



"El saber de mis hijos
hará mi grandeza"

UNIVERSIDAD DE SONORA

DIVISIÓN DE INGENIERÍA

**DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA QUÍMICA Y
METALURGIA**

**EVALUACIÓN DE LA CITOTOXICIDAD DE
BIOMATERIALES DE HIDROXIAPATITA
ESTEQUIOMÉTRICA UTILIZANDO
OSTEOBLASTOS HUMANOS hFOB 1.19**

Tesis

Que para obtener el título de:

INGENIERA EN MATERIALES

Presenta

LUCIANA MARÍA DURAZO BARCELÓ

Hermosillo, Sonora

Junio 2023

Universidad de Sonora

Repositorio Institucional UNISON



**"El saber de mis hijos
hará mi grandeza"**



Excepto si se señala otra cosa, la licencia del ítem se describe como openAccess

VOTOS APROBATORIOS

Hermosillo, Sonora a 20 de Junio del 2023

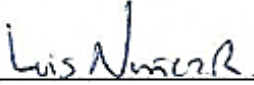
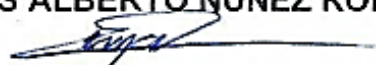
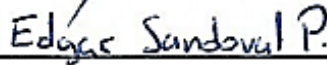
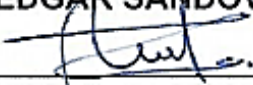
**DR. PAUL ZAVALA RIVERA
JEFE DEL DEPARTAMENTO
INGENIERÍA QUÍMICA Y METALURGIA**

Por medio de la presente, nos permitimos informarle que los miembros del Jurado designado para evaluar su propuesta de titulación por la Opción de Tesis Profesional con el Tema **“EVALUACIÓN DE LA CITOTOXICIDAD DE BIOMATERIALES DE HIDROXIAPATITA ESTEQUIOMÉTRICA UTILIZANDO OSTEOLASTOS HUMANOS hFOB 1.19”** presentada por:

LUCIANA MARÍA DURAZO BARCELÓ

La han revisado y cada uno de los integrantes da su **VOTO APROBATORIO** ya que cumple con los requisitos parciales para la obtención del título de:

INGENIERA EN MATERIALES

<u>20/06/2023</u>	<u></u>
Fecha	DR. LUIS ALBERTO NUÑEZ RODRIGUEZ
<u>20/06/2023</u>	<u></u>
Fecha	DR. MARTIN ANTONIO ENCINAS ROMERO
<u>20/06/2023</u>	<u></u>
Fecha	MC. EDGAR SANDOVAL PETRIS
<u>20/06/2023</u>	<u></u>
Fecha	DRA. MARIA GUADALUPE BURBOA ZAZUETA

DEDICATORIA

Dedicado a mí, por todo lo que este proyecto representa y como prueba de un reto superado.

AGRADECIMIENTOS

A mi familia.

A mis maestros.

A mis amigos.

A los departamentos y laboratorios que me apoyaron para el desarrollo del presente trabajo.

ÍNDICE DE CONTENIDO

	Pág.
I. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS	10
I.1 Introducción	10
I.2 Hipótesis	12
I.3 Objetivo General	12
I.4 Objetivos Particulares	12
II. ANTECEDENTES	13
II.1 Biomateriales	13
II.1.1 Biocerámicos	15
II.1.2 Propiedades de los Fosfatos de Calcio y su Influencia en el Comportamiento Celular	17
II.2 Hidroxiapatita	20
II.2.1 Relevancia de la Hidroxiapatita Estequiométrica	21
II.2.2 Proceso Sol-Gel	24
II.3 Evaluación de las Propiedades de Citotoxicidad	26
II.3.1 Ensayo MTT	27
II.3.2 Cultivo Celular	28
II.3.3 Línea Celular de Osteoblastos Humanos hFOB 1.19.....	29
II.3.3.1 Línea Celular Inmortalizada	32
II.4 Microscopio Electrónico de Barrido.....	34
III. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL	36
III.1 Síntesis de Hidroxiapatita Estequiométrica.....	36
III.2 Sinterización de Hidroxiapatita Estequiométrica	37
III.3 Estandarización del Manejo de las Células hFOB 1.19	38
III.4 Ensayo MTT.....	38
III.5 Análisis Estadístico	39
III.6 Técnicas de Caracterización.....	39

III.6.1	Microscopio Electrónico de Barrido	39
III.6.2	Microscopía Invertida	39
IV.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	40
IV.1	Morfología del Xerogel por Microscopía Electrónica de Barrido.....	40
IV.2	Morfología de las Células hFOB 1.19 por Microscopio Invertido	41
IV.3	Morfología de la Superficie del Material de Hidroxiapatita Estequiométrica tras el Contacto con la Línea Celular hFOB 1.19	45
IV.4	Viabilidad Celular	48
V.	CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	53
V.1	Conclusiones	53
V.2	Recomendaciones	53
VI.	BIBLIOGRAFÍA.....	55

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Diagrama general sobre la clasificación de los biomateriales.	14
Figura 2. Diagrama general sobre la clasificación de los biocerámicos.	16
Figura 3. Representación grafica del proceso de remodelación ósea llevada a cabo por acción de los osteoblastos (formación) y osteoclastos (degradación)...	18
Figura 4. Esquema de las principales propiedades de los CPC y su relación con los procesos biológicos que dan lugar a la formación de hueso nuevo (Samavedi et al., 2013).	19
Figura 5. Estructura cristalina de la hidroxiapatita $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$	21
Figura 6. Sustituciones iónicas en la celda unitaria de la hidroxiapatita.....	22
Figura 7. Patrones de difracción de rayos X para el xerogel de nitrato de calcio y fosfato de amonio tras tratamiento térmico a 350°C y 750°C. (*) Hidroxiapatita	23
Figura 8. Representación grafica de los eventos ocurridos en la superficie de la hidroxiapatita tras ser implantada en el organismo (Bertazzo et al., 2010).	24
Figura 9. Esquema general de las etapas en el proceso sol-gel.....	25
Figura 10. Representación grafica del proceso para realizar la prueba MTT... ..	28
Figura 11. Esquema general del proceso de obtención de una línea celular. ..	29
Figura 12. a) Morfología de las células hFOB 1.19 tras la siembra en medio de cultivo DMEM:F-12, b) morfología de las células hFOB 1.19 tras 24 horas de incubación.	30
Figura 13. Nivel de los marcadores más característicos del proceso de formación ósea en cada etapa de la diferenciación osteogénica (Przekora, 2019).	31
Figura 14. Diagrama general del proceso de transfección de una célula con el virus SV40 para inducir la inmortalización mediante la alteración de los telómeros y/o genes supresores de tumores.	33
Figura 15. Diagrama de la metodología empleada para la síntesis de hidroxiapatita estequiométrica (M. Encinas-Romero et al., 2013).	37
Figura 16. Micrografías elaboradas por SEM del xerogel obtenido a partir de nitrato de calcio y fosfato de amonio inmersos en agua, tratado térmicamente a 750°C.	40

Figura 17. Osteoblastos hFOB 1.19 en, a) pozo control (sin material) y b) pozo con pastilla de hidroxiapatita estequiométrica, después de ser sembrados (Dia 0). Dia 1 c) pozo control y d) pozo con material. Dia 3 e) pozo control y f) pozo con material.	42
Figura 18. Osteoblastos hFOB 1.19 durante el séptimo día de cultivo en a) pozo control y en b) pozo con hidroxiapatita estequiométrica.	43
Figura 19. Osteoblastos hFOB 1.19 al décimo día de cultivo en a) pozo control b) pozo con pastilla de hidroxiapatita muestra 1, c) muestra 2, d) muestra 3 (monocapa desprendida).	44
Figura 20. Micrografías del material de hidroxiapatita estequiométrica por SEM tras 14 días en contacto con las células hFOB 1.19 a) 600x y b) 1500x.....	46
Figura 21. Micrografía del material de hidroxiapatita estequiométrica por SEM después de a) 14 días (900x) y b,c) 21 días (910x y 5000x) en contacto con las células hFOB 1.19.....	48
Figura 22. a) Curva de crecimiento de los osteoblastos hFOB 1.19 en el material y el control durante 21 días. b) análisis estadístico del porcentaje de viabilidad del material con respecto al tiempo (días 1,3 y 7).....	50

RESUMEN

La creación de nuevos materiales enfocados a la reparación ósea sustenta su relevancia en las problemáticas de la sociedad actual, debido al gran impacto y la frecuencia con la que se presentan las enfermedades y padecimientos óseos en los adultos. En este ámbito los cerámicos basados en fosfatos de calcio (CPC) destacan por su similitud con la fase mineral del hueso, siendo la hidroxiapatita (HAp) uno de los más estudiados. Así mismo, dentro de los estudios de biocompatibilidad y aceptación biológica de biomateriales la línea celular de osteoblastos fetales humanos (hFOB 1.19) representa uno de los modelos celulares más estables y fenotípicamente similar a los osteoblastos primarios.

En el presente trabajo se realizó la síntesis de hidroxiapatita estequiométrica por una ruta sol-gel utilizando como precursores químicos Nitrato de Calcio ($\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) y Fosfato de Amonio ($\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$), para posteriormente llevar a cabo su conformación en materiales densos mediante sinterización y evaluar su citotoxicidad utilizando una línea celular de osteoblastos normales hFOB 1.19 a través del ensayo MTT (bromuro 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol). Los resultados obtenidos tanto por los análisis morfológicos como los ensayos de viabilidad indican que las células proliferaron adecuadamente en presencia del material demostrándose que las pastillas de hidroxiapatita estequiométrica no son citotóxicas.

I. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

I.1 Introducción

El tejido óseo tiene la capacidad de remodelarse activamente mediante la formación y resorción continua del hueso. Habitualmente, dicha respuesta fisiológica es lo suficientemente efectiva en el caso de pequeños defectos o fracturas y para la adaptación del esqueleto al uso mecánico (Sprio et al., 2021), sin embargo, en lesiones que provocan daños mayores como la remoción de tumores, traumatismos provocados por fracturas o enfermedades como osteoporosis, donde existe una pérdida ósea considerable es necesario recurrir al uso de prótesis o injertos. No obstante, estos tienden a ser rechazados o necesitan ser reemplazados con el tiempo, lo que conlleva a tratamientos costosos e invasivos con largos periodos de recuperación (Rashki Kemmak et al., 2020).

En vista de que las enfermedades y problemas óseos tienen un gran impacto en la calidad de vida de las personas, y estos padecimientos son cada vez más frecuentes, los científicos en el área de materiales y disciplinas afines en el ámbito de medicina regenerativa continúan en la búsqueda y creación de soluciones.

Los biomateriales son cualquier sustancia, ya sea de origen natural o sintético, que puede ser usada por un determinado periodo de tiempo, como sustituto completo o parcial de un sistema de forma biocompatible (Ghasemi-Mobarakeh, Kollahreez, Ramakrishna, & Williams, 2019), con la finalidad de tratar, aumentar o reemplazar cualquier tejido, órgano o función del cuerpo. En este sentido, los cerámicos son un campo de estudio muy prometedor.

Los cerámicos basados en fosfatos de calcio (CPC) imitan estrechamente la fase mineral del hueso y proporcionan una mayor adherencia y proliferación de osteoblastos en comparación con otros materiales (Ratner, Hoffman, Schoen, & Lemons, 2004; Sprio, Tampieri, Dapporto, Lafisco, & Montesi, 2021). La hidroxiapatita (HAP) $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, es el fosfato cálcico con mayor estabilidad

al pH fisiológico, es termodinámicamente estable y exhibe un carácter bioactivo (Sprio et al., 2021), además puede obtenerse por varias rutas de síntesis siendo el método sol-gel uno de los que sobresale, ya que además de ser una técnica de baja temperatura permite realizar mezclas homogéneas y obtener productos de alta pureza (M. A. Encinas-Romero, Peralta-Haley, Valenzuela-García, & Castellón-Barraza, 2013).

La evaluación de la biocompatibilidad *in vitro* es una etapa crucial a la hora de investigar biomateriales, puesto que nos da un primer acercamiento de las posibles interacciones célula-material.

Este tipo de ensayos son relativamente económicos, fáciles de preparar y presentan uniformidad experimental por lo que son reproducibles. En ellos se puede hacer uso de líneas celulares tales como hFOB 1.19, MC3T3-E1, Sao2-2, U-2OS y MG-63 la elección de cada una de ellas va depender del tipo de análisis a desarrollar y las condiciones del laboratorio (Ratner et al., 2004). Las células hFOB 1.19 expresan marcadores osteoblásticos incluyendo fosfatasa alcalina y osteocalcina, tienen la capacidad de producir nódulos mineralizados y de formar matriz extracelular en cultivos *in vitro* (Gholami, 2017; Hapidin, Rozelan, Abdullah, Hanaffi, & Soelaiman, 2015; Harris, Enger, Riggs, & Spelsberg, 1995) por lo que es considerado un modelo confiable de cultivo celular.

Por lo anteriormente mencionado, en el presente trabajo se propone sintetizar hidroxiapatita estequiométrica utilizando la técnica sol-gel, formar un material sinterizado y evaluar el efecto citotóxico de este sobre la línea celular de osteoblastos humanos hFOB 1.19 mediante el ensayo MTT, determinar su viabilidad y evaluar los cambios en la morfología del material en varios periodos de tiempo mediante microscopia electrónica de barrido.

I.2 Hipótesis

Los biomateriales sinterizados de hidroxiapatita estequiométrica no presentan citotoxicidad al estar en contacto con la línea celular de osteoblastos fetales humanos hFOB 1.19, bajo las siguientes condiciones de incubación: 90% de humedad, 5% CO₂, 37°C y utilizando como medio de cultivo DMEM/F-12.

I.3 Objetivo General

Evaluar la citotoxicidad de los materiales de hidroxiapatita estequiométrica utilizando osteoblastos humanos hFOB 1.19.

I.4 Objetivos Particulares

- Realizar la síntesis de hidroxiapatita estequiométrica mediante la técnica sol-gel y su conformación en materiales densos mediante sinterización.
- Estandarizar los cultivos de células de osteoblastos humanos hFOB 1.19
- Evaluar la citotoxicidad de los sinterizados de hidroxiapatita mediante la técnica MTT en diversos periodos de tiempo

II. ANTECEDENTES

II.1 Biomateriales

El uso de los biomateriales históricamente se remonta a la antigüedad, donde civilizaciones como los Mayas usaban fragmentos de conchas como sustitutos dentales los cuales lograban una perfecta osteointegración, o los Griegos que aplicaban suturas metálicas (Ratner et al., 2004), todo esto sin conocimiento alguno de los términos como biocompatibilidad o materiales bioactivos. Pero el campo moderno de los biomateriales tal como lo conocemos en la actualidad, inició hace apenas a unas cuantas décadas. Esta disciplina a pesar de ser relativamente joven ha generado un impacto significativo en la calidad de vida y salud humana, en ella participan ramas como la química, biológica, medicina e ingeniería en materiales, entre muchas otras (Park & Lakes, 2004; Ratner et al., 2004).

De manera general los biomateriales se pueden clasificar según su origen en sintéticos (polímeros, metales, cerámicos) o biológicos (aquellos derivados de animales, vegetales o humanos), como se ilustra en la Figura 1. Estos materiales se eligen en función de las propiedades que requiera la aplicación, pero todos ellos deben compartir ciertas cualidades como biocompatibilidad, estabilidad química y no ser tóxicos ni carcinogénicos (Ratner et al., 2004).

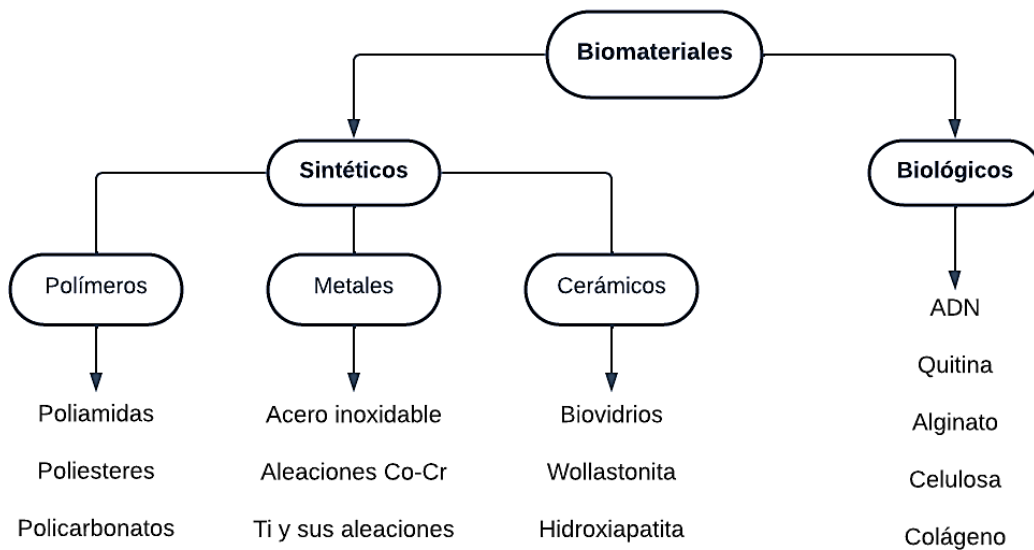


Figura 1. Diagrama general sobre la clasificación de los biomateriales.

