiento informado

Declara haber sido informado del estudio y procedimientos de la investigación del proyecto de la hipersensibilidad dentinaria, presentándose de manera voluntaria al mismo pudiendo abandonarlo en cualquier momento sin ningún perjuicio.

6.2.6. Procedimiento de recogida de datos

El estudio clínico se realiza en pacientes con hipersensibilidad dentinaria, con una muestra de 10 pacientes en los cuales se evalúa la sensibilidad dentinaria mediante sondaje y respuesta a estímulo térmico (frío). Los pacientes indicarán en una escala numérica del 0 al 3 el nivel de dolor que experimentan:

0: No hay respuesta al estímulo.

1: El paciente nota el estímulo, pero no hay dolor.

2: El paciente nota el estímulo y el dolor es moderado o se aparta del dolor

3: El paciente nota el estímulo y solicita que se interrumpa porque le duele mucho

Se han realizado mediciones ante los estímulos mencionados el día de la primera visita, a los 7, 14 y 30 días, obteniendo un total de 4 mediciones. A cada paciente se le administra un cuestionario para recoger la siguiente información: edad, sexo, hábito de fumar (número de cigarrillos por día), frecuencia de ingesta de bebidas carbonatadas, presencia de trastornos alimentarios, reflujo gastroesofágico habitual, hábitos de higiene dental (frecuencia diaria de cepillado, tipo de cepillo, dentífrico utilizado), y origen de la sensibilidad dentinaria (naturaleza, tratamiento periodontal, ortodoncia, entre otros).

A cada paciente se le entregará un consentimiento informado y una hoja explicativa (información para el paciente). Además, se proporcionará una hoja de seguimiento que deberá completar diariamente. Esta incluye una escala VAS (escala analógica visual) de 0 a 10, donde 0 representa ausencia de dolor y 10 indica dolor de máxima intensidad. También se utiliza una escala numérica del 0 al 10.

En el estudio, el paciente debe aplicarse el gel en la zona especificada por el odontólogo. Se realizarán citas de control cada 7, 14 y 30 días, durante las cuales se evaluará el grado de dolor ante un estímulo frío mediante una escala numérica del 0 al 3.

6.2.7. Variables del estudio

Tiempo de evolución, edad, origen de la hipersensibilidad (abfracciones, traumatismos, fracturas, espontáneos, etc).

6.2.8. Análisis de los datos

Los datos se expresaron mediante estadística descriptiva, en forma de medida y desviación estándar. Al ser un estudio piloto, se realiza la descripción de los casos y una valoración objetiva de los resultados obtenidos. No hay estadística comparativa.

CAPÍTULO VII – RESULTADOS

VII. RESULTADOS

7.1. IN VITRO

7.1.1. Caracterización

Las características, tales como solubilidad, rigidez, capacidad de retención de agua y degradación in vitro de las muestras de HA-Ge, se presentan en la Figura 1. La solubilidad de la muestra se evaluó en tres medios diferentes, como agua, PBS y DMEM, y los resultados mostraron que no se observaron cambios significativos entre el control (muestra de HA) y las muestras de prueba (excepto la muestra HA-5% Ge) en agua. Por el contrario, la solubilidad disminuyó ligeramente en la muestra HA-1% Ge, sin embargo, aumentó en la muestra HA-5% Ge incubada en agua, PBS y DMEM, respectivamente.

Es importante destacar que la muestra de HA con una mayor concentración de Ge fue más soluble en agua, en comparación con PBS o DMEM ($p > 0.05$). Notablemente, no se observaron cambios significativos en las propiedades de hinchamiento de los biomateriales de HA y HA-Ge durante todo el estudio.

En cuanto a la propiedad mecánica, la adición de Ge hasta un 3% no contribuyó a cambios significativos en la rigidez, aunque aumentó ligeramente la rigidez, y un 5% de Ge podría aumentar la rigidez (18.34 MPa), en comparación con la muestra de control HA (12.60 MPa). Al mismo tiempo, la capacidad de retención de agua de HA aumentó enormemente ($p < 0.05$) al incorporar un 5% de Ge, y el resto de las concentraciones no mejoraron la capacidad de retención de agua.

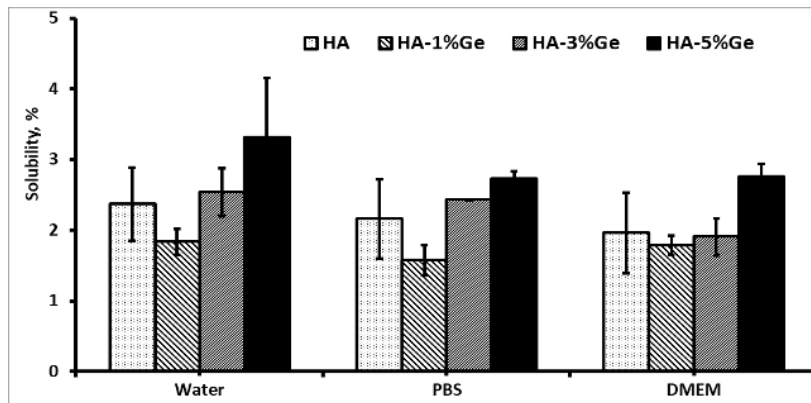


Figura 6. Solubilidad. Tomado de Elango et al., 2018.²²⁸

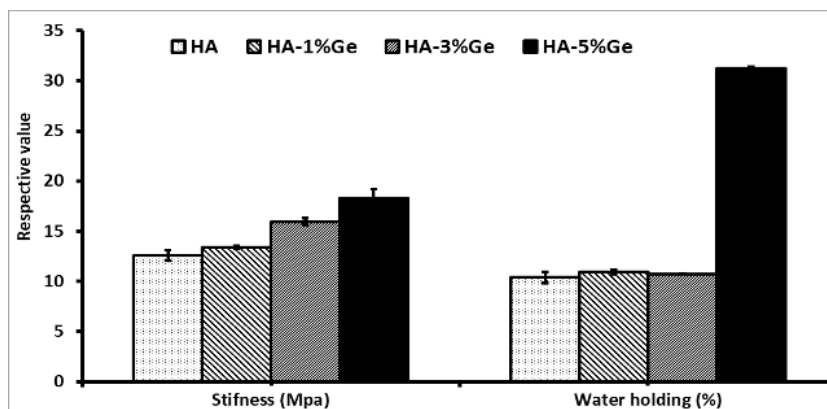


Figura 7. Rigidez, capacidad de retención de agua. Tomado de Elango et al., 2018.²²⁸

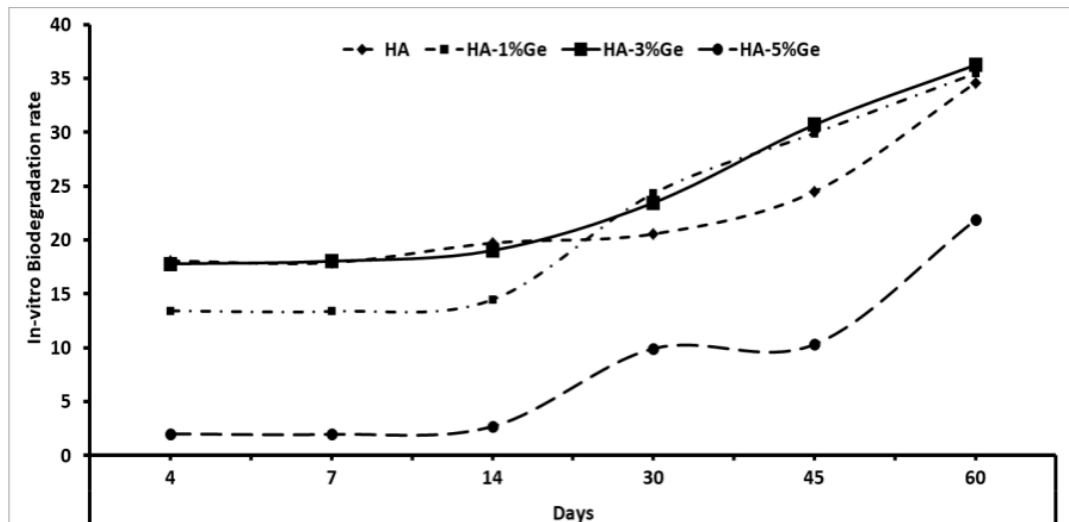


Figura 8. Degradación in vitro de los biomateriales de HA-Ge. Tomado de Elango et al., 2018.²²⁸

En general, la degradación enzimática no desintegró significativamente la molécula de HA, ya que la HA es un polímero mineral cerámico. Al igual que la solubilidad en agua, no hubo cambios en el patrón de degradación de los biomateriales de HA, HA-1% Ge y HA-3% Ge durante todo el estudio; sin embargo, el biomaterial HA-5% Ge mostró una mayor resistencia contra la degradación in vitro en comparación con la muestra de HA.

A los 60 días de tratamiento, los biomateriales HA, HA-1% Ge y HA-3% Ge se degradaron en un máximo del 35%, mientras que en el caso del biomaterial HA-5% Ge fue del 22%.

La Figura 9 muestra los patrones de difracción de rayos X de los compuestos HA-1% Ge, HA-3% Ge y HA-5% Ge biomateriales. Los patrones de difracción de rayos X de los biomateriales compuestos de HA mostraron

Los picos correspondientes con HA (datos estándar JCPDS de HA, tarjeta no. 09-0432) se observaron en los patrones de difracción de rayos X, independientemente de la adición de germanio, debido a que el porcentaje de

germanio no fue suficiente para ser detectado con el XRD (por debajo del límite de detección del XRD).

Los datos de granulometría mostraron que el tamaño de partícula promedio de la HA fue de 4.845 μm (el análisis de los resultados del informe de distribución del tamaño de partícula de HA y el EDX del germanio se presentan en las Figuras Suplementarias S3 y S4, respectivamente).

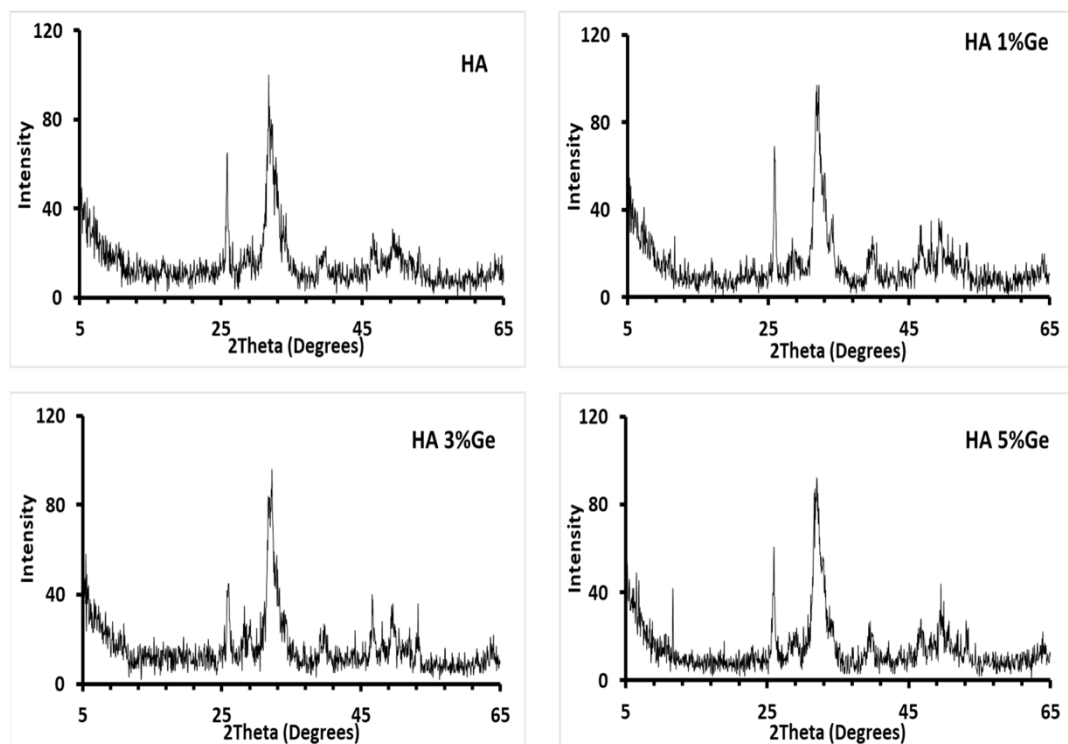


Figura 9. Patrones de Difracción de Rayos X de los Biomateriales Compuestos HA-Ge. Tomado de Elango et al., 2018. ²²⁸

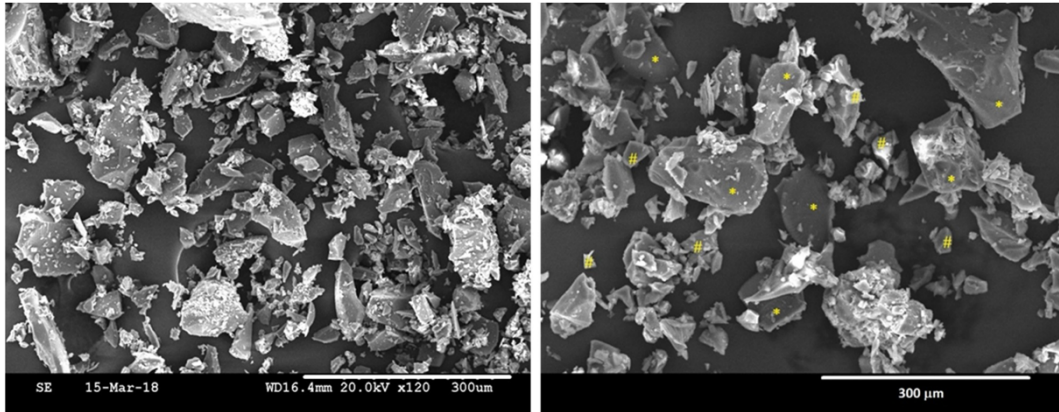


Figura 10. Imágenes SEM del polvo compuesto de Ge (A) y HA-5% Ge (B). Tomado de Elango et al., 2018.²²⁸

La Figura 10 muestra la morfología del compuesto HA-5%Ge antes de la prensa isostática como representante de todos los compuestos HA-Ge, ya que no se observaron muchas diferencias en la superficie de HA cargada con diferentes concentraciones. El compuesto estaba formado por partículas de HA (*) con bordes redondeados, y las partículas de Ge (#) mostraban bordes más marcados que la HA y eran más pequeñas en tamaño en comparación. El análisis EDX mostró que los materiales obtenidos eran HA estequiométrica con una relación Ca/P de ~1.66, y los compuestos eran una mezcla de partículas de HA y Ge (Tabla 2)

Tabla 2. Microanálisis EDX de los compuestos HA-Ge.

	Ca (atomic%)	P (atomic%)	Ge (atomic%)
HA	62.41	37.60	-
HA-1%Ge	61.78	37.22	1.01
HA-3%Ge	60.71	36.35	3.02
HA-5%Ge	59.3	35.72	5.01

Fuente: Elaboración propia.

HA-control, HA-1%Ge- HA con 1% de germanio, HA- 3%Ge- HA con 3% de germanio, y HA-5%Ge- HA con 5% de germanio.

7.1.2. Liberación del medicamento

Es crucial comprender el comportamiento de liberación de Ge por los biomateriales compuestos de HA para evaluar el comportamiento biológico. Por lo tanto, intentamos evaluar el comportamiento de liberación de Ge de la HA compuesta en diferentes medios, como SBF, DMEM y PBS, así como en diferentes niveles de pH durante un período determinado.

Como era de esperar, la tasa de liberación de Ge aumentó con el tiempo y la concentración en todas las muestras tratadas con diferentes medios y pH, sin embargo, el patrón de liberación de Ge fue diferente entre los grupos de prueba. Por ejemplo, se observó una mayor tasa de liberación de Ge en HA-3% Ge a pH 1 y 3, y en HA-5% Ge a pH 5, 7 y 9, respectivamente (Figura 11).

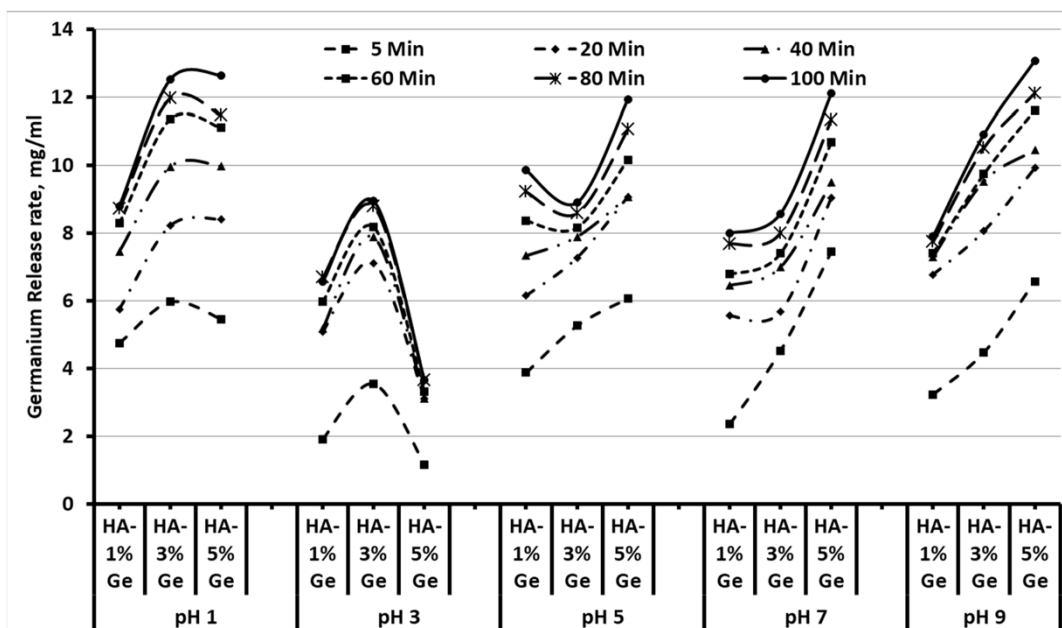


Figura 11. Patrón de liberación del medicamento de los biomateriales HA-Ge en diferentes niveles de pH. Tomado de Elango et al., 2018. ²²⁸

Entre todas las muestras probadas, la máxima liberación del medicamento se obtuvo en la muestra HA-5% Ge a pH 7 y pH 9. Al igual que en el pH, la tasa de liberación de Ge aumentó de manera constante en todas las muestras de prueba con respecto al tiempo de duración.

La tasa de liberación de Ge en PBS mostró una tendencia similar a la de SBF, liberando lentamente el Ge en el medio hasta los 90 minutos, y no se observaron muchos cambios a los 75 y 90 minutos. Por el contrario, se liberó una cantidad mínima de Ge en el medio DMEM hasta los 45 minutos y se observó una tasa de liberación repentina a los 60 minutos, y después disminuyó ligeramente a los 75 y 90 minutos en HA-3% Ge y HA-5% Ge. Todas estas variaciones no se observaron en HA-1% Ge, mostrando una ligera tasa de aumento de Ge a los 75 minutos. (Figura 12).

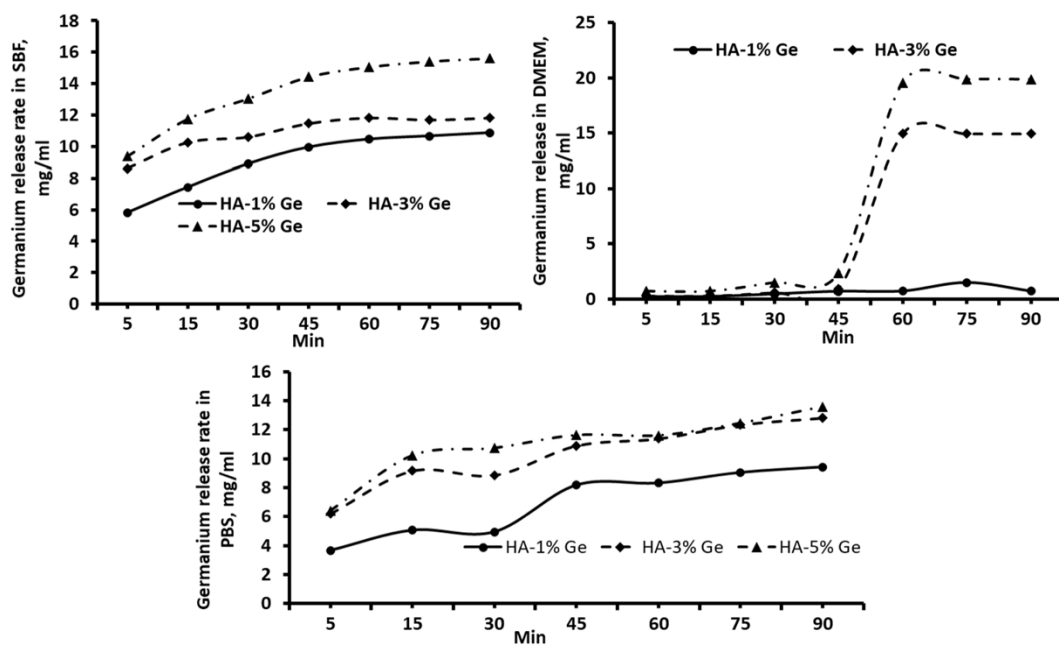


Figura 12. Patrón de liberación del medicamento de los biomateriales HA-Ge en diferentes medios. Tomado de Elango et al., 2018. ²²⁸

7.1.3. Prueba de ángulo de contacto

Los comportamientos hidrofílicos e hidrofóbicos de los biomateriales HA-Ge se probaron utilizando agua y glicerol, respectivamente (Figura 13). Como se muestra en la Figura 12, la adición de Ge pudo aumentar la naturaleza hidrofílica de la HA y, por lo tanto, reducir el ángulo de contacto con el agua, y, después de 15 s, el ángulo de contacto con el agua de todas las muestras de HA se volvió cero. Al mismo tiempo, la naturaleza hidrofóbica de la HA no cambió mucho con la incorporación de Ge, aunque el ángulo de contacto con glicerol aumentó ligeramente en las muestras de HA incorporadas con Ge.

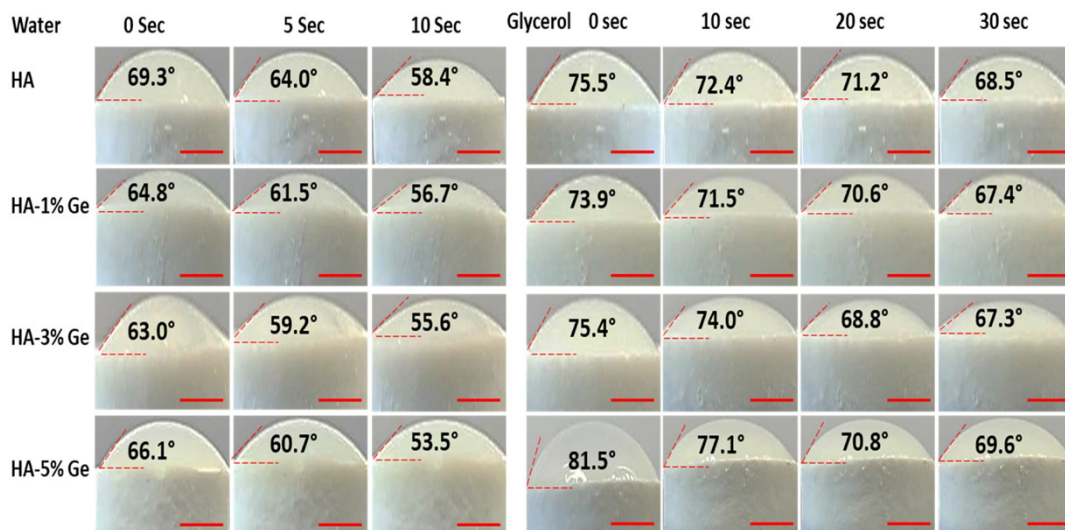


Figura 13. Comportamiento del ángulo de contacto de los biomateriales HA-Ge. Tomado de Elango et al., 2018.²²⁸

Se utilizó agua (10 s) y glicerol (30 s) para probar la naturaleza hidrofílica e hidrofóbica de los compuestos HA-Ge. HA—control, HA-1%Ge—HA con 1% de germanio, HA-3%Ge—HA con 3% de germanio, y HA-5%Ge—HA con 5% de germanio. Barra de escala—0.4 cm.

7.1.4. Capacidad de adsorción de proteínas

La capacidad de las muestras de HA-Ge para la adsorción de proteínas se evaluó utilizando el método de tinción con tinte CBB. En general, todas las muestras mostraron la capacidad de unirse potencialmente a la proteína del suero, y el tratamiento con etanol pudo aumentar la capacidad de adsorción de proteínas en la superficie de HA-Ge. Por ejemplo, la cuantificación de proteínas mediante UV-Vis a 590 nm mostró que la cantidad de proteína absorbida fue mayor en HA-Ge tratada con etanol en comparación con HA-Ge no tratada con etanol (Figura 14, 15), sin embargo, no se observó significancia estadística en la absorción de proteínas entre las muestras de HA-Ge tratadas con etanol.

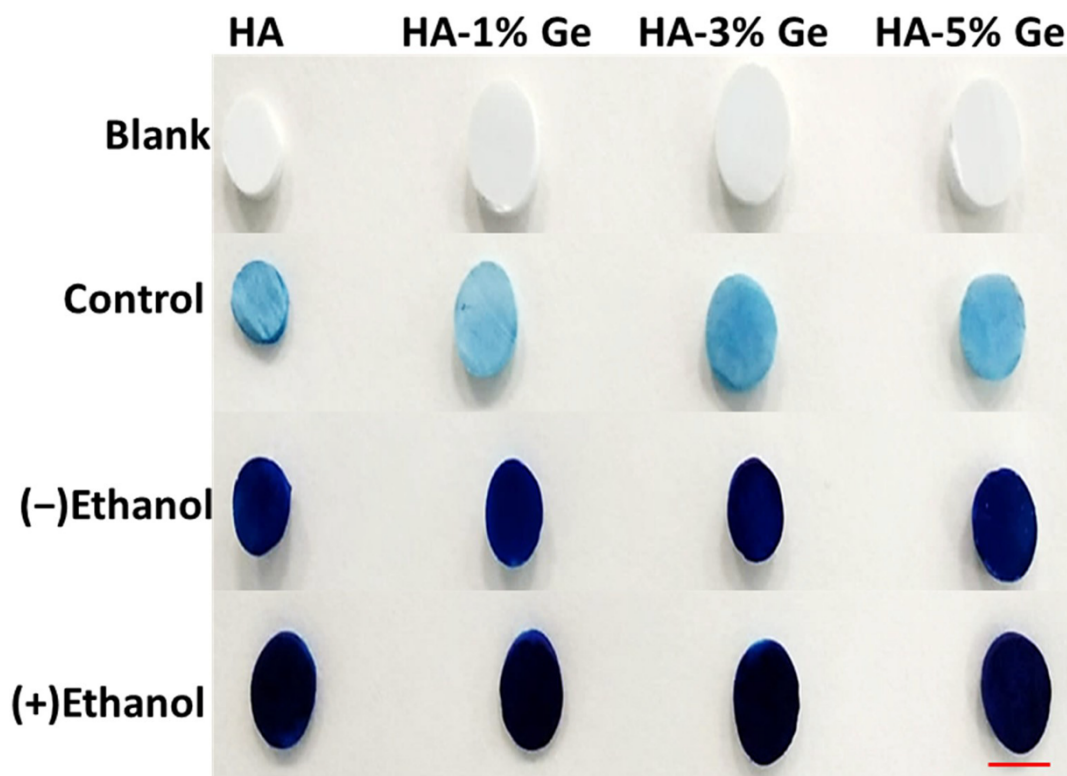


Figura 14. Capacidad de adsorción de proteínas de los biomateriales HA-Ge mediante la prueba de tinte CBB. Tomado de Elango et al., 2018.²²⁸

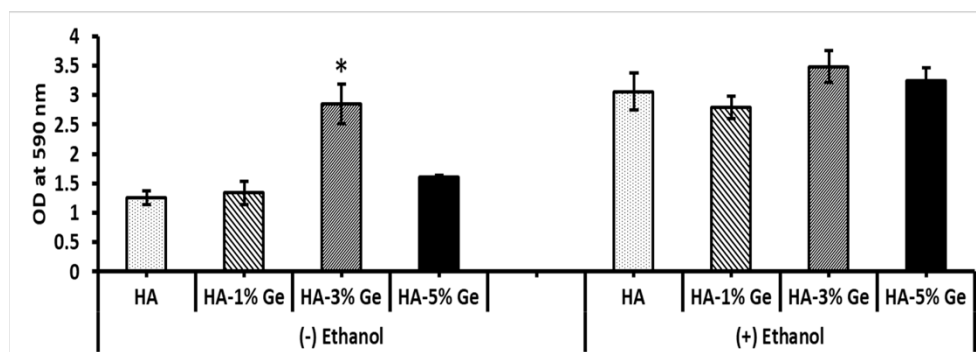


Figura 15. Evaluación de la intensidad de tinción de compuestos HA-Ge tratados con CBB y su absorción UV a 590 nm. Tomado de Elango et al., 2018.²²⁸

Composites de HA-Ge teñidos con CBB, Barra de escala—1 cm, (B) Intensidad de tinción con CBB en los compuestos HA-Ge mediante absorción UV a 590 nm. Blank—muestras sin ningún tratamiento, control—muestras no tratadas con FBS con tinte CBB, (-) Etanol: compuestos HA-Ge sin tratamiento con etanol y (+) Etanol: compuestos HA-Ge con tratamiento de etanol. HA-control, HA-1%Ge—HA con 1% de germanio, HA-3%Ge—HA con 3% de germanio y HA-5%Ge—HA con 5% de germanio. La absorción UV del control (2da fila en la imagen (A)) estuvo por debajo del rango medible. * indica significancia estadística, $p < 0.05$ vs. HA.

Por el contrario, HA-3% Ge no tratada tuvo una mayor absorción de proteínas ($p < 0.05$) que las demás muestras de HA-Ge no tratadas, y no se observó diferencia estadística entre las muestras de HA-3% Ge tratadas y no tratadas con etanol.

7.1.5. Bioactividad In-Vitro

Para evaluar el comportamiento de mineralización y favorecer la formación de la matriz extracelular, las muestras de HA-Ge se sumergieron en SBF durante 30 días, seguido de la cuantificación del mineral utilizando la tinción de alizarina roja. La deposición de la capa de apatita, compuesta principalmente por iones de calcio y fosfato, en la superficie de HA-Ge se visualizó mediante la tinción de alizarina roja y los resultados mostraron que la mineralización fue favorecida por todas las muestras, sin embargo, la cantidad de mineralización fue directamente proporcional a la concentración de Ge.

La formación de la capa de apatita aumentó con la concentración de Ge y el nivel de deposición de la capa de apatita fue mayor en HA-5% Ge en comparación con el control de HA ($p < 0.05$) (Figura 16,17). Como se muestra en la Figura 16, 17, se observó una estructura cristalina y morfología características en las muestras de HA con mayor concentración de Ge (3 y 5%).

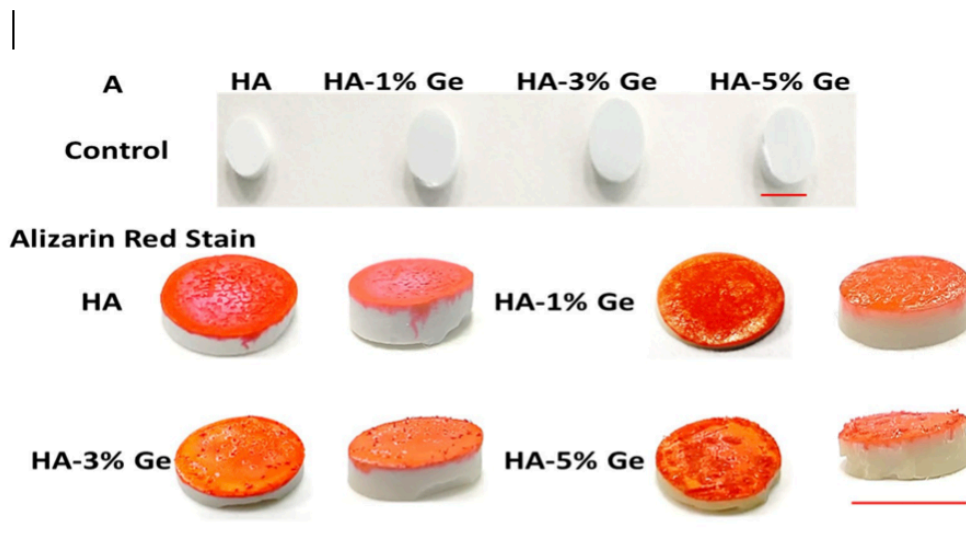


Figura 16. Bioactividad in vitro de los biomateriales HA-Ge después del tratamiento con SBF durante 28 días con tinción de alizarina roja. Tomado de Elango et al., 2018.²²⁸

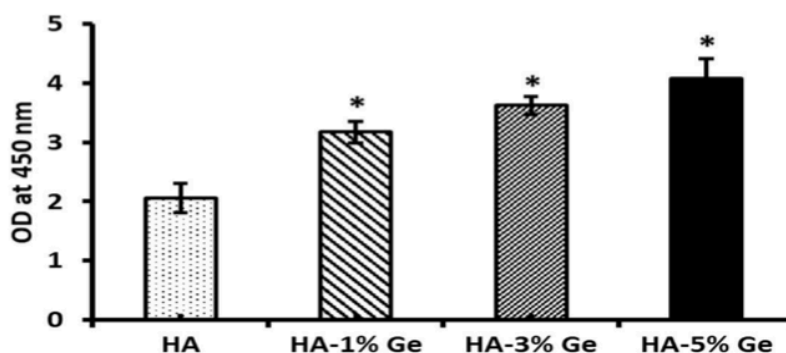


Figura 17. Bioactividad in vitro de los biomateriales HA-Ge—absorción UV de la tinción de alizarina roja 28 días. Tomado de Elango et al., 2018.²²⁸

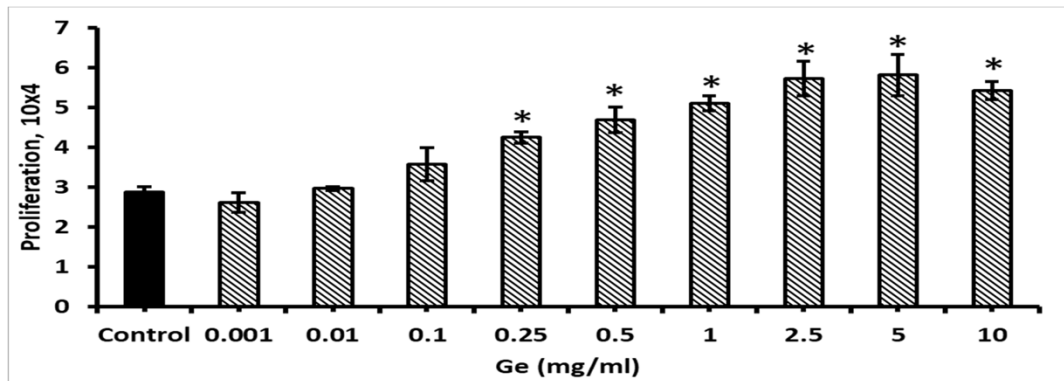
HA-control, HA-1%Ge—HA con 1% de germanio, HA-3%Ge—HA con 3% de germanio y HA-5%Ge—HA con 5% de germanio. La absorción UV del control (1ra fila en la imagen (A)) estuvo por debajo del rango medible. La bioactividad de HA se mejoró significativamente con la presencia de Ge. * indica significancia estadística $p < 0.05$ vs HA.

