

---

## Tesis doctoral

*“Creación de una matriz en reemplazo del aloinjerto capaz de permitir  
la utilización de L-PRF en la técnica de Ortodoncia Osteogénica  
Acelerada (OOA).*

*Un nuevo biomaterial osteoconductor para aplicaciones en  
remodelación ósea.”*

**Francisco Muñoz Thomson**

---



Aquesta tesi doctoral està subjecta a la licència [Reconeixement-NoComercial-SenseObraDerivada 4.0 Internacional \(CC BY-NC-ND 4.0\)](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/)

Esta tesis doctoral está sujeta a la licencia [Reconocimiento-NoComercial-SinObraDerivada 4.0 Internacional \(CC BY-NC-ND 4.0\)](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/)

This doctoral thesis is licensed under the [Attribution-NonCommercial-NoDerivatives 4.0 International \(CC BY-NC-ND 4.0\)](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/)

“Creación de una matriz en reemplazo del aloinjerto capaz de permitir la utilización de L-PRF en la técnica de Ortodoncia Osteogénica Acelerada (OOA).

Un nuevo biomaterial osteoconductor para aplicaciones en remodelación ósea.”

Francisco Muñoz Thomson

TESIS DOCTORAL

Universitat Internacional de Catalunya, 2024



“Creación de una matriz en reemplazo del aloinjerto capaz de permitir la utilización de L-PRF en la técnica de Ortodoncia Osteogénica Acelerada (OOA).

Un nuevo biomaterial osteoconductor para aplicaciones en remodelación ósea.”

Francisco Muñoz Thomson

TESIS DOCTORAL

Universitat Internacional de Catalunya, 2024

Directores:

Prof. Dr. Andreu Puigdollers

Dr. David Rosenberg Messina

Tutor:

Prof. Dr. Andreu Puigdollers

Programa de Doctorado en Ciencias de la Salud

Línea de investigación: Ortodoncia acelerada y remodelación ósea



## DEDICATORIA

A Gracia, Eva y Baltasar, el combustible inagotable que alimenta mi vida y que me estimula para esforzarme a diario para tratar de ser, cada vez, un poco mejor.

## AGRADECIMIENTOS

Respecto de cualquier acto de iniciativa, existe una verdad fundamental: debe surgir desde quien pretende lograr su objetivo. En el caso de esta aventura, llamada Doctorado en Ciencias de la Salud, la motivación propia es la que me permitió dar el primer paso. Sin embargo, una tarea como esta no requirió solamente de mi mejor esfuerzo individual, sino que habría sido imposible sin contar con la ayuda a lo largo del camino de personas que, desde sus habilidades académicas técnicas o profesionales, me hicieron posible recorrer este camino de manera exitosa. Del mismo modo, y probablemente de manera tanto o más relevante, hubo quienes me alentaron desde lo emocional, justo cuando más lo necesitaba sin saber que con esa palabra oportuna, esa sonrisa precisa, ese abrazo cariñoso, me estaban dando la gota extra de energía cuando parecía que todas las reservas disponibles se acababan.

Mis primeras palabras de agradecimiento son para mis hijos, Eva, Gracia y Baltasar quienes siempre tuvieron fe en que sería capaz de salir adelante con este desafío y que hasta el día de hoy son “mi barra brava”, alentándome con entusiasmo incondicional en cada proyecto que decido emprender ¡Ustedes son la gran motivación que impulsa mi vida!

Muchas gracias a mis tutores, Profesor Dr. Andreu Puigdollers y Profesor Dr. David Rosenberg quienes se mostraron siempre disponibles y pacientes en las innumerables reuniones, revisiones y correcciones necesarias para llegar, al fin, a la versión final de este trabajo. Han sido una inspiración para mí en lo profesional, pero siento que, a lo largo de estos años de trabajo juntos, he fortalecido la amistad que nos unía inicialmente con David y gracias a este proceso, he ganado a un nuevo amigo en la persona de Andreu. ¡Gracias de todo corazón!