Cuando se coloca un material dentro del cuerpo, el tejido puede reaccionar hacia este de varias maneras. El mecanismo de interacción dependerá de la respuesta del tejido a la superficie del implante. En general, hay tres términos en los que un biomaterial puede clasificarse para representar dichas respuestas (Ghasemi-Mobarakeh et al., 2019; Ratner et al., 2004):

- **Bioinerte:** Hace referencia a los materiales que tienen una influencia nula sobre los tejidos, por lo cual no inducen ninguna respuesta inmunológica en el organismo huésped.
- **Bioactivo:** Hace referencia a los materiales que interactúan de manera directa con el medio circundante y producen una respuesta biológica específica en la interfase, la cual resulta en la unión entre los tejidos y el material.
- **Biodegradable:** Hace referencia a los materiales que tienden a degradarse por efectos químicos, bioquímicos o físicos tras cumplir su función, los residuos pueden ser bioinertes o bioactivos y llevarán a la formación de tejido nuevo.

Con respecto a sus dimensiones, los biomateriales también pueden clasificarse en macrométricos, micrométricos y nanométricos; asimismo en base a su integridad estructural se pueden agrupar en porosos y no porosos (Ratner et al., 2004).

II.1.1 Biocerámicos

Son muchas las necesidades que el campo de los biomateriales debe cubrir actualmente, no solo en la creación de nuevos dispositivos sino también en la mejora de tratamientos que ayuden a promover una restauración de las funciones fisiológicas; y es precisamente en este ámbito, donde los biocerámicos destacan.

Los biocerámicos exhiben las mismas propiedades que los cerámicos, es decir son materiales inorgánicos, no metálicos que cuentan con elevados puntos de fusión, baja conductividad térmica y debido a la naturaleza iónica de sus enlaces presentan elevada dureza, pero con la cualidad extra de ser biocompatibles (Park & Lakes, 2004).

En base a la interacción superficie-tejido, estos materiales pueden clasificarse como bioinertes, bioactivos y bioreabsorbibles, como se ilustra en la Figura 2. Los cerámicos bioinertes o casi bioinertes son nombrados así ya que se caracterizan por una cinética de reacción extremadamente lenta. Estos a pesar de ser biocompatibles provocan una reacción de cuerpo extraño que resulta en una encapsulación del implante, el grosor de dicha capsula fibrosa varía en función del material (Ratner et al., 2004), (Vallet-Regí & Salinas, 2019).

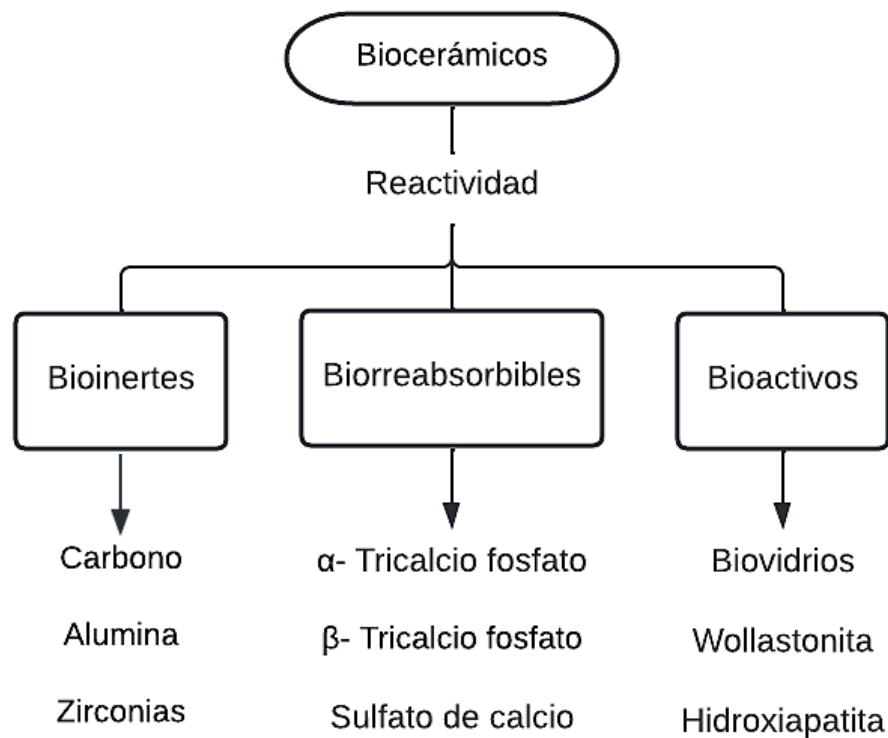


Figura 2. Diagrama general sobre la clasificación de los biocerámicos.

Los cerámicos bioactivos a diferencia de los bioinertes, no son aislados por medio de encapsulamiento; por el contrario, son capaces de estimular la formación de hueso nuevo. Dicho de otra manera, la superficie de estos materiales es capaz de reaccionar con el medio fisiológico, estas reacciones incluyen fenómenos de disolución, precipitación e intercambio iónico en combinación con adsorción de proteínas, dando lugar a la formación de una capa de fosfato de calcio. En virtud de esta capa neoformada (similar a la fase mineral del hueso), las células se adhieren y depositan una extensa matriz ósea sobre la superficie del biomaterial (El-Ghannam & Ducheyne, 2017; Vallet-Regí & Salinas, 2019).

Ahora bien, se denomina como bioreabsorbibles a los cerámicos diseñados para estar en el cuerpo por un determinado periodo de tiempo. Tras cumplir su función, el implante tendrá un cambio en sus propiedades físicas, químicas o biológicas

(Bajpai et al., 1988), que lo llevaran de manera progresiva a ser reabsorbido por el organismo.

Los cerámicos de fosfato de calcio son materiales ampliamente estudiados en el ámbito de regeneración ósea debido a su similitud con la fase mineral del hueso. Además, poseen propiedades superficiales que favorecen la adhesión y proliferación de las células óseas como los osteoblastos, logrando así inducir la formación de hueso nuevo (Sprio et al., 2021),(Samavedi, Whittington, & Goldstein, 2013).

II.1.2 Propiedades de los Fosfatos de Calcio y su Influencia en el Comportamiento Celular

La respuesta biológica de los cerámicos basados en fosfatos de calcio está determinada por un conjunto de propiedades fisicoquímicas que influyen en su capacidad para promover la remodelación ósea (Samavedi et al., 2013), acción llevada a cabo por las células óseas como se ilustra en la Figura 3, de modo que para diseñar un biomaterial acorde a la problemática que se busca solucionar, es necesario tener un buen grado de comprensión acerca de las propiedades que modulan el comportamiento celular. Cuando se implanta un injerto óseo ocurren una serie de eventos, comenzando por la adsorción de proteínas, seguido de la adhesión celular y la diferenciación (ver Figura 4). Uno de los factores más importantes para que esto se lleve a cabo es la topografía de la superficie (rugosidad, porosidad, tamaño de poros, tamaño de grano, etc) puesto que determina el área superficial y por ende el espacio de interacción para que se lleve a cabo la adsorción y posterior adhesión celular (K. Wang, Zhou, Hong, & Zhang, 2012).

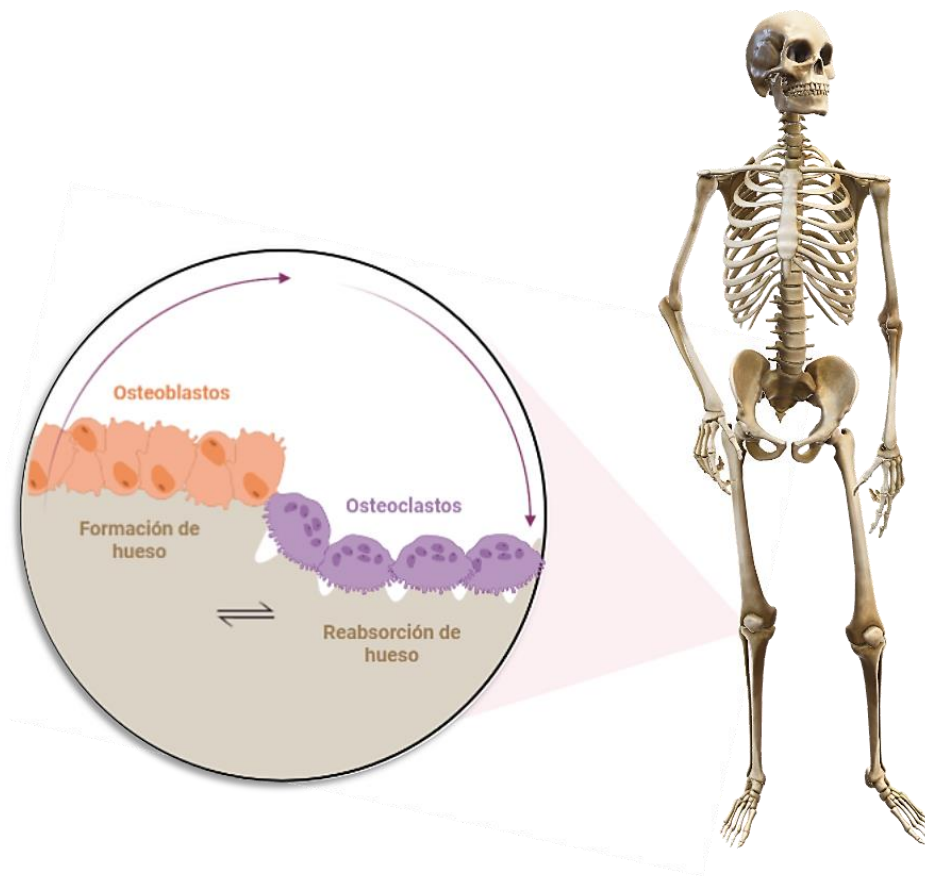


Figura 3. Representación grafica del proceso de remodelación ósea llevada a cabo por acción de los osteoblastos (formación) y osteoclastos (degradación).

Otros parámetros ligados a la adsorción de proteínas son la química de la superficie y la carga (grupos funcionales, humectabilidad, etc), varios estudios (Kazimierczak, Vivcharenko, Truskiewicz, Wójcik, & Przekora, 2019; Przekora, 2019; Samavedi et al., 2013; K. Wang et al., 2012) han reportado que superficies polares, cargadas positivamente e hidrofílicas exhiben una mejor capacidad para captar proteínas promoviendo la adhesión celular.

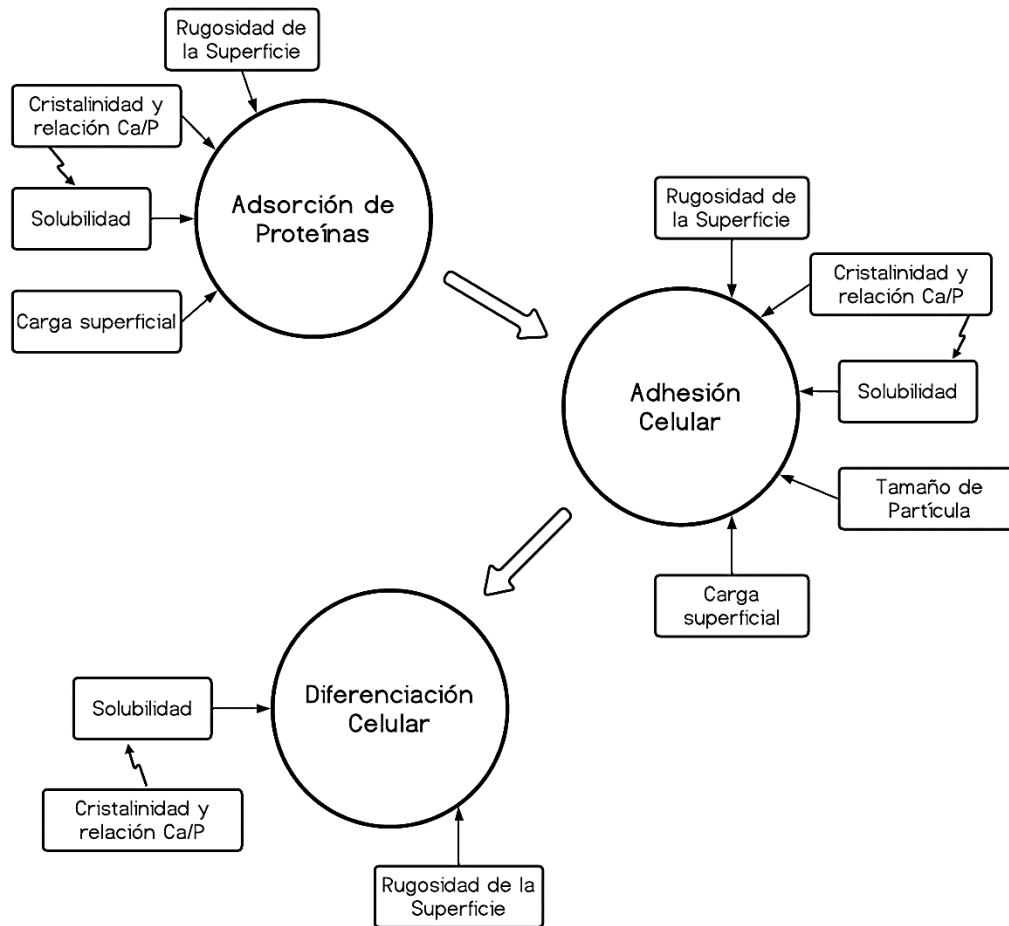


Figura 4. Esquema de las principales propiedades de los CPC y su relación con los procesos biológicos que dan lugar a la formación de hueso nuevo (Samavedi et al., 2013).

Igualmente, la solubilidad también tiene una influencia importante en esta etapa (Xiao et al., 2020), y a su vez dicho parámetro, depende estrechamente de la cristalinidad y la relación Ca/P (Samavedi et al., 2013); de esta manera mientras menor sea la cristalinidad y la relación Ca/P mayor será la solubilidad de la muestra y por ende su reactividad y capacidad para adsorber proteínas facilitando la adhesión de los osteoblastos.

Contrario a lo que se creía anteriormente, las propiedades superficiales no solo están estrechamente relacionadas con la osteoconducción, sino que también pueden influir en la osteoinducción sin recurrir a la adición de factores de crecimiento o citoquinas (Xiao et al., 2020). En las últimas décadas se ha observado que algunos cerámicos basados en fosfatos de calcio son capaces de inducir la diferenciación de las células osteoprogenitoras simplemente modificando las propiedades, ya que como se muestra en la Figura 4 estas intervienen en la adsorción de proteínas afectando en consecuencia a la adhesión de las células y a su interacción con la matriz extracelular, modulando así la diferenciación y por ende la capacidad osteoinductiva de los implantes (Samavedi et al., 2013; Sprio et al., 2021; Xiao et al., 2020).

Si bien es cierto que el potencial osteoinductivo de los CPC con factores de crecimiento es mayor, también lo es el hecho de que materiales como hidroxiapatita o α y β -tricalcio fosfato sin ningún aditivo, exhiben la misma propiedad y pueden competir a la par representando una alternativa muy prometedora como sustitutos de implantes óseos.

II.2 Hidroxiapatita

La hidroxiapatita, $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, es un biomaterial por excelencia debido a su semejanza con los tejidos duros del organismo, tanto en composición como en estructura (ver Figura 5). Siendo esta una de las principales razones por las que ha sido ampliamente investigada en los últimos años, ya sea como andamio en conjunto con otros materiales de refuerzo (Turnbull et al., 2018; W. Wang & Yeung, 2017), o como microesferas (Chao, Wang, Pai, & Yen, 2015), con el objetivo de ayudar a la reparación ósea.

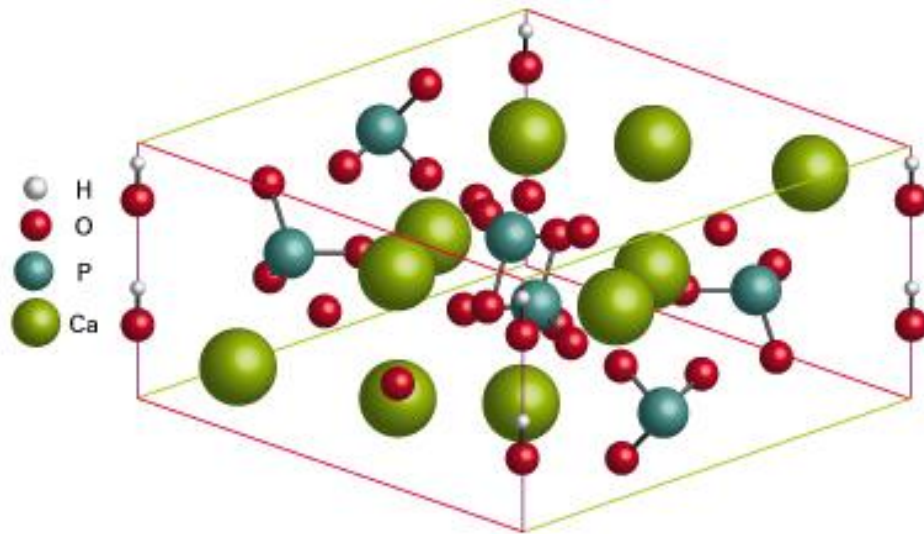


Figura 5. Estructura cristalina de la hidroxiapatita $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ (ChemTube 3D, n.d.).