7.1.6. Efecto de Ge en las BM-MSCs

Para optimizar la concentración de Ge y su efecto en la proliferación de las BM-MSCs, se eligieron diferentes concentraciones de Ge (0.001, 0.01, 0.1, 0.25, 0.5, 1, 2.5, 5 y 10 mg/mL) para cultivar las BM-MSCs y evaluar mediante recuento celular, tinción H&E (Figura S5 del suplemento) y tinciones de fluorescencia.

Como era de esperar, el crecimiento de las BM-MSCs aumentó con el aumento de la concentración de Ge (Figura 9). En comparación con el control, no se observaron cambios significativos en el crecimiento celular de las BM-MSCs tratadas con 0.001–0.1 mg/mL de Ge, pero el aumento de la concentración de Ge desde 0.25 hasta 10 mg/mL estimuló el crecimiento de las BM-MSCs ($p < 0.05$). Aunque el recuento de BM-MSCs aumentó de manera constante con el tratamiento

de Ge de 1 a 10 mg/mL, no mostraron ninguna significancia estadística entre estos grupos.



(A)

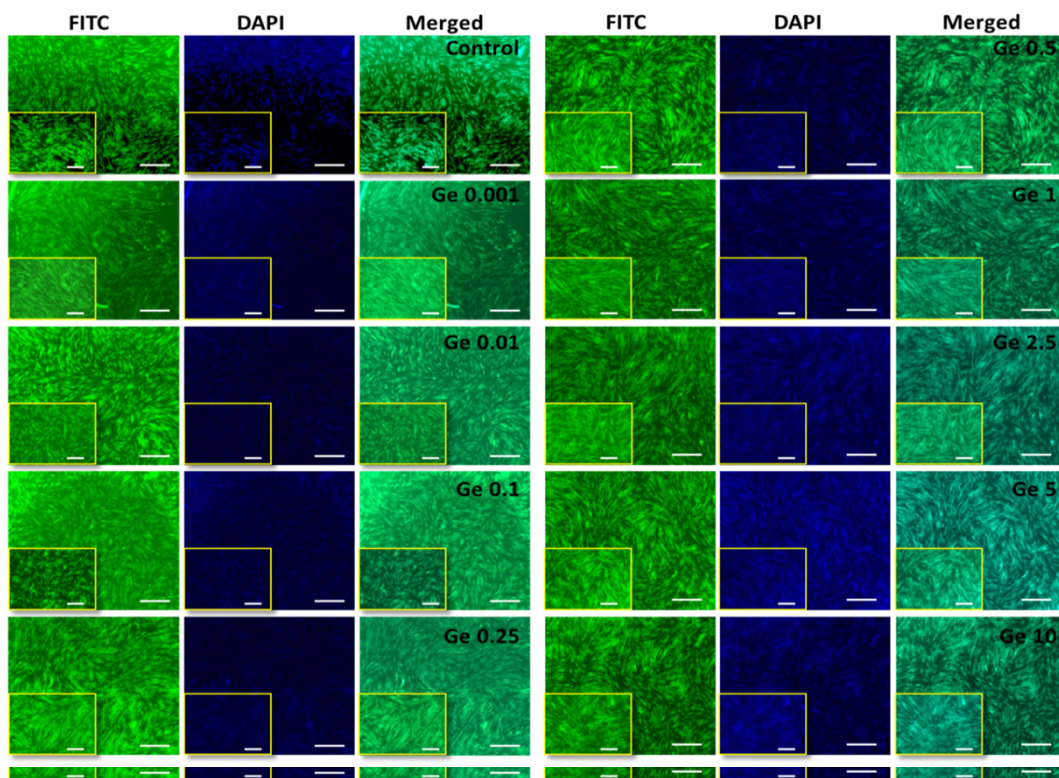


Figura 18. (A) Recuento celular y (B) Imágenes de fluorescencia (FITC, DAPI y combinadas) de las BM-MSCs cultivadas con Ge. Tomado de Elango et al., 2018.²²⁸

En figura 18 control—BM-MSCs cultivadas sin Ge, Ge 0.001, 0.01, 0.1, 0.25, 0.5, 1.0, 2.5, 5 y 10 representan sus respectivas concentraciones de Ge tratadas con las BM-MSCs, respectivamente. Barra de escala 5×-200 μm, 10×-100 μm (Inserto) * indica significancia estadística, $p < 0.05$ vs. control.

7.1.7. Efecto de HA en las BM-MSCs

Al igual que con el Ge, se probó el efecto de la HA en las BM-MSCs con diferentes concentraciones (0.01, 0.1, 0.25, 0.5, 1, 5 y 10 mg/mL). La tasa de proliferación de las BM-MSCs aumentó con la concentración de HA de 0.01 a 1 mg/mL en comparación con el control, sin embargo, las concentraciones más altas de 5 mg/mL en adelante disminuyeron significativamente la proliferación de las BM-MSCs ($p < 0.05$), lo cual se observó claramente en la imagen de tinción de fluorescencia FITC y DAPI (Figura 10). Curiosamente, la proliferación de las BM-MSCs mejoró significativamente con una concentración de 1 mg/mL de HA en comparación con las BM-MSCs de control ($p < 0.05$).

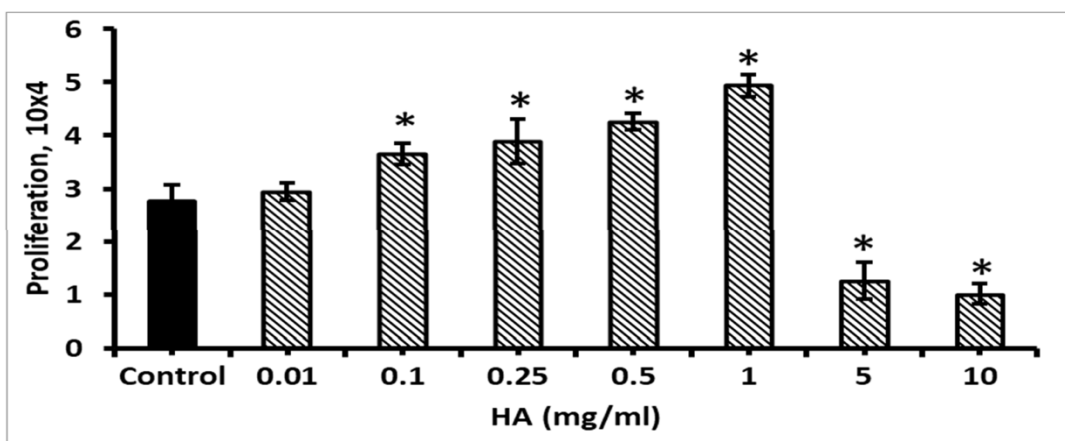


Figura 19. Recuento celular y de las BM-MSCs cultivadas con HA. Tomado de Elango et al., 2018.²²⁸

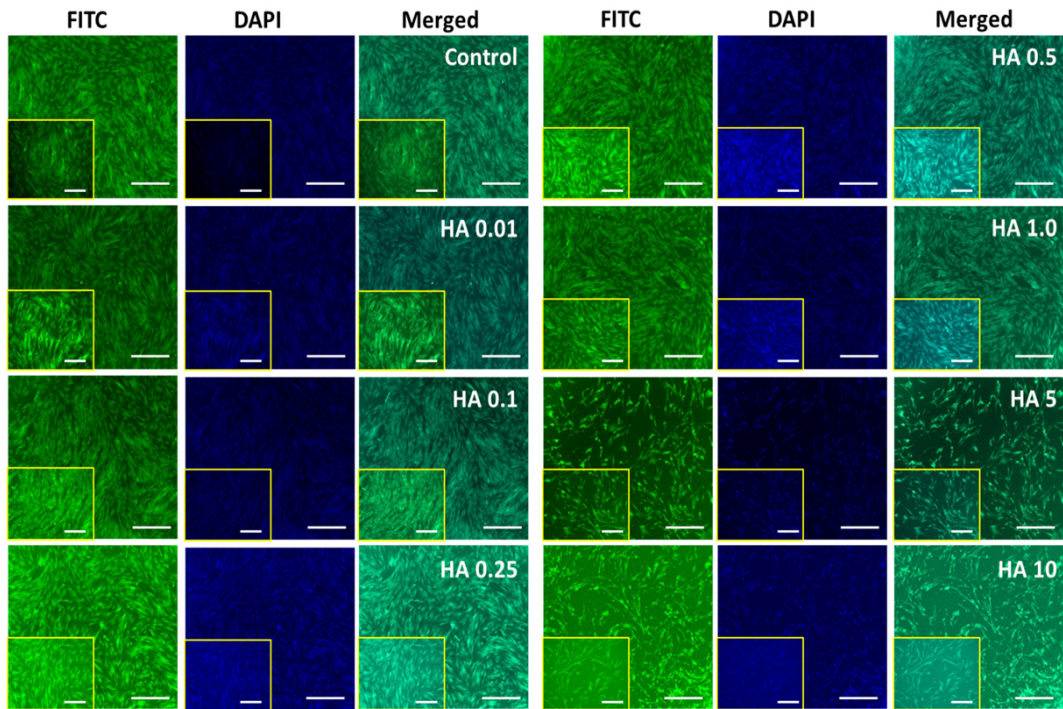


Figura 20. Imágenes de fluorescencia (FITC, DAPI y combinadas) de las BM-MSCs cultivadas con HA. Tomado de Elango et al., 2018.²²⁸

En figura 20. Imágenes de fluorescencia (FITC, DAPI y combinadas) de las BM-MSCs cultivadas con HA. Control—BM-MSCs cultivadas sin HA, HA 0.01, 0.1, 0.25, 0.5, 1.0, 5 y 10 representan sus respectivas concentraciones de HA tratadas con las BM-MSCs, respectivamente. Barra de escala 5×-200 μm , 10×-100 μm (Inserto). * indica significancia estadística, $p < 0.05$ vs. control.

7.1.8. Efecto del recubrimiento de HA-Ge en las BM-MSCs

Basándonos en los hallazgos anteriores, investigamos la eficiencia del recubrimiento de los compuestos HA-Ge en el crecimiento de las BM-MSCs. Con este propósito, las placas de cultivo fueron recubiertas con compuestos HA-Ge al 1 mg/mL basados en los resultados descritos. Como se muestra en la Figura 21,22, la tasa de proliferación de las BM-MSCs aumentó con los recubrimientos de HA-Ge en comparación con el control, y el crecimiento celular se reguló al alza en las BM-MSCs recubiertas con los compuestos HA-1% Ge, en comparación con otros compuestos ($p < 0.05$) (la tinción H&E de las BM-MSCs en los compuestos HA-Ge se muestra en la Figura S6 del suplemento). Además, el efecto fue insignificante entre las BM-MSCs recubiertas con HA y HA-3% Ge, y HA-1% Ge y HA-5% Ge, respectivamente.

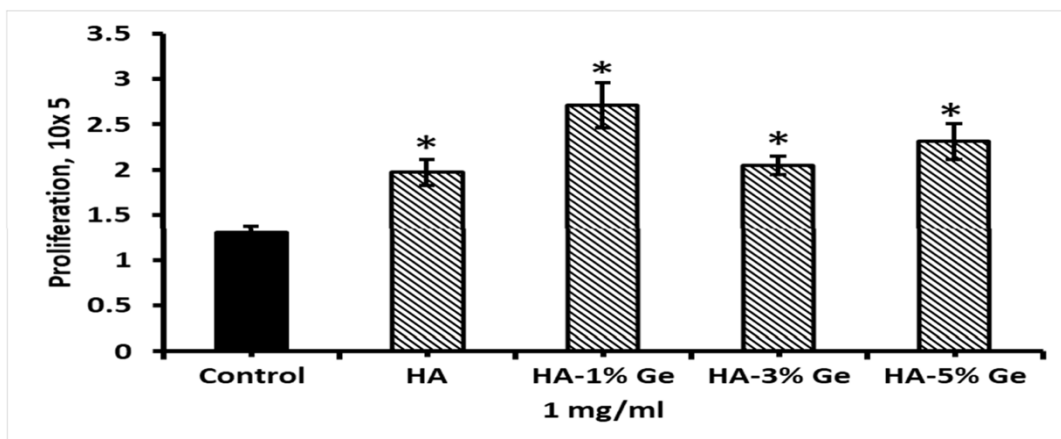


Figura 21. Recuento celular de las BM-MSCs cultivadas con recubrimiento de HA-Ge. Tomado de Elango et al., 2018.²²⁸

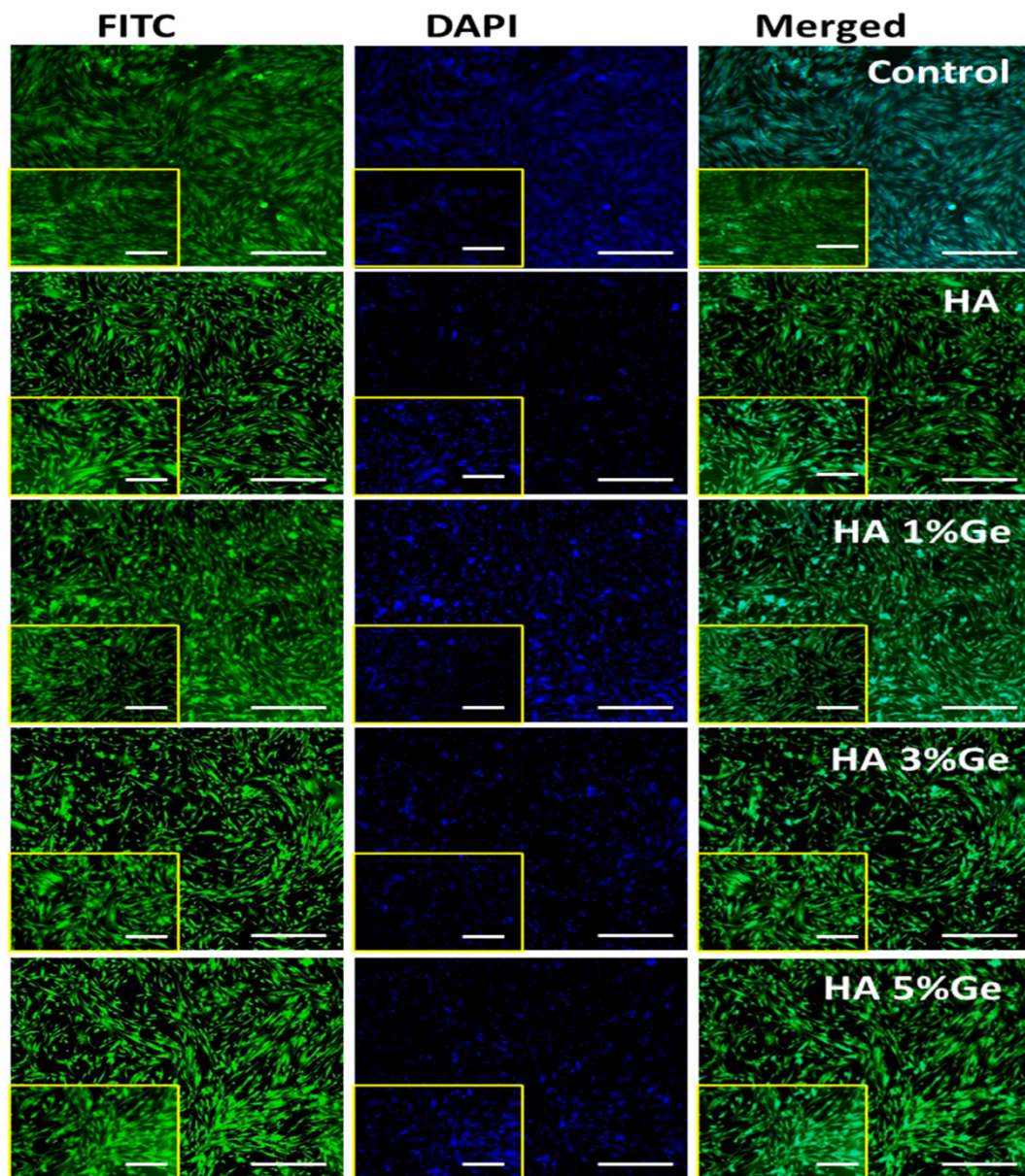


Figura 22. Imágenes de fluorescencia (FITC, DAPI y combinadas) de las BM-MSCs cultivadas con recubrimiento de HA-Ge. Tomado de Elango et al., 2018 .²²⁸

En Figura 21. recuento celular y fig. 22 imágenes de fluorescencia (FITC, DAPI y combinadas) de las BM-MSCs cultivadas con recubrimiento de HA-Ge. Control—BM-MSCs cultivadas sin HA o compuestos HA-Ge, HA—HA sin Ge, HA-1%Ge—HA con 1% de germanio, HA-3%Ge—HA con 3% de germanio y HA-5%Ge—HA con 5% de germanio. Barra de escala 5×-200 μm, 10×-100 μm (Inserto). * indica significancia estadística, $p < 0.05$ vs. control.

7.1.9. Densidad de carga celular

La capacidad total del biomaterial HA-Ge en el resultado de siembra de las BM-MSCs se presenta en la Figura 23. La densidad total de siembra de las BM-MSCs fue de 5×10^4 células/muestra y el total de BM-MSCs adheridas a la superficie de HA-Ge fue de $2.58\text{--}3.16 \times 10^4$, lo cual fue significativamente menor que las BM-MSCs de control (sin HA-Ge) (4.89×10^4) ($p < 0.05$). No hubo cambios significativos en la densidad de carga celular entre las muestras de HA y HA-Ge, lo cual fue respaldado por la tinción H&E de las BM-MSCs cargadas con HA-Ge. El porcentaje total de capacidad de carga celular fue del 97.8% en el control y del 51–63% en las muestras de HA y HA-Ge, respectivamente.

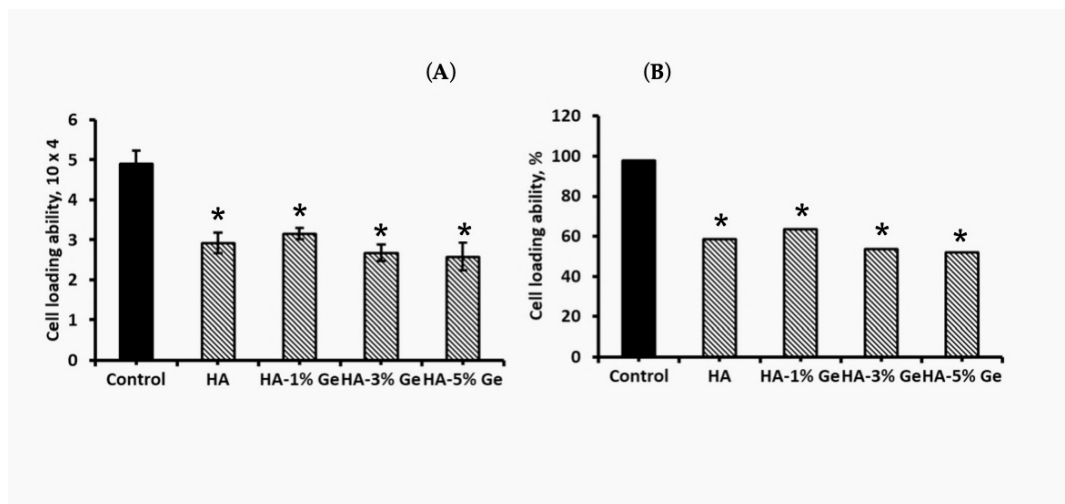


Figura 23. Capacidad total de siembra de las BM-MSCs en biomateriales HA-Ge. Tomado de Elango et al., 2018.²²⁸

Capacidad total de siembra de las BM-MSCs en biomateriales HA-Ge. (A) y (B) son la densidad real y el porcentaje de densidad de siembra celular de las BM-MSCs en los compuestos HA-Ge, respectivamente. Control— BM-MSCs cultivadas sin HA o compuestos HA-Ge, HA—HA sin Ge, HA-1%Ge—HA con 1% de germanio, HA-3%Ge—HA con 3% de germanio y HA-5%Ge—HA con 5% de germanio. * indica significancia estadística, $p < 0.05$ vs. control.

7.2. RESULTADOS EN ESTUDIO EN HUMANOS

En el presente estudio, participaron pacientes de edades comprendidas entre los 60 y 23 años, con un total de 4 hombres y 6 mujeres.

3. Tras las 4 mediciones en clínica:

0: No hay respuesta al estímulo.

1: El paciente nota el estímulo, pero no hay dolor.

2: El paciente nota el estímulo y el dolor es moderado o se aparta del dolor

3: El paciente nota el estímulo y solicita que se interrumpa porque le duele mucho

Tabla 3. Comparación de medidas tras el seguimiento clínico

	Pre-tratamiento	7 días	14 días	30 días
Paciente 1	2	1,8	1,5	1,3
Paciente 2	1,5	Aban dona		
Paciente 3	2,4	2	2	1,8
Paciente 4	1,5	1,4	1,1	1
Paciente 5	1,7	1,6	1,2	1
Paciente 6	2,2	1,8	1,6	1,5
Paciente 7	1,8	1,2	0,9	0,6
Paciente 8	2,4	1,5	1,2	0,8
Paciente 9	2,1	1,9	1,6	1,4
Paciente 10	2,6	2,4	2,1	1,8

Fuente: Elaboración propia.

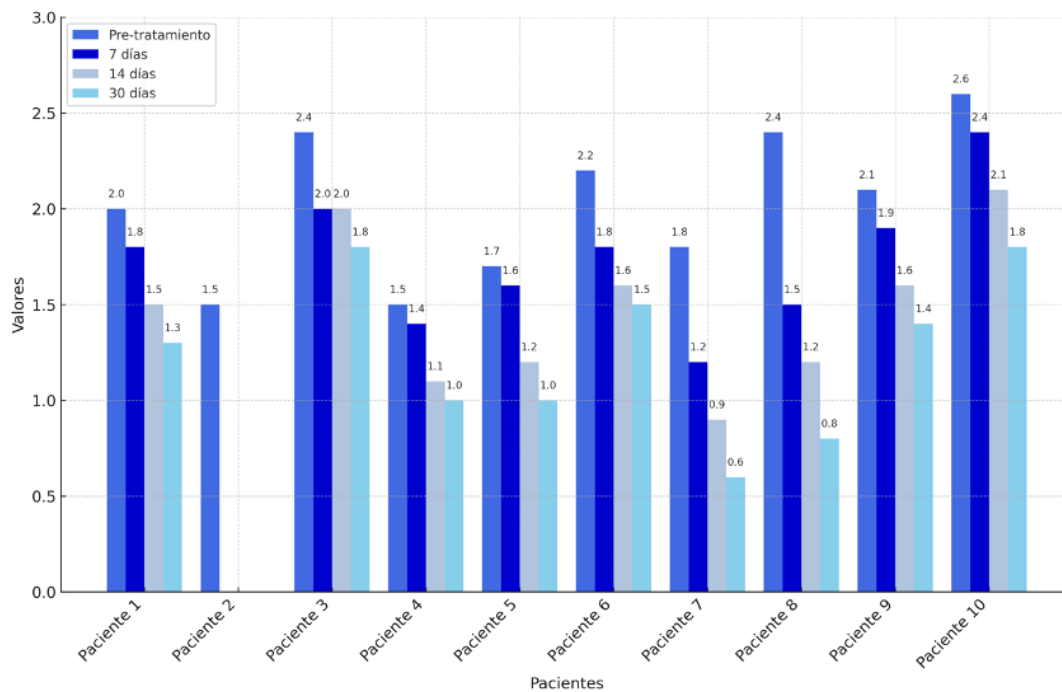


Figura 24. Seguimiento clínico. Elaboración propia.

7.2.1. Análisis de la hipersensibilidad dentinaria

Al examinar los resultados de las mediciones de hipersensibilidad dentinaria frente al estímulo térmico utilizando la escala EVA, se evidencia una reducción del dolor en todos los pacientes después de la primera semana de tratamiento, siendo esta disminución significativamente mayor a las 3 semanas de aplicación. Cabe destacar que, en uno de los pacientes evaluados, no se han observado cambios significativos en los resultados a lo largo del periodo de estudio. Tras el cuestionario diario:

Escala del dolor valorada mediante una escala numérica del 0-10, siendo 0 ausencia de dolor y 10 máximo dolor.

Tabla 4. Comparación de medidas tras el cuestionario diario

	Semana 1	Semana 2	Semana 3
Paciente 1	5	3,2	2,3
Paciente 2	5	Abandona	
Paciente 3	8,4	7,9	6,8
Paciente 4	5,3	4,1	3,6
Paciente 5	4	3,3	1,8
Paciente 6	8,3	7	5,6
Paciente 7	7	5,4	2,7
Paciente 8	8,6	6,7	4,6
Paciente 9	4,2	4,1	4,1
Paciente 10	8,2	7,6	6,4

Fuente: Elaboración propia.

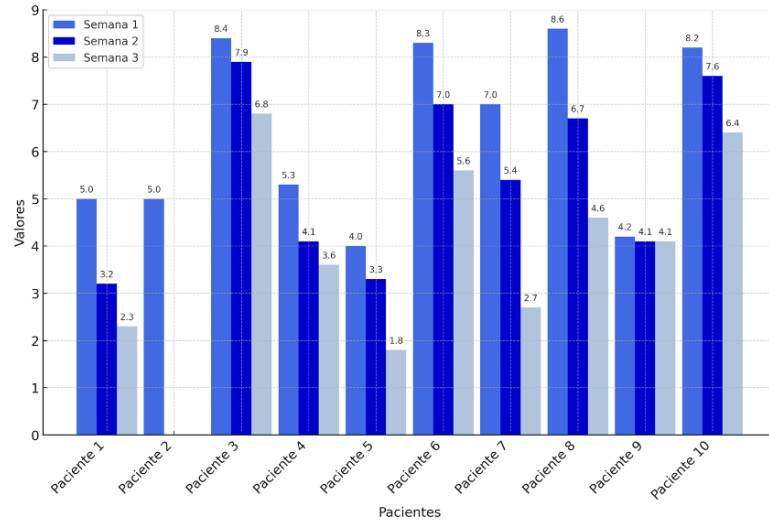


Figura 25. Cuestionario diario. Elaboración propia.

Al analizar los resultados de las mediciones de hipersensibilidad dentinaria tras el cuestionario diario, se observa una disminución del dolor en todos los pacientes tras la primera semana de aplicación, siendo significativamente mayor a las 3 semanas de tratamiento. En uno de los pacientes examinados, los resultados no han variado de manera significativa.

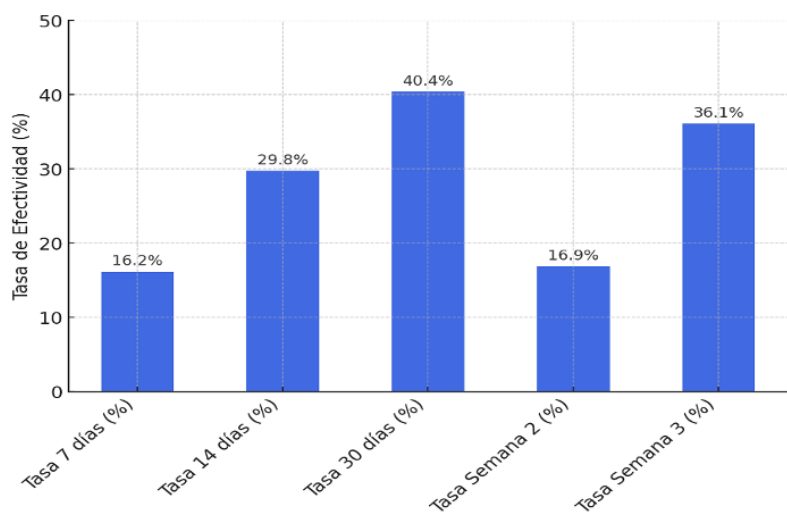


Figura 26. Tasa de efectividad. Elaboración propia.

En figura 26, media tasa de efectividad es el 40%.

7.2.2. Registro de efectos no deseados

En cuanto a la descripción de efectos no deseados, frente a la pasta utilizada en este estudio; se registró un efecto no deseado tras la primera semana de aplicación. El paciente 2 abandona el estudio por presentar disnea tras la aplicación del gel en 3 días distintos.

CAPÍTULO VIII - DISCUSIÓN

VIII. DISCUSIÓN

8.1. IN VITRO

En general, la HA no es soluble en agua, pero sí en jugo gástrico. En el experimento de 7 días, el porcentaje total de solubilidad de la HA en los tres medios fue aproximadamente del 1.9 al 2.3%, lo cual es similar a trabajos anteriores.¹⁹⁷ Se ha afirmado que la porosidad y la microestructura de la HA afectan la absorción de la solución.¹⁹⁸ Sin embargo, la solubilidad de la muestra de HA se vio favorecida al agregar Ge. Se cree que las propiedades fisicoquímicas del Ge moderan la propiedad funcional de los biomateriales de HA.

En general, la presencia de dos grupos carboxilo en el patrón molecular del Ge lo hace más hidrofílico y, por lo tanto, la adición de Ge a la HA promueve la naturaleza hidrofílica de los biomateriales de HA-Ge y, por lo tanto, aumenta la solubilidad en agua.

Similarmente, la rigidez de los biomateriales de HA mejoró con la adición de Ge al 5%, sin embargo, concentraciones más bajas no contribuyeron a la rigidez de los biomateriales de HA. Se ha informado que la rigidez de la HA varía entre 8 MPa y 520 MPa, según la fuente y el método de fabricación.^{199,200} En este estudio, la rigidez (resistencia a la compresión) de los biomateriales de HA fue similar a trabajos anteriores (5.67 a 7.66 MPa) que utilizaron andamios de HA reforzados con caolín para la regeneración ósea.²⁰¹

Sin embargo, se ha informado de una rigidez alta de aproximadamente 400 a 900 MPa para andamios de hidroxiapatita de origen natural destinados a biomateriales óseos.²⁰² Similar a la solubilidad en agua, la capacidad de retención de agua de la HA mejoró con la incorporación de Ge en una concentración más alta (5%); sin embargo, concentraciones más bajas no tuvieron ningún efecto en la capacidad de retención de agua.

De manera similar al presente hallazgo, la capacidad de retención de agua del material de HA se mejoró mediante la adición de biomoléculas como el ácido hialurónico²⁰³ y nanocompuestos de celulosa.²⁰⁴

En cuanto a la biodegradación *in vitro*, se observó claramente que el material de HA era lo suficientemente resistente a la digestión proteolítica y se logró una degradación muy lenta durante el estudio de 60 días. La tasa de degradación aumentó lentamente con la duración de la incubación. Es bien sabido que los tiempos de incubación crecientes son directamente lineales con la pérdida de peso y la tasa de degradación de los polímeros durante el estudio de degradación *in vitro*.²⁰⁵

La máxima degradación de la muestra de HA se observó alrededor del 35% después de 60 días de digestión enzimática. Varios factores, como la hidrofilia, la interconectividad de poros, el tamaño de poro, la reticulación de aditivos y las enzimas susceptibles, regulan el proceso de degradación del biomaterial¹⁹⁷, lo cual es un factor importante para la citotoxicidad, es decir, inhibir o estimular el metabolismo de las células madre.²⁰⁶ Previamente, Ganesan et al. investigaron la degradación *in vitro* de la HA en PBS a 37 °C durante 28 días y reportaron una degradación de alrededor del 1.2 al 1.75% al final del experimento.¹⁹⁷

Se ha informado que remojar los materiales en soluciones con un pH adecuado similar al pH de la sangre es la simulación original de los biomateriales que se colocan en el cuerpo humano.²⁰⁷ Por lo tanto, utilizamos SBF como un medio adecuado para comprender el comportamiento real de liberación de fármacos de los biomateriales de HA y se comparó el efecto de liberación de fármacos con PBS y DMEM. Nuestros resultados demostraron que los biomateriales compuestos podrían liberar Ge de manera favorable con el medio DMEM, lo que brinda un impacto adicional de este material para el cultivo de células madre. Además, el rango de pH óptimo para una mejor liberación de fármacos de Ge de los biomateriales de HA fue de 7 a 9.