El trabajo de campo en un estudio como este es el alma de toda la actividad. En este aspecto, lograr los resultados necesarios habría sido simplemente imposible sin la colaboración de una serie de personas que, desde sus diferentes áreas de experticia, me ayudaron para que las muchas y necesarias actividades en el laboratorio y en el bioterio pudiesen ser hechas de manera adecuada. En primer lugar, mis agradecimientos a Javier Enrione, jefe del laboratorio Bioprel donde se realizaron todas las pruebas de parametrización y caracterización constituyentes de la primera fase de este estudio. Su disposición a facilitar todo el proceso, así como su empatía para comprender mi situación personal durante el desarrollo de este proyecto, es algo que aprecio y valoro de manera muy especial.

La demandante y estimulante aventura que significó sumergirme en el mundo de la experimentación *in vivo* estuvo facilitada por la Dra. Nataly Quezada quien, con cariño por los animales y profesionalismo, me mostró cómo desenvolverse satisfactoriamente en este entorno, hasta ahora desconocido para mí.

Nicole Ortega, María José García, Cristina Padilla e Ignacio Guerra se merecen mi gratitud permanente por su ayuda invaluable en cada una de las etapas de este estudio, siendo la primera línea de trabajo que permitió obtener la valiosa información que hoy forma parte de este documento. A lo largo de este camino, Nicole y María José han decidido seguir vinculadas a etapas posteriores de este desarrollo y espero poder seguir disfrutando trabajar con ellas por mucho tiempo más.

Durante todos estos años, la compañía y asistencia, siempre oportuna y profesional de mi arsenalera y colaboradora Ángela Duarte, ha sido decisiva estando presente siempre que fue requerida en las etapas *in vivo* y preclínicas de este estudio. Muchas gracias, Angela por tu lealtad y profesionalismo los cuales valoro y aprecio de manera muy especial.

La redacción de los artículos científicos es un arte que ha sido, probablemente uno de los desafíos más exigentes de este proceso. En este aspecto he contado con la ayuda invaluable de Ziyad Haidar quien ha desplegado sus habilidades ayudándome en el pulido final de los manuscritos a fin de que fuesen material digno de las prestigiosas revistas en los cuales fueron publicados. Muchas gracias, Ziyad por ayudar a familiarizarme con los exigentes estándares existentes en el mundo de la publicación científica.

Mi hermana María Elisa ha estado siempre presente en cada uno de los desafíos de mi vida. Esta no sería la excepción. Estoy profundamente agradecido por su apoyo emocional siempre incondicional, especialmente cuando las cosas se pusieron más difíciles a lo largo de este camino, pero también de manera muy concreta poniendo a mi disposición sus extraordinarias capacidades como Diseñadora Gráfica. ¡Gracias por tu talento, pero sobre todo por tu cariño a toda prueba!

Como clínico (y ahora aprendiz de investigador), tengo una mirada sesgada de las oportunidades que se presentan a propósito de mi actividad profesional. Quiero manifestar mi agradecimiento a mis socios y amigos de toda una vida, Rodrigo Cereceda y Gastón Dupré por sus aportes en términos empresariales que abren la puerta para que este conocimiento, algún día llegue a beneficiar, como espero, a tantos pacientes como sea posible. Del mismo modo, han formado parte de quienes me alentaron a seguir adelante, especialmente en los días más difíciles.

Por último (y de manera póstuma), mis agradecimientos a mi mamá, Irene, quien desde su lugar de observación universal y privilegiado debe estar disfrutando, como siempre lo hizo en vida, de este nuevo logro mío. Todo lo que he llegado a ser es gracias a su entrega de amor incondicional y a los valores que me inculcó y que hoy, junto con permitirme alcanzar esta nueva meta, siguen guiando los pasos de mi vida.

Gracias, Mamá por todo.

## RESUMEN

La hidroxiapatita (HAP), mineral de fosfato de calcio, se utiliza actualmente para la producción de materiales biocerámicos para aplicaciones en el tratamiento de tejido óseo dañado debido a sus propiedades osteoconductoras (1,2).