Dentro de los cerámicos basados en fosfatos de calcio, la hidroxiapatita destaca ya que cuenta con una excelente compatibilidad a nivel fisiológico y exhibe un carácter bioactivo, presenta bajos costos de producción y además es posible modificar sus propiedades al cambiar su composición química o cristalinidad (Lin & Chang, 2015).

II.2.1 Relevancia de la Hidroxiapatita Estequiométrica

La estequiometría de la hidroxiapatita hace referencia a la relación atómica exacta de Ca/P en la celda unitaria (ver Figura 5) (El-Ghannam & Ducheyne, 2017); lo cual le otorga un comportamiento altamente cristalino y por ende una elevada estabilidad. Lo anterior provoca que el material sea poco soluble y por consiguiente menos bioactivo que la apatita biológica, ya que esta última contiene impurezas que causan una perturbación en el ordenamiento de los átomos de la red ocasionando un cambio en la cristalinidad y por lo tanto también en la reactividad (Ressler, Žužić, Ivanišević, Kamboj, & Ivanković, 2021); siendo esta descrita como una hidroxiapatita carbonatada de tipo A, si las sustituciones de carbonato (CO_3^{2-}) remplazan a los iones OH^- , o hidroxiapatita carbonatada de

tipo B si se remplazan los iones PO_4^{3-} (Pan & Darvell, 2010), como se muestra en la Figura 6.

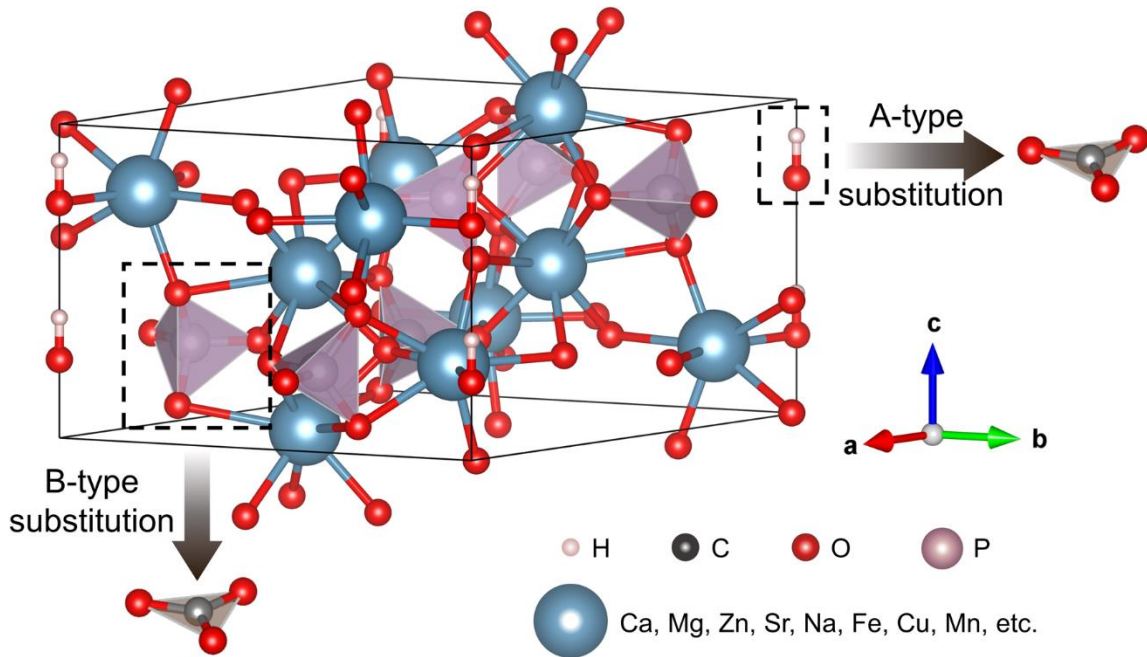


Figura 6. Sustituciones iónicas en la celda unitaria de la hidroxiapatita (Zhang et al., 2021).

No obstante, las características de la hidroxiapatita estequiométrica no representan una desventaja para su utilización como implante óseo, ya que en un cuerpo adulto la composición y estructura de la apatita sufre ciertos cambios de tal manera que la fase mineral del hueso se vuelve cada vez más cristalina debido a un aumento en la relación de Ca/P (Matsushima & Hikichi, 1989). Así pues, siendo este el enfoque, resulta más viable la utilización de una hidroxiapatita estequiométrica que se encuentre perfectamente cristalizada.

La cristalinidad de la hidroxiapatita es un parámetro que puede ser fácilmente modificado en función del tratamiento térmico aplicado durante la ruta de síntesis. Tal como se muestra en los patrones XRD de la Figura 7, donde el xerogel tratado a menor temperatura (350°C) se encuentra en una fase temprana de cristalización, simulando la fase mineral de un hueso inmaduro. Mientras que el

xerogel que fue tratado a 750°C se transformó en una hidroxiapatita perfectamente cristalizada, lo cual se puede ver representado por la definición en los patrones de difracción. Siendo esta última comparable con un tejido óseo maduro (M. A. Encinas-Romero et al., 2013).

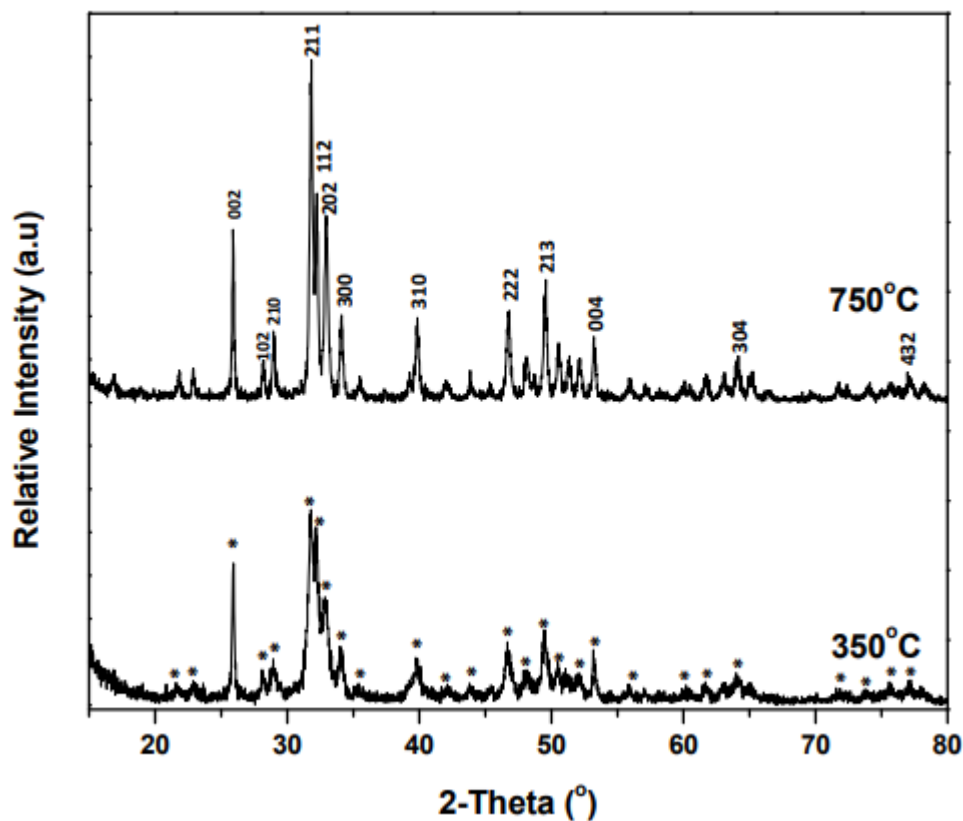


Figura 7. Patrones de difracción de rayos X para el xerogel de nitrato de calcio y fosfato de amonio tras tratamiento térmico a 350°C y 750°C. (*) Hidroxiapatita (M. Encinas-Romero, Peralta-Haley, Valenzuela, & Castellón-Barraza, 2013).

Acorde con lo mencionado anteriormente, se sabe que la reactividad en la superficie de la hidroxiapatita es un parámetro muy importante por considerar. Pero además es indispensable evaluar la proliferación y diferenciación celular para predecir el efecto que tendrá el material en los procesos de regeneración ósea.

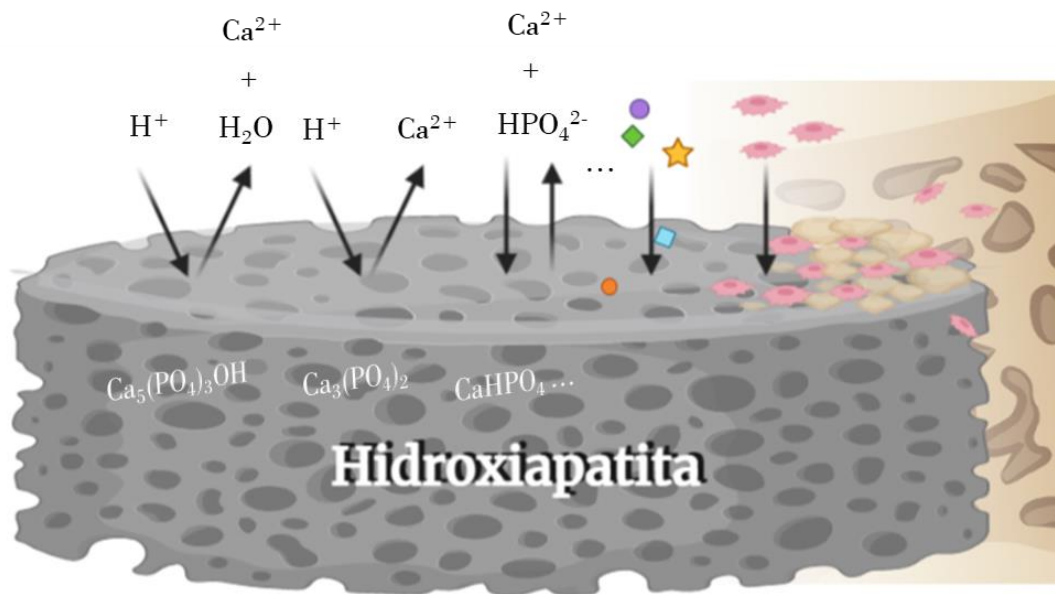


Figura 8. Representación grafica de los eventos ocurridos en la superficie de la hidroxiapatita tras ser implantada en el organismo (Bertazzo et al., 2010).

Sergio Bertazzo et al 2010, gracias a sus investigaciones lograron proponer un mecanismo que describe los fenómenos entre la superficie de la hidroxiapatita y el medio biológico, los eventos se describen a continuación (ver Figura 8); Una vez implantado el biocerámico, da inicio la solubilización en la superficie de la hidroxiapatita, proceso que continua hasta lograr el equilibrio entre la superficie y las soluciones fisiológicas. Posteriormente se lleva a cabo la adsorción de proteínas seguida de la adhesión y proliferación celular, dando lugar a la producción de hueso nuevo por acción de los osteoblastos (Bertazzo et al., 2010). Cabe resaltar que los acontecimientos no necesariamente siguen este patrón de forma sistemática, pero nos ayuda a comprender de manera general la interacción huésped-células-biomaterial.

II.2.2 Proceso Sol-Gel

Actualmente existen diversas rutas para sintetizar HAp y cada método le otorga al material diferentes morfológicas, cristalinidad y por ende diferentes propiedades. La técnica sol-gel es una de las más utilizadas ya que además de

ser versátil y relativamente sencilla, ofrece un gran control sobre el producto final al elegir los precursores adecuados.

El proceso sol-gel implica los fenómenos de hidrólisis y condensación de un precursor para formar un sol, es decir una suspensión de partículas coloidales, donde dichas partículas (en coexistencia con el líquido) tienden a conectarse entre sí formando una estructura de red conocida como gel, donde ambos componentes se encuentran dispersos. Posteriormente se lleva a cabo un proceso de envejecimiento y secado con la finalidad de eliminar la parte líquida y así obtener el xerogel. Finalmente se efectúa el tratamiento térmico del material obtenido (Crayston, 2003), en la Figura 9 se ilustra de manera general dicho proceso.

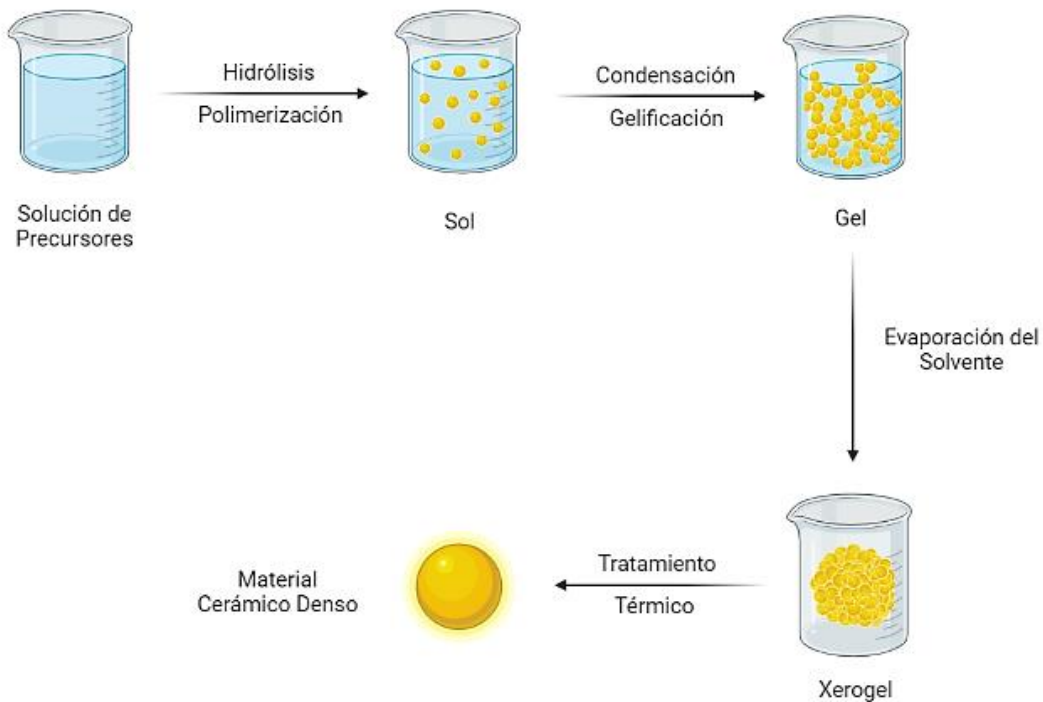


Figura 9. Esquema general de las etapas en el proceso sol-gel.

Las ventajas más destacables del proceso sol-gel, radican en la obtención de materiales homogéneos con alta pureza y formas diversas, haciendo uso de baja

temperatura. En cuanto a sus desventajas se encuentra principalmente el costo elevado de los materiales de partida (Crayston, 2003).

II.3 Evaluación de las Propiedades de Citotoxicidad

Hay una gran variedad de ensayos que ayudan a determinar la reacción que un material puede provocar al ser implantado en un organismo y por lo tanto la viabilidad de su utilización. Si un material no biocompatible entra en contacto con un organismo huésped puede ocasionar una alteración negativa en el entorno biológico produciendo una perturbación en el normal funcionamiento de las células circundantes (Ratner et al., 2004).

Las reacciones que un biomaterial puede ocasionar en las células son muy diversas y pueden depender de muchos factores, pero de manera general se clasifican en (Bruinink & Luginbuehl, 2012):

- 1. Efectos fuertes:** Muerte de las células por apoptosis o necrosis (citotoxicidad), o en su defecto mutación celular (genotoxicidad).
- 2. Efectos moderados:** Pequeños cambios en la funcionalidad de las células.
- 3. Ausencia de efectos medibles:** El biomaterial no provoca ningún cambio en las funcionalidades de la célula.

El término citotoxicidad hace referencia a la toxicidad que afecta únicamente a las células. Dicho parámetro puede medirse con ayuda de diversos ensayos *in vitro*, en base a los tipos de medición (cambio de color, fluorescencia, luminiscencia, etc) estos se pueden clasificar en (Aslantürk, 2018):

- 1. Exclusión de colorantes:** Azul de Tripano, Rojo Congo, etc.
- 2. Ensayos colorimétricos:** MTT, XTT, etc.
- 3. Ensayos fluorométricos:** alamarBlue, etc.

4. Ensayos luminométricos: ATP y ensayo de viabilidad en tiempo real.

II.3.1 Ensayo MTT

El ensayo MTT es una prueba colorimétrica que mide la actividad metabólica de las células, con el objetivo de cuantificar su viabilidad, proliferación y citotoxicidad tras el contacto con un biomaterial. Este método es superior al de exclusión de colorantes mencionado en el apartado II.3, ya que es más rápido, altamente reproducible y fácil de realizar (Aslantürk, 2018).

El protocolo consiste en solubilizar MTT (bromuro 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol) en una solución buffer de fosfato (PBS), añadirla al pozo correspondiente de cultivo celular e incubar por un periodo de tiempo establecido. Las células que permanecieron vivas tras el contacto con el biomaterial serán capaces de metabolizar el MTT reduciéndolo a cristales de formazán color violeta (Aslantürk, 2018), concretamente lo que sucede a nivel celular es que el MTT es atrapado por medio de la endocitosis y posteriormente reducido a formazán por acción de las enzimas mitocondriales para ser transportado a la superficie en forma de agujas de formazán insoluble.