A partir de la prueba del ángulo de contacto, confirmamos aún más que el aumento de la concentración de Ge del 1 al 5% podría mejorar la naturaleza hidrofílica y reducir la naturaleza hidrofóbica de la HA. Para respaldar este hallazgo, Zhang et al. informaron recientemente que la superficie hidrofílica de la

película de nanotubos de ZnO se mejoró al combinarla con partículas de germanio.²⁰⁸

Las propiedades de señalización de adentro hacia afuera y las propiedades celulares, como la proliferación, migración y diferenciación celular, están altamente influenciadas por la interacción de proteínas de la matriz extracelular, incluyendo vitronectina, laminina y fibronectina.^{208,209 210} Por lo tanto, evaluamos la capacidad de los biomateriales de HA-Ge para absorber proteínas funcionales mediante la prueba CBB. Además, la evidencia empírica confirma la capacidad potencial del etanol en la modificación superficial del polímero. Por lo tanto, en este estudio, comparamos la capacidad de los biomateriales de HA-Ge en la adherencia de proteínas funcionales con y sin tratamiento de etanol.

La alta capacidad de absorción de proteínas de HA, según la prueba CBB, demuestra que es un sistema portador potencial para la entrega controlada de proteínas. Por ejemplo, Ho et al. desarrollaron un sistema polimérico biodegradable utilizando ácido poliláctico glicólico (PLGA) y HA para un sistema de liberación controlada de proteínas de albúmina sérica bovina (BSA) y concluyeron que este sistema podría transportar de manera efectiva el fármaco hidrofílico para una liberación sostenida de sustancias.²¹¹

Lo más importante es que el comportamiento de mayor adhesión de proteínas de los biomateriales de HA-Ge evidencia finalmente que los biomateriales de HA-Ge podrían mejorar la funcionalidad celular de las células madre y respaldar la diferenciación de los osteoblastos. Para respaldar este hallazgo, Tripathi et al. ya afirmaron que el andamio de HA con buena capacidad de unión a proteínas podría potencialmente respaldar la proliferación y diferenciación de las células osteoblásticas humanas SaOS2.²¹²

En el presente estudio, los resultados de bioactividad *in vitro* también demostraron una mayor deposición de capa de apatita en la superficie de los biomateriales de HA-5% Ge, lo que respalda finalmente la capacidad de los biomateriales de HA-Ge en la formación de matriz extracelular durante la osteogénesis.

Además, en el presente estudio se investigó el efecto del Ge en la proliferación de las células madre mesenquimales de médula ósea (BM-MSCs). Nuestros resultados revelaron que el crecimiento de las BM-MSCs fue potencialmente

estimulado por el tratamiento con Ge, especialmente a concentraciones de 0.5 a 5 mg/mL. Curiosamente, no se observó ningún efecto citotóxico del Ge en todas las concentraciones probadas hasta 10 mg/mL, y las BM-MSCs permanecieron en su forma original con integridad del ADN incluso después de ser tratadas con Ge, según lo evidencian las tinciones de FITC y DAPI. Para respaldar este hallazgo, un estudio anterior realizado por Choi et al., al tratar las BM-MSCs con 50, 70 y 100 µg/mL de *Cordyceps militaris* enriquecido con germanio (CMGe), reveló que la proliferación de las BM-MSCs aumentó 1.8 veces con 50 µg/mL de CMGe en comparación con las células de control.

Aunque la tasa de proliferación de las BM-MSCs se reguló al alza con el tratamiento de HA hasta 1 mg/mL, el efecto se reguló a la baja en concentraciones más altas de HA alrededor de 5 y 10 mg/mL. Por lo tanto, se eligió una concentración óptima de 1 mg/mL de HA para los experimentos de recubrimiento posteriores de las BM-MSCs.

Los resultados mostraron que los pozos recubiertos con HA-1% Ge mostraron un efecto favorable en el crecimiento de las BM-MSCs en comparación con los demás. La razón exacta de este efecto aún es desconocida y necesita una investigación más extensa para comprender el mecanismo de HA-Ge en las BM-MSCs.

Según la literatura disponible, el porcentaje promedio de viabilidad utilizando células madre humanas para la HA se informa en torno al 70-100%.^{213,214, 215} Kumar et al. realizaron una prueba de citotoxicidad en hidroxiapatita utilizando células 3T3-L1 de fibroblastos de ratón con tiempos de observación variables.²¹⁶ Horta et al. investigaron células de hidroxiapatita a base de cáscara de huevo con un 98.9% de viabilidad que fueron cultivadas en células madre de pulpa dental (DPSCs) durante 24 h.

La citotoxicidad de la HA se probó con varios tipos de células, como células madre mesenquimales amnióticas²¹⁷, células madre mesenquimales derivadas de médula ósea²¹⁸, células madre mesenquimales derivadas de tejido adiposo²¹⁹, células madre mesenquimales de pulpa dental²²⁰, fibroblastos de ratón (línea celular 1929)^{198, 221}, células epiteliales renales²²², células óseas^{214, 215, 223, 224}, fibroblastos de pulmón humano (células mrc5), células de osteosarcoma humano²²⁵, células RAW²²⁶ y células L6 y MG63.²²⁷

La capacidad de carga celular de los biomateriales de HA-Ge fue mucho menor que la de los grupos de control (sin biomateriales), lo cual podría deberse a una menor área superficial de los biomateriales de HA-Ge en comparación con las placas de cultivo 2D.²²⁸ La densidad de carga de BM-MSCs en las superficies de polímeros difiere según varios factores, como afinidad, área superficial, lisura, rigidez y porosidad.^{229,230}

8.2. EN HUMANOS

La hipersensibilidad dentinaria representa un desafío clínico significativo, y tiene un impacto negativo en la calidad de vida de las personas.²³¹

Diversos estudios han demostrado que el diámetro de los túbulos dentinarios en dientes afectados por hipersensibilidad dentinaria (HD) es considerablemente mayor en comparación con los dientes no sensibles.²³² Esta diferencia en el tamaño de los túbulos dentinarios se debe a una mayor exposición a factores externos, lo que facilita la penetración de estímulos irritantes como cambios de temperatura, presión y sustancias químicas, causando la sensación de dolor característico de la HD. En este sentido, Oyama y Matsumoto señalaron una relación significativa entre la morfología de los túbulos dentinarios y la aparición de la hipersensibilidad, sugiriendo que un mayor diámetro de estos túbulos podría estar directamente relacionado con una mayor intensidad del dolor y la sensibilidad en los dientes afectados.²³²

Como consecuencia de estos hallazgos, varios investigadores han buscado desarrollar diversas técnicas y tratamientos para bloquear o reducir la apertura de los túbulos dentinarios. Estas estrategias tienen como objetivo aliviar el malestar asociado con la HD, ya que, al obstruir los túbulos, se previene la estimulación directa de las fibras nerviosas situadas en la pulpa dental, lo que reduce la sensación de dolor.²³³

Entre los métodos explorados, se han comparado varios métodos terapéuticos, se incluyen el uso de láseres, agentes desensibilizantes tópicos y tratamientos que favorezcan la remineralización de la dentina. Los estudios han demostrado que estos tratamientos pueden ser efectivos en la reducción de la sensibilidad dentinaria, aunque con variaciones en sus resultados y durabilidad.

Sin embargo, aún se requiere más investigación para establecer tratamientos más efectivos y duraderos que brinden alivio a largo plazo a los pacientes con esta condición.

8.2.1. Comparación de tratamientos

8.2.1.1. *El barniz de flúor*

Los barnices de flúor, según el conocimiento actual, son los medios más seguros y efectivos en el tratamiento y la prevención de la caries dental y la hipersensibilidad.²³⁴ A pesar de que contienen casi el doble de flúor que los geles y espumas utilizados, y más de 15 veces la cantidad de flúor de las pastas de dientes de uso diario, no implican riesgos para la salud.²³⁵

El barniz de flúor es uno de los tratamientos más comúnmente utilizados para aliviar la sensibilidad dentinaria, especialmente debido a su facilidad de aplicación y efectividad inicial. Este tratamiento se basa en la aplicación de una capa de flúor concentrado sobre la superficie dental, que actúa reforzando el esmalte dental y reduciendo la apertura de los túbulos dentinarios expuestos, lo que disminuye la sensación dolorosa en los dientes sensibles. Además, el barniz de flúor tiene la ventaja de ser una opción no invasiva, rápida y relativamente económica, lo que lo convierte en una elección popular tanto para profesionales de la odontología como para los pacientes.

Sin embargo, aunque el barniz de flúor proporciona un alivio efectivo a corto plazo, varios estudios han señalado que su eficacia puede disminuir con el paso del tiempo. Aunque el flúor tiene un impacto inmediato en la reducción de la hipersensibilidad, algunos pacientes experimentan una recurrencia de los síntomas de sensibilidad dentinaria después de un período de tiempo relativamente corto, generalmente alrededor de cuatro semanas. Esto puede deberse a varios factores, como la naturaleza temporal de la capa de flúor aplicada, el desgaste natural de la misma debido a la masticación o el contacto con los líquidos orales, o la exposición continua a factores irritantes que provocan la apertura de los túbulos dentinarios.

Además, la recurrencia de la sensibilidad después de la aplicación del barniz de flúor podría estar relacionada con las características individuales de cada

paciente, como la severidad de la hipersensibilidad dentinaria, la cantidad de exposición a factores que desensibilizan o estimulan los nervios dentales (como cambios térmicos o alimentos ácidos), y las posibles variaciones en la respuesta biológica al tratamiento.

A pesar de la disminución de su eficacia con el tiempo, el barniz de flúor sigue siendo una de las opciones más accesibles y simples para el tratamiento de la sensibilidad dentinaria. Sin embargo, para lograr una solución más duradera, algunos estudios sugieren la combinación de este tratamiento con otras terapias, como el uso de láseres o selladores dentales, que pueden proporcionar un alivio más prolongado y efectivo. La aplicación periódica del barniz de flúor también puede ayudar a mantener los resultados a lo largo del tiempo, reduciendo la frecuencia de recurrencia de la hipersensibilidad.¹⁸⁸

A pesar de un número muy grande de estudios realizados tanto *in vitro* como *in vivo*, aún no hay una opinión clara respecto a la elección del mejor barniz de flúor. Numerosos experimentos han demostrado que todos los barnices de primera y segunda generación aplicados sobre las superficies dentales liberan iones de flúor y provocan que se acumulen en el esmalte y la placa.^{236 237 238}

En los estudios *in vitro*, la liberación de flúor fue mayor durante las primeras horas después de la aplicación, disminuyendo con el tiempo, con algunos investigadores observando esto en el primer día después de la aplicación.^{238,239 240}

Y otros dentro de las 3 semanas.^{237,241}

Al comparar los barnices de primera y segunda generación entre sí, resulta que las opiniones sobre su efectividad y los factores que las afectan están divididas.²⁴²

Con base en datos de la literatura, se pueden encontrar tanto trabajos que, evaluando la cantidad de iones de flúor liberados, así como la composición y las propiedades mecánicas de las superficies de esmalte tratadas con barniz, mostraron la superioridad de los barnices de segunda generación sobre los de primera generación.^{236,238,242,243,244 245}

Como aquellos que no mostraron estas diferencias^{246,247, 248}, o incluso estudios que reportan la mayor efectividad de los barnices no enriquecidos.^{236,249}

En una serie de estudios comparativos, el barniz de mejor desempeño fue el de segunda generación que contenía el complejo CPP-ACP, para el cual se registró la mayor liberación acumulativa de flúor y los mayores aumentos en la liberación de flúor con el tiempo.^{236,238,240,250}

Además, es relevante señalar que esta liberación ocurrió de manera más dinámica en la fase inicial, provocando la liberación de más del 90% de la cantidad total de flúor disponible en el barniz en un tiempo bastante corto (hasta 24 h).^{238,240}

8.2.1.2. Tratamiento con láser

El uso de láseres de alta o media potencia sobre la dentina induce un proceso térmico que provoca la fusión de las estructuras mineralizadas de la dentina, seguido por la re-solidificación de la hidroxiapatita a medida que la superficie se enfría. Este fenómeno térmico es fundamental para el tratamiento de la hipersensibilidad dentinaria (HD), ya que la aplicación del láser genera una modificación en la estructura de la dentina, creando una capa más densa y menos permeable. Los resultados obtenidos en diversos estudios indican que, mediante la irradiación con láser, se consigue una superficie de dentina lisa y compacta, la cual presenta una significativa reducción en la apertura de los túbulos dentinarios. Esta capa lisa e impermeable actúa como una barrera física que reduce el paso de estímulos externos, como cambios de temperatura o agentes irritantes, hacia las fibras nerviosas de la pulpa dental, lo que ayuda a aliviar el dolor y la incomodidad asociados con la HD.

Además, la modificación de la dentina mediante láseres no solo contribuye a la obstrucción de los túbulos, sino que también puede favorecer la remineralización de la superficie dental, aumentando su resistencia a futuros estímulos.

Aunque la obstrucción total de los túbulos no siempre es alcanzada, los estudios sugieren que la aplicación de láseres de alta y media potencia puede proporcionar una mejora significativa en la sensibilidad dental al reducir la apertura de estos túbulos, lo que mejora la calidad de vida de los pacientes con hipersensibilidad dental. Sin embargo, es necesario seguir investigando sobre las condiciones óptimas de aplicación y el tipo de láser más adecuado para cada caso,

con el fin de maximizar los resultados y garantizar la efectividad a largo plazo de estos tratamientos.

8.2.1.3. Láser de diodo

El láser de diodo opera dentro de un espectro de longitudes de onda que varía entre 405 y 1064 nm, con una potencia de salida que oscila entre 0.2 y 12 watts, lo que permite su uso tanto en aplicaciones de baja potencia como de potencia media o alta.²⁵¹ Su versatilidad lo hace adecuado para diversos contextos terapéuticos, dependiendo del nivel de potencia seleccionado.

8.2.1.4. Efecto en la obstrucción de túbulos dentinarios

Los estudios de laboratorio han mostrado resultados consistentes sobre la capacidad del láser de diodo para obstruir los túbulos dentinarios a longitudes de onda de 810, 940 y 980 nm. En particular, un estudio demostró que al aumentar la longitud de onda (980 nm frente a 810 nm) y la potencia de salida del láser (2 W frente a 0.8 W), se observó un cierre más significativo de los túbulos dentinarios.²⁵²

8.2.1.5. Eficacia clínica en la reducción de la hipersensibilidad dentinaria (HD)

Los estudios clínicos han demostrado la eficacia de los láseres de diodo en diversas longitudes de onda (de 660 a 980 nm) para reducir la HD. En un estudio realizado por Gojkov-Vukelic et al.²⁵³ Se observó que los niveles de sensibilidad evaluados mediante la escala visual analógica (VAS) disminuyeron significativamente tras la primera sesión de tratamiento con láser, y no se reportó sensibilidad después de la tercera sesión.

8.2.1.6. Eficacia del láser de diodo en el tratamiento de la hipersensibilidad dentinaria (HD)

El láser de diodo ha demostrado ser más eficaz que otros métodos en la reducción de la HD, según diversos estudios^{254 255 256 257 258 259}

Sin embargo, la mayoría de las investigaciones concluyen que la combinación de un desensibilizante superficial, como gel de fluoruro de sodio, Gluma o pasta de nitrato de potasio, con el tratamiento láser ofrece una reducción del dolor más efectiva.^{254,260,261,262}

8.2.1.7. Comparación del láser de diodo con otros láseres

Las revisiones sistemáticas previas sobre la eficacia de los láseres en la HD han reportado consistentemente que el láser de diodo tiene un desempeño inferior frente a láseres alternativos como Er:YAG y Nd:YAG.^{263,264}

Sin embargo, el análisis actual revela que los estudios que informaron una menor eficacia del láser de diodo emplearon láseres de baja potencia (0.2 a 1 W). En cambio, los estudios que utilizaron láseres de mayor potencia (2 a 3 W) demostraron una notable capacidad del láser de diodo para aliviar el dolor causado por la HD.^{160, 265,266}

Los láseres de arseniuro de galio y aluminio (GaAlAs) son una categoría específica de láseres de diodo que operan generalmente en el rango de longitudes de onda del infrarrojo cercano (entre 780 y 980 nm).

8.2.1.8. Láseres de baja potencia GaAlAs

Se ha discutido que los láseres de baja potencia suelen reducir el movimiento de fluidos en los túbulos dentinarios mediante la fusión, recristalización de la dentina y vaporización del fluido presente en los túbulos. Por otro lado, los láseres de la segunda categoría (alta potencia) exhiben efectos analgésicos al suprimir la transmisión nerviosa o bloquear los túbulos dentinarios mediante la estimulación de odontoblastos y la formación de dentina terciaria.²⁶⁷

La principal ventaja de los láseres sobre los tratamientos convencionales radica en su capacidad para proporcionar efectos inmediatos y duraderos en la hipersensibilidad dentinaria (HD).²⁶⁷

El factor clave para lograr el resultado deseado sin efectos perjudiciales para la pulpa es la cuidadosa selección de un láser con parámetros de radiación adecuados.²⁶⁸

Además, se han observado discrepancias entre algunos de los resultados reportados en las revisiones sistemáticas y los artículos originales.²⁶⁴

Hasta ahora, no se ha llevado a cabo una revisión exhaustiva que analice los diferentes tratamientos con láser utilizados para reducir la HD y su correlación con el tipo de láser empleado. Tampoco se ha investigado la correlación entre los resultados de estudios clínicos y de laboratorio. Reconociendo la importancia de un enfoque terapéutico eficiente que minimice la invasividad y maximice los beneficios, este estudio se llevó a cabo para examinar el impacto del tratamiento con láser en la oclusión de los túbulos dentinarios y su potencial para reducir la HD.

8.2.1.9. Comparación

Los láseres, como el GaAlAs a 830 nm y el láser de CO₂, han demostrado ser efectivos en el tratamiento de la hipersensibilidad dentinaria (HD), presentando tasas de efectividad que varían significativamente según el tipo de láser utilizado y el protocolo de tratamiento. El láser GaAlAs, operando a una longitud de onda de 830 nm, ha mostrado una eficacia que oscila entre el 53,3% y el 94,2% en los estudios de seguimiento realizados a un mes después del tratamiento. Este láser se destaca por su capacidad para penetrar los tejidos dentales y modificar la estructura de los túbulos dentinarios, lo que ayuda a reducir la sensibilidad dental al bloquear la apertura de los mismos.

Por otro lado, el láser de CO₂ ha sido igualmente efectivo en el tratamiento de la HD, mostrando tasas de efectividad que varían entre el 59,8% y el 100%, también en estudios de seguimiento a un mes. Esta variabilidad en los resultados se debe, en parte, a las diferencias en los protocolos de tratamiento, como la potencia del láser, el tiempo de irradiación y las características individuales de los pacientes. El láser de CO₂ es conocido por su alta absorción en agua y tejidos biológicos, lo que le permite generar una mayor ablación y una oclusión más eficaz de los túbulos dentinarios expuestos.

Ambos tipos de láser, el GaAlAs y el CO₂, han mostrado un impacto positivo en la reducción de la hipersensibilidad, con el láser de CO₂ generalmente reportando mejores resultados a largo plazo debido a su capacidad para inducir un

sellado más duradero de los túbulos dentinarios. Sin embargo, la variabilidad en los resultados de ambos láseres puede depender de varios factores, como las condiciones clínicas específicas de cada paciente, las técnicas de aplicación y los parámetros del láser utilizados, lo que subraya la importancia de una correcta selección del tipo de láser y de un tratamiento individualizado. A pesar de estas diferencias, ambos láseres continúan siendo opciones valiosas en la odontología moderna para el manejo de la HD, especialmente en casos donde los tratamientos convencionales no logran ofrecer resultados satisfactorios.^{224,269,270}

8.2.1.10. Ventajas de la combinación de láser y desensibilizantes superficiales

Los barnices superficiales proporcionan una disminución inmediata del dolor al ocluir rápidamente las aperturas de los túbulos dentinarios. Por su parte, el láser de diodo no solo ocluye los túbulos, sino que también tiene un impacto a largo plazo al reducir la HD mediante efectos sobre las neuronas y la estimulación de odontoblastos para formar dentina reactiva. Además, la aplicación simultánea de barnices y láser permite una mayor penetración del barniz en los túbulos dentinarios, logrando una oclusión más efectiva.^{260,271}

Un estudio realizado por Narayanan et al. señaló que la combinación de láser de baja potencia con nitrato de potasio fue el enfoque más exitoso para reducir la HD en todos los intervalos de tiempo medidos. Esta combinación también fue más eficaz para reducir la HD a las 12 semanas de tratamiento en comparación con el grupo tratado con fluoruro.²⁶⁰

8.2.1.11. Desventajas láser

A pesar de la alta eficacia que los láseres han demostrado en diversos tratamientos dentales, incluidos aquellos para la hipersensibilidad dentinaria, existen algunas desventajas asociadas con su uso que deben ser consideradas. Una de las principales limitaciones es el alto coste de los equipos láser, lo que puede representar una barrera económica tanto para los profesionales de la odontología

como para los pacientes. Este factor puede restringir su disponibilidad en algunas clínicas, especialmente en aquellas con presupuestos limitados.

Otra desventaja importante es la complejidad técnica en el manejo de los láseres. El uso adecuado de estos dispositivos requiere formación especializada y un conocimiento profundo de sus parámetros de operación, como la potencia, la duración de la irradiación y la elección de la longitud de onda. La necesidad de un manejo preciso puede hacer que algunos profesionales sientan que la incorporación de láseres a su práctica diaria requiere una curva de aprendizaje considerable.

Además, aunque los láseres son generalmente seguros cuando se utilizan correctamente, existe un riesgo potencial de causar daño térmico en los tejidos dentales, como la pulpitis irreversible, especialmente cuando se aplican a altas temperaturas o cuando el tratamiento no se realiza con la técnica adecuada. Esto puede generar preocupación en cuanto a la seguridad a largo plazo del procedimiento, lo que limita su uso en algunos casos, particularmente en pacientes con dientes sensibles o con un historial de problemas pulpares.

A pesar de estas limitaciones, los láseres siguen siendo una herramienta valiosa en la odontología moderna. Su capacidad para tratar condiciones como la hipersensibilidad dentinaria y otras patologías dentales con resultados efectivos y de bajo riesgo para los tejidos circundantes continúa promoviendo su adopción en la práctica clínica. No obstante, es fundamental que su aplicación se haga con un adecuado control y en contextos donde los beneficios superen los riesgos, lo que permitirá a los profesionales aprovechar al máximo su potencial terapéutico.²⁷²

8.2.2 Eficiencia de productos de pasta dentífrica

Durante décadas, el flúor se ha incorporado en las pastas dentales para mejorar el proceso de remineralización. Actualmente, los investigadores y los laboratorios están investigando ingredientes además del flúor para incorporarlos en las pastas dentales con el fin de asistir en el proceso de mineralización de las caries dentales.

El vidrio bioactivo fue inventado a principios de la década de 1970.²⁷³

Estos vidrios son materiales basados en sílice, muy biocompatibles, y exhiben una unión ósea como resultado de la sílice reactiva en la superficie, los grupos de calcio y fosfato. El tratamiento de la hipersensibilidad dentinaria mediante el uso de vidrio bioactivo (NovaMin) ha mostrado resultados clínicos estadísticamente significativos y alentadores.^{274,275}

En 2006, Zero demostró que cuando NovaMin se exponía a la saliva o al agua, ocurría una reacción inmediata al liberar miles de millones de minerales, como calcio, sílice, fósforo y sodio, que ayudaban a potenciar el proceso de remineralización de los dientes, específicamente en las tuberías dentinarias expuestas que son responsables de la sensibilidad. Esta liberación de iones crea una capa protectora en la superficie del diente, lo que ayuda a sellar los túbulos dentinarios abiertos y reduce la transmisión de los estímulos dolorosos al interior del diente, protegiendo así las terminaciones nerviosas.²⁷⁶

Las pastas dentífricas como la NUPRO de Sensodyne con NovaMin han demostrado una mejora significativa en la sensibilidad dentinaria, alcanzando una reducción de aproximadamente el 50% en los niveles de sensibilidad después de cuatro semanas de uso continuo.

Estudios clínicos han respaldado la eficacia de NovaMin, mostrando que no solo alivia temporalmente el dolor, sino que también tiene un impacto positivo en la estructura dental a largo plazo. Después de un mes de uso regular, la reducción en la sensibilidad es notable, y algunos estudios sugieren que los beneficios pueden continuar mejorando con el uso continuo, lo que proporciona alivio sostenido a los pacientes.

Además, a diferencia de otros tratamientos que pueden requerir aplicaciones profesionales, las pastas dentífricas como NUPRO permiten a los pacientes tratar la hipersensibilidad de manera conveniente y autónoma en su hogar, con resultados significativos en un corto período de tiempo. Esto ha hecho que las pastas dentales con NovaMin sean una opción popular tanto en el ámbito clínico como en el hogar, especialmente para aquellos que sufren de hipersensibilidad dental ocasional o recurrente.²⁷⁷

8.2.3 Resultados del estudio actual

La pasta utilizada en este estudio está compuesta por hidroxiapatita, que es el componente básico de la dentina, un material biológico de fosfato cálcico efectivo para el tratamiento de la hipersensibilidad dentinaria.²⁷⁸ Y germanio orgánico, que tiene actividades biológicas, efecto analgésico, antitumoral, eficaz contra el estrés oxidativo e inhibe la metástasis del cáncer.¹⁴⁻¹⁶

El estudio actual se centró en la evaluación de una pasta dentífrica innovadora que combina hidroxiapatita y germanio orgánico, una combinación prometedora en el tratamiento de la sensibilidad dentinaria.

La tasa de efectividad alcanzó un valor más alto en la semana 3, con 36.10%. Esto refleja una mejora más sustancial en los pacientes a medida que avanzaron las semanas de tratamiento, lo que sugiere que el tratamiento continuó siendo eficaz con el tiempo.

En cuanto a la reducción del dolor, la efectividad promedio alcanzó 40.42% a los 30 días, lo que indica que la mayoría de los pacientes experimentaron una reducción sustancial del dolor a largo plazo. Esto refleja que el tratamiento siguió siendo efectivo con el paso del tiempo, con mejoras continuas.

La hidroxiapatita, un componente natural de la dentina, es bien conocida por su capacidad para promover la remineralización dental al ayudar a restaurar la estructura mineral de los dientes, cerrando los túbulos dentinarios expuestos, lo cual es crucial en la reducción de la sensibilidad dental.¹⁹¹

Por otro lado, el germanio orgánico, un compuesto con propiedades antioxidantes y de estimulación celular, puede potenciar los efectos remineralizantes de la hidroxiapatita, ayudando a regenerar la estructura dental de manera más eficiente.⁵⁵

Comparado con otras pastas dentífricas y tratamientos para la sensibilidad dentinaria, como las formulaciones con NovaMin o fluoruros, el enfoque basado en la hidroxiapatita y el germanio ha mostrado un rendimiento que se asemeja en términos de eficacia y velocidad de acción. Por ejemplo, pastas como la NUPRO de Sensodyne con NovaMin, que se ha reportado que mejora la sensibilidad dentinaria en un 50% después de cuatro semanas de uso, han sido ampliamente utilizadas y validadas en la práctica clínica. Sin embargo, el tratamiento con hidroxiapatita y

germanio parece ofrecer una reducción en la sensibilidad en un plazo más corto, destacándose como una opción eficaz para quienes buscan resultados rápidos y sostenibles.

Además, este tratamiento presenta una ventaja significativa en cuanto a la facilidad de uso y accesibilidad, en comparación con otros métodos más complejos o costosos, como los tratamientos con láser o los aplicados por profesionales en consultorios dentales. La combinación de estos dos componentes permite una solución menos invasiva y más asequible para los pacientes, manteniendo una alta efectividad, lo cual es un factor crucial en la toma de decisiones sobre el tratamiento de la sensibilidad dentinaria.

Este enfoque innovador resalta la importancia de desarrollar productos accesibles y eficaces que puedan ser utilizados de forma regular en el hogar, a la vez que ofrecen resultados clínicos sustanciales sin los costos asociados con procedimientos dentales más invasivos. Con la continua evolución de la investigación en este campo, es probable que surjan más avances en el tratamiento de la sensibilidad dentinaria, mejorando aún más la calidad de vida de los pacientes.

CAPÍTULO IX – CONCLUSIONES

9. CONCLUSIONES

9.1. IN VITRO

En esta investigación exhaustiva, se llevó a cabo una evaluación detallada de las propiedades fisicoquímicas, funcionales y citotóxicas de los biomateriales de hidroxiapatita (HA) con concentraciones variables de germanio (Ge). Los biomateriales de HA se sintetizaron con precisión, presentando un tamaño de partícula de 4.8 μm . Los resultados obtenidos revelaron mejoras significativas en las propiedades fisicoquímicas y mecánicas al incorporar un 5% de Ge, destacando la capacidad de esta adición para mejorar la naturaleza hidrofílica de los biomateriales de HA y acelerar la tasa de biodegradación.

La liberación controlada de fármacos de los biomateriales de HA-Ge alcanzó su punto máximo en un rango de pH entre 7 y 9, especialmente en presencia de medio DMEM. A pesar de que la concentración del 5% de Ge mejoró diversas propiedades de los biomateriales, se identificó que el óptimo porcentaje para el crecimiento de las células madre mesenquimales de médula ósea (BM-MSCs) fue del 1% de Ge. Este hallazgo es crucial, ya que sugiere una concentración específica que favorece el entorno propicio para el desarrollo de estas células esenciales.

Los resultados también revelaron una deposición notable de capa de apatita y un comportamiento mejorado de absorción de proteínas en los biomateriales de HA-Ge, evidenciando su eficacia en la diferenciación de células óseas. No obstante, se reconoce la necesidad de realizar estudios adicionales para profundizar en los efectos de estos biomateriales en la osteogénesis, especialmente al emplear BM-MSCs en condiciones tanto con como sin inductores osteogénicos. Estas conclusiones sientan las bases para futuras investigaciones que contribuirán al desarrollo y comprensión de biomateriales innovadores en el ámbito de la regeneración ósea.

9.2. EN HUMANOS

La hipersensibilidad dentinaria (HD) es una condición clínica de alta prevalencia que afecta negativamente la calidad de vida de los pacientes. Su origen está estrechamente relacionado con la morfología y el diámetro aumentado de los túbulos dentinarios en los dientes sensibles.

Esta patología requiere un enfoque multidisciplinario para su manejo, dada la variabilidad en las respuestas individuales a los tratamientos disponibles.

El tratamiento con pasta dentífrica que combina hidroxiapatita y germanio orgánico ha mostrado ser altamente eficaz en el tratamiento de la sensibilidad dentinaria. La hidroxiapatita, componente principal de la dentina, ayuda a restaurar la estructura mineral de los dientes al cerrar los túbulos dentinarios expuestos, lo que es clave para reducir la hipersensibilidad. Por su parte, el germanio orgánico, un compuesto con propiedades antioxidantes y de estimulación celular, potencia los efectos remineralizantes de la hidroxiapatita y contribuye a una regeneración más eficiente de la estructura dental.

En el transcurso del estudio, la tasa de efectividad alcanzó su valor máximo en la semana 3, con un 36.10% de mejora. Esta tasa progresiva de mejora a lo largo del tratamiento sugiere que la combinación de hidroxiapatita y germanio orgánico tiene efectos acumulativos, aumentando su efectividad a medida que el tratamiento avanza. Este incremento significativo indica que el tratamiento fue progresivamente más efectivo a medida que avanzaron las semanas de uso. Esto sugiere que la pasta dentífrica no solo alivió el dolor de manera inmediata, sino que también continuó proporcionando resultados efectivos con el paso del tiempo, lo que refuerza la idea de que el tratamiento tiene un efecto acumulativo positivo a largo plazo.

En términos de reducción del dolor, la efectividad promedio alcanzó un notable 40.42% a los 30 días de tratamiento. Este porcentaje indica que la mayoría de los pacientes experimentaron una reducción sustancial del dolor a largo plazo, lo que subraya la capacidad de la pasta dentífrica para proporcionar alivio duradero de la sensibilidad dental. Este hallazgo también sugiere que el tratamiento siguió siendo eficaz con el tiempo, evidenciando mejoras continuas y constantes en los pacientes. La persistencia de los beneficios del tratamiento sugiere

que, además de ser efectivo en el corto plazo, el producto también tiene el potencial de ofrecer mejoras a largo plazo en la salud dental de los pacientes.

Comparado con otras pastas dentífricas y tratamientos convencionales, como los que contienen NovaMin o fluoruros, la combinación de hidroxiapatita y germanio orgánico ha mostrado un rendimiento comparable.

Además, opciones alternativas como los tratamientos con láser, los estudios demuestran que estos dispositivos, especialmente los láseres de alta y media potencia, generan modificaciones significativas en la estructura de la dentina, creando superficies más densas y menos permeables. Estas características contribuyen a una reducción eficaz de la sensibilidad dental al obstruir los túbulos dentinarios. Cabe destacar que los tratamientos que combinan láseres con agentes desensibilizantes, como nitrato de potasio o fluoruro de sodio, han demostrado resultados superiores, al aprovechar los efectos sinérgicos de ambas estrategias, aunque son efectivos hay que destacar que son más invasivos, costosos y menos accesibles para el uso cotidiano.

Nuestro estudio también identificó una ventaja importante: la facilidad de integración de esta pasta dentífrica en la rutina diaria del paciente. Este enfoque no solo es más accesible y asequible, sino que también proporciona una solución eficaz para quienes buscan tratar la sensibilidad dental sin recurrir a procedimientos complejos.

Es importante resaltar que, en términos de calidad de vida, esta innovación ofrece a los pacientes una mejora tangible, permitiendo un alivio significativo y rápido, al tiempo que fomenta la salud dental a largo plazo. La combinación de eficacia, accesibilidad y rapidez de acción posiciona a esta formulación como una solución de vanguardia en el tratamiento de la sensibilidad dentinaria.

En conclusión, este estudio subraya el potencial de la hidroxiapatita combinada con germanio orgánico como una herramienta efectiva, asequible y de uso diario, marcando un avance significativo en el campo del cuidado dental. A medida que la investigación en este ámbito evoluciona, esperamos que surjan más desarrollos que amplifiquen los beneficios observados y continúen mejorando la salud y bienestar de los pacientes con sensibilidad dentinaria.