Actualmente, se comercializa hidroxiapatita obtenida de hueso humano (aloinjerto), porcino, bovino (xenoinjertos) y sintética (injerto aloplástico) que, en conjunto con fibrina rica en plaquetas y leucocitos (L-PRF, por su sigla en inglés, *leucocyte and platelet-rich fibrin*), es utilizada para tratamientos odontológicos como la ortodoncia osteogénica acelerada (OOA) (3). Sin embargo, este tratamiento es de acceso limitado debido a la restricción relacionada con consideraciones religiosas y culturales en el caso del origen porcino en lugares como el Medio Oriente, la preocupación creciente por la transmisión de priones en el caso del origen bovino, el bajo rendimiento biológico en el caso del origen sintético y las limitaciones medicolegales existentes en diversas partes del mundo asociadas con la donación de órganos en el caso del origen humano.

Independiente de su origen, todas las alternativas existentes tienen una limitación común que restringe el acceso a este tipo de soluciones en todo el mundo: su alto costo.

Es así como surge una oportunidad mediante la utilización del hueso de salmón (actualmente considerado un deshecho por la industria salmonera) como material de origen alternativo para producir hidroxiapatita natural. Al hacer coincidir una necesidad no resuelta en el mundo de los injertos óseos (el limitado acceso a biomateriales de injerto) con la oportunidad planteada mediante el aprovechamiento de una parte del deshecho de la industria salmonera (hueso de salmón), el objetivo general de este proyecto fue crear un nuevo biomaterial en base a hidroxiapatita extraída desde hueso de salmón (HAPS) parametrizar el proceso de producción y demostrar sus capacidades osteogénicas en presencia de L-PRF.

Los resultados demostraron que fue posible mejorar el proceso de producción de HAPS disminuyendo del tiempo de producción desde 70 a 30 horas y aumentando el rendimiento de producción desde un 16,6 % a un 19%. Además, se generaron modelos experimentales estadísticos que permitieron estudiar la inferencia de diversas variables en el protocolo de producción, así como su rendimiento en condiciones escaladas de producción esto es, pasar de una producción a baja escala (laboratorio) a una de mayor escala con potencial industrial. Los resultados sugirieron que un aumento en la temperatura de calcinación aumenta la cantidad de hidroxiapatita y, por ende, la cristalinidad en el biomaterial. En base a los resultados del modelo estadístico, se obtuvieron 3 HAPS (HAPS P1, P2 y P3) con características estructurales diferentes, utilizando variaciones en el proceso de calcinación.

En la segunda etapa del proyecto, se determinó la bioactividad de las 3 HAPS obtenidas a partir de los protocolos seleccionados, en donde se midió viabilidad y proliferación celular de células mesenquimales gingivales humanas, además de su diferenciación osteogénica en presencia de HAPS. Los resultados de viabilidad y

proliferación celular en presencia del biomaterial fueron positivos, obteniendo resultados similares de viabilidad celular a la del aloinjerto (humano) y xenoinjerto (bovino) comercial a las 48 horas. Al inducir la diferenciación de las células mesenquimales se observó que la presencia de las HAPS promueve la actividad osteogénica y osteoinductiva de las células, incluso en mayor medida que el aloinjerto comercial. Los resultados *in vivo* corroboraron la capacidad osteoconductora y osteogénica de HAPS, comprobando su efectividad como xenoinjerto óseo y sugiriendo un mejor desempeño que los otros productos comercialmente disponibles actualmente.

Tanto las pruebas de caracterización como los estudios *in vitro* e *in vivo* realizados en la hidroxiapatita proveniente de desechos de la industria salmonera, para ser utilizada potencialmente en aplicaciones biomédicas como injerto óseo, arrojaron resultados preliminares muy prometedores, sentando las bases para el estudio y desarrollo de un nuevo biomaterial con potencial utilización en aplicaciones médicas y odontológicas.

Hydroxyapatite (HAP), a calcium phosphate mineral, is currently used in the production of bioceramic materials for applications in the treatment of damaged bone tissue due to its osteoconductive properties (1,2). Currently, hydroxyapatite obtained from human bone (allograft), porcine, bovine (xenografts), and synthetic (alloplastic graft) sources is commercialized. These, together with platelet-rich fibrin (PRF) and leukocytes, are used in dental treatments such as accelerated osteogenic orthodontics (AOO) (3). However, access to this treatment is limited due to restrictions related to religious and cultural considerations regarding porcine origin in places like the Middle East, concerns about prion transmission from bovine sources, low biological performance with synthetic sources, and existing medical-legal limitations associated with organ donation from human sources worldwide. Regardless of their origin, all existing alternatives share a common limitation that restricts access to these solutions worldwide: their high cost.