Con ayuda de una solución solubilizante como el DMSO (dimetilsulfóxido) los cristales de formazán precipitan coloreando la solución a una tonalidad purpura, donde la intensidad de dicho color es un indicador de la cantidad de células que se encuentran vivas (Küete, Karaosmanoğlu, & Sivas, 2017). Y como se mencionó anteriormente es una prueba colorimétrica por lo que se cuantifica mediante absorbancia, el proceso se describe gráficamente en la Figura 10.

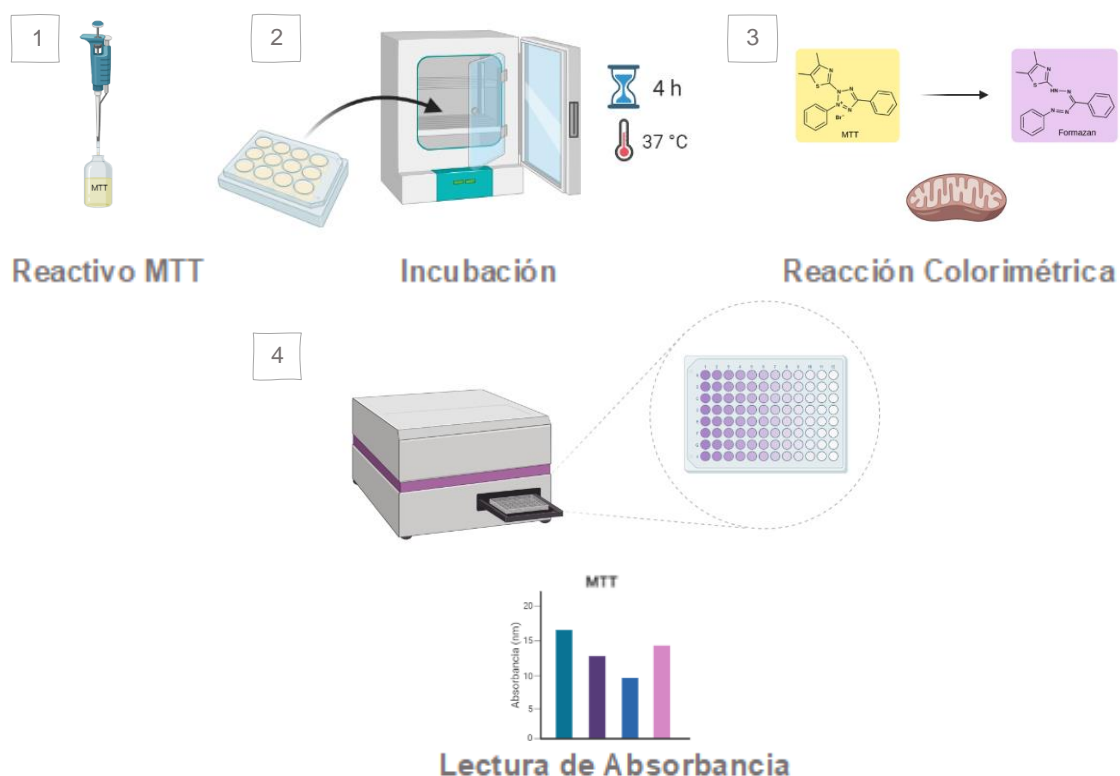


Figura 10. Representación grafica del proceso para realizar la prueba MTT.

II.3.2 Cultivo Celular

El cultivo celular supone la reproducción y conservación de las células de manera *in vitro*, preservando sus propiedades genéticas, fisiológicas y bioquímicas al proporcionarles un entorno con las condiciones ideales para su supervivencia (Uysal, Sevimli, Sevimli, Gunes, & Sariboyaci, 2018). Se conoce como cultivo primario a las células provenientes directamente del tejido original como se ilustra en la Figura 11, dichas células son capaces de proliferar ya sea en monocapa (adheridas a un sustrato) o en suspensión (dispersas en el medio de cultivo) (Uysal et al., 2018), bajo condiciones específicas de temperatura, humedad, nivel de CO₂, suministro de nutrientes (medio de cultivo) y pH (Ibidi, n.d.).

Las células pueden obtenerse de tejidos u órganos de humanos o animales como se ilustra en la Figura 11, y son aplicables a múltiples áreas de estudio como biotecnología, farmacología, ingeniería de tejidos, etc.

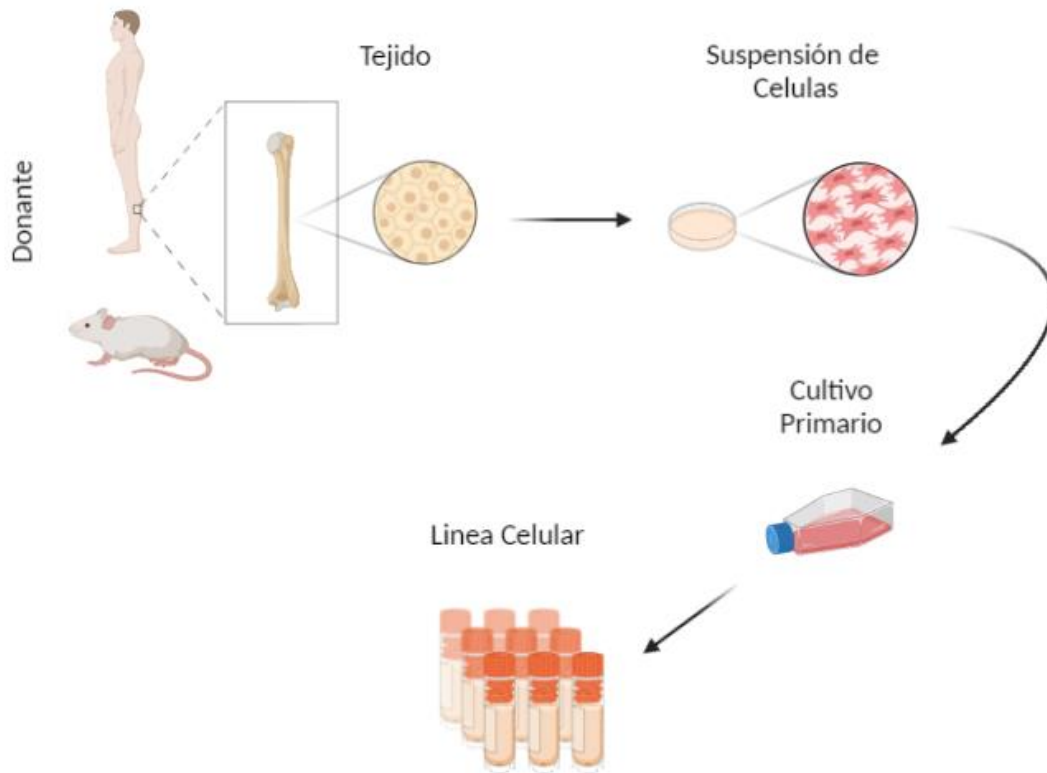


Figura 11. Esquema general del proceso de obtención de una línea celular.

Uno de los mayores desafíos que se presenta a la hora de manipular las células es evitar su contaminación, para ello es esencial apegarse a los protocolos del laboratorio y seguir las indicaciones otorgadas por los proveedores de la línea celular a utilizar.

II.3.3 Línea Celular de Osteoblastos Humanos hFOB 1.19

La línea celular hFOB 1.19, es una línea celular inmortalizada condicionalmente establecida por Harris y sus colaboradores en 1995, fue obtenida a partir de cultivos primarios de tejido fetal y transfectada con el virus SV40 el cual tiene un

efecto prolongador en el ciclo celular (Harris et al., 1995). Esta línea celular es un sistema de proliferación homogéneo que presenta mínimas anomalías cromosómicas (Marozin, Simon-Nobbe, Irausek, Chung, & Lepperdinger, 2021; Pinho, Pinto Joazeiro, & Santos, 2021), además es capaz de expresar marcadores fenotípicos tales como fosfatasa alcalina, osteocalcina, colágeno tipo I, etc; y de sintetizar matriz extracelular ósea *in vitro* (Gholami, 2017; Hapidin et al., 2015; Harris et al., 1995; Marozin et al., 2021; Pinho et al., 2021; Yanyang & Pu, 2023).

Los osteoblastos son células dependientes de anclaje, esto quiere decir que necesitan estar adheridas a un sustrato para sobrevivir y dividirse, normalmente este proceso suele tardar aproximadamente 24 horas. La morfología típica de las células hFOB 1.19 después de la siembra es redondeada, puesto que aún se encuentran en suspensión (ver Figura 12 a). Tras la incubación adoptan una forma plana y alargada, lo cual es un indicador de que las células ya están adheridas a la superficie (ver Figura 12 b) (Hapidin et al., 2015).

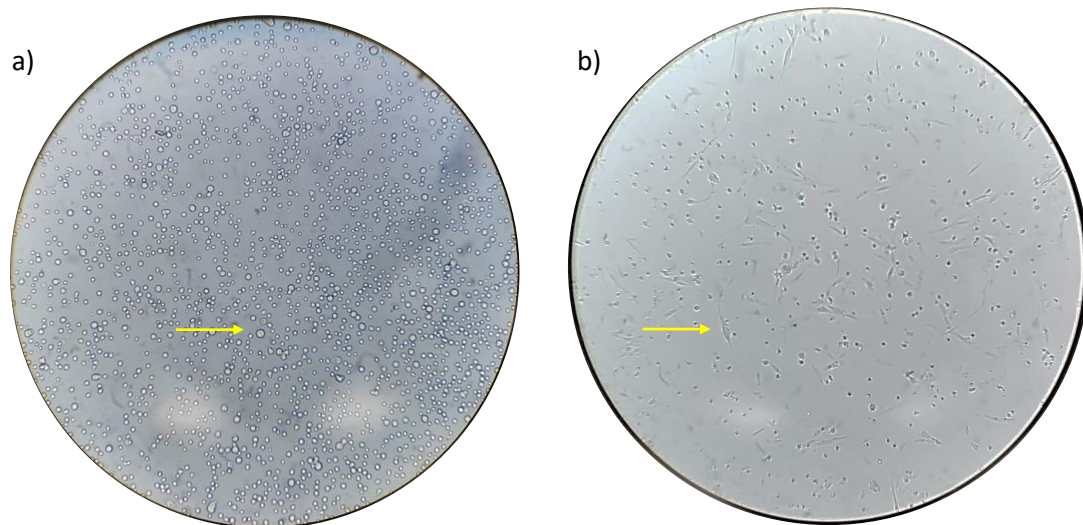


Figura 12. a) Morfología de las células hFOB 1.19 tras la siembra en medio de cultivo DMEM:F-12, b) morfología de las células hFOB 1.19 tras 24 horas de incubación.

La diferenciación es el proceso de desarrollo por el cual las células recién formadas se especializan y diferencian entre sí (es decir difieren en términos de forma y función) a medida que maduran. En el caso de los osteoblastos el proceso de diferenciación se caracteriza por una secuencia de tres fases o estados: 1) proliferación 2) síntesis de matriz extracelular y 3) mineralización (Kazimierczak et al., 2019; Przekora, 2019); donde cada uno de ellos implica la presencia o expresión de marcadores específicos como se observa en la Figura 13.

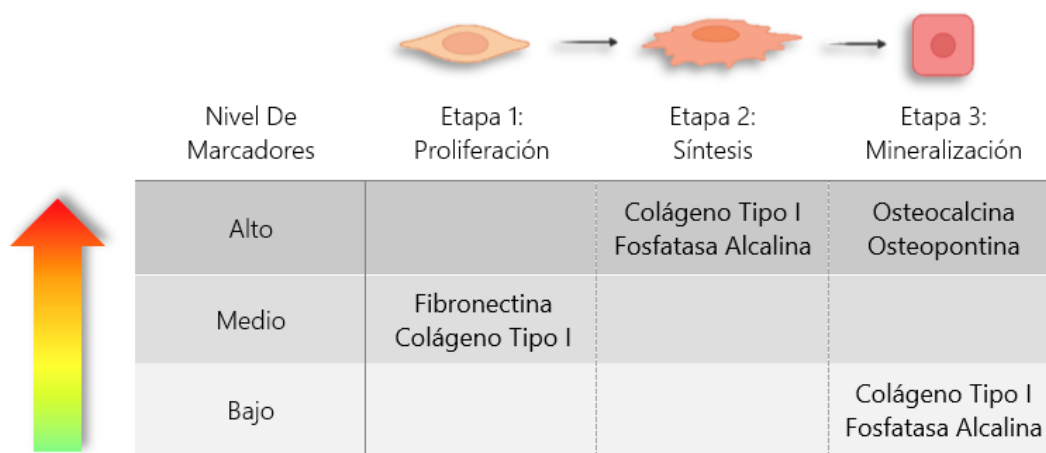


Figura 13. Nivel de los marcadores más característicos del proceso de formación ósea en cada etapa de la diferenciación osteogénica (Przekora, 2019).

La primera etapa se distingue por una constante proliferación de las células osteoprogenitoras las cuales a su vez sintetizan fibronectina y colágeno tipo I. Seguidamente las células osteoprogenitoras detienen su división y se diferencian en preosteoblastos, en este estado las células sintetizan la matriz extracelular y exhiben una alta producción de fosfatasa alcalina y colágeno tipo I. Finalmente en la tercera fase los preosteoblastos se convierten en osteoblastos maduros y esta diferenciación está relacionada con el proceso de mineralización de la matriz extracelular. Durante este estado los osteoblastos producen elevados niveles de osteocalcina y osteopontina, las cuales son muy importantes ya que son las proteínas responsables de la unión de los iones de calcio y por lo tanto de la

mineralización o calcificación de la matriz extracelular (Kazimierczak et al., 2019; Przekora, 2019).

El proceso de diferenciación osteogénica antes descrito es muy relevante en el estudio de la fisiopatología ósea, ya que gracias a dicho mecanismo se da la formación de hueso nuevo. Por lo tanto, se debe considerar a la hora de diseñar un biomaterial que estará en contacto con estos tejidos, es decir dentro de sus principales características debe estar su capacidad para favorecer la diferenciación y por supuesto esto significa contar con una superficie ideal para la proliferación celular.

Numerosos estudios (Harris et al., 1995; Marozin et al., 2021; Przekora, 2019; Yanyang & Pu, 2023), concluyen que la línea celular de osteoblastos humanos hFOB 1.19 es un modelo ideal para estudiar el comportamiento tanto de proliferación, diferenciación y aceptación biológica en biomateriales, no solo por su similitud con los osteoblastos primarios sino también por la capacidad de mantener su integridad tras realizarse varios pasajes.

II.3.3.1 Línea Celular Inmortalizada

Como se mencionó en la sección II.3.2, las células primarias son capaces de proliferar de manera *in vitro* hasta alcanzar la confluencia. Pero tras cierto número de duplicaciones estas células entran en un estado de senescencia replicativa donde ya no pueden dividirse (Applied Biological Materials Inc., 2012), por lo que el uso de estos cultivos primarios resulta ineficiente para ciertas investigaciones; de ahí la necesidad de utilizar líneas celulares inmortalizadas.

Las células inmortalizadas son células primarias que han sido modificadas de manera que se vuelven inmunes al proceso de senescencia y que, a diferencia de las células cancerosas, mantienen un genotipo y fenotipo normal (Applied Biological Materials Inc., 2012), entre los métodos más comunes para inducir la inmortalización se incluye la alteración de los telómeros y/o genes supresores de tumores (ver Figura 14).

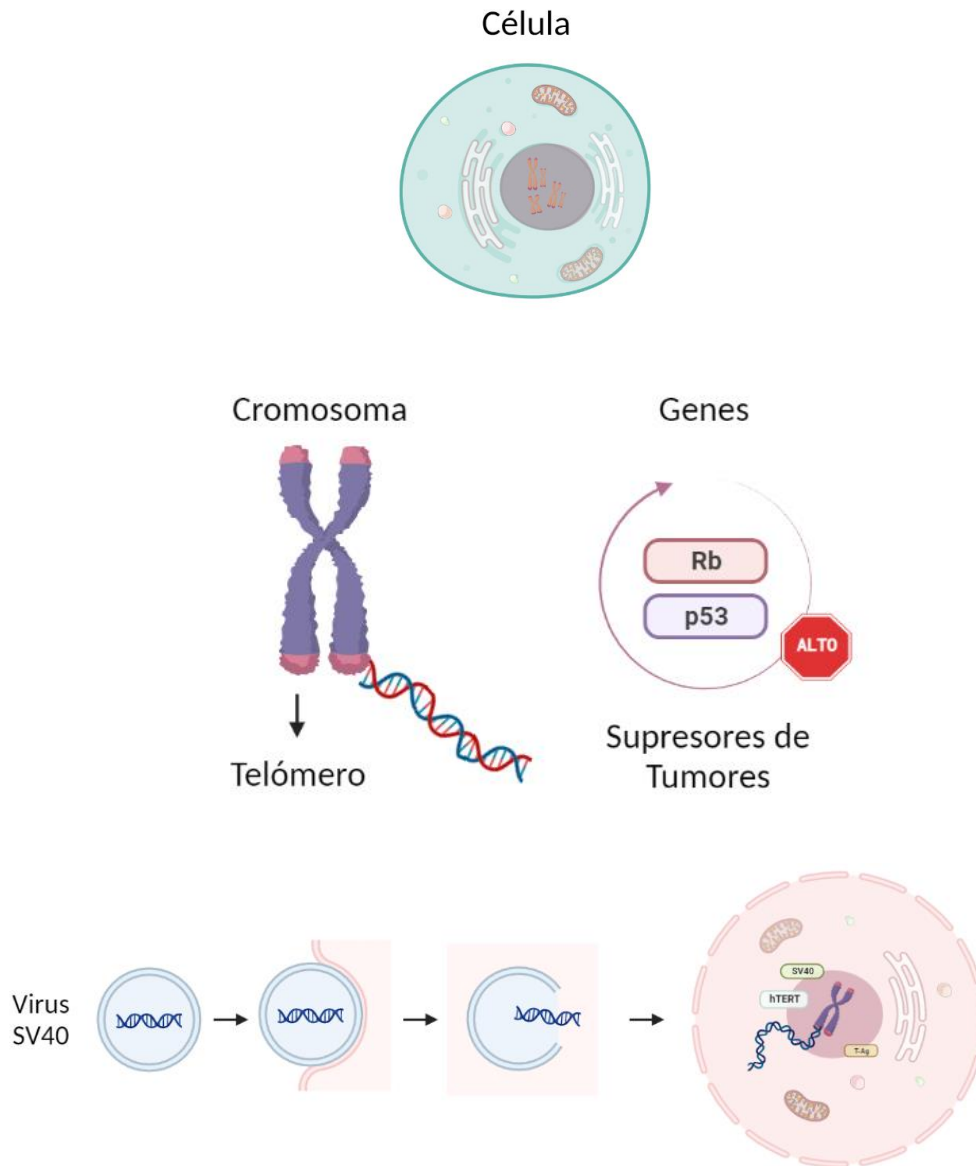


Figura 14. Diagrama general del proceso de transfección de una célula con el virus SV40 para inducir la immortalización mediante la alteración de los telómeros y/o genes supresores de tumores.