CAPÍTULO X – LIMITACIONES

X. LIMITACIONES

10.1. IN VITRO

A pesar de los hallazgos prometedores en esta investigación exhaustiva sobre las propiedades fisicoquímicas, funcionales y citotóxicas de los biomateriales de hidroxiapatita (HA) con concentraciones variables de germanio (Ge), se identificaron varias limitaciones que deben ser consideradas.

En primer lugar, aunque los biomateriales de HA-Ge se sintetizaron con precisión y presentaron mejoras significativas en sus propiedades fisicoquímicas y mecánicas, el estudio se basó en una muestra específica con un tamaño de partícula de 4.8 μm . Esta característica específica puede no representar adecuadamente la variabilidad que podría encontrarse en diferentes condiciones de síntesis y tamaños de partícula, limitando la generalización de los resultados a otros contextos o aplicaciones.

Además, la investigación determinó que, aunque una concentración del 5% de Ge mejoraba diversas propiedades de los biomateriales, el porcentaje óptimo para el crecimiento de las células madre mesenquimales de médula ósea (BM-MSCs) era del 1% de Ge. Este hallazgo es crucial, pero también destaca una limitación en la concentración óptima específica, sugiriendo que diferentes aplicaciones o tipos celulares podrían requerir ajustes en la composición de Ge, lo que no fue explorado exhaustivamente en este estudio.

Otra limitación significativa es la necesidad de estudios adicionales para profundizar en los efectos de estos biomateriales en la osteogénesis, especialmente utilizando BM-MSCs en condiciones tanto con como sin inductores osteogénicos. Aunque los resultados preliminares son prometedores, la investigación actual no proporciona una comprensión completa de cómo estos biomateriales interactúan con células en un entorno más complejo y variable que el utilizado en los experimentos iniciales.

La liberación controlada de fármacos de los biomateriales de HA-Ge se estudió principalmente en un rango de pH entre 7 y 9 en presencia de medio DMEM, lo que puede no reflejar completamente las condiciones fisiológicas variadas y más complejas presentes en el cuerpo humano. Este enfoque experimental podría limitar la aplicabilidad de los resultados en entornos biológicos reales.

Finalmente, aunque se observó una notable deposición de capa de apatita y un comportamiento mejorado de absorción de proteínas, lo que sugiere la eficacia de estos biomateriales en la diferenciación de células óseas, la investigación no abordó de manera exhaustiva las posibles respuestas inmunológicas o efectos adversos a largo plazo que podrían surgir con el uso de estos biomateriales en aplicaciones clínicas.

En resumen, las limitaciones del estudio incluyen la especificidad del tamaño de partícula, la concentración óptima de Ge que puede no ser aplicable a todas las condiciones, la necesidad de estudios adicionales sobre osteogénesis, la limitación de las condiciones experimentales respecto a las fisiológicas reales, y la falta de evaluación exhaustiva de respuestas inmunológicas y efectos a largo plazo. Estas limitaciones subrayan la necesidad de investigaciones futuras para validar y expandir los hallazgos preliminares y avanzar en el desarrollo de biomateriales innovadores para la regeneración ósea.

10.2. EN HUMANOS

El estudio que abordó la hipersensibilidad dentinaria presentó varias limitaciones que deben ser consideradas al interpretar sus resultados. Una de las principales limitaciones fue el tamaño reducido de la muestra inicial, que consistió en solo 17 pacientes. Este número limitado de participantes restringe la generalización de los hallazgos a una población más amplia.

Además, el estudio experimentó un número significativo de abandonos, con 7 pacientes que dejaron de participar prematuramente. Esta tasa de deserción representa un desafío común en estudios clínicos y puede afectar la validez externa de los resultados. La deserción de un paciente debido a la aparición de disnea durante la primera semana del tratamiento subraya la necesidad de una evaluación y gestión cuidadosa de los posibles efectos secundarios adversos en investigaciones clínicas. Sin embargo, la pérdida de participantes afecta la potencia estadística del estudio y puede introducir sesgos.

Con solo 9 pacientes completando el estudio, la muestra final fue aún más reducida. Esta disminución en el tamaño de la muestra limita la capacidad de detectar diferencias significativas y reduce la robustez de los hallazgos. Además, un tamaño de muestra tan pequeño puede no representar adecuadamente la variabilidad de la respuesta al tratamiento en la población general.

Para abordar la subjetividad inherente a los cuestionarios diarios de dolor, se utilizaron herramientas estandarizadas como la Escala Visual Analógica (EVA) y una escala numérica del 0 al 10 para evaluar la percepción del dolor. Aunque este enfoque mejora la precisión y la comparabilidad de los resultados, sigue existiendo una dependencia en las autovaloraciones de los participantes, lo cual puede introducir sesgos subjetivos.

En resumen, las limitaciones del estudio incluyen el tamaño reducido de la muestra inicial, la alta tasa de deserción, la muestra final aún más pequeña y la dependencia de las autovaloraciones para evaluar el dolor. Estas limitaciones deben ser tenidas en cuenta al interpretar los resultados y sugieren la necesidad de estudios futuros con muestras más grandes y estrategias para minimizar las deserciones.

**CAPÍTULO XI -
FUTURAS LINEAS DE
INVESTIGACIÓN**

XI. FUTURAS LINEAS DE INVESTIGACIÓN

11.2. IN VITRO

1. Estudios de osteogénesis en condiciones complejas.

- Realizar experimentos adicionales que utilicen BM-MSCs en condiciones con y sin inductores osteogénicos, evaluando la capacidad de los biomateriales de HA-Ge para promover la formación de hueso en un entorno más cercano a las condiciones fisiológicas.

- Investigar la influencia de factores ambientales y biológicos complejos presentes en el cuerpo humano en la efectividad osteogénica de los biomateriales.

2. Liberación controlada de fármacos en entornos fisiológicos diversos.

- Evaluar la liberación controlada de fármacos de los biomateriales de HA-Ge en una variedad de entornos fisiológicos, incluyendo diferentes niveles de pH y composiciones de fluidos corporales.

- Explorar la efectividad de la liberación controlada en modelos animales para validar su aplicabilidad clínica.

3. Respuestas inmunológicas y efectos a largo plazo:

- Investigar las posibles respuestas inmunológicas a los biomateriales de HA-Ge, asegurando que no se desencadenen reacciones adversas significativas.
- Realizar estudios a largo plazo para evaluar la seguridad y efectividad de los biomateriales en aplicaciones clínicas prolongadas.

4. Desarrollo de aplicaciones clínicas específicas.

- Diseñar y probar aplicaciones específicas para los biomateriales de HA-Ge en la regeneración ósea e implantes dentales.
- Colaborar con equipos clínicos para iniciar ensayos clínicos que evalúen la eficacia y seguridad de estos biomateriales en pacientes.

5. Integración con tecnologías avanzadas.

- Explorar la integración de los biomateriales de HA-Ge con tecnologías avanzadas como la impresión 3D para crear estructuras óseas personalizadas.

Investigar el uso de nanotecnología para mejorar las propiedades de los biomateriales y su interacción con células y tejidos

11.1. EN HUMANOS**1. Comparación de Tratamientos.**

- Evaluar la eficacia comparativa de la pasta de hidroxiapatita con germanio frente a otros tratamientos establecidos, como el láser, nitrato potásico y barniz de flúor, para determinar cuál ofrece mejores resultados a largo plazo.

2. Aumentar el número de muestras.

- Este enfoque permitirá obtener datos más representativos y robustos, lo que es fundamental para validar la eficacia de la pasta dental compuesta por hidroxiapatita y germanio.

3. Efectos en diferentes grupos poblacionales.

- Realizar estudios que evalúen la efectividad de la pasta en diferentes grupos demográficos, como pacientes con enfermedad periodontal, edad avanzada o condiciones sistémicas que puedan influir en la hipersensibilidad.

4. Protocolos de tratamiento personalizados.

- Desarrollar y probar protocolos de tratamiento personalizados que integren la pasta con germanio y hidroxiapatita, adaptando la terapia según la severidad de la hipersensibilidad y las características del paciente.

5. Durabilidad de los resultados.

- Realizar estudios longitudinales para evaluar la durabilidad de la eficacia de la pasta de hidroxiapatita y germanio en la reducción de la hipersensibilidad a lo largo del tiempo.

9. Efecto en la calidad de vida.

- Realizar estudios que midan el impacto del tratamiento en la calidad de vida de los pacientes, evaluando no solo la reducción de la

sensibilidad, sino también su efecto en la alimentación y bienestar general.

10. Innovaciones en formulación.

- Investigar nuevas formulaciones que combinen la hidroxiapatita y el germanio con otros compuestos para potenciar su eficacia y mejorar la experiencia del paciente.

- .

ANEXO

ANEXO

ANEXO 1. COMITÉ DE ÉTICA



COMITÉ DE ÉTICA DE LA UCAM

DATOS DEL PROYECTO

Título:	"Estudio de la adición del Germanio Orgánico en biomateriales aloplásticos"	
Investigador Principal	Nombre	Correo-e
Dr.	José Eduardo Maté Sánchez de Val	jemate@ucam.edu

INFORME DEL COMITÉ

Fecha	24/04/2020	Código	CE042006
--------------	------------	---------------	----------

Tipo de Experimentación

Investigación experimental clínica con seres humanos	X
Investigación experimental no clínica con seres humanos	
Utilización de tejidos humanos procedentes de pacientes, personas sanas, tejidos embrionarios o fetales	
Utilización de tejidos humanos, tejidos embrionarios o fetales procedentes de bancos de muestras o tejidos	
Investigación observacional con seres humanos, psicológica o comportamental en humanos	X
Uso de datos personales, información genética, etc.	X
Experimentación animal	
Utilización de agentes biológicos de riesgo para la salud humana, animal o las plantas	
Uso de organismos modificados genéticamente (OMGs)	

Comentarios Respecto al Tipo de Experimentación

Nada Obsta

Comentarios Respecto a la Metodología de Experimentación

Nada Obsta





COMITÉ DE ÉTICA DE LA UCAM

Sugerencias al Investigador

--

A la vista de la solicitud de informe adjunto por el Investigador y de las recomendaciones anteriormente expuestas el dictamen del Comité es:

Emitir Informe Favorable	X
Emitir Informe Desfavorable	
Emitir Informe Favorable condicionado a Subsanación	

MOTIVACIÓN

Incrementará conocimientos en su área

Vº Bº El Presidente,

Fdo.: José Alberto Cánovas Sánchez

El Secretario,

Fdo.: José Alarcón Teruel

ANEXO 2. ARTÍCULO PUBLICADO



Article

The Effect of Germanium-Loaded Hydroxyapatite Biomaterials on Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells Growth

Jeevithan Elango ^{1,2,*}, Rodion Bushin ¹, Artiom Lijnev ¹, Piedad N. De Aza ³,
 Carlos Pérez-Albacete Martínez ⁴, José Manuel Granero Marín ⁵, Ana Belen Hernandez ⁶,
 Luis Ramón Meseguer Olmo ⁶ and José Eduardo Maté Sánchez De Val ^{1,*}

¹ Department of Biomaterials Engineering, Faculty of Health Sciences, UCAM-Universidad Católica San Antonio de Murcia, Guadalupe, 30107 Murcia, Spain

² Center of Molecular Medicine and Diagnostics (COMManD), Department of Biochemistry, Saveetha Dental College and Hospitals, Saveetha Institute of Medical and Technical Sciences, Saveetha University, Chennai 600 077, India

³ Instituto de Bioingeniería, Universidad Miguel Hernández, Avda. Ferrocarril s/n, Elche, 03202 Alicante, Spain

⁴ Oral Surgery and Oral Implantology Department, UCAM-Universidad Católica San Antonio de Murcia, 30107 Murcia, Spain

⁵ Department of Implant Dentistry, Faculty of Medicine and Dentistry, UCAM-Universidad Católica San Antonio de Murcia, 30107 Murcia, Spain

⁶ Tissue Regeneration and Repair Group, Biomaterials and Tissue Engineering, Faculty of Health Sciences, UCAM-Universidad Católica San Antonio de Murcia, Guadalupe, 30107 Murcia, Spain

* Correspondence: srjeevithan@gmail.com or jelango@ucam.edu (J.E.); jemate@ucam.edu (J.E.M.S.D.V.)



Citation: Elango, J.; Bushin, R.; Lijnev, A.; De Aza, P.N.; Martínez, C.P.-A.; Marín, J.M.G.; Hernandez, A.B.; Olmo, L.R.M.; Val, J.E.M.S.D. The Effect of Germanium-Loaded Hydroxyapatite Biomaterials on Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells Growth. *Cells* **2022**, *11*, 2993. <https://doi.org/10.3390/cells11192993>

Academic Editors: Roberta Di Pietro and Florelle Gindraux

Received: 17 July 2022

Accepted: 22 September 2022

Published: 26 September 2022

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: Hydroxyapatite (HA) is a hard mineral component of mineralized tissues, mainly composed of calcium and phosphate. Due to its bioavailability, HA is potentially used for the repair and regeneration of mineralized tissues. For this purpose, the properties of HA are significantly improved by adding natural and synthetic materials. In this sense, the germanium (Ge) mineral was loaded in HA biomaterial by cold isostatic pressure for the first time and characterization and biocompatibility using bone marrow mesenchymal stem cells (BM-MSCs) were investigated. The addition of Ge at 5% improved the solubility (3.32%), stiffness (18.34 MPa), water holding (31.27%) and biodegradation (21.87%) properties of HA, compared to control. Compared to all composite biomaterials, the drug-releasing behavior of HA-3% Ge was higher at pH 1 and 3 and the maximum drug release was obtained at pH 7 and 9 with HA-5% Ge biomaterials. Among the different mediums tested, the DMEM-medium showed a higher drug release rate, especially at 60 min. HA-Ge biomaterials showed better protein adhesion and apatite layer formation, which ultimately proves the compatibility in BM-MSCs culture. Except for higher concentrations of HA (5 and 10 mg/mL), the different concentrations of Ge and HA and wells coated with 1% of HA-1% Ge had higher BM-MSCs growth than control. All these findings concluded that the fabricated HA biomaterials loaded with Ge could be the potential biomaterial for culturing mammalian cells towards mineralized tissue repair and regeneration.

Keywords: hydroxyapatite; germanium; drug release; mesenchymal stem cells; protein adhesion

1. Introduction

Natural minerals have continuously been used in biomedical applications due to their unique physicochemical and biocompatible properties. For instance, various natural-derived minerals and metals are widely used in tissue regeneration applications. In this aspect, hydroxyapatite (HA) is a well know ceramic mineral, primarily composed of phosphate and calcium that is extensively used in bone and dental tissue regeneration and repair. For this purpose, many researchers fabricated different types of HA materials in the form of the scaffold, graft, 3D matrix and hydrogel [1–3]. More specifically, the biological behavior of HA has been improved by fabricating with other bio(materials), such

as silk fibroin [4,5], cellulose [6], alginate [7], polylactic acid [8], Poly(ϵ -caprolactone) [9], collagen [10–12], polymethylmethacrylate [13] and gelatin/chitosan/polyvinyl alcohol [14], for better use in bone and dental tissue regeneration. Recently, several initiatives for the extraction methods are started to obtain HA from biowaste resources, such as fish bone, scale [15,16], rice husk and chicken eggshells [17–19].

In addition to HA, Germanium (Ge) is a naturally derived metalloid that structurally and physicochemically resembles diamond and silicon, respectively. Due to their excellent semiconductive properties, Ge is the first element used for the construction of transistors and semiconductors and has been triggering great interest in the field of biomedicine. The pharmacological studies already proved the antimicrobial, antimutagenic, antitumor, antiviral, immunomodulating and erythropoietic effects of Ge [20]. Though Ge has been commercially available for several decades, they recently got attracted to the treatment of certain diseases. For instance, organogermanium compounds have been used to treat AIDS, cancer [21], hemocompatibility [22], chronic hepatitis [23] and hematopoiesis [24] and to stimulate the immune system [25]. The biological activity of Ge depends on the chemical form and in most cases the Ge is used in the form of Ge132-beta-carboxyethylgermanium sesquioxide ((GeCH₂CH₂COOH)₂O₃), spirogermanium and germanium-lactate-citrate. Interestingly, a recent study demonstrated the low acute and chronic adverse effects of inorganic germanium dioxide [26]. Due to their excellent antioxidants, biocompatibility, immunostimulatory, low toxic (except GeH₄, GeO₂ and GeCl₄) [21] and regenerative effect, several researchers have used Ge as a potential drug loaded with other polymers to explore the applicability in tissue regeneration. In a recent study, Ge was incorporated as a biologically active substance with graphene films to stabilize the physicochemical properties, electrical conductivity and surface properties. Their findings disclosed that Ge incorporated graphene had enhanced biological activity through upregulating osteogenic markers gene expression in mesenchymal stem cells (MSC) [27]. The beneficial effects of Ge on MSCs were reported recently with or without incorporating other polymers [27,28]. So far Ge has been incorporated with different polymer systems, such as hydrophilic N-doped ultrathin graphite scaffold for advanced electrodes [29], silicon cluster [30], metal ions (Cr⁺ and Ni⁺) for the growth of small microorganisms and biofilms [31], hollow carbon spheres for lithium-ion batteries [32], gold ion implantation for bioactive surfaces [33] and hyaluronic acid-graft-dopamine hydrogel for spinal cord injury repair [34].

Though, HA and Ge have been fabricated with various synthetic and natural materials, the combined effect of Ge and HA has not yet been explored. Ge element as a good conductor and HA as a major component of bones (55%) are promising materials for tissue regeneration and self-healing ability by transmitting signals in biological cells. Therefore, it is necessary to understand the potential effect of Ge combined with HA in biomedical applications. As an initiative, this study aimed to optimize the appropriate composition of HA and Ge for the biocompatibility of bone marrow mesenchymal stem cells (BM-MSCs) growth. For this purpose, solid-state-synthesized HA was isostatically cold pressed with Ge for fabricating biomaterials and their drug-releasing, protein adhesion, mineral deposition and biocompatibility for BM-MSCs growth were investigated.

2. Materials and Methods

2.1. Raw Materials and Composition

The raw materials for the present study were commercial Germanium, 2-Carboxyethyl germanium sesquioxide (GeCH₂CH₂COOH)₂O₃ (Cat No. 21030164 Japan algae Co., Ltd., Tokyo, Japan) and synthesized HA.

2.2. Hydroxyapatite Synthesis

HA was synthesized by a solid-state reaction from a stoichiometric mixture of calcium hydrogen phosphate anhydrous (CaHPO₄, Sigma, St. Louis, MO, USA) and calcium carbonate (CaCO₃, Sigma, St. Louis, MO, USA) with an average particle size of <15 μ m and a Ca/P ratio of 1.72. The mixture of CaHPO₄ and CaCO₃ was heated in a platinum

crucible to 1200 °C for 6 h at a heating rate of 10 °C/min followed by a cooling rate of 6.5 °C/min until room temperature. The obtained material was ground to an average particle size of 4.8 µm (Mastersizer APA 2000 E Ver. 5.20, Serial Number: MAL1013724, Malvern Instruments Ltd., Malvern, UK).

2.3. Fabrication of HA-Ge Composite

The respective components were weighed-out and thoroughly dry mixed in a mixing miller with PSZ-zirconia balls. After the milling process, the powder mixture was cold iso-statically pressed at 200 MPa. The pressure was maintained for 30 min, after which it was slowly depressurized to 1 atmosphere. In total, four types of samples were fabricated: control (100% HA), HA-1% Ge (99% HA with 1% Ge), HA-3% Ge (99% HA with 3% Ge) and HA-5% Ge (99% HA with 5% Ge).

2.4. Composite Characterization

The materials were characterized by X-ray diffractometer (XRD) (Bruker-AXS D8Advance, Karlsruhe, Germany) analyses of the raw materials and the ceramic composites were performed to determine crystallography and phase identification using Cu-Kα radiation at 40 kV and 30 mA. The scans were performed with 2 θ values varying from 5° to 65° at a rate of 0.05°/min. The average particle size of HA was estimated by particle size distribution test using Granulometry (Mastersizer APA 2000 E). HA-Ge composite morphology was done by scanning electron microscopy in a SEM-Hitachi S-3500N device with an energy-dispersive X-Ray spectroscopy (EDS-INCA, Oxford Instruments Analytical, Wycombe, UK).

2.5. Mechanical Properties

The compression strength of HA-Ge biomaterial was determined by using a texture analyzer (Model: Brookfield, Model CT3 50K, Middleborough, MA, USA). Briefly, the biomaterials with 10 mm × 9 mm were placed on the sample holder and potential force was applied using a plunger attached to the instruments and the compression strength of HA-Ge was measured by calculating stress–strain curves.

2.6. Solubility

The solubility of HA-Ge biomaterial was evaluated in different mediums, such as water, PBS and DMEM culture mediums. The initial weight (W0) of samples after drying at 60 °C for 5 h was measured and the samples were immersed in the above medium for 7 days. Then, the samples were dried at 60 °C for 5 h and the final weights (W7) were measured. The percentage of sample solubility was measured by the following formula. All the sample weights were normalized to 1 g for comparison.

$W_s = ((W_0 - W_7)/W_0) \times 100$, where W_s -water solubility percentage, W_0 and W_7 -initial and final weight of samples, respectively.

2.7. Water Absorption Rate

The water absorption rate of HA-Ge biomaterial was measured by following the earlier method [35]. Briefly, the samples were dried at 37 °C for 36 h and weighed before immersion in distilled water. The samples were immersed in distilled water for 2 h at 37 °C and weighed the wet weight after gently removing the surface-bound excess water by filter paper. The water absorption rate was calculated according to the below equation.

$WAR = (W_w - W_d)/W_d \times 100\%$, where W_w and W_d are wet and dry weights of samples, respectively.

2.8. Swelling Rate

The swelling rate of HA-Ge biomaterial was measured by calculating the biomaterials' surface area before and after immersing the biomaterials in phosphate-buffered saline (PBS) (Labclinics, Barcelona, Spain). The percentage of swelling rate was calculated using the formula:

$SR = ((Aa - Ab)/Ab) \times 100$, where Ab and Aa are the area of biomaterials before and after immersion, respectively.

2.9. In-Vitro Degradation

The rate of degradation of HA-Ge biomaterial was measured by following the earlier method [36] with slight modification. Briefly, the biomaterial samples were immersed in 3 mL of Trypsin (Labclinics, Barcelona, Spain) and the enzymatic digestion was initiated by incubating at 37 °C. The initial weight of the sample (Wi) was measured after immersion in Trypsin solution and the weight of degraded samples (Wd) was measured periodically to calculate the percentage of degradation.

$$\text{Degradation rate} = ((Wi - Wd)/Wi) \times 100$$

2.10. Water Angle Contact

The wettability of the sample was measured by water contact angles using drop shape analysis at room temperature. Briefly, 5 µL of deionized water was dropped on the surface of samples and the contact angles were calculated on both sides of the drop. Prior to the experiment, the samples were acclimatized at room temperature (with a RH of 60%) for moisture equilibrium.

2.11. Protein Adsorption Ability

The ability of biomaterials to absorb functional proteins on their surface was evaluated by Coomassie brilliant blue (CBB) test by following the earlier method [37]. Briefly, the biomaterials were treated with concentrated ethanol overnight to modify the surface characterization and both ethanol-treated and untreated biomaterials were incubated in 1 mL fetal bovine serum (Lot No. 2445724RP, Gibco, Carlsbad, CA, USA) at 37 °C overnight, washed with PBS thrice, fixed with 4% paraformaldehyde for 15 min and the surface adsorbed proteins were stained with CBB G-250 (0.25% CBB G-250 in methanol/water/acetic acid, 40:50:10 volume ratio mixture) for 30 min. After staining, the biomaterials were de-stained with a methanol/water/acetic acid mixture overnight. Then, the samples were crushed in PBS and supernatant was measured at 590 nm. The amount of surface adsorbed protein on HA-Ge biomaterial was calculated based on the absorption curve of standard protein with different concentrations, as reported earlier [38].

2.12. Bioactivity

The efficiency of HA-Ge in mineralization was evaluated by the method of Kokubo et al. using simulated body fluid (SBF) [39]. The SBF (pH 7.4) was prepared exactly following the same steps and recipes, as recommended by Kokubo et al. [39]. The samples were incubated vertically in 50 mL falcon tubes with SBF for 28 days at 37 °C with changing the medium every 3 days once. Then, the samples were gently washed with distilled water three times and stained with an alizarin red stain to visualize the mineral deposition on the surface. The amount of staining rate was optically measured by UV-Vis spectrophotometry (Bio Tek Instruments Inc., Winooski, VT, USA) at 450 nm by subtracting the control value (samples without SBF treatment). For quantification, the alizarin red stain was dissolved in a mixture of methanol (20%) and acetic acid (10%) in water for 20 min [40].

2.13. Drug Release Behavior

The drug releasing pattern of HA-Ge biomaterial was done by varying parameters such as pH and solvents. Briefly, the biomaterials were immersed in a solution with different pHs 1, 3, 5, 7 and 9, respectively, for 5, 20, 40, 60, 80 and 100 min. Moreover, the drug-releasing pattern of biomaterial was determined in a different solvent system, such as PBS, DMEM culture medium and simulated body fluid for 5, 15, 30, 45, 60, 75 and 90 min. The simulated body fluid was prepared as per the instructions of Kokubo et al. [39]. At each time point, the release rate of germanium in the supernatant was measured at 215 nm (as

determined by the spectral absorption of germanium powder, Supplementary Figure S1). The amount of released germanium in the supernatant was calculated from the standard curve (Supplementary Figure S2) obtained with different concentrations of germanium 0.3125, 0.625, 1.25, 2.5, 5 and 10 mg/mL, respectively.

2.14. In-Vitro Cell Culture

The biocompatibility of HA-Ge biomaterials was assessed using in vitro cell culture of BM-MSCs. The cells were isolated from three healthy patients scheduled for elective orthopedic surgery in accordance with the criteria established by the International Society for Cell Therapy. The surface characterization of cells using CD73, CD90, CD105, CD44 and CD14/19/34/45 markers was already reported in our previous work [41].

BM-MSCs were cultured as per the standard cell culture protocol using DMEM medium supplemented with 10% FBS and 1% antibiotics (P/S) at 37 °C in a 5% CO₂ incubator. Firstly, the cells were treated with germanium (0.001, 0.01, 0.25, 0.5, 1, 5 and 10 mg/mL) and hydroxyapatite (0.01, 0.1, 0.25, 0.5, 1, 5 and 10 mg/mL) in a different concentrations at 37 °C for 7 d in a 48 well plates. At the same time, the cells were cultured with HA-Ge disc or composites (1 mg/mL) coating in 24 well plates at 37 °C for 7 d. The proliferation and morphology of BM-MSCs were evaluated as per the standard protocol using automated Invitrogen cell counter (Countess 3 FL, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) and staining (H&E and FITC-DAPI) methods, respectively.

2.15. Cell Loading Density

The BM-MSCs at a cell density of 5×10^4 were seeded on top of the biomaterials in order to evaluate the maximum amount of cell-loading capacity of HA-Ge composite. After 6 h incubation in a CO₂ incubator at 37 °C, the biomaterials were moved to a new well and the adherent cells were counted after trypsinization using an automated cell counter. The percentage values were calculated from the seeding density of BM-MSCs.

2.16. Statistical Analysis

All the experiments were repeated at least three times and data were represented as mean and standard deviation. The statistical analysis was done using ANOVA using GraphPrism 9.0.1 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA). A *p*-value less than 0.05 was considered statistical significance.

3. Results

3.1. Characterization

The characteristics, such as solubility, stiffness, water holding and in vitro degradation of HA-Ge samples, are shown in Figure 1. The solubility of the sample was tested in three different mediums, such as water, PBS and DMEM, and the results showed that no significant changes were observed between control (HA sample) and test samples (except HA-5% Ge sample) in water. On the contrary, the solubility was slightly decreased in HA-1% Ge, however, increased in HA-5% Ge sample incubated in water, PBS and DMEM, respectively. Notably, the higher concentration of Ge-incorporated HA sample was more soluble in water, compared to PBS or DMEM ($p > 0.05$). Notably, there was no significant change observed in the swelling properties of HA and HA-Ge biomaterials throughout the study. Regarding the mechanical property, the addition of Ge up to 3% did not contribute any significant changes in stiffness though slightly increased the stiffness and 5% Ge could increase the stiffness (18.34 MPa), compared to the control HA (12.60 MPa) sample. At the same time, the water-holding capacity of HA was tremendously increased ($p < 0.05$) by incorporating 5% Ge and the rest of the concentrations did not improve the water holding ability.

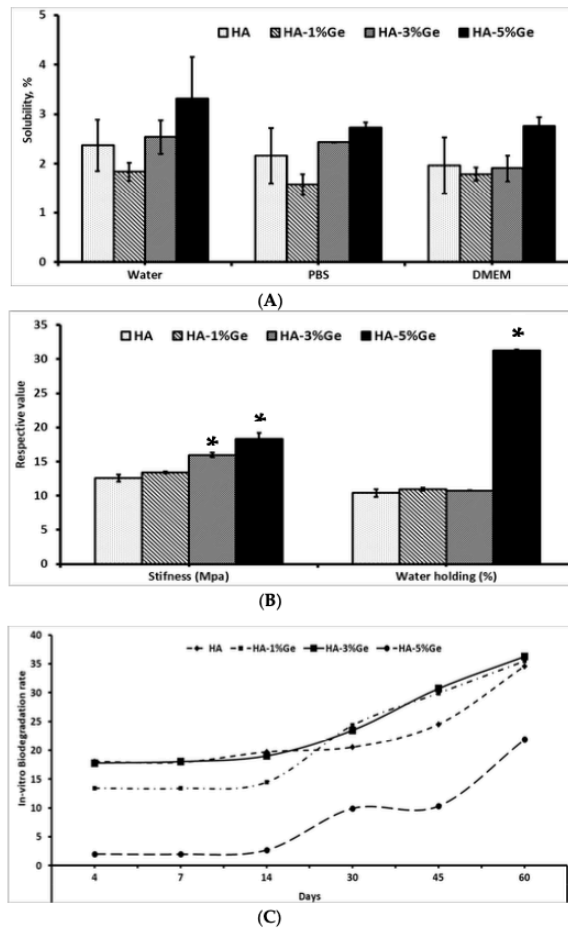


Figure 1. Solubility (A), stiffness, water holding (B) and in vitro biodegradation (C) of HA-Ge biomaterials. HA-control, HA 1% Ge: HA with 1% germanium, HA 3% Ge: HA with 3% germanium, and HA 5% Ge: HA with 5% germanium. * denotes statistical significance, $p < 0.05$ vs. HA.

In general, the enzymatic degradation did not disintegrate the HA molecule significantly, since the HA is a ceramic-like mineral polymer. Similar to water solubility, there were no changes in the degradation pattern of HA, HA-1% Ge, and HA-3% Ge biomaterials throughout the study, however, HA-5% Ge biomaterial had more resistance against in vitro degradation, compared to the HA sample. On 60 days of treatment, HA, HA-1% Ge, and HA-3% Ge biomaterials were degraded at most of 35%, which was 22% in HA-5% Ge biomaterial.

Figure 2 shows the X-ray diffraction patterns of the composites HA-1% Ge, HA-3% Ge and HA-5% Ge biomaterials. The XRD patterns of the composite HA biomaterials showed

peaks corresponding with HA (JCPDS standard data of HA, card no. 09-0432), regardless of the addition of germanium, due to the percentage of germanium not being enough to be detected with the XRD (below the limit of XRD detection). The granulometry data showed that the average particle size of the HA was 4.845 μm (result analysis report of particle size distribution test of HA and EDX of the Germanium are presented in the Supplementary Figures S3 and S4, respectively).

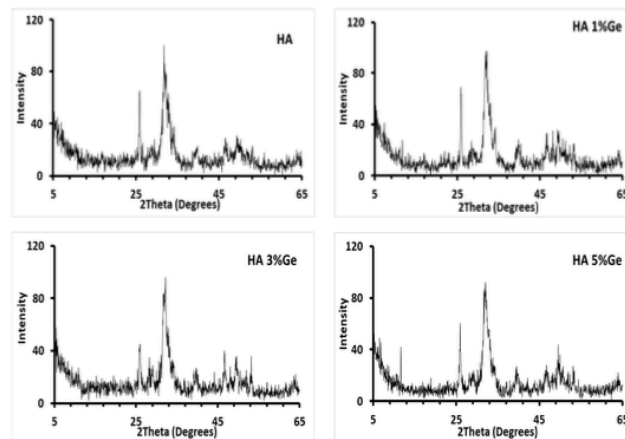


Figure 2. X-ray diffraction patterns of the composites HA-Ge biomaterials. HA-control, HA 1% Ge: HA with 1% germanium, HA 3% Ge: HA with 3% germanium, and HA 5% Ge: HA with 5% germanium.

Figure 3 shows the morphology of the HA-5%Ge composite before isostatic pressing as representative of all HA-Ge composites, since not much difference was observed in the surface of HA loaded with different concentrations. The composite was made up of particles of HA (*) with rounded edges, and the Ge particles (#) show edges more marked than HA and smaller in size, comparatively. EDX analysis showed that the obtained materials were stoichiometric HA with a Ca/P ratio of ~ 1.66 , and the composites were a mixture of HA and Ge particles (Table 1).

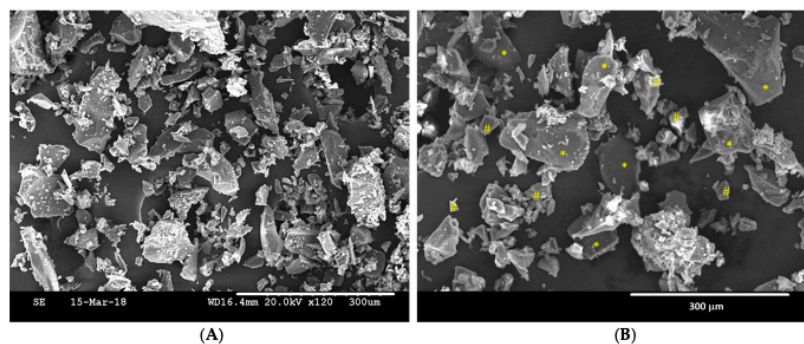


Figure 3. SEM images of the Ge (A) and HA-5% Ge powder composite (B). (*) HA particles and (#) Ge particles. Scale bar—300 μm .