This creates an opportunity by utilizing salmon bone (currently considered waste by the salmon industry) as an alternative source material to produce natural hydroxyapatite. By addressing an unresolved need in the field of bone grafts (limited access to graft biomaterials) and leveraging a part of the waste generated by the salmon industry (salmon bone), the general objective of this project was to create a new biomaterial based on hydroxyapatite extracted from salmon bone (HAPS), parameterize the production process, and demonstrate its osteogenic capabilities in the presence of L-PRF.

The results showed that it was possible to improve the production process of HAPS by reducing the production time from 70 to 30 hours and increasing the production yield from 16.6% to 19%. Additionally, statistical experimental models were generated to study the inference of various variables in the production protocol, as well as the improved yield under scalable conditions. The results suggested that an increase in the calcination temperature increases the amount of hydroxyapatite and, consequently, the crystallinity in the biomaterial. Based on the



results of the statistical model, 3 HAPS (HAPS P1, P2, and P3) with different structural characteristics were obtained using variations in the calcination process.

In the second stage of the project, the bioactivity of the 3 HAPS obtained from the selected protocols was determined, where the viability and proliferation of human gingival mesenchymal cells were measured, as well as their osteogenic differentiation in the presence of HAPS. The results of cell viability and proliferation in the presence of the biomaterial were positive, obtaining similar cell viability results to those of commercial allograft (human) and xenograft (bovine) at 48 hours. When inducing the differentiation of mesenchymal cells, it was observed that the presence of HAPS promotes the osteogenic and osteoinductive activity of the cells, even to a greater extent than commercial allograft. In vivo results corroborated the osteoconductive and osteogenic capacity of HAPS, confirming its effectiveness as a bone xenograft and suggesting better performance than other commercially available products currently.

Both the characterization tests and the in vitro and in vivo studies conducted on hydroxyapatite derived from salmon industry waste, potentially for use in biomedical applications such as bone grafting, yielded very promising preliminary results, laying the foundation for the study and development of a new biomaterial with potential use in medical and dental applications.

## PRÓLOGO

Augusta era una paciente de 9 años cuando consultó por primera vez con nosotros. Era portadora de una anomalía dentofacial cuya solución ideal la hacía candidata a una cirugía ortognática una vez hubiese terminado su crecimiento. Cuando explicamos los detalles de esta cirugía a su familia, no solamente se negaron a optar por esta solución, sino que nos preguntaron cómo era posible que en pleno siglo XXI aun no hubiese una alternativa para corregir una anomalía dentofacial por falta de desarrollo óseo que no fuese la cirugía ortognática.

Lo cierto es que dicha solución existía y había sido reportada en una publicación en el año 2001 por los hermanos Thomas y William Wilcko. Se trataba de lo que ellos habían bautizado como Ortodoncia Osteogénica Acelerada (OOA). Esta técnica proponía una alternativa para aumentar el hueso dentoalveolar disponible (de ahí el nombre osteogénica), expandir el perímetro de las arcadas dentarias y evitar extracciones dentales para producir espacios y volúmenes necesarios a fin de nivelar y alinear los dientes con el fin de generar las condiciones que permitiesen una oclusión funcional.

Junto con mi ortodoncista, la Dra. Silvana Palacios, decidimos viajar a Erie, Pensilvania a aprender la técnica de OOA directamente de sus creadores, los hermanos Wilcko. En ese viaje, hace casi 15 años atrás, no solamente nos encontramos con una técnica que modificó para siempre nuestra manera de abordar los casos de anomalías dentofaciales tan prevalentes en el mundo, sino que aprendimos a pensar de una manera creativa incorporando nuevos conceptos, en esos entonces revolucionarios para nosotros y que, sin embargo al día de hoy, son el fundamento sobre el cual se basan miles de pacientes tratados en nuestra práctica privada y en la Clínica docente asistencial donde me desempeñé como docente de Cirugía Bucal y Máxilofacial. Más importante aún, ese fue el comienzo de una amistad con los hermanos Wilcko que se cimentó con el pasar de los años y es una realidad en constante crecimiento hasta el día de hoy.