- **Alteración de los telómeros:** Los telómeros son secuencias de ADN localizados en los extremos de los cromosomas como se ilustra en la Figura 12. Cada vez que la célula se divide los telómeros se acortan, por lo que eventualmente el cromosoma alcanza una longitud crítica y la célula

ya no puede replicarse (National Human Genome Research Institute, 2023). Así pues, para immortalizar la línea celular se inserta cierto ADN con la capacidad de codificar la proteína hTERT induciendo la actividad de la telomerasa (es decir, regenerando los telómeros) y evitando la senescencia replicativa haciendo que la línea celular prolifere indefinidamente (Applied Biological Materials Inc., 2012).

- **Inactivación de los genes supresores de tumores:** Los genes supresores de tumores están involucrados en la regulación del ciclo celular y su función principal es detener la proliferación cuando se detecta ADN dañado (ver Figura 12). De modo que para inducir la immortalización se insertan genes virales que inactiven a Rb y p53 permitiendo que el ciclo celular continúe (Applied Biological Materials Inc., 2012).

El virus SV40 es una de las fuentes más comunes para el establecimiento de líneas celulares immortalizadas, este proviene de células de riñón de mono y contiene un gen (T-Ag) que expresa un mutante sensible a la temperatura lo que implica que las células transfectadas con SV40 como la línea celular hFOB 1.19, deban manipularse en cierto rango de temperatura para mantener dicha propiedad. De manera general su implementación resulta en una línea celular capaz de proliferar rápidamente y de mantenerse estable, a la vez que garantiza mínimas alteraciones en cuanto a morfología, potencial de diferenciación y demás propiedades biológicas, además se ha reportado que este mecanismo puede implicar tanto la inactivación de los genes supresores de tumores como la regeneración de los telómeros (Applied Biological Materials Inc., 2012; Yanyang & Pu, 2023).

II.4 Microscopio Electrónico de Barrido

El Microscopio Electrónico de Barrido o SEM (por sus siglas en inglés, Scanning Electron Microscopy) es un método eficaz para el análisis y caracterización de materiales tanto orgánicos como inorgánicos a escala nanométrica. Utiliza un haz

de electrones para formar una imagen morfológica del material al examinar su superficie (Abdullah & Mohammed, 2019)(Kannan, 2018). El equipo se encuentra principalmente conformado por un emisor de electrones, una columna y diferentes lentes electromagnéticas, así mismo también cuenta con varios detectores de electrones y un sistema de vacío (Kannan, 2018).

El emisor genera un haz de electrones que viaja a través de la columna y las diferentes lentes para escanear la muestra, de la interacción entre el haz y los átomos en la superficie del material se producen diferentes señales entre las que se encuentran los electrones secundarios, electrones retro-dispersados, rayos x, etc (Kannan, 2018).

Como se mencionó anteriormente para la formación de imágenes los detectores utilizan los electrones secundarios ubicados cerca de la superficie y los transforman en información sobre la morfología y topografía del material. A su vez se generan Rayos X característicos cuando el haz de electrones penetra e interacciona con el volumen bajo la superficie de la muestra, el detector EDS (Energy Dispersive Spectroscopy) separa y clasifica los rayos X correspondientes a los distintos elementos encontrados en el material, proporcionando así un análisis semicuantitativo (Abdullah & Mohammed, 2019; Kannan, 2018).

La Microscopia Electrónica de Barrido en conjunto con la Espectroscopia de Energía Dispersa (SEM-EDS) es una herramienta muy importante tanto en la ciencia como en la ingeniería, ya que además de generar imágenes tridimensionales de gran claridad, también proporciona datos sobre la distribución elemental de los materiales, dejando atrás las limitaciones de los microscopios ópticos.

III. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

III.1 Síntesis de Hidroxiapatita Estequiométrica

Para la obtención de 1.0 g de polvo de hidroxiapatita con una relación molar Ca/P de 1.67 se usaron 0.01639 moles de Nitrato de Calcio ($\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) y 0.00979 moles de Fosfato de Amonio ($\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$). La solución de dichos precursores se mantuvo en un baño ultrasónico hasta quedar totalmente mezclada y seguidamente se llevó a cabo agitación magnética constante por un lapso de 2 horas, tiempo durante el cual se controló y monitorizó el pH en un rango de 6 a 7.

A continuación, se llevó a cabo la etapa de secado durante 12 horas a 120°C para posteriormente someter al xerogel a un tratamiento térmico a 750°C durante 3 horas. Al finalizar esta etapa, se dejó enfriar el material dentro del horno apagado durante 12 horas. Por último, el material obtenido se desprende del vaso de precipitado, y se muele con la ayuda de un mortero de ágata obteniéndose aproximadamente 1.0 gramo de hidroxiapatita estequiométrica en polvo, en la Figura 15 se muestra el diagrama del procedimiento antes descrito.

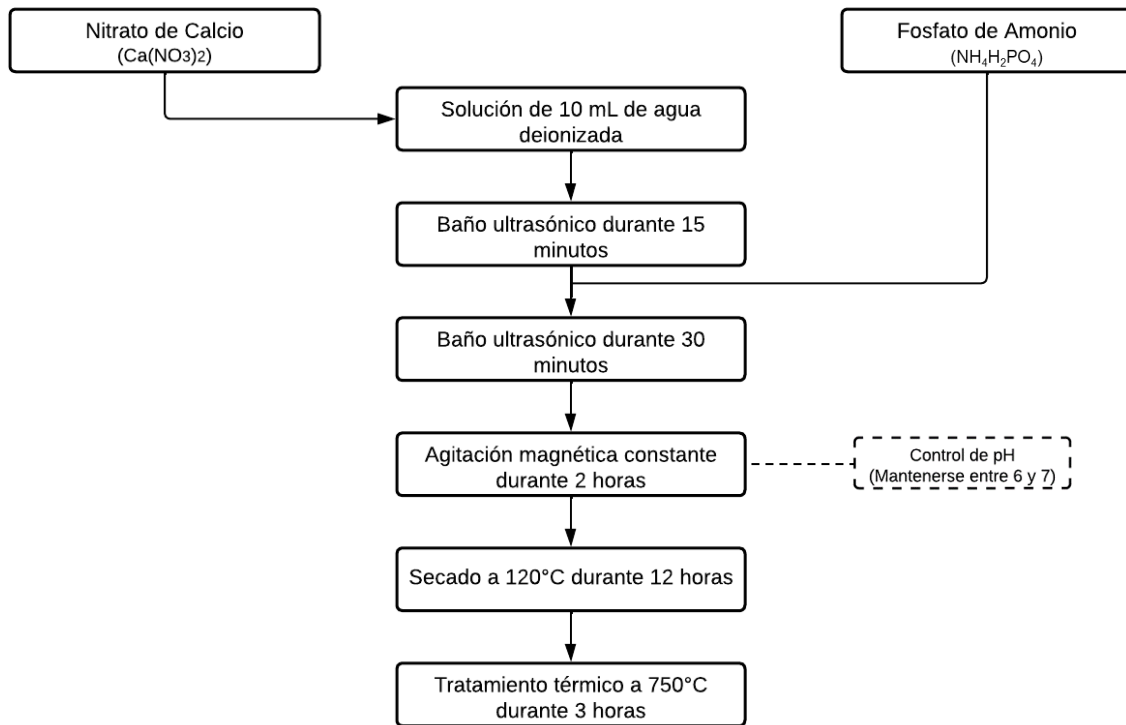


Figura 15. Diagrama de la metodología empleada para la síntesis de hidroxiapatita estequiométrica (M. Encinas-Romero et al., 2013).

III.2 Sinterización de Hidroxiapatita Estequiométrica

Para la preparación de un material denso en forma cilíndrica se vertieron 0.250 g de polvo de hidroxiapatita estequiométrica en un troquel Specac (10 mm DIE), el cual se colocó en una prensa Carver 3912 (Carver Inc., Wabash, IN), donde se aplicaron 220 MPa de presión durante 5 minutos.

Finalmente, para la sinterización, el material obtenido se colocó en un crisol de alta alúmina y fue llevado al horno a 1200°C por un periodo de 5 horas, aplicando una rampa de calentamiento de 2°C/min.

III.3 Estandarización del Manejo de las Células hFOB 1.19

La línea celular de osteoblastos fetales humanos hFOB 1.19 (CRL-11372) adquirida en American Type Culture Collection (ATCC), se cultivó en una mezcla 1:1 de Ham's F12 Medium Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM/F-12) el cual fue suplementado con un 10% de suero fetal bovino (SFB) más los siguientes antibióticos: estreptomina, anfotericina y gentamicina. La incubación de las células se dio en un ambiente humidificado al 90% con 5% CO₂ a 37°C por 72 horas hasta llegar a la confluencia. Asimismo, la manipulación de las células se realizó bajo estrictas condiciones de asepsia en una campana de flujo laminar LABCONCO PURIFIER CLASS II.

III.4 Ensayo MTT

Para determinar la citotoxicidad del material se utilizó el método MTT (bromuro 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol). Después de que las células cultivadas llegaron a 80% de confluencia aproximadamente se sembraron en una placa de 12 pozos, a una densidad de 90,000 células por pozo colocando el material en forma de pastilla en cada uno de ellos.

Tras el contacto entre las células y el material, el cual se llevó a cabo durante periodos de tiempo predeterminados (1,3,7,10, 14 y 21 días), se agregaron 200 µL de PBS más 20 µL de MTT a los pozos correspondientes (previamente vaciados) para incubar durante 4 horas, a 37°C, 5% CO₂ y 90% de humedad. Tras la incubación se retiró todo el líquido para añadir 200 µL de DMSO (dimetilsulfóxido) y resuspender los cristales de formazán. Finalmente se pasó todo el contenido a la placa de 96 pozos para leer absorbancia en UV Visible (570 nm).

Para el control se utilizó la misma densidad celular y el procedimiento antes mencionado, asimismo los cambios de medio se hicieron cada tres días tanto al grupo de control como a los pocillos con pastilla. El experimento se repitió un total de 3 veces.

III.5 Análisis Estadístico

El experimento de cultivo celular se realizó por triplicado durante puntos temporales específicos (1,3,7,10, 14 y 21 días) y los datos se expresaron como la media \pm desviación estándar (DE).

III.6 Técnicas de Caracterización

III.6.1 Microscopio Electrónico de Barrido

Para el análisis morfológico del material se utilizó un Microscopio Electrónico de Barrido Philips XL-30 ESEM, (Houston, TX, USA).

III.6.2 Microscopía Invertida

Se observó la morfología de la línea celular hFOB 1.19 en un Microscopio Invertido MicroscOptics IV900 Series, a 4x.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

IV.1 Morfología del Xerogel por Microscopia Electrónica de Barrido

En la Figura 16 se muestran las micrográficas elaboradas por SEM del xerogel obtenido a partir de nitrato de calcio y fosfato de amonio inmersos en agua, tratado térmicamente a 750°C, este exhibe una morfología bien definida donde cada partícula presenta una forma redondeada y de tamaños similares, dicho aspecto se atribuye a que el material se encuentra en una fase perfectamente cristalizada donde los granos son homogéneos entre sí (M. Encinas-Romero et al., 2013). Asimismo, en la Figura 16 donde se muestra un acercamiento a 40000x se aprecia con mayor detalle su morfología individual, a esta escala se puede ver con mayor claridad que la distribución de tamaños de cada grano es semejante, corroborando el hecho de que dicho material se encuentra en una fase cristalizada debido al tratamiento térmico aplicado.

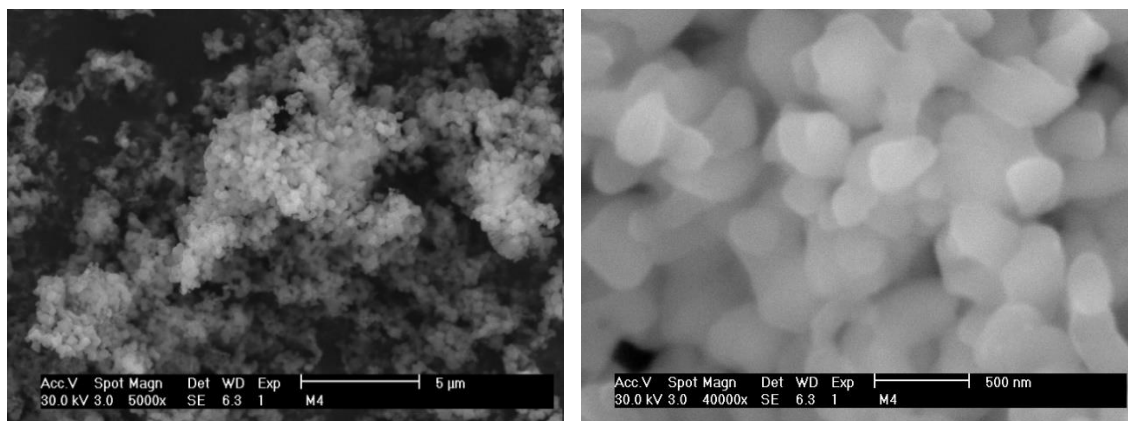


Figura 16. Micrografías elaboradas por SEM del xerogel obtenido a partir de nitrato de calcio y fosfato de amonio inmersos en agua, tratado térmicamente a 750°C.

IV.2 Morfología de las Células hFOB 1.19 por Microscopio Invertido

La morfología de las células hFOB 1.19 inmediatamente después de la siembra se observó redondeada ya que se encontraban suspendidas en el medio y aún no se habían adherido (Figura 17 a,b) (Hapidin et al., 2015).

Normalmente las células de cultivo que se encuentran sanas o en óptimas condiciones suelen tardar aproximadamente 24 horas en adherirse a la superficie y proliferar, por el contrario, en aquellas superficies que exhiben una mala compatibilidad las células permanecen redondeadas durante más tiempo en comparación con aquellas superficies más compatibles (Hapidin et al., 2015; Yanyang & Pu, 2023).

Tras un periodo de incubación de 24 horas las células mostraron una morfología alargada y plana, lo cual indica que ya se encontraban adheridas a la superficie de la placa (Hapidin et al., 2015). Como se observa en la Figura 17 d), las células en contacto con el material no mostraron dificultad para adherirse (al compararlo con el pozo control Figura 17 c), lo cual sugiere que los osteoblastos hFOB 1.19 no llevaron a cabo un proceso para compatibilizar la superficie y el tiempo de adherencia tanto en el control como en el pozo de tratamiento fue similar. Los osteoblastos hFOB 1.19 después de 72 horas de incubación mantuvieron la morfología característica de las células dependientes de anclaje es decir se observaron uniformemente alargadas y planas (Hapidin et al., 2015; Laboy-López, Méndez Fernández, Padilla-Zayas, & Nicolau, 2022), asimismo tras la adherencia, comenzaron a proliferar y expandieron su crecimiento a lo largo de los pozos de cultivo como se muestra en la Figura 17 e), f). Durante el tercer día aún se mantenía la existencia de espacios vacíos entre las células en los diversos pozos de cultivo indicando que aún no se había llegado a la confluencia.