Table 1. EDX microanalysis of the HA-Ge composites.

	Ca (atomic%)	P (atomic%)	Ge (atomic%)
HA	62.41	37.60	-
HA-1%Ge	61.78	37.22	1.01
HA-3%Ge	60.71	36.35	3.02
HA-5%Ge	59.3	35.72	5.01

HA-control, HA-1%Ge- HA with 1% germanium, HA- 3%Ge- HA with 3% germanium, and HA-5%Ge- HA with 5% germanium.

3.2. Drug-Release

It is important to understand the releasing behavior of Ge by composite HA biomaterials to assess the biological behavior. Therefore, we tried to evaluate the Ge releasing behavior of composite HA in different mediums, such as SBF, DMEM and PBS, as well as in different pH at a period. As expected, the releasing rate of Ge was increased with respect to time and concentration in all the samples treated with different mediums and pH, however, the Ge-releasing pattern was different between test groups. For instance, the higher releasing rate of Ge was observed in HA-3% Ge at pH 1 and 3, and in HA-5% Ge at pH 5, 7 and 9, respectively (Figure 4).

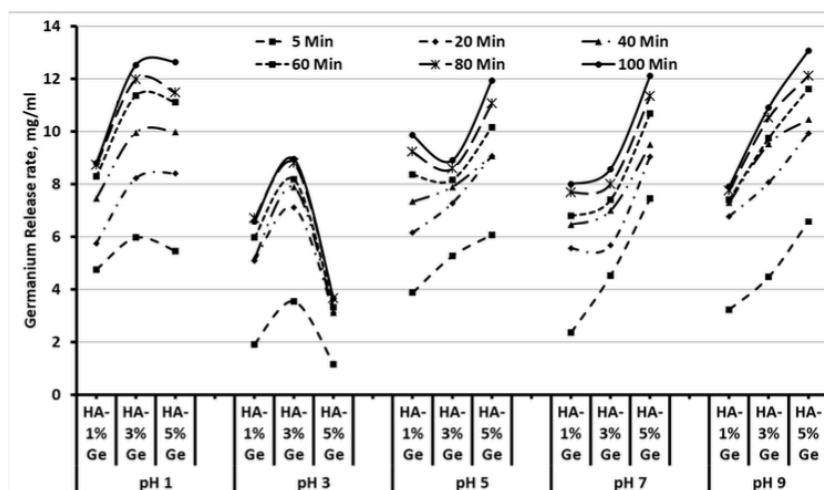


Figure 4. Drug-releasing pattern of HA-Ge biomaterials in different pH. HA-1% Ge-HA with 1% germanium, HA-3% Ge-HA with 3% germanium, and HA-5% Ge-HA with 5% germanium.

Among all samples tested, the maximum drug release was obtained in the HA-5% Ge sample at pH 7 and pH 9. Similar to pH, the releasing rate of Ge was steadily increased in all the test samples with respect to increasing duration. The release rate of Ge in PBS had a similar trend, compared to SBF, slowly releasing the Ge in medium up to 90 min, and not many changes were observed at 75 and 90 min. On contrary, there was a minimum amount of Ge released in DMEM medium until 45 min and a sudden release rate was noted at 60 min, and after that slightly decreased at 75 and 90 min by HA-3% Ge and HA-5% Ge. All these changes were not seen in HA-1% Ge, showing a slight increase rate of Ge in 75 min (Figure 5).

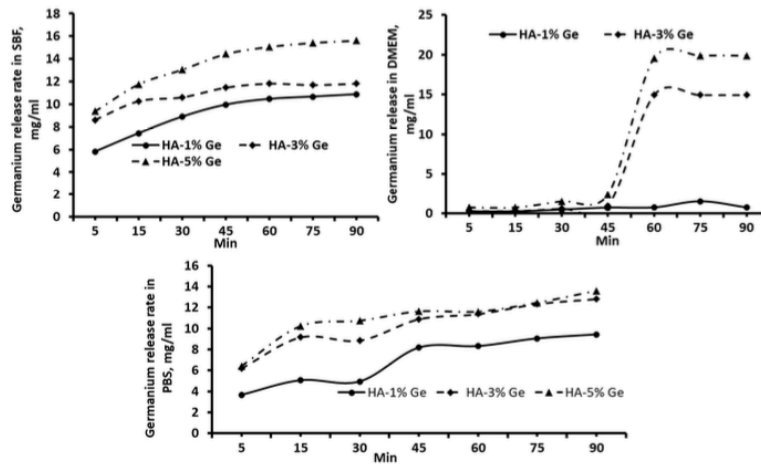


Figure 5. Drug-releasing pattern of HA-Ge biomaterials in different media. PBS—phosphate buffered saline, SBF—simulated body fluid, DMEM—DMEM culture medium. HA-1%Ge—HA with 1% germanium, HA-3%Ge—HA with 3% germanium and HA-5%Ge—HA with 5% germanium.

3.3. Contact Angle Test

The hydrophilic and hydrophobic behaviors of HA-Ge biomaterials were tested by using water and glycerol, respectively (Figure 6). As shown in Figure 5, the addition of Ge could increase the hydrophilic nature of HA and thereby reduce the water contact angle, and, after 15 s, the water contact angle of all HA samples became zero. At the same time, the hydrophobic nature of HA did not alter much by the incorporation of Ge, even though the glycerol contact angle was slightly increased in Ge-incorporated HA samples.

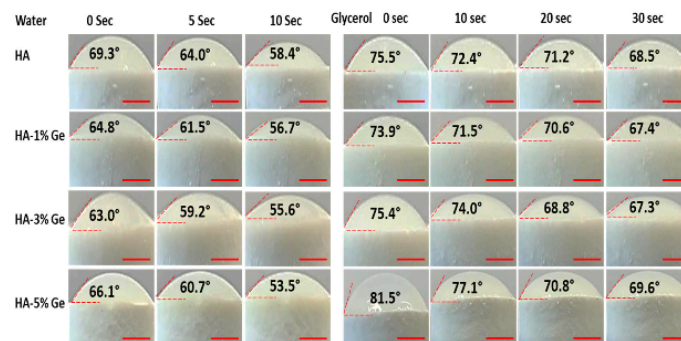


Figure 6. Contact angle behavior of HA-Ge biomaterials. Water (10 s) and glycerol (30 s) were used to test the hydrophilic and hydrophobic nature of HA-Ge composites. HA—control, HA-1%Ge—HA with 1% germanium, HA-3%Ge—HA with 3% germanium, and HA-5%Ge—HA with 5% germanium. Scale bar—0.4 cm.

3.4. Protein Adsorption Ability

The ability of HA-Ge samples in protein adsorption was evaluated using the CBB dye method. In general, all the samples were potentially bound to the serum protein and ethanol treatment could increase the ability of protein adsorption onto the HA-Ge surface. For instance, the quantification of protein by UV-Vis at 590 nm showed that the amount of protein absorbed more in ethanol-treated HA-Ge, compared to ethanol non-treated HA-Ge (Figure 7), however, no statistical significance was observed in protein absorption among ethanol-treated HA-Ge samples.

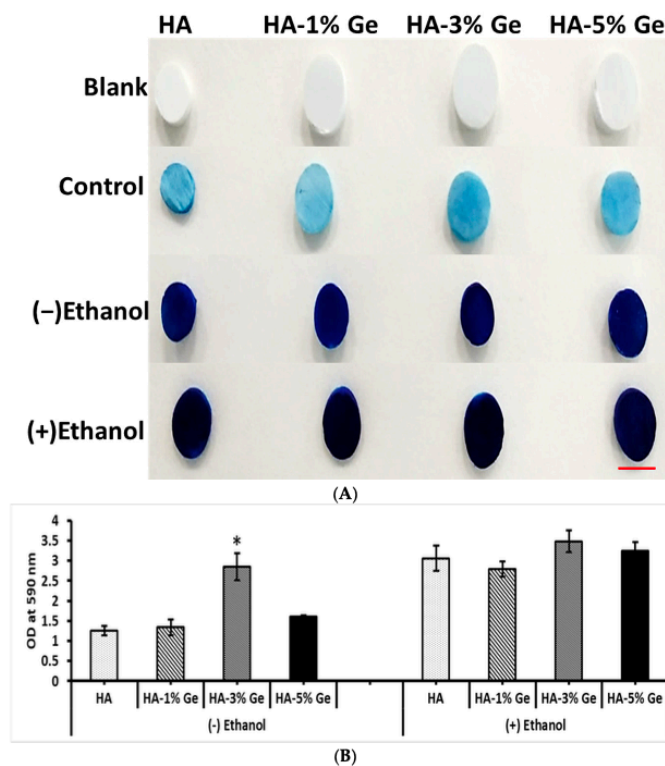


Figure 7. Protein adsorption ability of HA-Ge biomaterials by CBB test. (A) CBB stained HA-Ge composites, Scale bar—1 cm, (B) Intensity of CBB staining in HA-Ge composites by UV absorption at 590 nm. Blank—samples without any treatment, control—FBS untreated samples with CBB stain, (-) Ethanol: HA-Ge composites without ethanol treatment and (+) Ethanol: HA-Ge composites with ethanol treatment. HA-control, HA-1%Ge-HA with 1% germanium, HA-3%Ge-HA with 3% germanium and HA-5%Ge-HA with 5% germanium. The UV absorption of control (2nd row in image (A)) was below the measurable range. * denotes statistical significance, $p < 0.05$ vs. HA.

In contrast, non-treated HA-3% Ge had higher protein absorption ($p < 0.05$) than that of other non-treated HA-Ge samples and no statistical difference was observed between ethanol-treated and non-treated HA-3% Ge samples.

3.5. In-Vitro Bioactivity

To evaluate the mineralization behavior to favor extracellular matrix formation, the HA-Ge samples were soaked in SBF for 30 days followed by quantification of mineral using alizarin red stain. The deposition of the apatite layer, which is mainly composed of calcium and phosphate ions, onto the HA-Ge surface was visualized by Alizarin red stain and the results showed that mineralization was favored by all the samples, however, the range of mineralization was directly proportional to the concentration of Ge. The formation of the apatite layer was increased by increasing Ge concentration and the level of apatite layer deposition was more in HA-5% Ge, compared to control HA ($p < 0.05$) (Figure 8). As shown in Figure 8, the characteristic crystal structure and morphology were seen in higher concentration of Ge (3 and 5%)-incorporated HA samples.

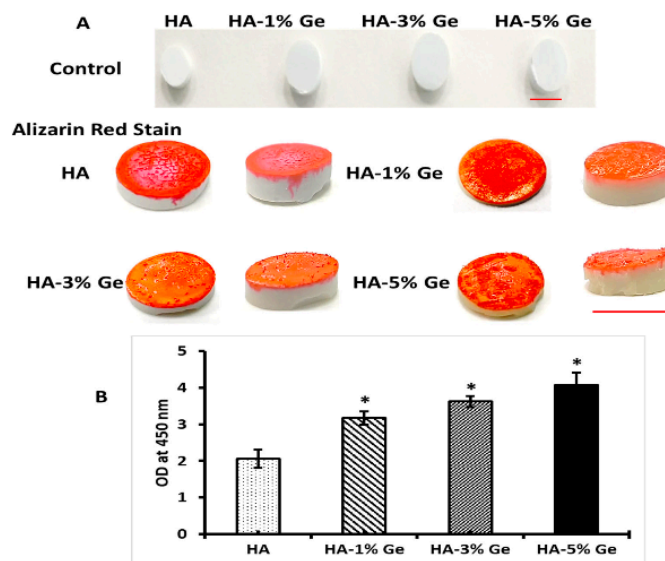


Figure 8. In vitro bioactivity of HA-Ge biomaterials after SBF treatment for 28 days with Alizarin red stain. (A)—samples with Alizarin red stain, Scale bar —1 cm, and (B)—UV absorption of Alizarin red stain on samples at 450 nm (B). HA-control, HA-1%Ge-HA with 1% germanium, HA-3%Ge-HA with 3% germanium and HA-5%Ge-HA with 5% germanium. The UV absorption of control (1st row in image (A)) was below the measurable range. The bioactivity of HA was significantly improved by Ge. * denotes statistical significance $p < 0.05$ vs. HA.

3.6. Effect of Ge on BM-MSCs

To optimize the Ge concentration and its effect on BM-MSCs proliferation, different concentration of Ge (0.001, 0.01, 0.1, 0.25, 0.5, 1, 2.5, 5 and 10 mg/mL) was chosen to culture BM-MSCs and evaluated by cell counting, H&E stain (Supplementary Figure S5) and fluorescence stains.

As expected, the BM-MSCs growth was increased by increasing the concentration of Ge (Figure 9). Compared to control, no significant changes were observed in cells growth of BM-MSCs treated with 0.001–0.1 mg/mL Ge but increasing Ge concentration further from 0.25 to 10 mg/mL triggered BM-MSCs growth ($p < 0.05$). Though the BM-MSCs count increased steadily with the treatment of Ge with 1–10 mg/mL, they did not show any statistical significance among these groups.

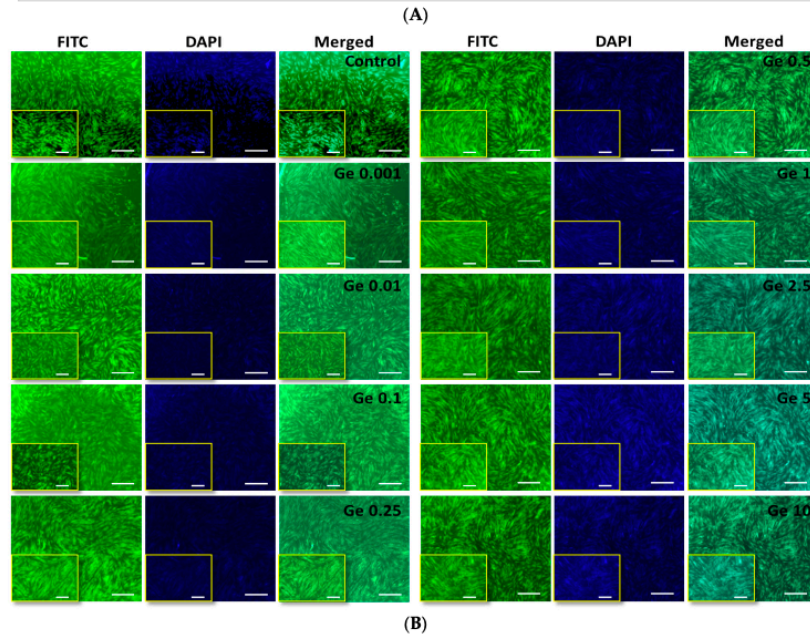
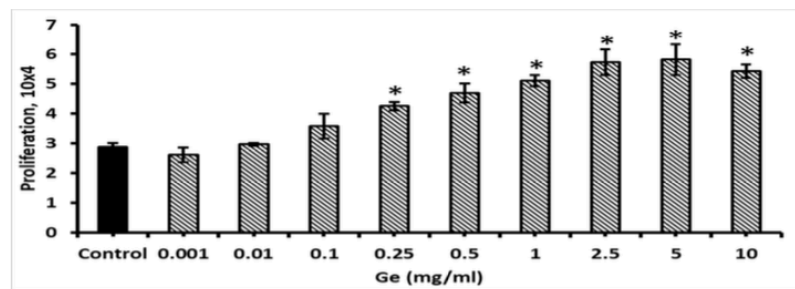
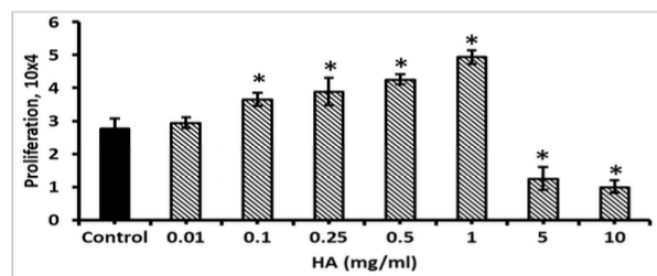


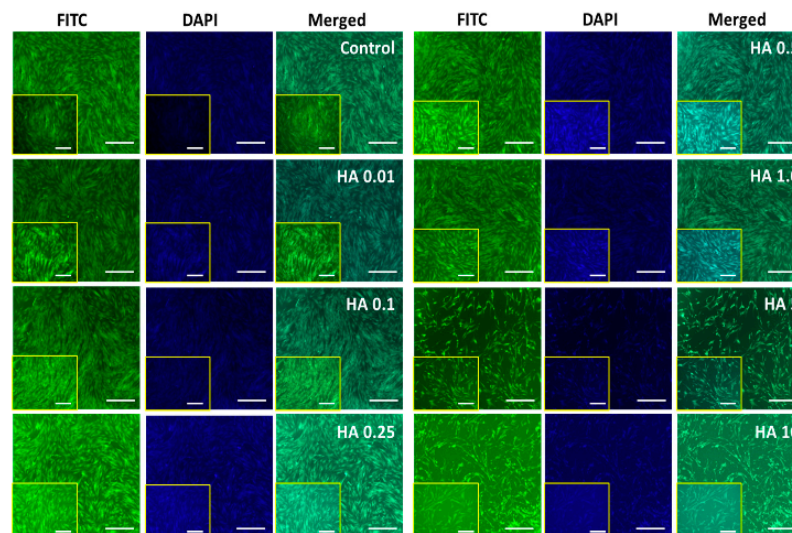
Figure 9. (A) Cell count and (B) Fluorescence (FITC, DAPI and merged) images of BM-MSCs cultured with Ge. Control—BM-MSCs cultured without Ge, Ge 0.001, 0.01, 0.1, 0.25, 0.5, 1.0, 2.5, 5 and 10 represent their respective concentration of Ge treated with BM-MSCs, respectively. Scale bar 5×-200 μm, 10×-100 μm (Insert) * denotes statistical significance, $p < 0.05$ vs. control.

3.7. Effect of HA on BM-MSCs

Similar to Ge, the effect of HA on BM-MSCs were tested with different concentrations (0.01, 0.1, 0.25, 0.5, 1, 5 and 10 mg/mL). The rate of BM-MSCs proliferation was increased with increasing HA concentration from 0.01 to 1 mg/mL, compared to control, however, the higher concentration over 5 mg/mL significantly decreased the BM-MSCs proliferation ($p < 0.05$), which was clearly seen in FITC and DAPI fluorescence staining image (Figure 10). Interestingly, the BM-MSC proliferation was significantly improved by 1 mg/mL concentration of HA, compared to control BM-MSCs ($p < 0.05$).



(A)



(B)

Figure 10. (A) Cell count and (B) Fluorescence (FITC, DAPI and merged) images of BM-MSCs cultured with HA. Control—BM-MSCs cultured without HA, HA 0.01, 0.1, 0.25, 0.5, 1.0, 5 and 10 represent their respective concentration of HA treated with BM-MSCs, respectively. Scale bar 5×-200 μm, 10×-100 μm (Insert). * denotes statistical significance, $p < 0.05$ vs. control.

3.8. Effect of HA-Ge Coating on BM-MSCs

Based on the above findings, we investigated the coating efficiency of HA-Ge composites in BM-MSCs growth. For this purpose, the culture plates were coated with 1 mg/mL HA-Ge composites based on the results described in Section 3.6. As shown in Figure 11, the proliferation rate of BM-MSCs was increased with HA-Ge coatings, compared to control, and the cell growth was upregulated in BM-MSCs coated with HA-1% Ge composites, compared to other composites ($p < 0.05$) (the H&E staining of BM-MSCs on HA-Ge composites are shown in Supplementary Figure S6). Moreover, the effect was insignificant between BM-MSCs coated with HA and HA-3% Ge and HA-1% Ge and HA-5% Ge, respectively.

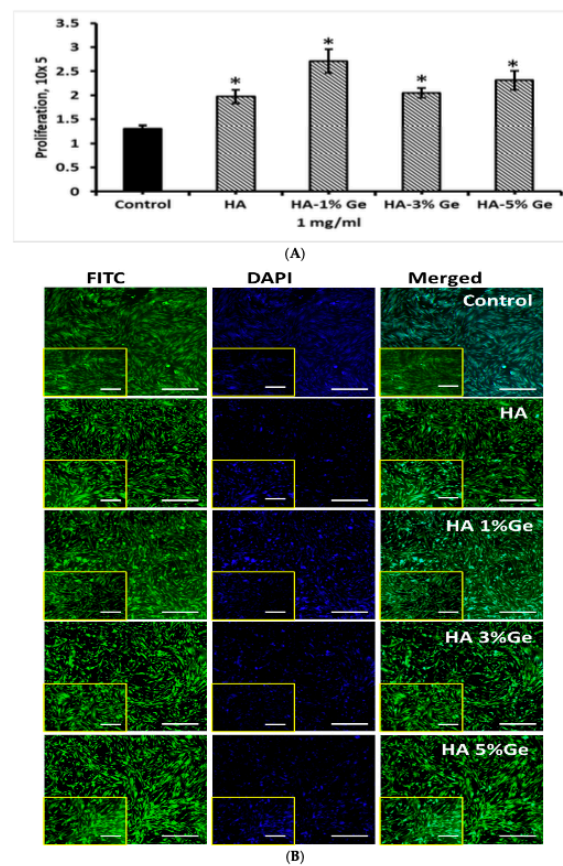


Figure 11. (A) Cell count and (B) Fluorescence (FITC, DAPI and merged) images of BM-MSCs cultured with HA-Ge coating. Control—BM-MSCs cultured without HA or HA-Ge composites, HA—HA without Ge, HA-1%Ge—HA with 1% germanium, HA-3%Ge—HA with 3% germanium, and HA-5%Ge—HA with 5% germanium. Scale bar 5 × 200 μm, 10 × 100 μm (Insert). * denotes statistical significance, $p < 0.05$ vs. control.

3.9. Cell Loading Density

The total capacity of HA-Ge biomaterial in BM-MSCs seeding result is presented in Figure 12. The total seeding density of BM-MSCs was 5×10^4 cells/sample and the total BM-MSCs attached to HA-Ge surface were $2.58\text{--}3.16 \times 10^4$, which was significantly lower than control (without HA-Ge) BM-MSCs (4.89×10^4) ($p < 0.05$). There was no significant change in cell loading density among HA and HA-Ge samples, which was further supported by H&E staining of HA-Ge-loaded BM-MSCs. The total percentage of cell loading ability was 97.8% in control and 51–63% in HA and HA-Ge samples, respectively.

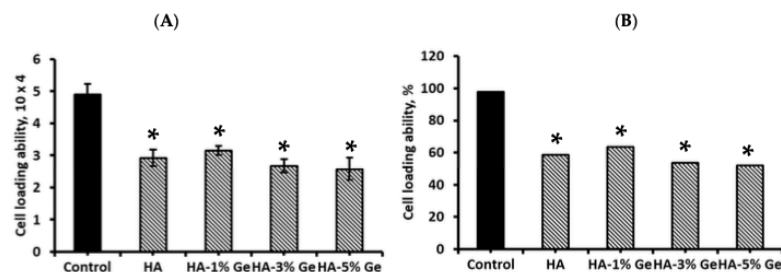


Figure 12. The total BM-MSCs seeding capacity of HA-Ge biomaterials. (A) and (B) are the actual and percentage of cell seeding density of BM-MSCs on HA-Ge composites, respectively. Control—BM-MSCs cultured without HA or HA-Ge composites, HA—HA without Ge, HA-1%Ge—HA with 1% germanium, HA-3%Ge—HA with 3% germanium, and HA-5%Ge—HA with 5% germanium. * denotes statistical significance, $p < 0.05$ vs. control.

4. Discussion

In general, HA is not soluble in water but soluble in gastric juice. In the 7 days experiment, the total percentage of HA solubility in all three mediums was about 1.9–2.3%, which was similar to the earlier works [42]. It was stated that the porosity and microstructure of HA affect the absorption of the solution [42,43]. However, the solubility of the HA sample was promoted by adding Ge. The physicochemical properties of Ge are believed to moderate the functional property of HA biomaterials. In general, the presence of two carboxyl groups in the molecular pattern of Ge makes it more hydrophilic, and, therefore, adding Ge into HA promotes the hydrophilic nature of HA-Ge biomaterials and thereby increases water solubility. Similarly, the stiffness of HA biomaterial was improved by the addition of Ge at 5%, however, lower concentration did not contribute to the stiffness of HA biomaterials. It was reported that the stiffness of HA was about 8 MPa to 520 MPa, which varies based on the source and fabrication method [44,45].

In the present study, the stiffness (compressive strength) of HA biomaterial was similar to the earlier work (5.67 to 7.66 MPa) using kaolin-reinforced hydroxyapatite scaffolds for bone regeneration [46]. However, high stiffness of about 400–900 MPa was reported for naturally derived hydroxyapatite scaffolds for bone biomaterials [47]. Similar to water solubility, the water holding capacity of HA was improved by Ge incorporation at a higher concentration (5%); however, lower concentration did not contribute any effect to water holding capacity. Similar to the present finding, the water holding ability of HA material was improved by the addition of biomolecules, such as hyaluronic acid [48] and cellulose nanocomposites [49].

From the *in vitro* biodegradation, it was clearly seen that the HA material was resistant enough to proteolytic digestion and very slow degradation was achieved throughout the study conducted for 60 days. The rate of degradation slowly increased with the duration of incubation. It is well known that the increasing incubation times are directly linear

to the weight loss and degradation rate of the polymers during the in vitro degradation study [50].

The maximum degradation of the HA sample was observed at about 35% after 60 days of enzymatic digestion. Various factors, such as hydrophilic, pores interconnectivity, pore size, additives crosslinking and susceptible enzymes, regulate the degradation process of biomaterial [42], which is an important factor for cytotoxicity, i.e., inhibit or stimulate the metabolism of stem cells [51]. Previously, Ganesan et al. [42] investigated the in-vitro degradation of HA in PBS at 37 °C for 28 days and reported the degradation of around 1.2–1.75% at end of the experiment.

It has been reported that soaking the materials in solutions with an appropriate pH similar to the blood pH is the original simulation of the biomaterials being placed into the human body [43]. Therefore, we used SBF as a suitable medium to understand the actual drug-releasing behavior of HA biomaterials and the drug-releasing effect was compared with PBS and DMEM. Our results proved that the composite biomaterials could release Ge favorably with DMEM medium, which gives an additional impact of this material for stem cell culture. In addition, the optimum pH range for better Ge drug release of HA biomaterial was 7–9.

From the contact angle test, we further confirm that increasing Ge concentration from 1 to 5% could improve the hydrophilic and reduce the hydrophobic nature of HA. To support this finding, Zhang et al. recently reported that the hydrophilic surface of ZnO nanorod film was improved by combining it with germanium particles [52].

The inside-out signaling and cellular properties, such as proliferation, migration and differentiation of cells, are highly influenced by the interaction of extracellular matrix proteins, including vitronectin, laminin and fibronectin [53–55]. Hence, we evaluated the ability of HA-Ge biomaterials to absorb functional protein by CBB test. Moreover, the empirical evidence confirms the potential ability of ethanol in surface modification of polymer. Therefore, in this study, we compared the ability of HA-Ge biomaterials in functional protein adhesion with and without ethanol treatment.

The high protein absorption ability of HA, as evidenced by the CBB test, proves that it is a potential carrier system for protein drug delivery. For instance, Ho et al. developed a biodegradable polymer system using poly(lactic glycolic acid) (PLGA) and HA for bovine serum albumin (BSA) protein-controlled release system and concluded that this system could effectively carry the hydrophilic drug for sustained substance release [56]. Most importantly, the higher protein adhesion behavior of HA-Ge biomaterials ultimately evidenced that the HA-Ge biomaterials could enhance the cellular functionality of stem cells and support osteoblast differentiation. To support this finding, Tripathi et al. already claimed that the HA scaffold with good protein binding ability could potentially support the proliferation and differentiation of human osteoblast SaOS2 cells [57]. In the present study, the in vitro bioactivity results also proved the higher apatite layer deposition on HA-5% Ge biomaterials surface, which eventually supports the ability of HA-Ge biomaterials on extracellular matrix formation during osteogenesis.

Further, the effect of Ge on BM-MSCs proliferation was investigated in the present study. Our results disclosed that the BM-MSCs growth was potentially stimulated by Ge treatment, especially at 0.5–5 mg/mL. Interestingly, no cytotoxic effect of Ge was observed in all concentrations tested up to 10 mg/mL and BM-MSCs remain in their original shape with integrity DNA even after being treated with Ge, as evidenced by FITC and DAPI staining. To support the present finding, an earlier study conducted by Choi et al. by treating BM-MSCs with 50, 70 and 100 µg/mL germanium-enriched *Cordyceps militaris* (CMGe) disclosed that the proliferation of BM-MSCs was increased to 1.8 fold by 50 µg/mL CMGe than control cells.

Though the proliferation rate of BM-MSCs was upregulated by the treatment of HA up to 1 mg/mL, the effect was downregulated in a higher concentration of HA around 5 and 10 mg/mL. Therefore, 1 mg/mL of HA was chosen as an optimum concentration for the following coating experiments of BM-MSCs. The results showed that the wells

coated with HA-1% Ge showed a favorable effect on BM-MSCs growth, compared to others. The exact reason for this effect is still unknown and needs further extensive research to understand the mechanism of HA-Ge in BM-MSCs.

From the available literature, the average percentage of viability using human stem cells for HA is reported to be around 70–100% [58–60]. Kumar et al. performed a cytotoxicity test on hydroxyapatite using mouse fibroblast 3T3-L1 cells with variable observation times [61]. Horta et al. investigated eggshell-based hydroxyapatite cells with 98.9% viability that were cultured in dental pulp stem cells (DPSCs) for 24 h [51]. The cytotoxicity of HA was tested with various type of cells, such as amniotic mesenchymal stem cell [62], bone-marrow-derived mesenchymal stem cells [63], adipose-derived mesenchymal stem cells [64], dental pulp stem cells [65], mouse fibroblast (929 cell line) [19,42], kidney epithelial cells [16], bone cells [17,58,59,66], human lung fibroblast (mrc5) cells [18], human osteosarcoma cells [67], RAW cells [68] and L6 and MG63 cells [69].

The cell-loading ability of HA-Ge biomaterials was much lower than the control (without biomaterials) groups, which might be due to the lower surface area of HA-Ge biomaterials, compared to 2D culture plates. The loading density of BM-MSCs on polymer surfaces differs based on various factors, such as affinity, surface area, smoothness, stiffness and porosity [70,71].

5. Conclusions

In the present study, the physicochemical, functional and cytotoxic properties of HA biomaterials were tested with varying Ge concentrations. The HA biomaterials were synthesized with a particle size of 4.8 μm . The results concluded that the physicochemical and mechanical properties were improved by 5% Ge and the addition of Ge could improve the hydrophilic nature of HA biomaterials and biodegradation rate. The drug releasing rate of HA-Ge biomaterials was high in pH 7–9 and DMEM medium. Even though 5% Ge increased the physicochemical, mechanical and functional properties of HA biomaterials, the optimum percentage of BM-MSCs growth was noted as 1% Ge. Interestingly, the higher apatite layer deposition and protein absorption behavior ultimately proved the efficiency of HA-Ge biomaterials in bone cell differentiation. However, further studies are essential to prove their effects on osteogenesis using BM-MSCs with and without osteogenic inducers.

Supplementary Materials: The following supporting information can be downloaded at: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/cells11192993/s1>, Figure S1: Spectral absorption of Germanium powder. Maximum absorption at 215 nm; Figure S2: Standard curve obtained from different concentrations of germanium; Figure S3: The average particle size of HA by particle size distribution test using Granulometry. Figure S4: The EDX of the Germanium; Figure S5: H&E staining of BM-MSCs treated with 0.001–10 mg/mL Ge (A), 0.01–10 mg/mL HA (B) and HA-Ge composites (C). HA-control without germanium, HA-1%Ge-HA with 1% germanium, HA-3%Ge-HA with 3% germanium, and HA-5%Ge-HA with 5% germanium; Figure S6: H&E staining of HA-Ge composites with BM-MSCs. HA-control without germanium, HA-1%Ge-HA with 1% germanium, HA-3%Ge-HA with 3% germanium, and HA-5%Ge-HA with 5% germanium.

Author Contributions: Conceptualization, J.E. and J.E.M.S.D.V.; methodology, J.E. and R.B.; study design, P.N.D.A. and L.R.M.O.; validation, J.E. and J.E.M.S.D.V.; formal analysis, J.E. and A.L.; investigation, J.E.; resources, J.E. and P.N.D.A.; writing—original draft preparation, J.E.; writing—review and editing, C.P.-A.M., A.B.H. and J.M.G.M.; supervision, J.E.; project administration, J.E.M.S.D.V.; funding acquisition, J.E. and J.E.M.S.D.V. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by MCIN/AEI/10.13039/501100011033 Grant numbers PID2020-116693RB-C21 and PID2020-116693RB-C22, Generalitat Valenciana Grant number CIAICO/2021/157 and Internal Research Fund from Universidad Católica San Antonio de Murcia (UCAM), Grant number PMAFI-27/21, Murcia, Spain.

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: Not applicable.