La técnica, llevada a nuestras manos, funcionó magníficamente y nos permitió dar solución no solo al caso de Augusta, sino que, con el devenir de los años, a más de mil pacientes que se han beneficiado de este conocimiento.

Sin embargo, la OOA es una técnica que, si bien ofrece resultados a menudo impresionantes en los casos en que no es estrictamente necesario pasar por una cirugía ortognática, sigue requiriendo de un procedimiento quirúrgico que, aunque menos invasivo, no está exento de limitaciones. La principal radica en el hecho de que, para lograr los resultados planificados, es necesaria la utilización de una cantidad considerable de material de injerto óseo; 10 CC por paciente en promedio, pudiendo llegar incluso a los 20 CC en ciertos casos. Esto ofrecía una

limitante para muchos de mis pacientes si consideramos que el precio de 1 CC de biomaterial de injerto puede costar entre U\$100 y U\$200.

La primera solución pasó por disminuir la cantidad de biomaterial necesaria incorporando derivados plaquetarios como el Plasma Rico en Fibrina (L-PRF). Esta modificación a la técnica original (publicada en 2015) fue reconocida por el Estado de Chile a través de la otorgación de un capital semilla de CORFO (instrumento de financiamiento estatal para la puesta en marcha de desarrollos con potencial tecnológico). Sin embargo, la cantidad mínima de injerto necesaria para resolver los casos bajó de 10 CC a 7 CC en el mejor de los promedios calculados. La limitante del costo para muchos pacientes seguía siendo una barrera de entrada que me frustraba como cirujano.

Es así como comencé a buscar soluciones alternativas que permitieran contar con un biomaterial similar a los existentes, pero de menor costo. Al terminar por convencerme de que dicho material no existía, decidí dedicar mi tesis doctoral a intentar solucionar este problema.

Chile es el segundo productor mundial de salmón, generando unas 700,000 toneladas al año. De estas, 200,000 son deshechos entre los cuales se encuentra el hueso y particularmente el esquelón.

Resolví dedicar estos 5 años de tesis doctoral a investigar si a partir del hueso de salmón era posible obtener el componente básico de todo material de injerto óseo: hidroxiapatita. Una vez demostrado que sí era posible, vino el desafío de parametrizar la producción a fin de definir y ajustar las variables del proceso y luego modelarla para hacerla eficiente en la etapa de escalamiento. Luego, fue preciso estudiar en detalle las propiedades físicas, químicas y biológicas de este nuevo material mediante una etapa de caracterización que consumió los primeros años del doctorado. Una vez conocidos los detalles característicos de esta nueva hidroxiapatita, procedimos a estudiar sus propiedades *in vitro* y vimos, no sin cierta sorpresa, que esta nueva hidroxiapatita tenía las propiedades osteoconductoras esperadas, pero además poseía un potencial osteogénico al favorecer la proliferación y diferenciación de células mesenquimales a osteoblastos. Finalmente, en los dos últimos años del doctorado pasamos a las pruebas *in vivo* para demostrar la capacidad osteoconductoras y osteogénica de la hidroxiapatita derivada del hueso de salmón (HAPS) en un modelo animal utilizando ratas Sprague Dowley. Los resultados hematológicos, imagenológicos e histológicos de esta etapa *in vivo* muestran que la HAPS es al menos tan eficiente en facilitar la formación de hueso humano como las alternativas disponibles en el mercado.

Actualmente nuestro modelo productivo alcanza una eficiencia de 24% y aumentando lo que significa que, de una tonelada de hueso de salmón podemos producir aproximadamente 240 kilos de biomaterial de injerto de alta calidad, bajando los costos de producción significativamente.

A 5 años de iniciado los estudios, los resultados se ven promisorios. La hidroxiapatita derivada de salmón es el primer xenoinjerto no mamífero, libre de las limitaciones existentes, favorece la economía circular, fortalece a las comunidades locales, protege el medio ambiente y aumenta el abanico de opciones terapéuticas para miles de pacientes que hoy en día ven limitado su acceso a soluciones cotidianas como la instalación de implantes óseo-integrables pero también a grandes cirugías reconstructivas.