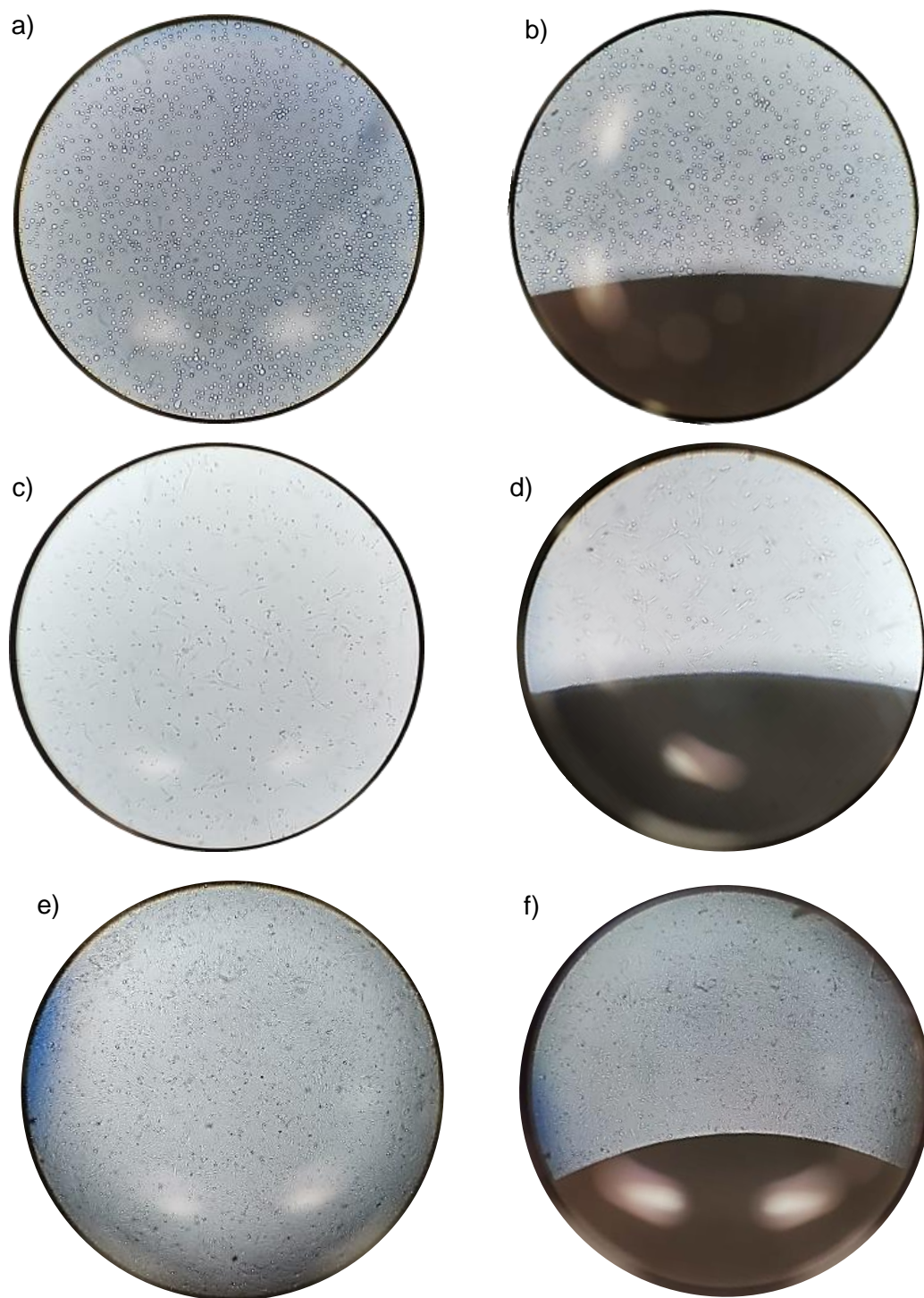


Figura 17. Osteoblastos hFOB 1.19 en, a) pozo control (sin material) y b) pozo con pastilla de hidroxapatita estequiométrica, después de ser sembrados (Día 0).

Día 1 c) pozo control y d) pozo con material. Día 3 e) pozo control y f) pozo con material.

Según lo observado a las 168 horas, se llegó a una confluencia aproximada del 90% tanto en el pozo control como en los diferentes pozos con hidroxiapatita estequiométrica como se muestra en la figura 18 a) y b) respectivamente (Nare, 2022; StackExchange, 2020). Esto en un lapso entre el día 3 y 7, en este último, la superficie de los pozos se encontraba prácticamente cubierta de células. Incluso se observó cierto número de células redondeadas, lo cual indica que algunas de ellas detuvieron su crecimiento y murieron.

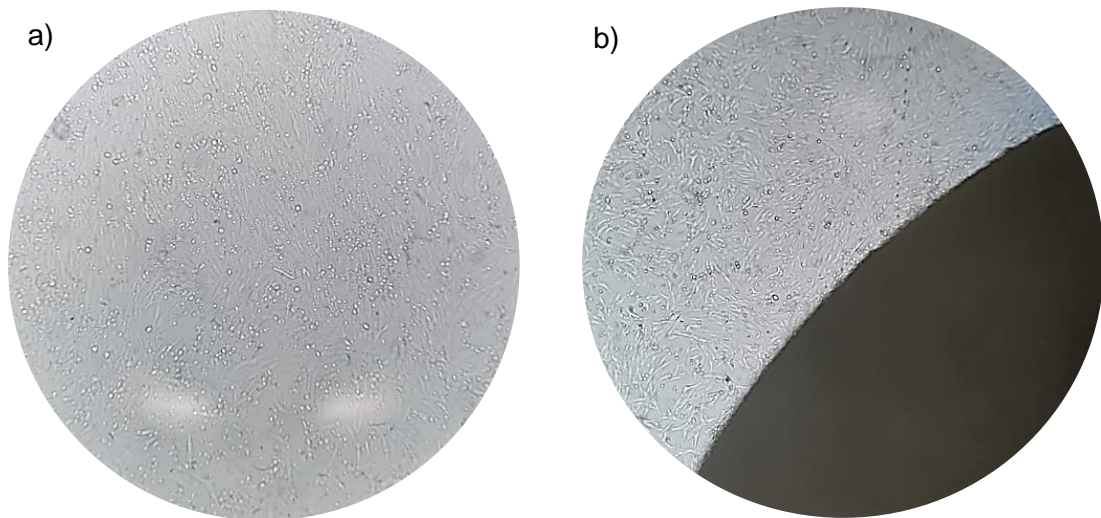


Figura 18. Osteoblastos hFOB 1.19 durante el séptimo día de cultivo en a) pozo control y en b) pozo con hidroxiapatita estequiométrica.

En el siguiente análisis, correspondiente al día 10 a partir del comienzo del experimento, se observó una monocapa saturada de osteoblastos hFOB 1.19 (ver Figura 19 a-c) indicando que los pozos se encontraban sobreconfluentes y las células se superponían llegando incluso a doblar la monocapa como se muestra en la Figura 19 d). En los días posteriores al décimo se observó una menor cantidad de células adheridas a la superficie, a la par que la monocapa incrementaba su tamaño y superposición.

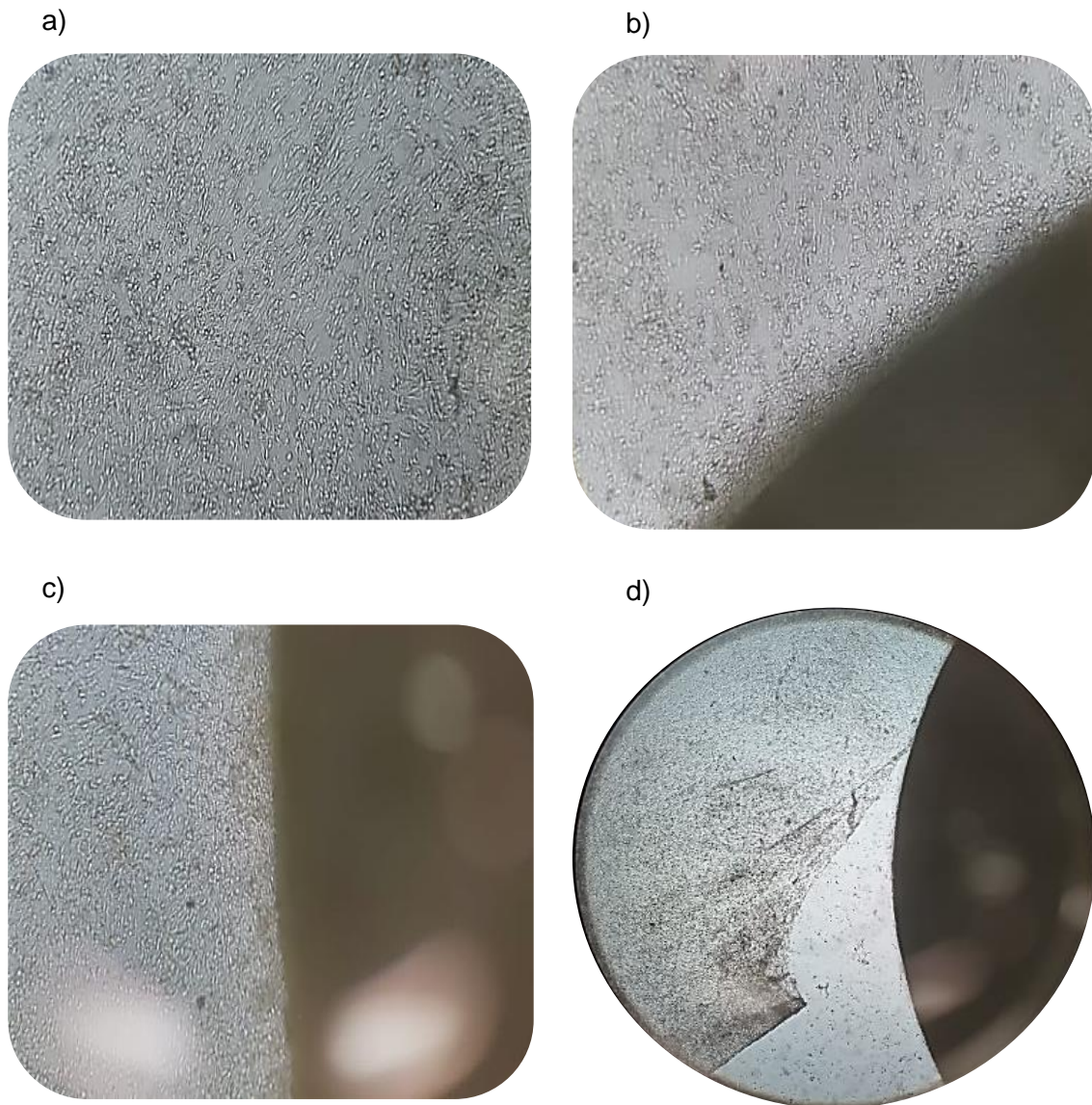


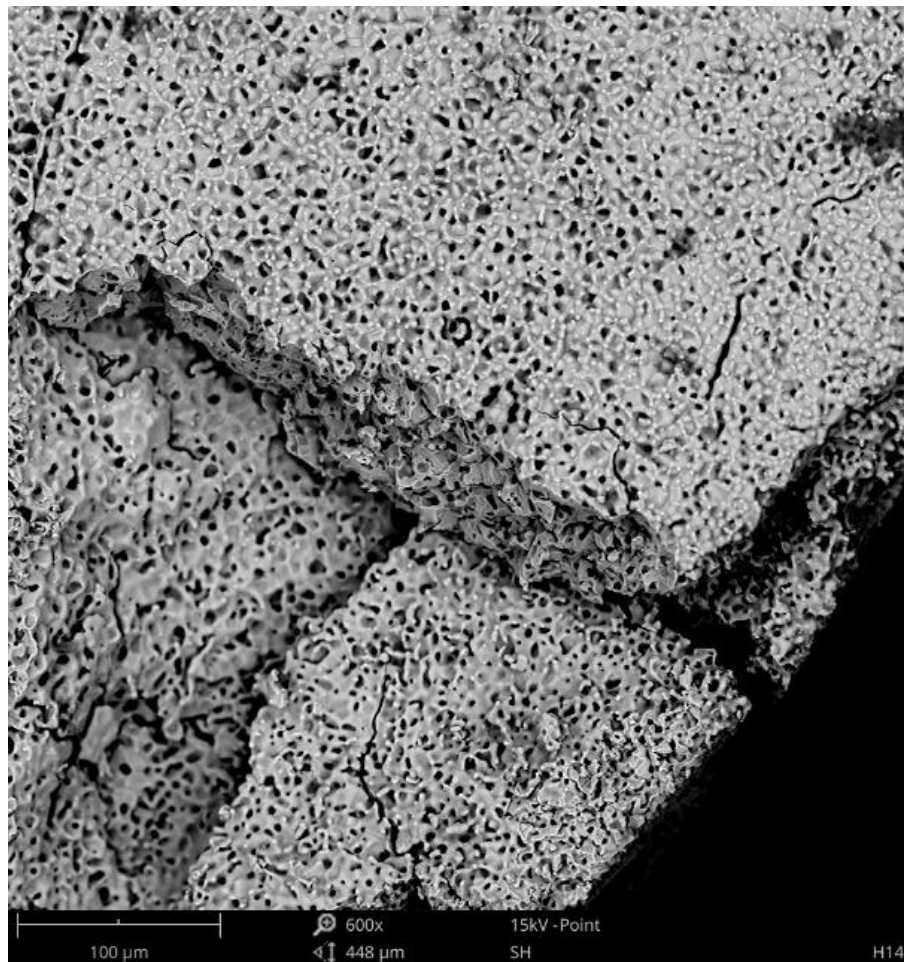
Figura 19. Osteoblastos hFOB 1.19 al décimo día de cultivo en *a)* pozo control *b)* pozo con pastilla de hidroxiapatita muestra 1, *c)* muestra 2, *d)* muestra 3 (monocapa desprendida).

De manera general la proliferación de la línea celular hFOB 1.19 evolucionó de manera satisfactoria y acorde a lo esperado, tanto en los pozos control como en los pozos donde las células estuvieron expuestas al material de hidroxiapatita estequiométrica.

IV.3 Morfología de la Superficie del Material de Hidroxiapatita Estequiométrica tras el Contacto con la Línea Celular hFOB 1.19

Las pastillas de hidroxiapatita estequiométrica sinterizadas a 1200°C y 220 MPa tras 14 días en contacto con las células muestran una superficie porosa la cual se extiende ampliamente por toda su longitud y de manera tridimensional como se observa en la Figura 20 a), dicha característica es una de las más importantes en el diseño de andamios óseos puesto que la porosidad favorece el transporte de proteínas y células, aumenta el área superficial y mejora la fijación del implante al promover la adhesión ósea (Canillas, Pena, De Aza, & Rodríguez, 2017; Laboy-López et al., 2022). Así mismo en la Figura 20 b) donde se muestra un acercamiento de otra sección de la misma pastilla a 1500x, se aprecia que cierta parte de los poros han sido cubiertos por un material neoformado.

a)



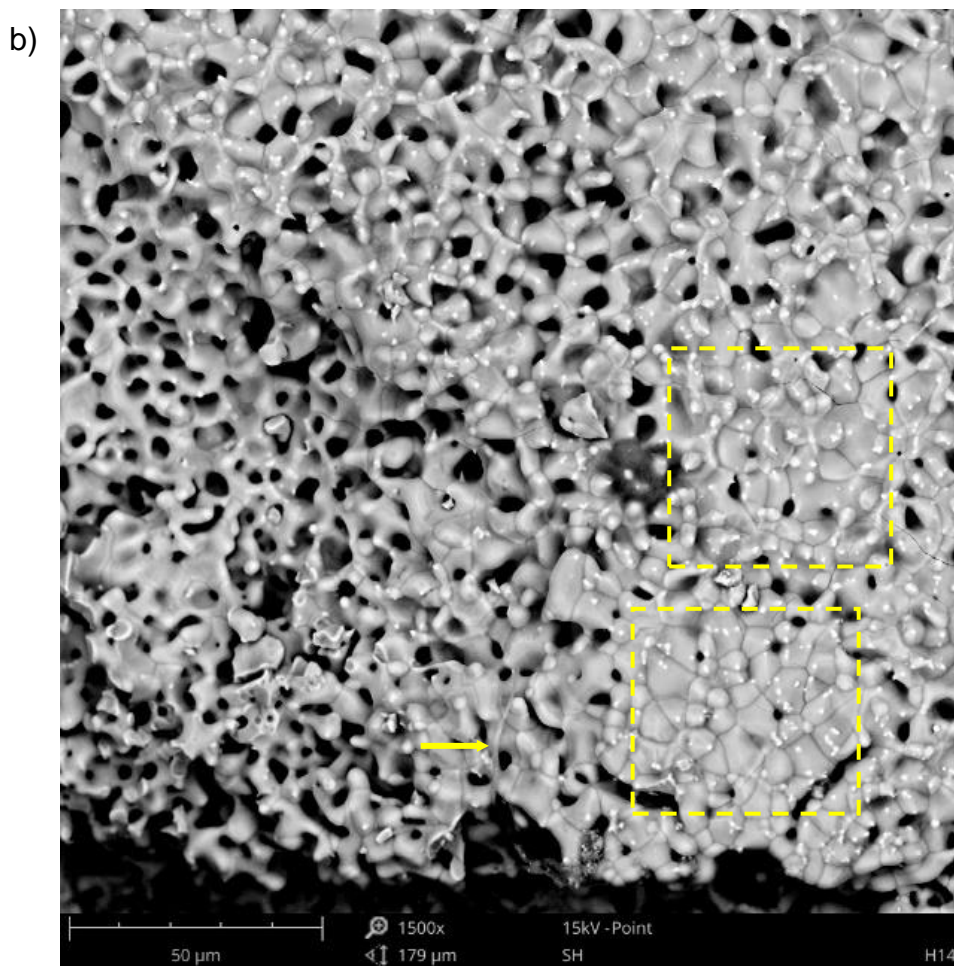
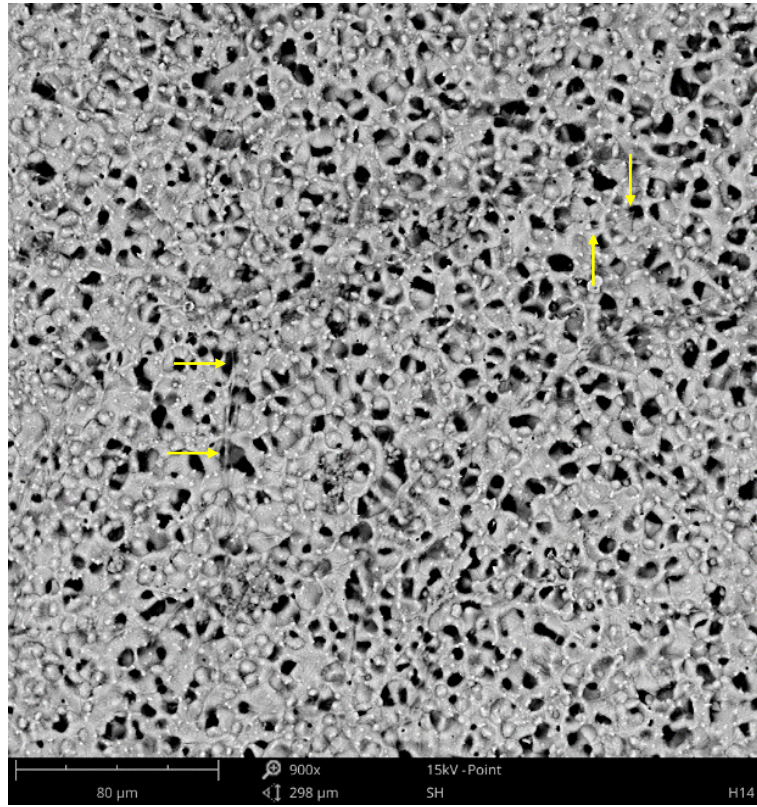