Acknowledgments: We sincerely acknowledge the Vice-Chancellor of Research, Professor Maria Estrella Núñez Delicado, UCAM, Murcia, Spain for organizing all the facilities and instruments to successfully conduct the present study.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Lett, J.A.; Sagadevan, S.; Fatimah, I.; Hoque, E.; Lokanathan, Y.; Léonard, E.; Alshahateet, S.F.; Schirhagl, R.; Oh, W.C. Recent advances in natural polymer-based hydroxyapatite scaffolds: Properties and applications. *Eur. Polym. J.* **2021**, *148*, 110360. [[CrossRef](#)]
2. Senra, M.R.; de Lima, R.B.; Souza, D.D.H.S.; Marques, M.D.F.V.; Monteiro, S.N. Thermal characterization of hydroxyapatite or carbonated hydroxyapatite hybrid composites with distinguished collagens for bone graft. *J. Mater. Res. Technol.* **2020**, *9*, 7190–7200. [[CrossRef](#)]
3. Fiume, E.; Magnaterra, G.; Rahdar, A.; Verné, E.; Baino, F. Hydroxyapatite for Biomedical Applications: A Short Overview. *Ceramics* **2021**, *4*, 542–563. [[CrossRef](#)]
4. Saleem, M.; Rasheed, S.; Yougen, C. Silk fibroin/hydroxyapatite scaffold: A highly compatible material for bone regeneration. *Sci. Technol. Adv. Mater.* **2020**, *21*, 242–266. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Farokhi, M.; Mottaghitalab, F.; Shokrgozar, M.A.; Ai, J.; Hadjati, J.; Azami, M. Bio-hybrid silk fibroin/calcium phosphate/PLGA nanocomposite scaffold to control the delivery of vascular endothelial growth factor. *Mater. Sci. Eng. C* **2014**, *35*, 401–410. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Daugela, P.; Pranskunas, M.; Juodzbalys, G.; Liesiene, J.; Baniukaitiene, O.; Afonso, A.; Sousa Gomes, P. Novel cellulose/hydroxyapatite scaffolds for bone tissue regeneration: *In-vitro* and *in vivo* study. *J. Tissue Eng. Regen. Med.* **2018**, *12*, 1195–1208. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
7. Sancilio, S.; Gallorini, M.; Di Nisio, C.; Marsich, E.; Di Pietro, R.; Schweikl, H.; Cataldi, A. Alginate/Hydroxyapatite-Based Nanocomposite Scaffolds for Bone Tissue Engineering Improve Dental Pulp Biomineralization and Differentiation. *Stem Cells Int.* **2018**, *2018*, 9643721. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
8. Bernardo, M.P.; da Silva, B.C.R.; Hamouda, A.E.I.; de Toledo, M.A.S.; Schalla, C.; Rütten, S.; Goetzke, R.; Mattoso, L.H.C.; Zenke, M.; Sechi, A. PLA/Hydroxyapatite scaffolds exhibit *in-vitro* immunological inertness and promote robust osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells without osteogenic stimuli. *Sci. Rep.* **2022**, *12*, 2333. [[CrossRef](#)]
9. Biscaia, S.; Branquinho, M.V.; Alvites, R.D.; Fonseca, R.; Sousa, A.C.; Pedrosa, S.S.; Caseiro, A.R.; Guedes, F.; Patrício, T.; Viana, T.; et al. 3D Printed Poly(ϵ -caprolactone)/Hydroxyapatite Scaffolds for Bone Tissue Engineering: A Comparative Study on a Composite Preparation by Melt Blending or Solvent Casting Techniques and the Influence of Bioceramic Content on Scaffold Properties. *Int. J. Mol. Sci.* **2022**, *23*, 2318. [[CrossRef](#)]
10. Elango, J.; Saravankumar, K.; Rahman, S.U.; Henrotin, Y.; Regenstein, J.M.; Wu, W.; Bao, B. Chitosan-collagen 3D matrix mimics trabecular bone and regulates RANKL-mediated paracrine cues of differentiated osteoblast and mesenchymal stem cells for bone marrow macrophage-derived osteoclastogenesis. *Biomolecules* **2019**, *9*, 173. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
11. Elango, J.; Zhang, J.; Bao, B.; Palaniyandi, K.; Wang, S.; Wenhui, W.; Robinson, J.S. Rheological, biocompatibility and osteogenesis assessment of fish collagen scaffold for bone tissue engineering. *Int. J. Biol. Macromol.* **2016**, *91*, 51–59. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Elango, J.; Selvaganapathy, P.R.; Lazzari, G.; Bao, B.; Wenhui, W. Biomimetic collagen-sodium alginate-titanium oxide (TiO₂) 3D matrix supports differentiated periodontal ligament fibroblasts growth for periodontal tissue regeneration. *Int. J. Biol. Macromol.* **2020**, *163*, 9–18. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Li, S.H.; De Wijn, J.R.; Layrolle, P.; De Groot, K. Synthesis of macroporous hydroxyapatite scaffolds for bone tissue engineering. *J. Biomed. Mater. Res.* **2002**, *61*, 109–120. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Pengfei, M.; Wenjing, W.; Yu, W.; Le, R.; Shuxian, L.; Junhua, W. Biomimetic gelatin/chitosan/polyvinyl alcohol/nano-hydroxyapatite scaffolds for bone tissue engineering. *Mater. Des.* **2021**, *207*, 109865. [[CrossRef](#)]
15. Wu, C.-S.; Wang, S.-S.; Wu, D.-Y.; Shih, W.-L. Novel composite 3D-printed filament made from fish scale-derived hydroxyapatite, eggshell and polylactic acid via a fused fabrication approach. *Addit. Manuf.* **2021**, *46*, 102169. [[CrossRef](#)]
16. Jahangir, M.U.; Islam, F.; Wong, S.Y.; Jahan, R.A.; Matin, M.A.; Li, X.; Arfat, M.T. Comparative analysis and antibacterial properties of thermally sintered apatites with varied processing conditions. *J. Am. Ceram. Soc.* **2021**, *104*, 1023–1039. [[CrossRef](#)]
17. Tram, N.X.T.; Ishikawa, K.; Minh, T.H.; Benson, D.; Tsuru, K. Characterization of carbonate apatite derived from chicken bone and its *in-vitro* evaluation using MC3T3-E1 cells. *Mater. Res. Express* **2021**, *8*, 025401. [[CrossRef](#)]
18. Cestari, F.; Agostinacchio, F.; Galotta, A.; Chemello, G.; Motta, A.; Sglavo, V.M. Nano-hydroxyapatite derived from biogenic and bioinspired calcium carbonates: Synthesis and *in-vitro* bioactivity. *Nanomaterials* **2021**, *11*, 264. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
19. Muthu, D.; Kumar, G.S.; Kattimani, V.; Viswabaskaran, V.; Girija, E. Optimization of a lab scale and pilot scale conversion of eggshell biowaste into hydroxyapatite using microwave reactor. *Ceram. Int.* **2020**, *46*, 25024–25034. [[CrossRef](#)]
20. Ge, M.; Zong, M.; Xu, D.; Chen, Z.; Yang, J.; Yao, H.; Wei, C.; Chen, Y.; Lin, H.; Shi, J. Freestanding germanene nanosheets for rapid degradation and photothermal conversion. *Mater. Today Nano* **2021**, *15*, 100119. [[CrossRef](#)]

21. Singh, M.; Kumar, D.; Singh, G. Natural Minerals and Cancer. *J. Appl. Pharm. Sci.* **2012**, *2*, 158–165. [[CrossRef](#)]
22. Geng, H.; Dai, J.; Li, J.; Di, Z.; Liu, X. Antibacterial ability and hemocompatibility of graphene functionalized germanium. *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 1–9. [[CrossRef](#)]
23. Yoshinari, O.; Shiojima, Y.; Igarashi, K. Hepatoprotective effect of germanium-containing Spirulina in rats with D-galactosamine- and lipopolysaccharide-induced hepatitis. *Br. J. Nutr.* **2014**, *111*, 135–140. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Li, L.; Ruan, T.; Lyu, Y.; Wu, B. Advances in effect of germanium or germanium compounds on animals—A review. *J. Biosci. Med.* **2017**, *5*, 56–73. [[CrossRef](#)]
25. Aso, H.; Suzuki, F.; YAMAGUCHI, T.; Hayashi, Y.; Ebina, T.; Ishida, N. Induction of interferon and activation of NK cells and macrophages in mice by oral administration of Ge-132, an organic germanium compound. *Microbiol. Immunol.* **1985**, *29*, 65–74. [[CrossRef](#)]
26. Schauss, A.G. Nephrotoxicity and neurotoxicity in humans from organogermanium compounds and germanium dioxide. *Biol. Trace Elem. Res.* **1991**, *29*, 267–280. [[CrossRef](#)]
27. Li, J.; Wang, G.; Zhang, W.; Jin, G.; Zhang, M.; Jiang, X.; Di, Z.; Liu, X.; Wang, X. Graphene film-functionalized germanium as a chemically stable, electrically conductive, and biologically active substrate. *J. Mater. Chem. B* **2015**, *3*, 1544–1555. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
28. Choi, J.S.; Heo, J.H.; Kim, D.J.; Namkung, S.M.; Lee, T.B.; Lee, M.W.; Kim, S.W. Anti-cancer effect of hot water extract from mycelium in germanium-enriched *Cordyceps militaris*. *Korean J. Clin. Lab. Sci.* **2017**, *49*, 69–78. [[CrossRef](#)]
29. Mo, R.; Lei, Z.; Rooney, D.; Sun, K. Three-dimensional double-walled ultrathin graphite tube conductive scaffold with encapsulated germanium nanoparticles as a high-areal-capacity and cycle-stable anode for lithium-ion batteries. *ACS Nano* **2019**, *13*, 7536–7544. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
30. Scheschke, D.; Poitiers, N.E.; Huch, V.; Morgenstern, B.; Zimmer, M. Siliconoid Expansion by a Single Germanium Atom through Isolated Intermediates. *Angew. Chem.* **2022**, *61*, e202205399.
31. Evtugin, V.; Rogov, A.; Valeeva, L.; Khabipova, N.; Nuzhdin, V.; Valeev, V.; Stepanov, A. Biological cell scaffolds based on nanoporous germanium layers formed by ion implantation. *Vacuum* **2020**, *177*, 109403. [[CrossRef](#)]
32. Li, D.; Feng, C.; Liu, H.K.; Guo, Z. Hollow carbon spheres with encapsulated germanium as an anode material for lithium ion batteries. *J. Mater. Chem. A* **2015**, *3*, 978–981. [[CrossRef](#)]
33. Dell'Anna, R.; Masciullo, C.; Jacob, E.; Barozzi, M.; Giubertoni, D.; Böttger, R.; Cecchini, M.; Pepponi, G. Multiscale structured germanium nanoripples as templates for bioactive surfaces. *RSC Adv.* **2017**, *7*, 9024–9030. [[CrossRef](#)]
34. Xu, C.; Chang, Y.; Wu, P.; Liu, K.; Dong, X.; Nie, A.; Mu, C.; Liu, Z.; Dai, H.; Luo, Z. Two-Dimensional-Germanium Phosphide-Reinforced Conductive and Biodegradable Hydrogel Scaffolds Enhance Spinal Cord Injury Repair. *Adv. Funct. Mater.* **2021**, *31*, 210440. [[CrossRef](#)]
35. Fu, S.; Wang, X.; Guo, G.; Shi, S.; Liang, H.; Luo, F.; Wei, Y.; Qian, Z. Preparation and characterization of nano-hydroxyapatite/poly (ϵ -caprolactone)–poly (ethylene glycol)–poly (ϵ -caprolactone) composite fibers for tissue engineering. *J. Phys. Chem. C* **2010**, *114*, 18372–18378. [[CrossRef](#)]
36. Love, W.; Millay, D.; Huston, J.S. Properties of disulfide-linked tubulin purified on hydroxyapatite and its comparison with intact and dissociated microtubules using limited tryptic digestion. *Arch. Biochem. Biophys.* **1981**, *207*, 300–310. [[CrossRef](#)]
37. Lü, X.; Li, D.; Huang, Y.; Zhang, Y. Application of a modified Coomassie brilliant blue protein assay in the study of protein adsorption on carbon thin films. *Surf. Coat. Technol.* **2007**, *201*, 6843–6846. [[CrossRef](#)]
38. Luo, W.-h.; Cheng, L.; Yuan, C.; Wu, Z.; Yuan, G.; Hou, M.; Chen, J.Y.; Luo, C.; Li, W. Preparation, characterization and evaluation of cellulose nanocrystal/poly(lactic acid) in situ nanocomposite scaffolds for tissue engineering. *Int. J. Biol. Macromol.* **2019**, *134*, 469–479. [[CrossRef](#)]
39. Kokubo, T.; Takadama, H. How useful is SBF in predicting in vivo bone bioactivity? *Biomaterials* **2006**, *27*, 2907–2915. [[CrossRef](#)]
40. Gholami, S.A.; Labbaf, S.; Houreh, A.B.; Ting, H.; Jones, J.R.; Esfahani, M.H.N. Long term effects of bioactive glass particulates on dental pulp stem cells in vitro. *Biomed. Glasses* **2017**, *3*, 103–196. [[CrossRef](#)]
41. López-González, I.; Zamora-Ledezma, C.; Sanchez-Lorenzo, M.I.; Tristante Barrenechea, E.; Gabaldón-Hernández, J.A.; Meseguer-Olmo, L. Modifications in Gene Expression in the Process of Osteoblastic Differentiation of Multipotent Bone Marrow-Derived Human Mesenchymal Stem Cells Induced by a Novel Osteoinductive Porous Medical-Grade 3D-Printed Poly(ϵ -caprolactone)/ β -tricalcium Phosphate Composite. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 11216.
42. Ganesan, V.; Devaraj, M.; Govindan, S.; Kattimani, V.S.; Easwaradas Kreedapathy, G. Eggshell derived mesoporous biphasic calcium phosphate for biomedical applications using rapid thermal processing. *Int. J. Appl. Ceram. Technol.* **2019**, *16*, 1932–1943. [[CrossRef](#)]
43. Rohmadi, R.; Harwijayanti, W.; Ubaidillah, U.; Triyono, J.; Diharjo, K.; Utomo, P. In-vitro Degradation and Cytotoxicity of Eggshell-Based Hydroxyapatite: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Polymers* **2021**, *13*, 3223. [[CrossRef](#)]
44. Cordell, J.M.; Vogl, M.; Wagoner Johnson, A.J. The influence of micropore size on the mechanical properties of bulk hydroxyapatite and hydroxyapatite scaffolds. *J. Mech. Behav. Biomed. Mater.* **2009**, *2*, 560–570. [[CrossRef](#)]
45. Mondal, S.; Pal, U.; Dey, A. Natural origin hydroxyapatite scaffold as potential bone tissue engineering substitute. *Ceram. Int.* **2016**, *42*, 18338–18346. [[CrossRef](#)]

46. Obada, D.O.; Osseni, S.A.; Sina, H.; Salami, K.A.; Oyedeji, A.N.; Dodoo-Arhin, D.; Bansod, N.D.; Csáki, Š.; Atta, A.Y.; Fasanya, O.O.; et al. Fabrication of novel kaolin-reinforced hydroxyapatite scaffolds with robust compressive strengths for bone regeneration. *Appl. Clay Sci.* **2021**, *215*, 106298. [\[CrossRef\]](#)
47. Osuchukwu, O.A.; Salihi, A.; Abdullahi, I.L.; Abdulkareem, B.; Nwannenna, C.S. Synthesis techniques, characterization and mechanical properties of natural derived hydroxyapatite scaffolds for bone implants: A review. *SN Appl. Sci.* **2021**, *3*, 1–23. [\[CrossRef\]](#)
48. Taşdelen, B.; Erdoğan, S.; Bekar, B. Radiation synthesis and characterization of chitosan/hyaluronic acid/hydroxyapatite hydrogels: Drug uptake and drug delivery systems. *Mater. Today Proc.* **2018**, *5*, 15990–15997. [\[CrossRef\]](#)
49. Wan, Y.Z.; Hong, L.; Jia, S.; Huang, Y.; Zhu, Y.; Wang, Y.L.; Jiang, H.J. Synthesis and characterization of hydroxyapatite–bacterial cellulose nanocomposites. *Compos. Sci. Technol.* **2006**, *66*, 1825–1832. [\[CrossRef\]](#)
50. Wang, Y.; He, W.-J.; Hao, H.; Wu, J.; Qin, N. Eggshell derived Se-doped HA nanorods for enhanced antitumor effect and curcumin delivery. *J. Sol-Gel Sci. Technol.* **2018**, *87*, 600–607. [\[CrossRef\]](#)
51. Horta, M.K.d.S.; Moura, F.J.; Aguilar, M.S.; Westin, C.B.; Campos, J.B.d.; Peripolli, S.B.; Ramos, V.S.; Navarro, M.I.; Archanjo, B.S. Nanostructured hydroxyapatite from Hen’s eggshells using sucrose as a template. *Mater. Res.* **2020**, *23*, 45–51. [\[CrossRef\]](#)
52. Zhang, C.; Yi, Y.; Yang, H.-s.; Yi, Z.; Chen, X.; Zhou, Z.; Yi, Y.; Li, H.; Chen, J.; Liu, C. Wide spectrum solar energy absorption based on germanium plated ZnO nanorod arrays: Energy band regulation, Finite element simulation, Super hydrophilicity, Photothermal conversion. *Appl. Mater. Today* **2022**, *28*, 101531. [\[CrossRef\]](#)
53. Zhu, X.; Ohtsubo, M.; Böhmer, R.M.; Roberts, J.M.D.; Assoian, R.K. Adhesion-dependent cell cycle progression linked to the expression of cyclin D1, activation of cyclin E-cdk2, and phosphorylation of the retinoblastoma protein. *J. Cell Biol.* **1996**, *133*, 391–403. [\[CrossRef\]](#)
54. Steele, J.G.; Dalton, B.A.; Johnson, G.; Underwood, P.A. Adsorption of fibronectin and vitronectin onto Primaria and tissue culture polystyrene and relationship to the mechanism of initial attachment of human vein endothelial cells and BHK-21 fibroblasts. *Biomaterials* **1995**, *16*, 1057–1067. [\[CrossRef\]](#)
55. Kim, H.; Yang, G.H.; Kim, G. Three-dimensional gelatin/PVA scaffold with nanofibrillated collagen surface for applications in hard-tissue regeneration. *Int. J. Biol. Macromol.* **2019**, *135*, 21–28. [\[CrossRef\]](#)
56. Ho, M.L.; Fu, Y.C.; Wang, G.J.; Chen, H.-T.; Chang, J.-K.; Tsai, T.H.; Wang, C.-K. Controlled release carrier of BSA made by W/O/W emulsion method containing PLGA and hydroxyapatite. *J. Control. Release* **2008**, *128*, 142–148. [\[CrossRef\]](#)
57. Tripathi, G.; Basu, B. A porous hydroxyapatite scaffold for bone tissue engineering: Physico-mechanical and biological evaluations. *Ceram. Int.* **2012**, *38*, 341–349. [\[CrossRef\]](#)
58. Gutiérrez-Prieto, S.J.; Fonseca, L.F.; Sequeda-Castañeda, L.G.; Díaz, K.J.; Castañeda, L.Y.; Leyva-Rojas, J.A.; Salcedo-Reyes, J.C.; Acosta, A.P. Elaboration and Biocompatibility of an Eggshell-Derived Hydroxyapatite Material Modified with Si/PLGA for Bone Regeneration in Dentistry. *Int. J. Dent.* **2019**, *2019*, 5949232. [\[CrossRef\]](#)
59. Patel, D.K.; Kim, M.-H.; Lim, K.-T. Synthesis and Characterization of Eggshell-Derived Hydroxyapatite Bioceramics. *J. Biosyst. Eng.* **2019**, *44*, 128–133. [\[CrossRef\]](#)
60. Ingole, V.H.; Vuherer, T.; Maver, U.; Vinchurkar, A.S.; Ghule, A.V.; Kokol, V. Mechanical Properties and Cytotoxicity of Differently Structured Nanocellulose-hydroxyapatite Based Composites for Bone Regeneration Application. *Nanomaterials* **2019**, *10*, 25. [\[CrossRef\]](#)
61. Kumar, G.S.; Giriya, E.K. Flower-like hydroxyapatite nanostructure obtained from eggshell: A candidate for biomedical applications. *Ceram. Int.* **2013**, *39*, 8293–8299. [\[CrossRef\]](#)
62. Neacșu, I.; Serban, A.P.; Nicoară, A.I.; Trusca, R.; Ene, V.L.; Iordache, F. Biomimetic Composite Scaffold Based on Naturally Derived Biomaterials. *Polymers* **2020**, *12*, 1161. [\[CrossRef\]](#)
63. Li, Y.; Wang, Y.; Li, Y.; Luo, W.; Jiang, J.; Zhao, J.; Liu, C. Controllable Synthesis of Biomimetic Hydroxyapatite Nanorods with High Osteogenic Bioactivity. *ACS Biomater. Sci. Eng.* **2020**, *6*, 320–328. [\[CrossRef\]](#)
64. Roopavath, U.K.; Sah, M.K.; Panigrahi, B.B.; Rath, S.N. Mechanochemically synthesized phase stable and biocompatible β -tricalcium phosphate from avian eggshell for the development of tissue ingrowth system. *Ceram. Int.* **2019**, *45*, 12910–12919. [\[CrossRef\]](#)
65. Huang, K.; Hou, J.; Gu, Z.; Wu, J. Egg-White-/Eggshell-Based Biomimetic Hybrid Hydrogels for Bone Regeneration. *ACS Biomater. Sci. Eng.* **2019**, *5*, 5384–5391. [\[CrossRef\]](#)
66. Yılmaz, P.; Öztürk Er, E.; Bakırdere, S.; Ülgen, K.Ö.; Özbek, B. Application of supercritical gel drying method on fabrication of mechanically improved and biologically safe three-component scaffold composed of graphene oxide/chitosan/hydroxyapatite and characterization studies. *J. Mater. Res. Technol.* **2019**, *8*, 5201–5216. [\[CrossRef\]](#)
67. McDonnell, L.P.; Viner, J.J.S.; Ruiz-Tijerina, D.A.; Rivera, P.; Xu, X.; Fal’ko, V.I.; Smith, D.C. Superposition of intra- and inter-layer excitons in twistrionic MoSe₂/WSe₂ bilayers probed by resonant Raman scattering. *2D Mater.* **2020**, *8*, 035009. [\[CrossRef\]](#)
68. Mondal, S.; Bardhan, R.; Mondal, B.; Dey, A.; Mukhopadhyay, S.S.; Roy, S.; Guha, R.; Roy, K. Synthesis, characterization and in-vitro cytotoxicity assessment of hydroxyapatite from different bioresources for tissue engineering application. *Bull. Mater. Sci.* **2012**, *35*, 683–691. [\[CrossRef\]](#)

69. Jayasree, R.; Kumar, T.S.S.; Venkateswari, R.; Nankar, R.P.; Doble, M. Eggshell derived brushite bone cement with minimal inflammatory response and higher osteoconductive potential. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **2019**, *30*, 113. [[CrossRef](#)]
70. Manakhov, A.M.; Solovieva, A.O.; Permyakova, E.S.; Sitnikova, N.A.; Klyushova, L.S.; Kiryukhantsev-Korneev, P.V.; Konopatsky, A.S.; Shtansky, D.V. Adhesion and Proliferation of Mesenchymal Stem Cells on Plasma-Coated Biodegradable Nanofibers. *J. Compos. Sci.* **2022**, *6*, 193. [[CrossRef](#)]
71. Costa, B.N.L.; Adão, R.M.R.; Maibohm, C.; Accardo, A.; Cardoso, V.F.; Nieder, J.B. Cellular Interaction of Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells with Polymer and Hydrogel 3D Microscaffold Templates. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2022**, *14*, 13013–13024. [[CrossRef](#)]

**REFERENCIAS
BIBLIOGRÁFIAS**

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ¹ Percival KM, Paul V, Hussein GA. Recent advancements in bone tissue engineering: Integrating smart scaffold technologies and bioresponsive systems for enhanced regeneration. *Int J Mol Sci.* 2024 May 30;25(11):6012. PMID: 38892199; PMCID: PMC11172494. <https://doi.org/10.3390/ijms25116012>.
- ² Miron RJ, Zhang YF. Osteoinduction: A review of old concepts with new standards. *J Dent Res.* 2012;91(8):736–44. <https://doi.org/10.1177/0022034512444617>.
- ³ Lee SS, Du X, Kim I, Ferguson SJ. Scaffolds for bone tissue engineering. *Matter.* 2022 ;5(9): 2722–59. <https://doi.org/10.1016/j.matt.2022.06.003>.
- ⁴ Mouriño V, Cattalini JP, Roether JA, Dubey P, Roy I, Boccaccini AR. Composite polymer-bioceramic scaffolds with drug delivery capability for bone tissue engineering. *2013;10(10):1353–65.* <https://doi.org/10.1517/17425247.2013.808183>.
- ⁵ Lett JA, Sagadevan S, Fatimah I, Hoque E, Lokanathan Y, Léonard E, et al. Recent advances in natural polymer-based hydroxyapatite scaffolds: Properties and applications. *Eur Polym J.* 2021;148:110360. <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2021.110360>.
- ⁶ Senra MR, de Lima RB, Souza DDHS, Marques MDFV, Monteiro SN. Thermal characterization of hydroxyapatite or carbonated hydroxyapatite hybrid composites with distinguished collagens for bone graft. *J Mater Res Technol.* 2020;9:7190–200. <https://doi.org/10.1016/j.jmrt.2020.04.068>.
- ⁷ Fiume E, Magnaterra G, Rahdar A, Verné E, Baino F. Hydroxyapatite for biomedical applications: A short overview. *2021;4(4):542–63.* <https://doi.org/10.3390/ceramics4040037>.

- ⁸ Gapurenko OA, Starikov AG, Minyaev RM, Minkin VI. Germanium, carbon-germanium, and silicon-germanium triangulenes. *J Comput Chem.* 2015;36(29):2193–9. <https://doi.org/10.1002/jcc.24199>.
- ⁹ Pan L, Lew KK, Redwing JM, Dickey EC. Stranski-Krastanow growth of germanium on silicon nanowires. *Nano Lett.* 2005;5(6):1081–5. <https://doi.org/10.1021/nl050605z>.
- ¹⁰ Sutter E, Zhang B, Sun M, Sutter P. Few-layer to multilayer germanium(II) sulfide: synthesis, structure, stability, and optoelectronics. *ACS Nano.* 2019;13(8):9352–62. <https://doi.org/10.1021/acsnano.9b03986>.
- ¹¹ Ballato J, Hawkins T, Foy P, Yazgan-Kokuoz B, Stolen R, McMillen C, et al. Glass-clad single-crystal germanium optical fiber. *Opt Express.* 2009;17(10):8029–35. <https://doi.org/10.1364/oe.17.008029>.
- ¹² Zhang Y, Chen B, Zhang X, Zhang J, Xu S, Li X, et al. Net optical gain coefficients of Cu⁺ and Tm³⁺ single-doped and co-doped germanate glasses. *Materials (Basel).* 2022;15(6):2134. <https://doi.org/10.3390/ma15062134>.
- ¹³ Kadomtseva AV, Mochalov GM, Kuzina OV. Biologically active coordination compounds of germanium synthesis and physicochemical properties. *Russ J Org Chem.* 2021;57(6):879–88. <https://doi.org/10.1134/S1070428021060026>.
- ¹⁴ Wang YS, Teng GQ, Zhou H, Dong CL. Germanium reduces inflammatory damage in mammary glands during lipopolysaccharide-induced mastitis in mice. *Biol Trace Elem Res.* 2020;198(2):617–26. <https://doi.org/10.1007/s12011-020-02106-x>.
- ¹⁵ Dobrzyński D, Boguszevska-Czubara A, Sugimori K. Hydrogeochemical and biomedical insights into germanium potential of curative waters: a case study of health resorts in the Sudetes Mountains (Poland). *Environ Geochem Health.* 2018;40(4):1355–75. <https://doi.org/10.1007/s10653-017-0061-0>.
- ¹⁶ Marczynski B. Carcinogenesis as the result of the deficiency of some essential trace elements. *Med Hypotheses.* 1988;26(4):239–49. [https://doi.org/10.1016/0306-9877\(88\)90127-2](https://doi.org/10.1016/0306-9877(88)90127-2).

-
- ¹⁷ Ge M, Zong M, Xu D, Chen Z, Yang J, Yao H, et al. Freestanding germanene nanosheets for rapid degradation and photothermal conversion. *Mater Today Nano*. 2021;15:100119. <https://doi.org/10.1016/j.mtnano.2021.100119>.
- ¹⁸ Singh M, Kumar D, Singh G. Natural minerals and cancer. *J Appl Pharm Sci*. 2012;2(3):158–65.
- ¹⁹ Geng H, Dai J, Li J, Di Z, Liu X. Antibacterial ability and hemocompatibility of graphene functionalized germanium. *Sci Rep*. 2016;6:1–9.
- ²⁰ Yoshinari O, Shiojima Y, Igarashi K. Hepatoprotective effect of germanium-containing *Spirulina* in rats with D-galactosamine and lipopolysaccharide-induced hepatitis. *Br J Nutr*. 2014;111:135–40.
- ²¹ Li L, Ruan T, Lyu Y, Wu B. Advances in effect of germanium or germanium compounds on animals—a review. *J Biosci Med*. 2017;5:56–73.
- ²² Aso H, Suzuki F, Yamaguchi T, Hayashi Y, Ebina T, Ishida N. Induction of interferon and activation of NK cells and macrophages in mice by oral administration of Ge-132, an organic germanium compound. *Microbiol Immunol*. 1985;29:65–74.
- ²³ Li J, Wang G, Zhang W, Jin G, Zhang M, Jiang X, et al. Graphene film-functionalized germanium as a chemically stable, electrically conductive, and biologically active substrate. *J Mater Chem B*. 2015;3(8):1544–55.
- ²⁴ Choi JS, Heo JH, Kim DJ, Namkung SM, Lee TB, Lee MW, et al. Anti-cancer effect of hot water extract from mycelium in germanium enriched *Cordyceps militaris*. *Korean J Clin Lab Sci*. 2017;49(2):69–78.
- ²⁵ Vaughn DD, Schaak RE. Synthesis, properties and applications of colloidal germanium and germanium based nanomaterials. *Chem Soc Rev*. 2013;42(7):2861–79. <https://doi.org/10.1039/c2cs35364d>.
- ²⁶ Kang SK, Park G, Kim K, Hwang SW, Cheng H, Shin J, et al. Dissolution chemistry and biocompatibility of silicon and germanium-based semiconductors

for transient electronics. *ACS Appl Mater Interfaces*. 2015;7(17):9297–305. <https://doi.org/10.1021/acsami.5b02526>.

²⁷ Fan J, Chu PK. Group IV nanoparticles: synthesis, properties, and biological applications. *Small*. 2010;6(19):2080–98. <https://doi.org/10.1002/smll.201000543>.

²⁸ Kabashin AV, Singh A, Swihart MT, Zvestovskaya IN, Prasad PN. Laser-processed nanosilicon: a multifunctional nanomaterial for energy and healthcare. *ACS Nano*. 2019;13(9):9841–67. <https://doi.org/10.1021/acsnano.9b04610>.

²⁹ Tao SH, Bolger PM. Hazard assessment of germanium supplements. *Regul Toxicol Pharmacol*. 1997;25(3):211–219. <https://doi.org/10.1006/rtph.1997.1129>.

³⁰ Schroeder HA, Balassa JJ. Abnormal trace metals in man: Germanium. *J Chronic Dis*. 1967;20(4):211–24. <https://doi.org/10.1006/jchr.1967.1129>.

³¹ Kolesnikov S. Research in chemistry of trihalogermans and germanium analogues of dihalocarbenes. ND Zelinsky Institute of Organic Chemistry, Academy of Sciences of USSR, Moscow; 1966.

³² Nefedov O, Kolesnikov S, Perlmutter B. Reactions of trichlorogermane with ketones and alcohols. *Angew Chem Int Ed Engl*. 1967;6(7):628–9. <https://doi.org/10.1002/anie.196706281>.

³³ Mironov V, Berliner E, Gar T. Reactions of trichlorogermane with acrylic acid and its derivatives. *J General Chem USSR*. 1967;37(4):911–2.

³⁴ Mironov V, Berliner E, Gar T, Rybakov E. Reactions of trichlorogermane with unsaturated carboxylic acids. *J General Chem USSR*. 1968;38(10):2218.

³⁵ Wada T, Hanyu T, Nozaki K, Kataoka K, Kawatani T, Asahi T, et al. Antioxidant activity of Ge-132, a synthetic organic germanium, on cultured mammalian cells. *Biol Pharm Bull*. 2018;41(5):749–53. <https://doi.org/10.1248/bpb.b17-00949>.

³⁶ Kazuhiko A, Kazuo M. Organogermanium compounds. Japan Patent 46-2964. 1971.

³⁷ Kazuhiko A, Kazuo M. Biscarboxyethyl germanium sesquioxide and process for preparing same. US Patent 3689516. 1972.

- ³⁸ Hachisu M, Takahashi H, Koeda T, Sekizawa Y. Analgesic effect of novel organogermanium compound, Ge-132. *Chem Pharm Bull.* 1983;31(6):814–20. <https://doi.org/10.1248/cpb.31.814>.
- ³⁹ Sanai T, Okuda S, Onoyama K, Oochi N, Takaichi S, Mizuhira V, Fujishima M. Chronic tubulointerstitial changes induced by germanium dioxide in comparison with carboxyethylgermanium sesquioxide. *Kidney Int.* 1991;40(5):882-90. <https://doi.org/10.1038/ki.1991.303>.
- ⁴⁰ Takeda T, Doiyama S, Azumi J, Shimada Y, Tokuji Y, Yamaguchi H, et al. Organogermanium suppresses cell death due to oxidative stress in normal human dermal fibroblasts. *Sci Rep.* 2019;9(1):13637. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-49883-7>.
- ⁴¹ Nakamura T, Shimada Y, Sato K. Bioorganic and medicinal organogermanium chemistry. In: *Organogermanium compounds*. Hoboken: Wiley; 2023. p. 839–65. <https://doi.org/10.1002/9781119613466.ch19>.
- ⁴² Nagai H, Hasegawa K, Shimpo K. Reproductive study of rats intraperitoneally treated with carboxyethylgermanium sesquioxide (GE-132). *Ohyoh Yakuri (Applied Drug Science)*. 1980;20:271-80.
- ⁴³ Kagoshima M, Onishi T. Metabolic fate of 2-carboxyethylgermanium sesquioxide (3); continual administration. *Ohyoh Yakuri (Applied Drug Science)*. 1986;32:89-92.
- ⁴⁴ Sugiya Y, Eda K, Yoshida K. Reproductive and teratogenic studies of carboxyethylgermanium sesquioxide (Ge-132) (1); fertility study in rats by intravenous administration. *Ohyoh Yakuri (Applied Drug Science)*. 1986;32:113-21.
- ⁴⁵ Nakamura T, Takeda T, Tokuji Y. The Oral Intake of Organic Germanium, Ge-132, Elevates α -Tocopherol Levels in the Plasma and Modulates Hepatic Gene Expression Profiles to Promote Immune Activation in Mice. *Int J Vitam Nutr Res.* 2014;84(3-4):183-95. <https://doi.org/10.1024/0300-9831/a000205>.

- ⁴⁶ Sato I, Yuan BD, Nishimura T, Tanaka N. Inhibition of tumor growth and metastasis in association with modification of immune response by novel organic germanium compounds. *J Biol Response Mod.* 1985;4:159-68. PMID: 3998767.
- ⁴⁷ Suzuki F, Brutkiewicz RR, Pollard RB. Importance of T-cells and macrophages in the antitumor activity of carboxyethylgermanium sesquioxide (Ge-132). *Anticancer Res.* 1985;5:47-83. PMID: 3877491.
- ⁴⁸ Suzuki F, Brutkiewicz RR, Pollard RB. Cooperation of lymphokine(s) and macrophages in expression of antitumor activity of carboxyethylgermanium sesquioxide (Ge-132). *Anticancer Res.* 1986;6:177-182. PMID: 3085573.
- ⁴⁹ Kaplan BJ, Andrus GM, Parish WW. Germane facts about germanium sesquioxide: II. Scientific error and misrepresentation. *J Altern Complement Med.* 2004 Apr;10(2):345-8. <https://doi.org/10.1089/107555304323062338>. PMID: 15165415.
- ⁵⁰ Li L, Xu G, Shao H, Zhang ZH, Pan XF, Li JY. Analysis of blood concentrations of zinc, germanium, and lead and relevant environmental factors in a population sample from Shandong Province, China. *Int J Environ Res Public Health.* 2017;14(3):227. <https://doi.org/10.3390/ijerph14030227>.
- ⁵¹ Sugiya Y, Sakamaki S, Satoh H. Reversibility study in rats after two months' oral administration of carboxyethylgermanium sesquioxide (Ge-132). *Ohyoh Yakuri (Applied Drug Science).* 1986;31:1191-1200.
- ⁵² Sugiya Y, Yoshida K, Sakamaki S. Reproductive and teratogenic studies of carboxyethylgermanium sesquioxide (Ge-132) (2); teratogenesis study in rats by intravenous administration. *Ohyoh Yakuri (Applied Drug Science).* 1986;32:123-138.
- ⁵³ Lee J, Kim K, Yoon M, Lee J, Kim C, Sim S. Immune activation of Bio-Germanium in a randomized, double-blind clinical trial with 130 human subjects: Therapeutic opportunities from new insights. *Auton Autacoid Pharmacol.* 2005 Aug;25(4):129-34. <https://doi.org/10.1111/j.1474-8673.2005.00335.x>. PMID: 16248813.

-
- ⁵⁴ Menchikov LG, Popov AV. Physiological Activity of Trace Element Germanium Including Anticancer Properties. Edited by Sinha R. PMID: PMC10295216. PMID: 37371629.
- ⁵⁵ Goodman S. Therapeutic effects of organic germanium. *Med Hypotheses*. 1988 Jul;26(3):207-15. [https://doi.org/10.1016/0306-9877\(88\)90101-6](https://doi.org/10.1016/0306-9877(88)90101-6). PMID: 3043151.
- ⁵⁶ Wang JC, Xing GS, Hu WD, Zhu TL, Wang Q, Zhao H. Effects of Ge-132 on oxygen free radicals and the lipid peroxidation induced by hydroxyl free radical in vitro. *Chinese Pharmaceutical Journal*. 1994;1:6. doi:CNKI:SUN:ZGYX.0.1994-01-006.
- ⁵⁷ Prónai L, Arimori S. Protective effect of carboxyethylgermanium sesquioxide (Ge-132) on superoxide generation by⁶⁰Co-irradiated leukocytes. *Biotherapy*. 1991;3:273-9. <https://doi.org/10.1007/BF02171692>.
- ⁵⁸ Nakamura T, Nagura T, Akiba M, Sato K, Tokuji Y, Ohnishi M, et al. Promotive effects of the dietary organic germanium poly-trans-[(2-carboxyethyl)germasesquioxane](Ge-132) on the secretion and antioxidative activity of bile in rodents. *Journal of Health Science*. 2010;56:72-80. <https://doi.org/10.1248/jhs.56.72>.
- ⁵⁹ Han C, Li G, Cao S. Assay of GSHpx, TBA, FFA in blood of children with Kaschin-Beck disease. *Chin J Controll Endem Dis*. 1983;2(2):65-68.
- ⁶⁰ Tezuka T. Book Review of “The Secret of Organogermanium—Amazing Power to Renew Life”. *Adv Enzyme Res*. 2021 Sep 13;9(3):50-53. doi: 10.4236/aer.2021.93005.
- ⁶¹ Levine SA, Kidd PM. Oxygen-nutrition for super health. *J Orthomol Med*. 1986;1(3):145-8.
- ⁶² Kim E, Jeon Y, Kim DY, Lee E, Hyun S-H, Anti-oxidative effect of carboxyethylgermanium sesquioxide (Ge-132) on in vitro maturation of porcine oocytes and subsequent embryonic development after parthenogenetic activation

and in vitro fertilization, *Theriogenology* (2015).
<https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2015.03.006>.

⁶³ Matsumoto H, Iwafuji H, Yamane J, Takeuchi R, Utsunomiya T, Fujii A. Restorative effect of organic germanium compound (Ge-132) on dermal injury. *Wound Med.* 2016;15:6-10. <https://doi.org/10.1016/j.wndm.2016.09.001>

⁶⁴ Coi S, Oh C, Han J, Park J, et al. Synthesis and biological evaluation of water-soluble organogermanium. *Eur J Med Chem.* 2010;45:610-5. 2010. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2009.12.069>.

⁶⁵ Kumano N, Ishikawa T, Koinuma S, Kikumoto T, Suzuki S, Nakai Y, Konno K. Antitumor effect of the organogermanium compound Ge-132 on Lewis lung carcinoma (3LL) in C57BL/6 (B6) mice. *Tohoku J Exp Med.* 1985;146:97-104. <https://doi.org/10.1620/tjem.146.97>.

⁶⁶ Suzuki F, Brutkiewicz RR, Pollard RB (1985) Ability of sera from mice treated with Ge-132, an organic germanium compound, to inhibit experimental murine ascites tumours. *Br J Cancer* 52:757–763. <https://doi.org/10.1038/bjc.1985.254>.

⁶⁷ Suzuki F. Suppression of tumor growth by peritoneal macrophages isolated from mice treated with carboxy-ethylgermanium sesquioxide (Ge-132). *Gan To Kagaku Ryoho* 12, 2122-8. 1985.

⁶⁸ Suzuki G, Pollard RB. Prevention of suppressed interferon gamma production in thermally injured mice by administration of a novel organogermanium compound, Ge-132. *J Interferon Res.* 1984;4:223-33. PMID: 6338957.

⁶⁹ Fukazawa H, Ohashi Y, Sekiyama S, Hoshi H, Abe M, Takahashi M, Sato T. Multidisciplinary treatment of head and neck cancer using BCG, OK-432, and GE-132 as biologic response modifiers. *Head Neck.* 1994 Jan-Feb;16(1):30-8. <https://doi.org/10.1002/hed.2880160108>. PMID: 7510275.

⁷⁰ Aso H, Suzuki F, Ebina T, Ishida N. Antiviral activity of carboxyethylgermanium sesquioxide (Ge-132) in mice infected with influenza virus. *J Biol Response Mod.* 1989;8:36-42.

-
- ⁷¹ Lee JH, Kim KW, Yoon MY, Lee JY, Kim CJ, Sim SS. Anti-inflammatory effect of germanium-concentrated yeast against paw oedema is related to the inhibition of arachidonic acid release and prostaglandin E2 production in RBL 2H3 cells. Department of Pathophysiology, College of Pharmacy, Chung-Ang University, Seoul, South Korea. 52:37. <https://doi.org/10.11250/chemotherapy1953.34.665>.
- ⁷² Kakimoto N, et al. Synthesis and properties of 2-carbox-yethylgermanium sesquioxide(Ge-132) and related compounds as bioactive organogermanium compound. *Frontiers of Organogermanium - Tin and Lead Chemistry*, Riga 1993. <https://doi.org/10.3987/R-1987-02-0347>
- ⁷³ Kuga N, Oboshi S, Sato H, Sato R. Inhibition of senile amyloidosis of mice by biscarboxyethyl germanium sesquioxide. *Acta Pathol Jpn.* 1976;26(1):63-71. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1827.1976.tb03293.x>.
- ⁷⁴ Guo X, Aigner T, Lammi P, et al. A study of abnormal chondrocyte differentiation and abnormal expression of collagen types in articular cartilage from patients with Kaschin-Beck disease. *Chin J Pathol.* 1998;27(1):19-21.
- ⁷⁵ Peng X, Lingxia Z, Schrauzer GN, Xiong G. Selenium, boron, and germanium deficiency in the etiology of Kashin-Beck disease. *Biol Trace Elem Res.* 2000;77(3):193-197. <https://doi.org/10.1385/BTER:77:3:193>.
- ⁷⁶ Lindsay R, Cosman F. Osteoporosis. In: Kasper D, Fauci A, Hauser S, Longo D, Jameson J, Loscalzo J, editors. *Harrison's Principles of Internal Medicine*. 19th ed. New York: McGraw-Hill; 2014. p. 2201-12.
- ⁷⁷ Kasper DL, Fauci AS, Hauser SL, Longo DL, Jameson JL, Loscalzo J, editors. Osteoporosis and osteomalacia. In: *Harrison's Manual of Medicine*. 19th ed. New York: McGraw-Hill; 2016. p. 61. Disponible en: https://harrisons.unboundmedicine.com/harrisons/view/Harrisons-Manual-of-Medicine/623099/all/Chapter_180:_Osteoporosis_and_Osteomalacia.

- ⁷⁸ Pietschmann P, Mechtcheriakova D, Meshcheryakova A, Föger-Samwald U, Ellinger I. Immunology of osteoporosis: a mini-review. *Gerontology*. 2016;62(2):128-137. <https://doi.org/10.1159/000441354>.
- ⁷⁹ Raisz LG. Pathogenesis of osteoporosis: concepts, conflicts, and prospects. *J Clin Invest*. 2005;115(12):3318-3325. <https://doi.org/10.1172/JCI27071>.
- ⁸⁰ Weitzmann MN, Pacifici R. Estrogen deficiency and bone loss: an inflammatory tale. *J Clin Invest*. 2006;116(5):1186-1194. <https://doi.org/10.1172/JCI28550>.
- ⁸¹ Redlich K, Smolen JS. Inflammatory bone loss: pathogenesis and therapeutic intervention. *Nat Rev Drug Discov*. 2012;11(3):234-250. <https://doi.org/10.1038/nrd3669>.
- ⁸² Elefteriou F. Regulation of bone remodeling by the central and peripheral nervous system. *Arch Biochem Biophys*. 2008;473(2):231-236. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2008.03.031>.
- ⁸³ Caetano-Lopes J, Canhão H, Fonseca JE. Osteoimmunology—the hidden immune regulation of bone. *Autoimmun Rev*. 2009;8(3):250-255. <https://doi.org/10.1016/j.autrev.2008.07.028>.
- ⁸⁴ Hecheng L, Xiangfang S. Experimental therapeutic effect of Germanium-132 on osteoporosis. In: *The 3rd National Proceedings on Germanium in China*. 1995. p. 61-68.
- ⁸⁵ Fujii A, et al. Effect of organic germanium compound (Ge-132) on experimental osteoporosis in rats. *Gen Pharmacol*. 1993;24(6):577-80.
- ⁸⁶ Seaborn CD, Nielsen FH. Silicon deprivation decreases collagen formation in wounds and bone, and ornithine transaminase enzyme activity in liver. *Biol Trace Elem Res*. 2002;89(3):251-261. <https://doi.org/10.1385/BTER:89:3:251>.
- ⁸⁷ Kim HS, Cho HJ, Bae SM, Kim YY, Baek SI, Bae KH. Association of Periodontitis with the Concentration Levels of Germanium and Tin in Hair. *Biol Trace Elem Res*. 2018;186(1):68-73. <https://doi.org/10.1007/s12011-018-1296-z>.

-
- ⁸⁸ Iordanishvili AK, Lobeiko VV. Lechenie travmaticheskogo proteznogo stomatita u liudej pozhilogo i starcheskogo vozrasta pri sindrome 'sukhogo rta' [Treatment of traumatic prosthetic stomatitis in elderly and senium people with 'dry mouth' syndrome]. *Stomatologija*. 2018;97(3):30-4. <https://doi.org/10.17116/stomat201897330>.
- ⁸⁹ Vlasova N, Samusenkov V, Novikova I, Nikolenko D, Nikolashvili N, Gor I, et al. Clinical efficacy of hydroxyapatite toothpaste containing Polyol Germanium Complex (PGC) with threonine in the treatment of dentine hypersensitivity. *Saudi Dent J*. 2022;34(4):310-4. <https://doi.org/10.1016/j.sdentj.2022.03.001>.
- ⁹⁰ Van der Weijden F, Dell'Acqua F, Slot DE. Alveolar bone dimensional changes of post-extraction sockets in humans: A systematic review. *J Clin Periodontol*. 2009;36(12):1048-1058. doi: 10.1111/j.1600-051X.2009.01482.x.
- ⁹¹ Schropp L, Wenzel A, Kostopoulos L, Karring T. Bone healing and soft tissue contour changes following single-tooth extraction: A clinical and radiographic 12-month prospective study. *Int J Periodontics Restorative Dent* 2003;23:313-323. PMID: 12956475.
- ⁹² Sommerfeldt DW, Rubin CT. Biology of bone and how it orchestrates the form and function of the skeleton. *Eur Spine J*. 2001;10(S2):S86-S95. <https://doi.org/10.1007/s005860100283>.
- ⁹³ Rubin CT, Lanyon LE. Kappa Delta Award paper. Osteoregulatory nature of mechanical stimuli: function as a determinant for adaptive remodeling in bone. *J Orthop Res*. 1987;5(2):300-10. <https://doi.org/10.1002/jor.1100050217>. PMID: 3572599.
- ⁹⁴ Seeman E, Delmas PD. Bone Quality—The Material and Structural Basis of Bone Strength and Fragility. *N Engl J Med*. 2006 May 25;354(21):2250-60. doi: 10.1056/NEJMra053077. PMID: 16723616.

- ⁹⁵ Wolff J. The classic: on the theory of fracture healing. 1873. *Clin Orthop Relat Res.* 2010 Apr;468(4):1052-5. <https://doi.org/10.1007/s11999-010-1240-9>. PMID: 20146037; PMCID: PMC2835578.
- ⁹⁶ Rocchietta I, Fontana F, Simion M. Clinical outcomes of vertical bone augmentation to enable dental implant placement: a systematic review. *J Clin Periodontol.* 2008;35:203–215. <https://doi.org/10.1111/j.1600-051X.2007.01190.x>.
- ⁹⁷ Rodrigo D, Aracil L, Martin C, Sanz M. Diagnosis of implant stability and its impact on implant survival: a prospective case series study. *Clin Oral Implants Res.* 2010;21:255-61. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0501.2009.01874.x>.
- ⁹⁸ Adell R, Lekholm U, Rockler B, Branemark P-I. A 15 year study of osseointegrated implants in the treatment of edentulous jaw. *J Oral surg.* 1981;6:387-416.
- ⁹⁹ Albrektsson, T., Zarb, G., Worthington, P., & Eriksson, A. R. (1986). The long-term efficacy of currently used dental implants: A review and proposed criteria of success. *International Journal of Oral Maxillofacial Implants*, 1(1), 11-25.
- ¹⁰⁰ Lee CT, Chu V, Borzabadi-Farahani A, Chen HS, Macari AT. Influence of implant positioning in extraction sockets on bone remodeling. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2016;45(6):717-22. PMID: 26997494.
- ¹⁰¹ Buser D, Martin W, Belser UC. Optimizing esthetics for implant restorations in the anterior maxilla: Anatomic and surgical considerations. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2004;19(suppl):43–61. PMID: 15635946.
- ¹⁰² Esposito M, Grusovin MG, Willings M, Coulthard P, Worthington HV. The effectiveness of immediate, early, and conventional loading of dental implants: a Cochrane systematic review of randomized controlled clinical trials. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2007 Nov-Dec;22(6):893-904. PMID: 18271370.
- ¹⁰³ Jung RE, Zembic A, Pjetursson BE, Zwahlen M, Thoma DS. Systematic review of the survival rate and the incidence of biological, technical, and aesthetic complications of single crowns on implants reported in longitudinal studies with a mean follow-up of 5 years. *Clin Oral Implants Res.* 2012 Oct;23 Suppl 6:2-21. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0501.2012.02547.x>. PMID: 23062124.

-
- ¹⁰⁴ Qahash M, Susin C, Polimeni G, Hall J, Wikesjo UM.) Bone healing dynamics at buccal peri-implant sites. *Clinical Oral Implants Research*. 2008;19:166–172.
- ¹⁰⁵ Spray JR, Black CG, Morris HF, Ochi S. The influence of bone thickness on facial marginal bone response: Stage 1 placement through stage 2 uncovering. *Ann Periodontol* 2000;5:119-128. PMID: 18070104.
- ¹⁰⁶ Pedroza JE, Tocarruncho O, Arango DX, Marcovich I. Espesor de la tabla ósea vestibular antero-superior en un grupo de pacientes colombianos. *Journal Odontol Col*. 2014;7(13):40-46.
- ¹⁰⁷ Schrott AR, Jimenez M, Hwang JW, Fiorellini J, Weber HP. Five-year evaluation of the influence of keratinized mucosa on peri-implant soft-tissue health and stability around implants supporting full-arch mandibular fixed prostheses. *Clin Oral Implants Res*. 2009 Oct;20(10):1170-7. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0501.2009.01795.x>. Epub 2009 Aug 30. PMID: 19719741; PMCID: PMC4928380.
- ¹⁰⁸ Lin GH, Chan HL, Wang HL. The significance of keratinized mucosa on implant health: a systematic review. *J Periodontol*. 2013 Dec;84(12):1755-67. doi: 10.1902/jop.2013.120688. Epub 2013 Mar 1. PMID: 23451989.
- ¹⁰⁹ Gobbato L, Avila-Ortiz G, Sohrabi K, Wang CW, Karimbux N. The effect of keratinized mucosa width on peri-implant health: a systematic review. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2013 Nov-Dec;28(6):1536-45. <https://doi.org/10.11607/jomi.3244>. PMID: 24278922.
- ¹¹⁰ Chiu YW, Lee SY, Lin YC, Lai YL. Significance of the width of keratinized mucosa on peri-implant health. *J Chin Med Assoc*. 2015 Jul;78(7):389-94. <https://doi.org/10.1016/j.jcma.2015.05.001>. Epub 2015 Jun 27. PMID: 26122633.
- ¹¹¹ Monje A, González-Martín O, Ávila-Ortiz G. Impact of peri-implant soft tissue characteristics on health and esthetics. *J Esthet Restor Dent*. 2023 Jan;35(1):183-196. <https://doi.org/10.1111/jerd.13003>. Epub 2023 Jan 17. PMID: 36650691.

- ¹¹² Wennström JL, Bengazi F, Lekholm U. The influence of the masticatory mucosa on the peri-implant soft tissue condition. *Clin Oral Implants Res.* 1994 Mar;5(1):1-8. <https://doi.org/10.1034/j.1600-0501.1994.050101.x>. PMID: 8038340.
- ¹¹³ Zigdon H, Machtei EE. The dimensions of keratinized mucosa around implants affect clinical and immunological parameters. *Clin Oral Implants Res* 2008;19: 387-392. PMID: 18352929.
- ¹¹⁴ De Rouck T, Eghbali R, Collys K, De Bruyn H, Cosyn J. The gingival biotype revisited: Transparency of the periodontal probe through the gingival margin as a method to discriminate thin from thick gingiva. *J Clin Periodontol* 2009; 36:428-433. PMID: 19341584.
- ¹¹⁵ Fu JH, Yeh CY. Tissue biotype and its relation to the underlying bone morphology. *J Periodontol.* 2010;81:569-74. PMID: 20127608.
- ¹¹⁶ Kan JY, Rungcharassaeng K, Umezu K, Kois JC. Dimensions of peri-implant mucosa: An evaluation of maxillary anterior single implants in humans. *J Periodontol* 2003;74:557-562. PMID: 12727773.
- ¹¹⁷ Araújo MG, Lindhe J. Dimensional ridge alterations following tooth extraction. An experimental study in the dog. *J Clin Periodontol.* 2005;32(2):212-8. PMID: 15667579.
- ¹¹⁸ Schwartz Z, Carnes DL. Bone response to dental implants. *Dent Clin North Am.* 1998;42(3):491-506. PMID: 9638262.
- ¹¹⁹ Burchardt H. The biology of bone graft repair. *Clin Orthop Relat Res.* 1983;(174):28-42. PMID: 6830200.
- ¹²⁰ Srouji S, Kizhner T, Ben David D, Riminucci M, Bianco P, Livne E, et al. The schneiderian membrane contains osteoprogenitor cells: in vivo and in vitro study. *Calcif Tissue Int.* 2010;87(1):55-63 PMID: 20425063.
- ¹²¹ Araújo MG, da Silva JCC, de Mendonça AF, Lindhe J. Ridge alterations following grafting of fresh extraction sockets in man. A randomized clinical trial. *Clin Oral Implants Res.* 2015 Apr;26(4):407-412. <https://doi.org/10.1111/clr.12366>. Epub 2014 Mar 12. PMID: 24621203.

-
- ¹²² Forero-Sossa PA, Salazar-Martínez JD, Giraldo-Betancur AL, Segura-Giraldo B, Restrepo-Parra E. Temperature effect in physicochemical and bioactive behavior of biogenic hydroxyapatite obtained from porcine bones. *Sci Rep.* 2021 May 26;11(1):11069. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-89776-2>. PMID: 34040024; PMCID: PMC8154992.
- ¹²³ Felice P, Marchetti C, Iezzi G, et al. Vertical ridge augmentation of the atrophic posterior mandible with interpositional bloc grafts: bone from the iliac crest vs bovine anorganic bone. Clinical and histological results up to one year after loading from a randomized controlled clinical trial. *Clin Oral Implants Res.* 2009;20:1386–1393. PMID: 19563543.
- ¹²⁴ Carinci F, Farina A, Zanetti U, et al. Alveolar ridge augmentation: a comparative longitudinal study between calvaria and iliac crest bone grafts. *J Oral Implantol.* 2005;31:39–45. PMID: 15831368.
- ¹²⁵ Nkenke E, Neukam FW, Lell M, Wiltfang J, Schultze-Mosgau S, Radespiel-Tröger M. Morbidity of harvesting of retromolar bone grafts: a prospective study. *Clin Oral Implants Res.* 2014;25(7):827-35. PMID: 24034735.
- ¹²⁶ Schmitz JP, Hollinger JO, Milam SB. Reconstruction of bone using calcium phosphate bone cements: a critical review. *J Oral Maxillofac Surg.* 2009;67(5):1123-30. PMID: 19361956.
- ¹²⁷ Urist MR, Strates BS. Bone morphogenetic protein. *J Dent Res.* 1971;50:1392-406. PMID: 4937325.
- ¹²⁸ Shigeyama Y, D'Errico JA, Stone R, Somerman MJ. Commercially-prepared allograft material has biological activity in vitro. *J Periodontol.* 1995;66:478-87. PMID: 7605513.
- ¹²⁹ Schwartz Z, Mellonig JT, Carnes DL Jr, et al. Ability of commercial demineralized freeze-dried bone allograft to induce new bone formation. *J Periodontol.* 1996;67:918-26. PMID: 8883743.

- ¹³⁰ Wang HL, Tsao YP. Mineralized bone allograft-plug socket augmentation: Rationale and technique. *Implant Dent.* 2007;16:33-41. PMID: 17327443.
- ¹³¹ Pochaspski MT, Martins MC, Zenóbio EG, Spolidoro LC, Marcantonio E. Comparison of biomaterial implants in the dental socket: histological analysis in dogs. *Clin Implant Dent Relat Res.* 2010;12:18-25. PMID: 19192172.
- ¹³² Scarano A, Piatelli A, Perrotti V, Manzon L, Lezzi G. Maxillary sinus augmentation in humans using cortical porcine bone: a histological and histomorphometrical evaluation after 4 and 6 months. *Clin Implant Dent Relat Res.* 2009. doi: 10.1111/j.1708-8208.2009.00176.
- ¹³³ Werber KD, Brauer RB, Weiss W, Becker K. Osseous integration of bovine hydroxyapatite ceramic in metaphyseal bone defects of the distal radius. *J Hand Surg Am.* 2000;25:833-41. PMID: 11044472.
- ¹³⁴ Cardaropoli D, Cardaropoli G. Preservation of the postextraction alveolar ridge: a clinical and histologic study. *Int J Periodontics Restorative Dent.* 2008;28:469-77. PMID: 18806575.
- ¹³⁵ Norton MR, Odell EW, Thompson ID, Cook RJ. Efficacy of bovine mineral for alveolar augmentation: a human histologic study. *Clin Oral Implants Res.* 2003;14:775-83. PMID: 14641747.
- ¹³⁶ Kin SH, Shin JW, Park SA. Chemical, structural properties and osteoconductive effectiveness of bone block derived from porcine cancellous bone. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2004;68:69-74. PMID: 14580383.
- ¹³⁷ Ramírez-Fernández MP, Calvo-Guirado JL, Delgado-Ruiz RA, Maté-Sánchez del Val JE, Vicente-Ortega V, Meseguer Olmos L. Bone response to hydroxyapatites with open porosity of animal origin (porcine [OsteoBiol mp3] and bovine [Endobon]): a radiological and histomorphometric study. *Clin Oral Implants Res.* 2011;22:767-73. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0501.2010.02058>.
- ¹³⁸ Dutta-Roy T, Simon JL, Ricci JL, Rekow ED, Thompson VP, Parsons JR. Performance of hydroxyapatite bone repair scaffolds created via three-dimensional fabrication techniques. *J Biomed Mater Res.* 2003;67:1228-37. PMID: 12826869.

-
- ¹³⁹ Motomiya M, Ito M, Takahata K, Irie K, Abumi K, Minami A. Effect of hydroxylapatite porous characteristics on healing outcomes in rabbit posterolateral spinal fusion model. *Eur Spine J.* 2007;16:2215-24. PMID: 17562165.
- ¹⁴⁰ Hing KA, Best SM, Tanner KE, Bonfield W, Revell PA. Mediation of bone ingrowth in porous hydroxyapatite bone graft substitutes. *J Biomed Mater Res A.* 2004;68:187-200. PMID: 14618560.
- ¹⁴¹ Tadic D, Epple M. A thorough physico-chemical characterisation of 14 calcium phosphate-based bone substitution materials in comparison to natural bone. *Biomaterials.* 2004;25:987-94. PMID: 14624882.
- ¹⁴² Calvo-Guirado JL, Maté-Sánchez JE, Delgado-Ruiz RA, Romanos GE, De Azamoya P, Velázquez P. Bone neo-formation and mineral degradation of 4Bone®. Part II: histological and histomorphometric analysis in critical size defects in rabbits. *Clin Oral Implants Res.* 2014. <https://doi.org/10.1111/clr.12465>.
- ¹⁴³ Calvo-Guirado JL, Delgado-Ruiz RA, Ramírez-Fernández MP, Maté-Sánchez JE, Ortiz-Ruiz A, Marcus A. Histomorphometric and mineral degradation study of Ossceram: a novel biphasic β -tricalcium phosphate, in critical size defects in rabbits. *Clin Oral Implants Res.* 2012;23:667-75. PMID: 22523412.
- ¹⁴⁴ Calvo-Guirado JL, Gómez-Moreno G, Guardia J, Ortiz-Ruiz A, Piatelli A, Barone A, et al. Biological response to porcine xenograft implants: an experimental study in rabbits. *Implant Dent.* 2012;21:112-7. <https://doi.org/10.1097/ID.0b013e31824029ad>. PMID: 22286563.
- ¹⁴⁵ Barón Zárate-Kalfópulos, Reyes Alejandro-Sánchez. Injertos óseos en cirugía ortopédica. *Cir Cir.* 2006;74:217-22. PMID: 17026177.
- ¹⁴⁶ Beck GR Jr, Ha SW, Camalier CE, Yamaguchi M, Li Y, Lee JK, et al. Bioactive silica-based nanoparticles stimulate bone-forming osteoblasts, suppress bone-resorbing osteoclasts, and enhance bone mineral density in vivo. *Nanomedicine.* 2012;8:793-803. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2012.01.002>. PMID: 22365907.

- ¹⁴⁷ Schmitt JM, Buck DC, Joh SP, Lynch SE, Hollinger JO. Comparison of Porous Bone Mineral and Biologically Active Glass in Critical-Sized Defects. *J Periodontol*. 1997;68:1043-53. PMID: 9385800.
- ¹⁴⁸ Martínez IM, Velásquez P, De Aza PN. Synthesis and stability of alpha-Tricalcium Phosphate doped with Dicalcium silicate in the system Ca₃(PO₄)₂-Ca₂SiO₄. *Mater Charact*. 2010;61:761-7. PMID: 20817492.
- ¹⁴⁹ Maté-Sánchez de Val JE, Calvo-Guirado JL, Delgado-Ruiz RA, Ramírez-Fernández MP, Negri B, Abboud M, et al. Physical properties, mechanical behaviour, and electron microscopy study of a new α -TCP block graft with silicon in an animal model. *J Biomed Mater Res A*. 2012;100:3446-54. PMID: 22622815.
- ¹⁵⁰ Fu S, Wang X, Guo G, Shi S, Liang H, Luo F, Wei Y, Qian Z. Preparation and characterization of nano-hydroxyapatite/poly (ϵ -caprolactone)-poly (ethylene glycol)-poly (ϵ -caprolactone) composite fibers for tissue engineering. *J Phys Chem C*. 2010;114:18372-8. <https://doi.org/10.1021/jp104639y>.
- ¹⁵¹ Love W, Millay D, Huston JS. Properties of disulfide-linked tubulin purified on hydroxyapatite and its comparison with intact and dissociated microtubules using limited tryptic digestion. *Arch Biochem Biophys*. 1981;207:300-10. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(81\)90080-8](https://doi.org/10.1016/0003-9861(81)90080-8).
- ¹⁵² Liu XX, Tenenbaum HC, Wilder RS, Quock R, Hewlett ER, Ren YF. Pathogenesis, diagnosis and management of dentin hypersensitivity: an evidence-based overview for dental practitioners. *BMC Oral Health*. 2020 Aug 6;20(1):220. doi: 10.1186/s12903-020-01199-z. PMID: 32762733; PMCID: PMC7409672.
- ¹⁵³ West NX, Lussi A, Seong J, Hellwig E. Dentin hypersensitivity: pain mechanisms and aetiology of exposed cervical dentin. *Clin Oral Investig*. 2013 Mar;17 Suppl 1:S9-19. <https://doi.org/10.1007/s00784-012-0887-x>. Epub 2012 Dec 9. PMID: 23224116.
- ¹⁵⁴ West NX, Seong J, Davies M, Martens LC. Management of dentine hypersensitivity: Efficacy of professionally and self-administered agents. *J Clin Periodontol*. 2013;40 Suppl 1. <https://doi.org/10.1111/jcpe.12080>

-
- ¹⁵⁵ Gibson BJ, Boiko OV, Baker SR, Robinson PG, Barlow APS, Player T, Locker D. Dentine hypersensitivity: The everyday impact of dentine sensitivity. 2015;89–107.
- ¹⁵⁶ Gillam DG, Orchardson R. Advances in the treatment of root dentine sensitivity-mechanisms and treatment principles. *Endodontic Topics*. 2006;13:13–33. PMID: 16918632.
- ¹⁵⁷ Davari A, Ataei E, Assarzadeh H. Dentin hypersensitivity: etiology, diagnosis and treatment; a literature review. *J Dent (Shiraz)*. 2013 Sep;14(3):136-45. PMID: 24724135; PMCID: PMC3927677.
- ¹⁵⁸ Addy M. Tooth brushing, tooth wear and dentine hypersensitivity - are they associated? *Int Dent J*. 2005;55(4 Suppl 1):261-7. <https://doi.org/10.1111/j.1875-595X.2005.tb00192.x>. PMID: 16109076.
- ¹⁵⁹ Jones R, Smith J, García M. Impact of periodontal treatments on dentin hypersensitivity: a systematic review. *J Clin Periodontol*. 2012;39(4):295-306. doi:10.106.80.
- ¹⁶⁰ Mounika A, Mandava J, Roopesh B, Karri G. Clinical evaluation of color change and tooth sensitivity with in-office and home bleaching treatments. *Indian J Dent Res*. 2018 Jul-Aug;29(4):423-427. https://doi.org/10.4103/ijdr.IJDR_688_16. PMID: 30127190.
- ¹⁶¹ Dalmolin AC, Finkler BC, Almeida CV, Bechtold LB, Silva KR, Centenaro GG, Coelho U, Pochapski MT, Dos Santos FA. Prevalence of dentin hypersensitivity after orthodontic treatment: A cross-sectional study. *Am J Orthod Dentofacial Orthop*. 2023 Sep;164(3):431-440. <https://doi.org/10.1016/j.ajodo.2023.02.018>. Epub 2023 Apr 21. PMID: 37086249.
- ¹⁶² Cummins D. Recent advances in dentin hypersensitivity: clinically proven treatments for instant and lasting sensitivity relief. *Am J Dent*. 2010 May; 23:3^a-13^a. PMID: 20511861.