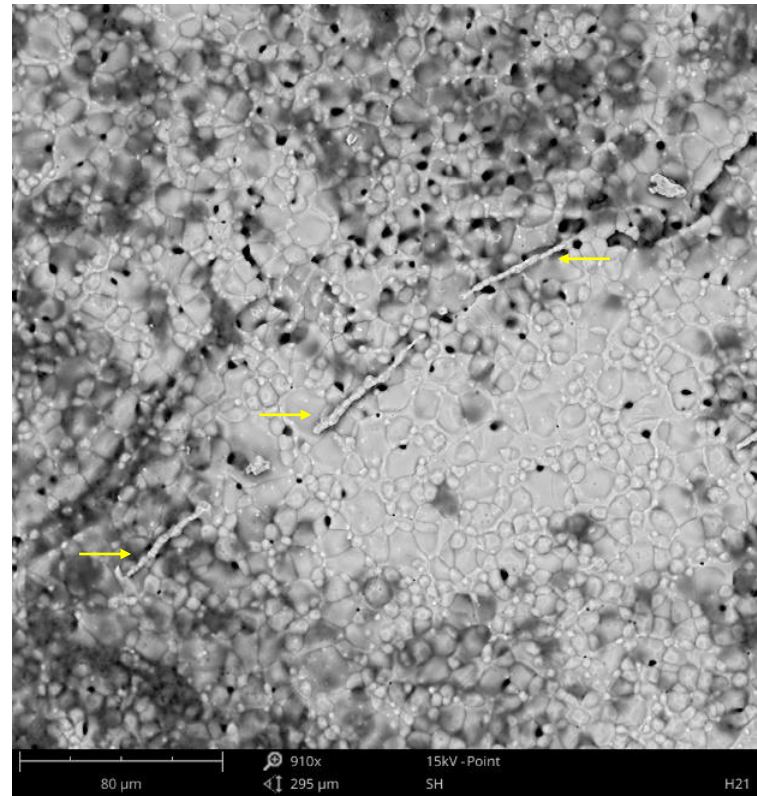
Figura 20. Micrografías del material de hidroxiapatita estequiométrica por SEM tras 14 días en contacto con las células hFOB 1.19 a) 600x y b) 1500x.

En la Figura 21 a) correspondiente a la superficie de la hidroxiapatita tras 14 días en contacto con las células se puede observar una estructura de poros interconectados que son atravesados por unas delgadas fibras de apariencia flexible (Meseguer-Olmo et al., 2006), asimismo en la Figura 21 b) correspondiente al día 21, se puede destacar la presencia de una fibra que pasa a través de varios poros los cuales se ven cubiertos por material neoformado casi en su totalidad; a diferencia de lo observado en la Figura 21 a), la apariencia de esta fibra es más rígida y bastante similar al material que cubre la superficie, el material neoformado se aprecia con mayor claridad en el Figura 21 c) a 5000x.

a)



b)



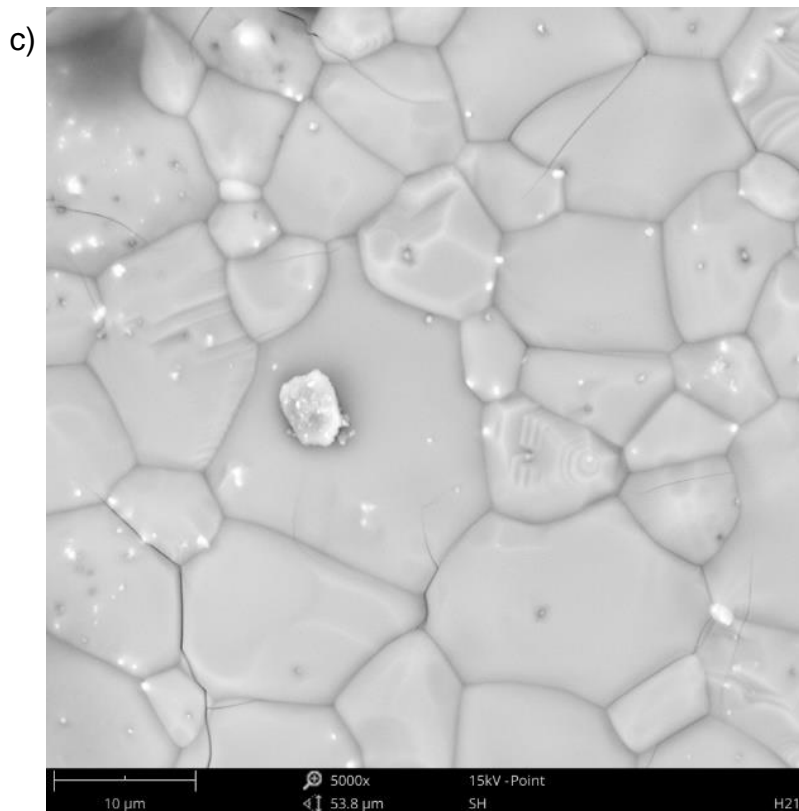


Figura 21. Micrografía del material de hidroxapatita estequiométrica por SEM después de a) 14 días (900x) y b,c) 21 días (910x y 5000x) en contacto con las células hFOB 1.19.

Lo anterior puede analizarse en base a las etapas de diferenciación de los osteoblastos, los cuales (como se indica en la sección II.3.3) expresan ciertos marcadores característicos del proceso de formación ósea. Durante las dos primeras etapas los osteoblastos secretan colágeno y diversas proteínas que actúan como cimientos para la formación del tejido óseo maduro es decir finalizan con la mineralización de la matriz extracelular (tercera etapa) (Kazimierczak et al., 2019; Przekora, 2019).

IV.4 Viabilidad Celular

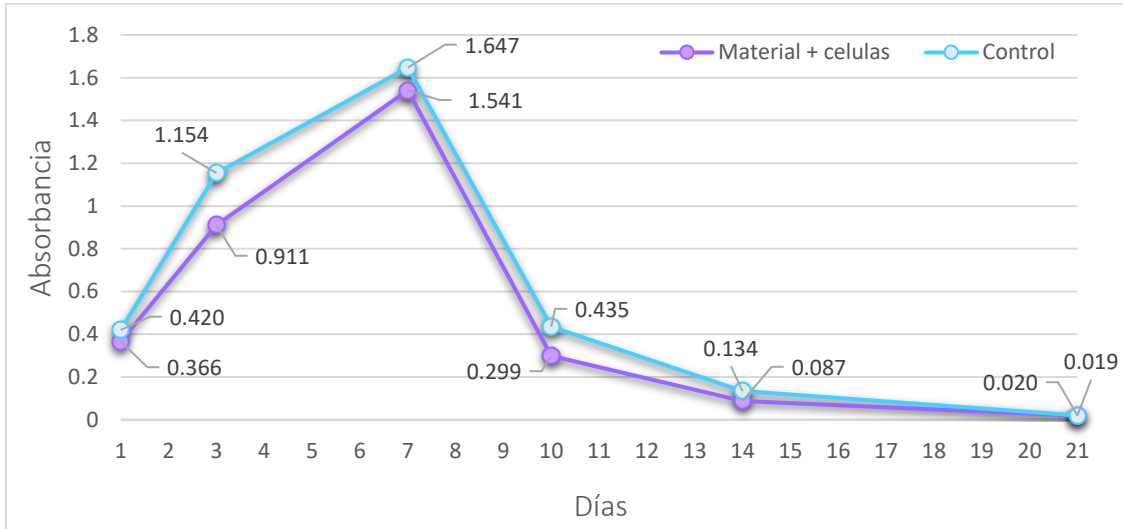
Como se observa en la curva de crecimiento de la Figura 22 a), la proliferación de las células que estuvieron en contacto con el material fue muy similar al control

durante todo el periodo de evaluación. Tal como lo indican los valores de absorbancia el crecimiento celular se dio durante los primeros siete días, siendo este último donde se reportaron los valores máximos tanto para el control como para los materiales con células; cabe resaltar que la cantidad de células vivas se relaciona con la biocompatibilidad del material y para efectos de esta investigación se hace una comparación con el grupo con crecimiento ideal por lo que dichos resultados también se relacionan con la viabilidad del material (Bodhak, Bose, Kinsel, & Bandyopadhyay, 2012).

Al estudiar el crecimiento celular con respecto al tiempo es importante tomar en cuenta la fase de proliferación en la que se encuentran las células. Concretamente existen cuatro fases: 1) latente o retardo 2) logarítmica o exponencial 3) estacionaria o meseta y 4) declive. En este caso, la primera etapa ocurrió tras la siembra es decir las primeras 24 horas donde las células se adaptaron al nuevo ambiente. Posteriormente los cultivos entraron en un periodo de crecimiento exponencial (etapa que se mantiene hasta llegar a la confluencia) en este caso los osteoblastos hFOB 1.19 transitaron esta fase durante los primeros 7 días (ver Figura 22 a); es importante destacar que la población celular es la más viable en esta etapa por lo que se recomienda realizar las evaluaciones durante este tiempo (The European Collection of Authenticated Cell Cultures ECACC., n.d.). A partir del séptimo día los valores de absorbancia comenzaron a disminuir considerablemente tanto en los pozos donde únicamente había células con medio de cultivo (pozo control donde hay actividad metabólica plena), como en los pozos con tratamiento, es decir el triplicado de muestras donde los osteoblastos crecieron en presencia del biomaterial, atravesando las últimas dos fases ya que estas se caracterizan por un descenso en la proliferación para finalmente detener su división (ATCC®, 2014; INVITROGEN, n.d.; The European Collection of Authenticated Cell Cultures ECACC., n.d.). Lo anterior es una consecuencia directa de la etapa logarítmica ya que una vez todos los cultivos eran confluentes las células comenzaron a morir, sin embargo, se mantuvo vivo

cierto porcentaje celular hasta día 21 ya que el medio de cultivo se sustituía periódicamente (cada tres días) hasta que finalizó el experimento.

a)



b)

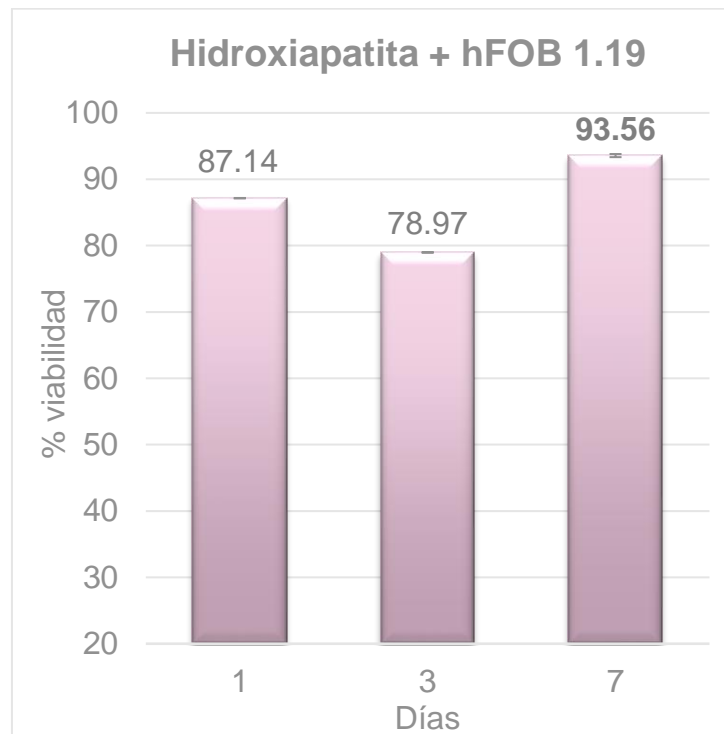


Figura 22. a) Curva de crecimiento de los osteoblastos hFOB 1.19 en el material y el control durante 21 días. b) análisis estadístico del porcentaje de viabilidad del material con respecto al tiempo (días 1,3 y 7).

Anteriormente, en la sección II.1.2, se señaló la importancia de las propiedades con las que un biomaterial debía contar para influir positivamente en el comportamiento celular (Samavedi et al., 2013; Sprio et al., 2021; Xiao et al., 2020), y a su vez Przekora señala que una buena adhesión celular favorece una rápida proliferación (Przekora, 2019). Por lo que en base a los datos que se presentan en la curva de crecimiento y el análisis de las fases, la proliferación de las células se dio de manera efectiva, tomando también en cuenta la densidad celular de siembra (90,000 celular por pozo) y el tiempo promedio en que se llegó a la confluencia, puesto que en una placa de 12 pozos el número de células en confluencia es de 500,000 (Fisher Scientific, n.d.).

En un estudio realizado por Hapidin y sus colaboradores analizaron la proliferación de las células hFOB 1.19 con diversos tratamientos durante 14 días utilizando una densidad de 5000 células por pozo en una placa de 96, las condiciones de incubación fueron las mismas que en este experimento (ambiente humidificado a 37°C, 5% CO₂); Reportando que el número de células del control durante todo el periodo de evaluación fue en aumento (Hapidin et al., 2015), indicando que el crecimiento de las células (fase de logarítmica) se llevó a cabo durante los 14 días, es decir el doble de tiempo que en el presente proyecto ya que tanto para las células con medio de cultivo como para las células en contacto con los materiales de HAp el crecimiento exponencial se dio durante los primeros 7 días.

Por otra parte, en la investigación de Meseguer-Olmo y sus colaboradores, titulada “Cinética de crecimiento *in vitro* de osteoblastos humanos sobre cerámica porosa de hidroxiapatita” donde utilizaron osteoblastos de un cultivo primario muestran una curva de crecimiento de absorbancia con respecto al tiempo. En ella se compara la evolución de las células control y de las células en contacto con sus muestras de hidroxiapatita, señalando que las células del cultivo control tuvieron un crecimiento exponencial entre las 24 y 48 horas, alcanzando rápidamente la fase estacionaria al cuarto día (Meseguer-Olmo et al., 2006). En

dicho artículo, la etapa de crecimiento logarítmica que tuvieron los osteoblastos primarios fue transitada en un corto periodo al compararla con el crecimiento que las células hFOB 1.19 presentaron en el presente trabajo de tesis (7 días).

Ahora bien, en base a los valores de absorbancia obtenidos en el ensayo MTT también se realizó un análisis estadístico para determinar el porcentaje de viabilidad celular con respecto al tiempo en el que se llegó a la confluencia (días 1,3,7), tomando como referencia las pautas para los ensayos de viabilidad donde se utilizó la ecuación 1 (Kamiloglu, Sari, Ozdal, & Capanoglu, 2020).

$$\% Viabilidad = \frac{Abs\ células + material}{Abs\ control} \times 100 \quad Ec. (1)$$

En la Figura 22 b) se muestra el porcentaje de viabilidad de las células tratadas (el cálculo se hizo con respecto a la viabilidad de las células control es decir el 100%), como se puede ver el primer día tuvo un valor de 84.14% de viabilidad, el día 3 reportó una viabilidad del 78.97% y finalmente en el séptimo día donde las células llegaron al punto máximo de crecimiento se presentó una viabilidad del 93.56%. Gürlek y sus colaboradores afirman que al evaluar un tratamiento, en este caso un biomaterial, no se considera citotóxico si la viabilidad celular es superior al 70% (Gürlek et al., 2020), lo anterior indica que en el presente trabajo la línea celular de osteoblastos fetales humanos hFOB 1.19 no presentó citotoxicidad significativa en la evaluación *in vitro*, y que además proliferó de manera satisfactoria en presencia de las pastillas de HAp presentando una alta viabilidad. Lo anterior sugiere que el material de hidroxiapatita estequiométrica representa una opción factible para ser estudiado en un modelo *in vivo*.