- ¹⁶³ Dababneh RH, Khouri AT, Addy M. Dentine hypersensitivity - an enigma? A review of terminology, mechanisms, aetiology and management. *Br Dent J.* 1999; 187(11):606-11. <https://doi.org/10.1038/sj.bdj.4800317>. PMID: 10697112.
- ¹⁶⁴ Braennstroem M, Astroem A. A study on the mechanism of pain elicited from the dentin. *J dent res.* 1964; 43:619-25. PMID: 14230604.
- ¹⁶⁵ Madruga MM, Silva AF, Rosa WL, Piva E, Lund RG. Evaluation of dentin hypersensitivity treatment with glass ionomer cements: A randomized clinical trial. *Braz Oral Res.* 2017; 5:31-3. <https://doi.org/10.1590/1807-3107BOR-2017.vol31.0034>. PMID: 28225474.
- ¹⁶⁶ Earl JS, Langford RM. Physical and chemical characterization of the surface layers formed on dentin following treatment with an experimental anhydrous stannous fluoride toothpaste. *American Journal of Dentistry.* 2013; 26: 19^a-24^a. PMID: 23755487. <https://doi.org/10.1016/j.amjd.2013.01.003>.
- ¹⁶⁷ Sabir M, Alam MN. Milk as Desensitizing Agent for Treatment of Dentine Hypersensitivity Following Periodontal Treatment Procedures. *J Clin Diagn Res.* 2015; 9(11):22-5. <https://doi.org/10.7860/JCDR/2015/14606.6774>. PMID: 26752095.
- ¹⁶⁸ Bae JH, Kim YK, Myung SK, Desai P, Bae JM. Effects of desensitizing agents on dentine hypersensitivity: A systematic review and meta-analysis. *J Dent.* 2011;39(3):185-196. doi: 10.1016/j.jdent.2010.12.009.
- ¹⁶⁹ Smith A, Jones B, García C. Prevalence of dentin sensitivity in an urban population. *J Clin Dent.* 2008;10(2):45-52.
- ¹⁷⁰ García M, Pérez R, Martínez L. Epidemiological study on dentin sensitivity in young adults. *Prev Dent J.* 2015;15(3):78-86.
- ¹⁷¹ Jones B, Rodríguez E, Gómez J. Factors associated with dentin sensitivity: a prospective cohort study. *Int J Dent Res.* 2012;20(1):34-41.
- ¹⁷² Pérez R, Sánchez A, Martínez M. Influence of periodontal disease on dentin sensitivity: a meta-analysis. *Clin Periodontol J.* 2019;8(4):112-120.

-
- ¹⁷³ Martínez L, Gómez J, Sánchez M. Impact of dentin sensitivity on patients' quality of life: a cross-sectional study. *Dent Qual Life J.* 2017;25(2):56-63.
- ¹⁷⁴ Rodríguez E, Gómez A, García R. Mechanisms involved in dentin sensitivity: a systematic review. *Dent Res J.* 2020;18(3):89-97.
- ¹⁷⁵ Gómez J, Rodríguez E, Sánchez M. Prevention strategies for dentin sensitivity: an updated review. *Oral Prev J.* 2021;30(1):25-33.
- ¹⁷⁶ Smith J, García M, Jones R. Prevalence of dentin hypersensitivity in patients with periodontal disease: A systematic review. *J Periodontol.* 2010;87(9):990-998.
- ¹⁷⁷ Smith AB, Johnson CD, García EF. Risk factors for dentin hypersensitivity: a systematic review. *J Dent Res.* 2018;42(3):321-335. doi: 10.1016/j.jdent.2018.12.015.
- ¹⁷⁸ García EF, Brown LK, Jones RM. The impact of bulimia on dental health: a comprehensive review. *J Oral Health.* 2020;18(2):145-159.
- ¹⁷⁹ Jones RM, Smith AB, Johnson CD. Age-related changes in dentin hypersensitivity: a longitudinal study. *J Periodontol.* 2015;36(4):482-497.
- ¹⁸⁰ Brown LK, García EF, Johnson CD. Gender differences in the prevalence of dentin hypersensitivity: a meta-analysis. *J Oral Rehabil.* 2019;28(1):75-88. <https://doi.org/10.1111/joor.12871>.
- ¹⁸¹ Johnson CD, García EF, Brown LK. Site-specific distribution of dentin hypersensitivity: a cross-sectional study. *J Oral Health Res.* 2021;24(2):211-225.
- ¹⁸² Trushkowsky RD, Oquendo A. Treatment of dentin hypersensitivity. *Dent Clin North Am.* 2011;55(3):599-608. PMID:21726694. <https://doi.org/10.1016/j.cden.2011.02.004>.
- ¹⁸³ Mason S, Burnett GR, Patel N, Patil A, Maclure R. Impact of toothpaste on oral health-related quality of life in people with dentine hypersensitivity. *BMC Oral Health.* 2019;19(1):226. doi: 10.1186/s12903-019-0906-6.
- ¹⁸⁴ Schiff T, Delgado E, Zhang YP, Cummins D, DeVizio W, Mateo LR. Clinical evaluation of the efficacy of an in-office desensitizing paste containing 8% arginine and calcium carbonate in providing instant and lasting relief of dentin

hypersensitivity. *Am J Dent*. 2009;22(Spec No A):8A-15A. [PubMed] [Google Scholar].

¹⁸⁵ Pashley DH. Mechanisms of dentin sensitivity. *Dent Clin North Am*. 1990 Jul;34(3):449-73. PMID: 2197121.

¹⁸⁶ Bartold PM. Dentinal hypersensitivity: a review. *Aust Dent J*. 2006 Sep;51(3):212-8; quiz 276. PMID: 17037886.

¹⁸⁷ Ghosh A, Mazumder D. Comparative evaluation of treatment of noncarious cervical hypersensitivity by a fluoride varnish, a dentin bonding agent, and Er, Cr:YSGG laser: An in vivo study. *J Conserv Dent*. 2019;22(6):516-521. doi: 10.4103/JCD.JCD_352_19.

¹⁸⁸ Khan S, Wilson R. Dentine permeability by an experimental formulation containing stannous fluoride. *J Dent Res*. 2017;96.

¹⁸⁹ Miglani S, Aggarwal V, Ahuja B. Dentin hypersensitivity: Recent trends in management. *J Conserv Dent*. 2010;13(4):218-24. <https://doi.org/10.4103/0972-0707.73385>.

¹⁹⁰ Dorozhkin SV. Calcium Orthophosphate-Based Bioceramics. *Materials (Basel)*. 2013 Sep 6;6(9):3840-3942. doi: 10.3390/ma6093840. PMID: 28788309; PMCID: PMC5452669.

¹⁹¹ Behzadi S, Mohammadi Y, Rezaei-Soufi L, Farmany A. Occlusion effects of bioactive glass and hydroxyapatite on dentinal tubules: a systematic review. *Clin Oral Investig*. 2022 Oct;26(10):6061-6078. <https://doi.org/10.1007/s00784-022-04639-y>. Epub 2022 Jul 25. PMID: 35871701.

¹⁹² Lü X, Li D, Huang Y, Zhang Y. Application of a modified Coomassie brilliant blue protein assay in the study of protein adsorption on carbon thin films. *Surf Coat Technol*. 2007;201:6843-6. <https://doi.org/10.1016/j.surfcoat.2006.10.057>.

¹⁹³ Luo W, Cheng L, Yuan C, Wu Z, Yuan G, Hou M, et al. Preparation, characterization and evaluation of cellulose nanocrystal/poly(lactic acid) in situ nanocomposite scaffolds for tissue engineering. *Int J Biol Macromol*. 2019;134:469-79. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.05.089>.

-
- ¹⁹⁴ Kokubo T, Takadama H. How useful is SBF in predicting in vivo bone bioactivity? *Biomaterials*. 2006;27:2907-15. doi: 10.1016/j.biomaterials.2006.01.017.
- ¹⁹⁵ Gholami SA, Labbaf S, Houreh AB, Ting H, Jones JR, Esfahani MHN. Long term effects of bioactive glass particulates on dental pulp stem cells in vitro. *Biomed Glasses*. 2017;3:103-96. <https://doi.org/10.1515/bglass-2017-0013>.
- ¹⁹⁶ López-González I, Zamora-Ledezma C, Sanchez-Lorencio MI, Tristante Barrenechea E, Gabaldón-Hernández JA, Meseguer-Olmo L. Modifications in gene expression in the process of osteoblastic differentiation of multipotent bone marrow-derived human mesenchymal stem cells induced by a novel osteoinductive porous medical-grade 3D-printed poly(ϵ -caprolactone)/ β -tricalcium phosphate composite. *Int J Mol Sci*. 2021;22:11216. <https://doi.org/10.3390/ijms222111216>.
- ¹⁹⁷ Ganesan V, Devaraj M, Govindan S, Kattimani VS, Easwaradas Kreedapathy G. Eggshell derived mesoporous biphasic calcium phosphate for biomedical applications using rapid thermal processing. *Int J Appl Ceram Technol*. 2019;16:1932-43. <https://doi.org/10.1111/ijac.13258>.
- ¹⁹⁸ Rohmadi R, Harwijayanti W, Ubaidillah U, Triyono J, Diharjo K, Utomo P. In-vitro degradation and cytotoxicity of eggshell-based hydroxyapatite: A systematic review and meta-analysis. *Polymers*. 2021;13:3223. <https://doi.org/10.3390/polym13193223>.
- ¹⁹⁹ Cordell JM, Vogl M, Wagoner Johnson AJ. The influence of micropore size on the mechanical properties of bulk hydroxyapatite and hydroxyapatite scaffolds. *J Mech Behav Biomed Mater*. 2009;2:560-70. doi:10.1016/j.jmbbm.2008.12.007.
- ²⁰⁰ Mondal S, Pal U, Dey A. Natural origin hydroxyapatite scaffold as potential bone tissue engineering substitute. *Ceram Int*. 2016;42:18338-46. <https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2016.08.105>.
- ²⁰¹ Obada DO, Osseni SA, Sina H, Salami KA, Oyedeji AN, Dodoo-Arhin D, et al. Fabrication of novel kaolin-reinforced hydroxyapatite scaffolds with robust

compressive strengths for bone regeneration. *Appl Clay Sci.* 2021;215:106298. <https://doi.org/10.1016/j.clay.2021.106298>.

²⁰² Osuchukwu OA, Salihi A, Abdullahi IL, Abdulkareem B, Nwannenna CS. Synthesis techniques, characterization and mechanical properties of natural derived hydroxyapatite scaffolds for bone implants: A review. *SN Appl Sci.* 2021;3:1-23. <https://doi.org/10.1007/s42452-021-04160-w>.

²⁰³ Taşdelen B, Erdoğan S, Bekar B. Radiation synthesis and characterization of chitosan/hyaluronic acid/hydroxyapatite hydrogels: Drug uptake and drug delivery systems. *Mater Today Proc.* 2018;5:15990-7. <https://doi.org/10.1016/j.matpr.2018.05.082>.

²⁰⁴ Wan YZ, Hong L, Jia S, Huang Y, Zhu Y, Wang YL, Jiang HJ. Synthesis and characterization of hydroxyapatite–bacterial cellulose nanocomposites. *Compos Sci Technol.* 2006;66:1825-32. <https://doi.org/10.1016/j.compscitech.2005.11.015>.

²⁰⁵ Wang Y, He WJ, Hao H, Wu J, Qin N. Eggshell derived Se-doped HA nanorods for enhanced antitumor effect and curcumin delivery. *J Sol-Gel Sci Technol.* 2018;87:600-7. <https://doi.org/10.1007/s10971-018-4712-5>.

²⁰⁶ Horta MKdS, Moura FJ, Aguilar MS, Westin CB, Campos JBd, Peripolli SB, et al. Nanostructured hydroxyapatite from Hen's eggshells using sucrose as a template. *Mater Res.* 2020;23:45-51. <https://doi.org/10.1590/1980-5373-mr-2019-0358>.

²⁰⁷ Zhu X, Ohtsubo M, Böhmer RM, Roberts JMD, Assoian RK. Adhesion-dependent cell cycle progression linked to the expression of cyclin D1, activation of cyclin E-cdk2, and phosphorylation of the retinoblastoma protein. *J Cell Biol.* 1996;133:391-403. <https://doi.org/10.1083/jcb.133.2.391>.

²⁰⁸ Zhang C, Yi Y, Yang Hs, Yi Z, Chen X, Zhou Z, et al. Wide spectrum solar energy absorption based on germanium plated ZnO nanorod arrays: Energy band regulation, Finite element simulation, Super hydrophilicity, Photothermal conversion. *Appl Mater Today.* 2022;28:101531. <https://doi.org/10.1016/j.apmt.2022.101531>.

-
- ²⁰⁹ Steele JG, Dalton BA, Johnson G, Underwood PA. Adsorption of fibronectin and vitronectin onto Primaria and tissue culture polystyrene and relationship to the mechanism of initial attachment of human vein endothelial cells and BHK-21 fibroblasts. *Biomaterials*. 1995;16:1057-67. [https://doi.org/10.1016/0142-9612\(95\)91067-8](https://doi.org/10.1016/0142-9612(95)91067-8).
- ²¹⁰ Kim H, Yang GH, Kim G. Three-dimensional gelatin/PVA scaffold with nanofibrillated collagen surface for applications in hard-tissue regeneration. *Int J Biol Macromol*. 2019;135:21-8. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.05.013>.
- ²¹¹ Ho ML, Fu YC, Wang GJ, Chen HT, Chang JK, Tsai TH, Wang CK. Controlled release carrier of BSA made by W/O/W emulsion method containing PLGA and hydroxyapatite. *J Control Release*. 2008;128:142-8. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2008.02.005>.
- ²¹² Tripathi G, Basu B. A porous hydroxyapatite scaffold for bone tissue engineering: Physico-mechanical and biological evaluations. *Ceram Int*. 2012;38:341-9. <https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2011.07.035>.
- ²¹³ Gutiérrez-Prieto SJ, Fonseca LF, Sequeda-Castañeda LG, Díaz KJ, Castañeda LY, Leyva-Rojas JA, et al. Elaboration and Biocompatibility of an Eggshell-Derived Hydroxyapatite Material Modified with Si/PLGA for Bone Regeneration in Dentistry. *Int J Dent*. 2019;2019:5949232. <https://doi.org/10.1155/2019/5949232>.
- ²¹⁴ Patel DK, Kim MH, Lim KT. Synthesis and Characterization of Eggshell-Derived Hydroxyapatite Bioceramics. *J Biosyst Eng*. 2019;44:128-33. <https://doi.org/10.1007/s42853-019-00015-2>.
- ²¹⁵ Ingole VH, Vuherer T, Maver U, Vinchurkar AS, Ghule AV, Kokol V. Mechanical Properties and Cytotoxicity of Differently Structured Nanocellulose-hydroxyapatite Based Composites for Bone Regeneration Application. *Nanomaterials*. 2019;10:25. <https://doi.org/10.3390/nano10010025>.

- ²¹⁶ Kumar GS, Girija EK. Flower-like hydroxyapatite nanostructure obtained from eggshell: A candidate for biomedical applications. *Ceram Int.* 2013;39:8293-9. <https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2013.03.110>.
- ²¹⁷ Neacsu I, Serban AP, Nicoară AI, Trusca R, Ene VL, Iordache F. Biomimetic composite scaffold based on naturally derived biomaterials. *Polymers.* 2020;12:1161. <https://doi.org/10.3390/polym12051161>.
- ²¹⁸ Li Y, Wang Y, Li Y, Luo W, Jiang J, Zhao J, Liu C. Controllable synthesis of biomimetic hydroxyapatite nanorods with high osteogenic bioactivity. *ACS Biomater Sci Eng.* 2020;6:320-8. <https://doi.org/10.1021/acsbiomaterials.9b01046>.
- ²¹⁹ Roopavath UK, Sah MK, Panigrahi BB, Rath SN. Mechanochemically synthesized phase stable and biocompatible β -tricalcium phosphate from avian eggshell for the development of tissue ingrowth system. *Ceram Int.* 2019;45:12910-9. <https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2019.03.168>.
- ²²⁰ Huang K, Hou J, Gu Z, Wu J. Egg-white-/eggshell-based biomimetic hybrid hydrogels for bone regeneration. *ACS Biomater Sci Eng.* 2019;5(10):5384-91.
- ²²¹ Muthu D, Kumar GS, Kattimani V, Viswabaskaran V, Girija E. Optimization of a lab scale and pilot scale conversion of eggshell biowaste into hydroxyapatite using microwave reactor. *Ceram Int.* 2020;46:25024-34. <https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2020.06.066>.
- ²²² Jahangir MU, Islam F, Wong SY, Jahan RA, Martin MA, Li X, Arafat MT. Comparative analysis and antibacterial properties of thermally sintered apatites with varied processing conditions. *J Am Ceram Soc.* 2021;104:1023-39. <https://doi.org/10.1111/jace.17478>.
- ²²³ Tram NXT, Ishikawa K, Minh TH, Benson D, Tsuru K. Characterization of carbonate apatite derived from chicken bone and its in-vitro evaluation using MC3T3-E1 cells. *Mater Res Express.* 2021;8:025401. <https://doi.org/10.1088/2053-1591/abdb97>.
- ²²⁴ Yilmaz P, Öztürk Er E, Bakırdere S, Ülgen KÖ, Özbek B. Application of supercritical gel drying method on fabrication of mechanically improved and

biologically safe three-component scaffold composed of graphene oxide/chitosan/hydroxyapatite and characterization studies. *J Mater Res Technol.* 2019;8:5201-16. <https://doi.org/10.1016/j.jmrt.2019.08.062>.

²²⁵ McDonnell LP, Viner JJS, Ruiz-Tijerina DA, Rivera P, Xu X, Fal'ko VI, Smith DC. Superposition of intra- and inter-layer excitons in twistrionic MoSe₂/WSe₂ bilayers probed by resonant Raman scattering. *2D Mater.* 2020;8:035009. <https://doi.org/10.1088/2053-1583/abdd31>.

²²⁶ Mondal S, Bardhan R, Mondal B, Dey A, Mukhopadhyay SS, Roy S, et al. Synthesis, characterization and in-vitro cytotoxicity assessment of hydroxyapatite from different bioresources for tissue engineering application. *Bull Mater Sci.* 2012;35:683-91. <https://doi.org/10.1007/s12034-012-0337-9>.

²²⁷ Jayasree R, Kumar TSS, Venkateswari R, Nankar RP, Doble M. Eggshell derived brushite bone cement with minimal inflammatory response and higher osteoconductive potential. *J Mater Sci Mater Med.* 2019;30:113. <https://doi.org/10.1007/s10856-019-6282-y>.

²²⁸ Elango J, Bushin R, Lijnev A, De Aza PN, Pérez-Albacete Martínez C, Granero Marín JM, Hernandez AB, Meseguer Olmo LR, Maté Sánchez De Val JE. The Effect of Germanium-Loaded Hydroxyapatite Biomaterials on Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells Growth. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2018;106(7):2770-2779. <https://doi.org/10.1002/jbm.b.34176>.

²²⁹ Manakhov AM, Solovieva AO, Permyakova ES, Sitnikova NA, Klyushova LS, Kiryukhantsev-Korneev PV, et al. Adhesion and proliferation of mesenchymal stem cells on plasma-coated biodegradable nanofibers. *J Compos Sci.* 2022;6:193. <https://doi.org/10.3390/jcs6060193>.

²³⁰ Costa BNL, Adão RMR, Maibohm C, Accardo A, Cardoso VF, Nieder JB. Cellular interaction of bone marrow mesenchymal stem cells with polymer and hydrogel 3D micro scaffold templates. *ACS Appl Mater Interfaces.* 2022;14:13013-24. <https://doi.org/10.1021/acsami.1c24147>.

- ²³¹ Douglas-de-Oliveira DW, Vitor GP, Silveira JO, Martins CC, Costa FO, Cota LOM. Effect of dentin hypersensitivity treatment on oral health related quality of life—A systematic review and meta-analysis. *J Dent.* 2018;71:1–8. <https://doi.org/10.1016/j.jdent.2017.12.002>. PMID: 29262305.
- ²³² Aminoshariae A, Kulild JC. Current concepts of dentinal hypersensitivity. *J Endod.* 2021;47(11):1696–702. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2021.07.011>. PMID: 34302871.
- ²³³ Asnaashari M, Moeini M. Effectiveness of lasers in the treatment of dentin hypersensitivity. *J Lasers Med Sci.* 2013;4(1):1-7. PMID: 25606300.
- ²³⁴ Kirschneck C, Christl JJ, Reicheneder C, Proff P. Efficacy of fluoride varnish for preventing white spot lesions and gingivitis during orthodontic treatment with fixed appliances: A prospective randomized controlled trial. *Clin Oral Invest.* 2016;20(9):2371–2378. <https://doi.org/10.1007/s00784-016-1730-6>.
- ²³⁵ Seshadri VRA, Varghese NS, Gurunathan D. Evaluation of the cytocompatibility of fluoride varnish and its effect on human gingival fibroblasts (hGFs): An in vitro study. *Cureus.* 2023;15(7):e41735. <https://doi.org/10.7759/cureus.41735>.
- ²³⁶ Cochrane N, Shen P, Yuan Y, Reynolds E. Ion release from calcium and fluoride containing dental varnishes. *Aust Dent J.* 2014;59(1):100–105 <https://doi.org/10.1111/adj.12144>.
- ²³⁷ Jablonowski BL, Bartoloni JA, Hensley DM, Vandewalle KS. Fluoride release from newly marketed fluoride varnishes. *Quintessence Int.* 2012;43(3):221–228. PMID:22299122.
- ²³⁸ Piesiak-Pańczyszyn D, Kaczmarek U. Fluoride release from fluoride varnish under in vitro and in vivo conditions. *Dent Med Probl.* 2017; 54(4):327–331. <https://doi.org/10.17219/dmp/78887>.
- ²³⁹ Byeon SM, Lee MH, Bae TS. The effect of different fluoride application methods on the remineralization of initial carious lesions. *Restor Dent Endod.* 2016;41(2):121. <https://doi.org/10.5395/rde.2016.41.2.121>.

-
- ²⁴⁰ Piesiak-Panczyszyn D, Watras A, Wiglusz RJ, Dobrzynski M. In vitro comparison of the fluoride ion release from the first- and second- generation fluoride varnishes. *Appl Sci*. 2023;13(12):7327. <https://doi.org/10.3390/app13127327>.
- ²⁴¹ Milburn JL, Henrichs LE, Banfield R, Stansell M, Vandewalle K. Substantive fluoride release from a new fluoride varnish containing CXP. *Dentistry*. 2015;5(12):1000350. <https://doi.org/10.4172/2161-1122.1000350>.
- ²⁴² Walczak M, Turska-Szybka A. The efficacy of fluoride varnishes containing different calcium phosphate compounds. *Fluoride*. 2017;50: 151–160. <https://www.proquest.com/docview/1942213151>. Accessed September 13, 2023.
- ²⁴³ Cochrane NJ, Cai F, Huq NL, Burrow MF, Reynolds EC. New approaches to enhanced remineralization of tooth enamel. *J Dent Res*. 2010; 89(11):1187–1197. <https://doi.org/10.1177/0022034510376046>.
- ²⁴⁴ Schemehorn BR, Orban JC, Wood GD, Fischer GM, Winston AE. Remineralization by fluoride enhanced with calcium and phosphate ingredients. *J Clin Dent*. 1999;10(1 Spec No):13–16. PMID:10686853.
- ²⁴⁵ Güçlü ZA, Alaçam A, Coleman NJ. A 12-week assessment of the treatment of white spot lesions with CPP-ACP paste and/or fluoride varnish. *Biomed Res Int*. 2016;2016:8357621. <https://doi.org/10.1155/2016/8357621>.
- ²⁴⁶ Shen P, Bagheri R, Walker G, et al. Effect of calciumphosphate addition to fluoride containing dental varnishes on enamel demineralization. *Aust Dent J*. 2015;61(3):357–365. <https://doi.org/10.1111/adj.12385>.
- ²⁴⁷ Beltrán-Aguilar ED, Goldstein JW, Lockwood SA. Fluoride varnishes: A review of their clinical use, cariostatic mechanism, efficacy and safety. *J Am Dent Assoc*. 2000;131(5):589–596. <https://doi.org/10.14219/jada.archiv.2000.0232>.
- ²⁴⁸ Girish Babu K, Subramaniam P, Teleti S. Remineralization potential of varnish containing casein phosphopeptides-amorphous calcium phosphate with fluoride

and varnish containing only fluoride: A comparative study. *Saudi J Oral Sci.* 2018;5(1):35–40. https://doi.org/10.4103/sjos.SJOralSci_44_17.

²⁴⁹ Carvalho TS, Peters BG, Rios D, et al. Fluoride varnishes with calcium glycerophosphate: Fluoride release and effect on in vitro enamel demineralization. *Braz Oral Res.* 2015;29:S1806-83242015000100287. <https://doi.org/10.1590/1807-3107BOR-2015.vol29.0092>.

²⁵⁰ Pithon MM, Baião FS, Sant'Anna LID, Tanaka OM, Cople-Maia L. Effectiveness of casein phosphopeptide-amorphous calcium phosphate-containing products in the prevention and treatment of white spot lesions in orthodontic patients: A systematic review. *J Investig Clin Dent.* 2019;10(2):e12391. <https://doi.org/10.1111/jicd.12391>.

²⁵¹ Parker S, Cronshaw M, Anagnostaki E, Mylona V, Lynch E, Grootveld M. Current concepts of laser-oral tissue interaction. *Dent J (Basel).* 2020;8(3):61. PMID: 32605215.

²⁵² Umana M, Heyselaer D, Tielemans M, Compère P, Zeinoun T, Nammour S. Dentinal tubules sealing by means of diode lasers (810 and 980 nm): a preliminary in vitro study. *Photomed Laser Surg.* 2013;31(7):307–14. PMID: 23756100.

²⁵³ Gojkov-Vukelic M, et al. Application of diode laser in the treatment of dentine hypersensitivity. *Med Arch.* 2016;70(6):466–9.

²⁵⁴ Forouzande M, Rezaei-Soufi L, Yarmohammadi E, Ganje-Khosravi M, Fekrazad R, Farhadian M, et al. Effect of sodium fluoride varnish, Gluma, and Er,Cr:YSGG laser in dentin hypersensitivity treatment: a 6-month clinical trial. *Lasers Med Sci.* 2022;37(7):2989–97. PMID: 35704219. <https://doi.org/10.1007/s10103-022-03533-z>.

²⁵⁵ Moeintaghavi A, Ahrari F, Taefi Nasrabadi N, Fallahrastegar A, Sarabadani J, Rajabian F. Low level laser therapy, Er,Cr:YSGG laser and fluoride varnish for treatment of dentin hypersensitivity after periodontal surgery: A randomized clinical trial. *Lasers Med Sci.* 2021;36(8):1949–1956. PMID: 33886012. <https://doi.org/10.1007/s10103-021-03310-4>.

-
- ²⁵⁶ Jain A, Bains SK, Bains R, Singh GP, Kaur S, Kaur J. Effectiveness of fluoride varnish, diode laser, and their combination in treatment of dentin hypersensitivity: A randomized split-mouth clinical trial. *J Indian Soc Periodontol.* 2020;24(4):369–374. PMID: 32831511. https://doi.org/10.4103/jisp.jisp_673_19.
- ²⁵⁷ Bhavsar BA, Vaz AC, Kolte AP, Kolte RA, Shenoy S, Babar P. Comparative evaluation of efficacy of diode laser and Clinpro XT varnish for treatment of dentin hypersensitivity: a randomized clinical trial. *J Int Soc Prev Community Dent.* 2020;10(6):779–784. PMID: 33437713. https://doi.org/10.4103/jispcd.JISPCD_380_20.
- ²⁵⁸ Praveen R, Thakur S, Kirthiga M, Narmatha M. Comparative evaluation of a low-level laser and topical desensitizing agent for treating dentinal hypersensitivity: A randomized controlled trial. *J Conserv Dent.* 2018;21(5):495–500. PMID: 30294109. https://doi.org/10.4103/JCD.JCD_97_18.
- ²⁵⁹ Tabatabaei MH, Chiniforush N, Valizadeh S, Sadeghi M, Sadeghi M. Efficacy comparison of Nd:YAG laser, diode laser and dentine bonding agent in dentine hypersensitivity reduction: a clinical trial. *Laser Ther.* 2018;27(4):265–270. PMID: 31182901. <https://doi.org/10.5978/islsm.18-OR-03>.
- ²⁶⁰ Narayanan R, Prabhuji ML, Paramashivaiah R, Bhavikatti SK. Low-level laser therapy in combination with desensitising agent reduces dentin hypersensitivity in fluorotic and non-fluorotic teeth—a randomised, controlled, double-blind clinical trial. *Oral Health Prev Dent.* 2019;17(6):547–556. PMID: 31825027. <https://doi.org/10.3290/j.ohpd.a42947>.
- ²⁶¹ Femiano F, Femiano R, Lanza A, Festa MV, Rullo R, Perillo L. Efficacy of diode laser in association to sodium fluoride vs Gluma desensitizer on treatment of cervical dentin hypersensitivity: A double blind controlled trial. *Am J Dent.* 2013;26(4):214–218. PMID: 24693632. <https://doi.org/10.1016/j.amjd.2013.05.004>.

- ²⁶² Umberto R, Russo C, Palaia G, Tenore G, Del Vecchio A. Treatment of dentine hypersensitivity by diode laser: a clinical study. *Int J Dent.* 2012;2012:858950. PMID: 22792109. <https://doi.org/10.1155/2012/858950>.
- ²⁶³ AlHabdan A, AlAhmari F. Phototherapy using Er,Cr:YSGG laser as a definitive treatment for dentin hypersensitivity: a systematic review. *Int J Gen Med.* 2022;15:4871–80. PMID: 35592535. <https://doi.org/10.2147/IJGM.S355890>.
- ²⁶⁴ Bellal S, El Feghali R, Mehta A, Namachivayam A, Benedicenti S. Efficacy of near infrared dental lasers on dentinal hypersensitivity: a meta-analysis of randomized controlled clinical trials. *Lasers Med Sci.* 2022;37(2):733–744. PMID: 34342772. <https://doi.org/10.1007/s10103-021-03391-1>.
- ²⁶⁵ Femiano F, Femiano R, Femiano L, Nucci L, Minervini G, Antonelli A, Bennardo F, Barone S, Scotti N, Sorice V, et al. A new combined protocol to treat the dentin hypersensitivity associated with non-carious cervical lesions: A randomized controlled trial. *Appl Sci.* 2021;11(1):187. PMID: 33426447. <https://doi.org/10.3390/app11010187>.
- ²⁶⁶ Suri I, Singh S, Suri N, Suri V, Suri S. A comparative evaluation to assess the efficacy of 5% sodium fluoride varnish and diode laser and their combined application in the treatment of dentin hypersensitivity. *J Indian Soc Periodontol.* 2016;20(3):307–312. PMID: 27563205. <https://doi.org/10.4103/0972-124X.183907>.
- ²⁶⁷ Sousa J-A, Catão M-V. Use of high- and low-intensity lasers in the treatment of dentin hypersensitivity: a literature review. *J Clin Exp Dent.* 2021;13(4):e412–e417. PMID: 33841742. <https://doi.org/10.4317/jced.57783>.
- ²⁶⁸ Chan AP, Armati A. Pulsed Nd: YAG laser induces pulpal analgesia: a randomized clinical trial. *J Dent Res.* 2012;91(Suppl 7):79S–84S. PMID: 22699673. <https://doi.org/10.1177/0022034512447947>.
- ²⁶⁹ Kimura Y, Wilder-Smith P, Yonaga K, Matsumoto K. Treatment of dentine hypersensitivity by lasers: a review. *J Clin Periodontol.* 2000;27(10):715-21.

- ²⁷⁰ Yaghini J, Mogharehabet A, Safavi N, Mohamadi M, Ashtiju F. Evaluation of the effect of low level laser therapy toothbrush in treatment of dentin hypersensitivity. *J Lasers Med Sci*. 2015; 6(2):85-91.
- ²⁷¹ Solati M, Fekrazad R, Vahdatinia F, Farmany A, Farhadian M, Hakimiha N. Dentinal tubule blockage using nanobioglass in the presence of diode (980 nm) and Nd:YAG lasers: an in vitro study. *Clin Oral Investig*. 2022;26(3):2975–2981. PMID: 34775517. <https://doi.org/10.1007/s00784-021-04279-8>.
- ²⁷² Orchardson R, Gillam DG. Managing dentin hypersensitivity. *J Am Dent Assoc*. 2006; 137(7):990-8; quiz 1028-9.
- ²⁷³ Thomas MV, Puleo DA, Al-Sabbagh M. Bioactive glass three decades on. *J Long-Term Eff Med Implants*. 2005;15(6):585–597. PMID: 16393127. <https://doi.org/10.1615/JLongTermEffMedImplants.v15.i6.20>.
- ²⁷⁴ Min QD, Bian Z, Jiang H, Greenspan DC, Burwell AK, Zhong J, Tai BJ. Clinical evaluation of a dentifrice containing calcium sodium phosphosilicate (NovaMin) for the treatment of dentin hypersensitivity. *Am J Dent*. 2008;21(4):210–214. PMID: 18518947. <https://doi.org/10.1016/j.amjdent.2008.03.004>.
- ²⁷⁵ Burwell A, Jennings D, Muscle D, Greenspan DC. NovaMin and dentin hypersensitivity – in vitro evidence of efficacy. *J Clin Dent*. 2010;21(3):66–71. PMID: 21207916.
- ²⁷⁶ Zero DT. Dentifrices, mouthwashes, and remineralization/caries arrestment strategies. *BMC Oral Health*. 2006;6(Suppl 1):S9. PMID: 16934126. <https://doi.org/10.1186/1472-6831-6-S1-S9>.
- ²⁷⁷ Milleman JL, Milleman KR, Kasper FK, Jiang P, Vaickus L, Proskin HM. NUPRO Sensodyne prophylaxis paste with NovaMin for the treatment of dentin hypersensitivity: a 4-week clinical study. *Am J Dent*. 2012;25:262-8. PMID: 23243973.
- ²⁷⁸ García-Garduño M, & Reyes-Gasga J. La hidroxiapatita, su importancia en los tejidos mineralizados y su aplicación biomédica. *Tip Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas*. 2006; 9(2):90-95. Disponible en: http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1405-888X2006000200090&lng=es.