V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

V.1 Conclusiones

Este proyecto se diseñó con el objetivo de evaluar la viabilidad de los biomateriales de hidroxiapatita estequiométrica, demostrándose mediante análisis morfológico y de viabilidad que dicho material no presenta citotoxicidad al ponerse en contacto con células de osteoblastos humanos de manera *in vitro*.

Asimismo, las células hFOB 1.19 fueron capaces de proliferar y sobrevivir sobre el biomaterial durante el tiempo en el que se llevó a cabo la evaluación, e incluso presentaron indicios de diferenciación a través de la síntesis y mineralización de una capa neoformada sobre su superficie. De igual manera se concluye que el modelo celular utilizado representó una elección acertada puesto que a diferencia de los modelos animales o derivados de osteosarcoma, esta línea difiere mínimamente de los osteoblastos humanos primarios normales.

A su vez, el presente estudio sienta las bases para que los biomateriales de hidroxiapatita estequiométrica puedan ser evaluados de manera *in vivo*, pero a continuación se proponen una serie de recomendaciones que se pueden abordar antes de pasar a dicha etapa.

V.2 Recomendaciones

Para comprobar la diferenciación de las células hFOB 1.19 sobre el material de hidroxiapatita estequiométrica se propone:

- Realizar las pruebas ELISA para detectar el nivel de los marcadores de remodelación ósea tales como fosfatasa alcalina, osteocalcina, osteopontina, fibronectina y colágeno tipo I durante todos los días en los que se lleva a cabo la evaluación (1,3,7,10,14 y 21).
- Realizar técnicas de caracterización para comprobar la composición del material neoformado que recubre el material, el cual se presume sea la

matriz extracelular mineralizada durante la última fase de diferenciación de las células.

- Realizar un análisis morfológico del material a través de SEM durante todos los días en los que se lleva a cabo la evaluación (1,3,7,10,14 y 21) para detectar en que punto comienza la aparición de las fibras y del material neoformado que recubre los poros.
- Realizar un análisis por Microscopia Laser Confocal para comprobar que los materiales neoformados son producidos por los osteoblastos hFOB 1.19.

Para estudiar el comportamiento del material y su interacción con el organismo de una manera más profunda a nivel *in vitro* se propone:

- La utilización de biosensores OoC (Organ on a Chip) donde se represente la interacción del material y un conjunto de órganos interconectados, simulando en conjunto la cascada de reacciones que ocurrirían en el organismo de un ser humano tras la colocación del implante.

Para mejorar la composición del implante se propone:

- Hacer un biomaterial compuesto de hidroxiapatita estequiométrica con wollastonita y cerio con la finalidad de compensar las propiedades mecánicas de la hidroxiapatita y optimizar la bioactividad, así como darle propiedades antimicrobianas al implante.

VI. BIBLIOGRAFÍA

- Abdullah, A., & Mohammed, A. (2019). Scanning Electron Microscopy (SEM): A Review. *Proceedings of 2018 International Conference on Hydraulics and Pneumatics - HERVEX*.
- Applied Biological Materials Inc. (2012). General Guidelines for Cell Immortalization. *Abm*, 1–10.
- Aslantürk, Ö. S. (2018). In Vitro Cytotoxicity and Cell Viability Assays: Principles, Advantages, and Disadvantages. *Genotoxicity - A Predictable Risk to Our Actual World*, 1–18. <https://doi.org/10.5772/intechopen.71923>
- ATCC®. (2014). *ATCC® ANIMAL CELL CULTURE GUIDE tips and techniques for continuous cell lines* (p. 37). p. 37.
- Bajpai, P. K., Patka, P., Bonel, G., Starling, L. B., Rosenstiel, T., Muschler, G., ... Timmermans, J. (1988). Significance of the Porosity and Physical Chemistry of Calcium Phosphate Ceramics: Orthopedic Uses. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 523(1), 278–282. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1988.tb38521.x>
- Bertazzo, S., Zambuzzi, W. F., Campos, D. D. P., Ogeda, T. L., Ferreira, C. V., & Bertran, C. A. (2010). Hydroxyapatite surface solubility and effect on cell adhesion. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 78(2), 177–184. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2010.02.027>
- Bodhak, S., Bose, S., Kinsel, W., & Bandyopadhyay, A. (2012). Investigation of In Vitro Bone Cell Adhesion and Proliferation on Ti Using Direct Current Stimulation. *Materials Science & Engineering. C, Materials for Biological Applications*, 32, 2163–2168. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2012.05.032>
- Bruinink, A., & Luginbuehl, R. (2012). Evaluation of biocompatibility using in vitro methods: interpretation and limitations. *Advances in Biochemical*

Engineering/Biotechnology, 126(October 2011), 117–152.
https://doi.org/10.1007/10_2011_111

Canillas, M., Pena, P., De Aza, A. H., & Rodríguez, M. A. (2017). Calcium phosphates for biomedical applications. *Boletín de La Sociedad Española de Cerámica y Vidrio*, 56(3), 91–112.
<https://doi.org/10.1016/j.bsecv.2017.05.001>

Chao, S. C., Wang, M. J., Pai, N. S., & Yen, S. K. (2015). Preparation and characterization of gelatin-hydroxyapatite composite microspheres for hard tissue repair. *Materials Science and Engineering C*, 57, 113–122.
<https://doi.org/10.1016/j.msec.2015.07.047>

ChemTube 3D. (n.d.). Hydroxyapatite $\text{Ca}_5(\text{OH})(\text{PO}_4)_3$. Retrieved July 11, 2022, from <https://www.chemtube3d.com/sshydroxyapatite/>

Crayston, J. A. (2003). 1.40 - Sol–Gel (J. A. McCleverty & T. J. B. T.-C. C. C. I. I. Meyer, Eds.). <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B0-08-043748-6/01113-0>

El-Ghannam, A., & Ducheyne, P. (2017). Bioactive ceramics. In *Comprehensive Biomaterials II* (Vol. 1). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803581-8.10169-9>

Encinas-Romero, M. A., Peralta-Haley, J., Valenzuela-García, J. L., & Castellón-Barraza, F. F. (2013). Synthesis and Structural Characterization of Hydroxyapatite-Wollastonite Biocomposites, Produced by an Alternative Sol-Gel Route. *Journal of Biomaterials and Nanobiotechnology*, 04(04), 327–333.
<https://doi.org/10.4236/jbnb.2013.44041>

Encinas-Romero, M., Peralta-Haley, J., Valenzuela, J., & Castellón-Barraza, F. (2013). Synthesis and Structural Characterization of Hydroxyapatite-Wollastonite Biocomposites, Produced by an Alternative Sol-Gel Route. *Journal of Biomaterials and Nanobiotechnology*, 04, 327–333.
<https://doi.org/10.4236/jbnb.2013.44041>

- Fisher Scientific. (n.d.). Cell Culture Dishes Frequently Asked Questions. Retrieved from Thermo Fisher Scientific website: https://www.fishersci.es/es/en/scientific-products/featured-categories/cell-culture-dishes/frequently-asked-questions.html?change_lang=true
- Ghasemi-Mobarakeh, L., Kolahreez, D., Ramakrishna, S., & Williams, D. (2019). Key terminology in biomaterials and biocompatibility. *Current Opinion in Biomedical Engineering*, 10, 45–50. <https://doi.org/10.1016/j.cobme.2019.02.004>
- Gholami, B. (2017). *Functional analyses of candidate genes for osteoporosis: RUNX2 and LRP5 interplay during differentiation of the hFOB human osteoblast cell line*. University of Barcelona.
- Gürlek, C., Yarkent, Ç., Köse, A., Tuğcu, B., Gebeloğlu, I. K., Öncel, S., & Elibol, M. (2020). Screening of antioxidant and cytotoxic activities of several microalgal extracts with pharmaceutical potential. *Health and Technology*, 10(1), 111–117. <https://doi.org/10.1007/s12553-019-00388-3>
- Hapidin, H., Rozelan, D., Abdullah, H., Hanaffi, W. N. W., & Soelaiman, I. N. (2015). Quercus infectoria gall extract enhanced the proliferation and activity of human fetal osteoblast cell line (hFOB 1.19). *Malaysian Journal of Medical Sciences*, 22(1), 12–22.
- Harris, S. A., Enger, R. J., Riggs, L. B., & Spelsberg, T. C. (1995). Development and characterization of a conditionally immortalized human fetal osteoblastic cell line. *Journal of Bone and Mineral Research*, 10(2), 178–186. <https://doi.org/10.1002/jbmr.5650100203>
- Ibidi. (n.d.). Cell Culture: Parameters for Healthy Cells. Retrieved November 18, 2022, from <https://ibidi.com/content/435-parameters-for-healthy-cells>
- INVITROGEN. (n.d.). *CELL CULTURE BASICS*.
- Kamiloglu, S., Sari, G., Ozdal, T., & Capanoglu, E. (2020). Guidelines for cell

viability assays. *Food Frontiers*, 1(3), 332–349.
<https://doi.org/10.1002/fft2.44>

Kannan, M. (2018). Scanning Electron Microscopy: Principle, Components and Applications. In *A Textbook on Fundamentals and Applications of Nanotechnology* (pp. 81–92). Daya Publishing House® A Division of Astral International Pvt. Ltd. New Delhi.

Kazimierczak, P., Vivcharenko, V., Truszkiewicz, W., Wójcik, M., & Przekora, A. (2019). Osteoblasts response to novel chitosan/agarose/hydroxyapatite bone scaffold – studies on MC3T3-E1 and hFOB 1.19 cellular models. *Engineering of Biomaterials*, 151, 24–29. Retrieved from <http://www.biomaterials.pl/Osteoblasts-response-to-novel-chitosan-agarose-hydroxyapatite-bone-scaffold-studies,136209,0,2.html>

Kuete, V., Karaosmanoğlu, O., & Sivas, H. (2017). Anticancer Activities of African Medicinal Spices and Vegetables. *Medicinal Spices and Vegetables from Africa: Therapeutic Potential Against Metabolic, Inflammatory, Infectious and Systemic Diseases*, 271–297. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809286-6.00010-8>

Laboy-López, S., Méndez Fernández, P. O., Padilla-Zayas, J. G., & Nicolau, E. (2022). Bioactive Cellulose Acetate Electrospun Mats as Scaffolds for Bone Tissue Regeneration. *International Journal of Biomaterials*, 2022. <https://doi.org/10.1155/2022/3255039>

Lin, K., & Chang, J. (2015). Structure and properties of hydroxyapatite for biomedical applications. In *Hydroxyapatite (Hap) for Biomedical Applications* (Vol. 4214). <https://doi.org/10.1016/b978-1-78242-033-0.00001-8>

Marozin, S., Simon-Nobbe, B., Irausek, S., Chung, L. W. K., & Lepperdinger, G. (2021). Kinship of conditionally immortalized cells derived from fetal bone to human bone-derived mesenchymal stroma cells. *Scientific Reports*, 11(1), 1–13. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-90161-2>

- Matsushima, N., & Hikichi, K. (1989). Age changes in the crystallinity of bone mineral and in the disorder of its crystal. *BBA - General Subjects*, 992(2), 155–159. [https://doi.org/10.1016/0304-4165\(89\)90004-4](https://doi.org/10.1016/0304-4165(89)90004-4)
- Meseguer-Olmo, L., Muñoz-Ruiz, J., Bernabeu-Esclapez, A., Clavel-Sainz Nolla, M., Arcos-Pérez, D., Vallet-Regi, M., ... Meseguer-Ortiz De Villajos, C. L. (2006). Cinética de crecimiento in vitro de osteoblastos humanos sobre cerámica porosa de hidroxiapatita. *Revista de Ortopedia y Traumatología*, 50(3), 224–232. [https://doi.org/10.1016/S0482-5985\(06\)74958-6](https://doi.org/10.1016/S0482-5985(06)74958-6)
- Nare, Z. (2022). How Confluent Are Your Cells? A Beginner's Guide to Measuring Cell Culture Confluency. Retrieved from Cells and Model Organisms website: <https://bitesizebio.com/63887/cell-confluency/>
- National Human Genome Research Institute. (2023). *TELÓMERO*. Retrieved from <https://www.genome.gov/es/genetics-glossary/Telomero>
- Pan, H., & Darvell, B. W. (2010). Effect of Carbonate on Hydroxyapatite Solubility. *Crystal Growth & Design*, 10(2), 845–850. <https://doi.org/10.1021/cg901199h>
- Park, J., & Lakes, R. S. (2004). Biomaterials, An Introduction. In *Verhandelingen - Koninklijke Academie voor Geneeskunde van België* (3rd ed., Vol. 66). https://doi.org/10.4324/9780203381564_biomaterials
- Pinho, O. F., Pinto Joazeiro, P., & Santos, A. R. (2021). Evaluation of the Growth and Differentiation of Human Fetal Osteoblasts (hFOB) Cells on Demineralized Bone Matrix (DBM). *Organogenesis*, 17(3–4), 136–149. <https://doi.org/10.1080/15476278.2021.2003134>
- Przekora, A. (2019). The summary of the most important cell-biomaterial interactions that need to be considered during in vitro biocompatibility testing of bone scaffolds for tissue engineering applications. *Materials Science and Engineering C*, 97(March 2018), 1036–1051. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2019.01.061>

- Rashki Kemmak, A., Rezapour, A., Jahangiri, R., Nikjoo, S., Farabi, H., & Soleimanpour, S. (2020). Economic burden of osteoporosis in the world: A systematic review. *Medical Journal of the Islamic Republic of Iran*, *34*, 154. <https://doi.org/10.34171/mjiri.34.154>
- Ratner, B. D., Hoffman, A. S., Schoen, F. J., & Lemons, J. E. (2004). Biomaterials science: an introduction to materials in medicine. In *Chemical Engineering* (Third Edit).
- Ressler, A., Žužić, A., Ivanišević, I., Kamboj, N., & Ivanković, H. (2021). Ionic substituted hydroxyapatite for bone regeneration applications: A review. *Open Ceramics*, *6*, 100122. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.oceram.2021.100122>
- Samavedi, S., Whittington, A. R., & Goldstein, A. S. (2013). Calcium phosphate ceramics in bone tissue engineering: A review of properties and their influence on cell behavior. *Acta Biomaterialia*, *9*(9), 8037–8045. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2013.06.014>
- Sprio, S., Tampieri, A., Dapporto, M., Iafisco, M., & Montesi, M. (2021). *Bioceramics in Regenerative Medicine* (M. B. T.-E. of M. T. C. and G. Pomeroy, Ed.). <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803581-8.12091-0>
- StackExchange. (2020). Origin of term ‘confluency’ in cell culture. Retrieved from Biology website: <https://biology.stackexchange.com/questions/29857/origin-of-term-confluency-in-cell-culture>
- The European Collection of Authenticated Cell Cultures ECACC. (n.d.). *Fundamental Techniques in Cell Culture Laboratory Handbook* (4th Editio; Sigma-Aldrich, Ed.). Retrieved from <https://www.culturecollections.org.uk/media/161749/ecacc-lab-handbook-fourth-edition.pdf>

- Turnbull, G., Clarke, J., Picard, F., Riches, P., Jia, L., Han, F., ... Shu, W. (2018). 3D bioactive composite scaffolds for bone tissue engineering. *Bioactive Materials*, 3(3), 278–314. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.bioactmat.2017.10.001>
- Uysal, O., Sevimli, T., Sevimli, M., Gunes, S., & Sariboyaci, A. E. (2018). Cell and tissue culture: The base of biotechnology. In *Omics Technologies and Bio-engineering: Towards Improving Quality of Life* (Vol. 1). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-804659-3.00017-8>
- Vallet-Regí, M., & Salinas, A. J. (2019). 6 - Ceramics as bone repair materials. In K. M. Pawelec & J. A. Planell (Eds.), *Bone Repair Biomaterials (Second Edition)* (Second Edition, pp. 141–178). <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-08-102451-5.00006-8>
- Wang, K., Zhou, C., Hong, Y., & Zhang, X. (2012). A review of protein adsorption on bioceramics. *Interface Focus*, 2, 259–277. <https://doi.org/10.1098/rsfs.2012.0012>
- Wang, W., & Yeung, K. W. K. (2017). Bone grafts and biomaterials substitutes for bone defect repair: A review. *Bioactive Materials*, 2(4), 224–247. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.bioactmat.2017.05.007>
- Xiao, D., Zhang, J., Zhang, C., Barbieri, D., Yuan, H., Moroni, L., & Feng, G. (2020). The role of calcium phosphate surface structure in osteogenesis and the mechanisms involved. *Acta Biomaterialia*, 106, 22–33. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2019.12.034>
- Yanyang, W., & Pu, X. (2023). 人胎儿成骨细胞系 hFOB1.19 在骨组织工程中的应用. 9292(82060194), 3266–3273.
- Zhang, Y., Wang, C., Li, Y., Lu, A., Meng, F., Ding, H., ... Li, Y. (2021). Carbonate and cation substitutions in hydroxylapatite in breast cancer micro-

calcifications. *Mineralogical Magazine*, 85(3), 321–331. <https://doi.org/DOI:10.1180/mgm.2021.23>