¡Hay mucho por hacer aún pero el primer paso ya ha sido dado!

## INDICE DE CONTENIDOS

1. Introducción.....	19
2. Hipótesis y Objetivos.....	22
2.1 Hipótesis.....	22
2.2 Objetivo General.....	22
2.3 Objetivos específicos.....	22
3. Material y Métodos.....	23
3.1 Proceso de Producción HAPS.....	23
3.2 Optimización del proceso de producción HAPS.....	24
3.2.1 Optimización Inicial.....	24
3.2.2 Diseño experimental estadístico.....	24
3.3 Caracterización de HAPS.....	25
3.3.1 Espectroscopía de Raman.....	25
3.3.2 Difracción de rayos X (XRD).....	25
3.3.3 Análisis termogravimétrico (TGA).....	26
3.3.4 Microscopía electrónica de barrido, acoplada con espectroscopía de rayos X dispersiva (SEM-EDX) .....	26
3.3.5 Picnometría de gases.....	26
3.3.6.1 Texturómetro.....	27
3.4 Bioactividad de HAPS in vitro .....	27
3.4.1 Cultivo de células mesenquimales gingivales.....	27
3.4.2 Viabilidad y proliferación celular.....	27
3.4.3.1 Diferenciación celular .....	28
3.5 Evaluación de microestructura adecuada para manejo clínico de HAPS.....	29
3.5.1 Diseño experimental estadístico para la estimación de la porosidad del biomaterial.....	29
3.5.2 Combinación con L-PRF y uso en contexto clínico .....	30
3.6 Escalamiento de HAPS bajo condiciones parametrizadas.....	31
3.7 Bioactividad de HAPS <i>in vivo</i> .....	32
3.7.1 Procedimiento quirúrgico.....	32
3.7.2 Análisis de biocompatibilidad.....	34
3.7.3 Análisis imagenológico.....	35
3.7.4.1 Análisis histológico.....	36
4. Resultados.....	37
4.1 Optimización del proceso de producción de HAPS.....	37
4.1.1 Mejora operación de desproteización.....	37
4.1.2 Mejora operación de deslipidificación.....	38
4.1.3 Mejora operación de calcinación.....	40

4.2	Modelo de optimización de proceso de producción de HAPS...	42
4.2.1	Resultado superficie respuesta para variable rendimiento.....	42
4.2.2	Resultado superficie de respuesta para concentración y Cristalinidad de hidroxiapatita.....	43
4.3	Caracterización de HAPS obtenidas mediante procesos seleccionados.....	45
4.3.1	Espectroscopía de Raman.....	45
4.3.2	Difracción de rayos X (XRD).....	46
4.3.3	Análisis termogravimétrico (TGA).....	48
4.3.4	Microscopía electrónica de barrido, acoplada con espectroscopía de rayos X- dispersiva (SEM-EDX).....	50
4.3.5	Picnometría de gases.....	52
4.3.6	Texturómetro.....	52
4.4	Bioactividad de HAPS <i>in vitro</i> .....	54
4.4.1	Viabilidad y proliferación celular.....	54
4.4.2	Diferenciación celular.....	56
4.5	Evaluación de microestructura adecuada para manejo clínico de HAPS.....	57
4.5.1	Diseño experimental estadístico para la estimación de la porosidad y tamaño del biomaterial.....	57
4.5.2	Combinación de HAPS con L-PRF y evaluación de su uso en contexto clínico.....	62
4.6	Escalamiento de HAPS bajo condiciones parametrizadas.....	64
4.6.1	Rendimiento de HAPS obtenido con proceso escalado.....	64
4.6.2	Difracción de rayos X.....	65
4.6.3	Análisis termogravimétrico (TGA).....	66
4.6.4	Microscopía electrónica de barrido, acoplada con espectroscopía de rayos X- dispersiva (SEM-EDX).....	67
4.6.5	Picnometría de gases.....	68
4.6.6	Texturómetro.....	69
4.6.7	Combinación de HAPS con L-PRF y evaluación de su uso en contexto clínico.....	70
4.7	Bioactividad de HAPS <i>in vivo</i> .....	71
4.7.1	Análisis de biocompatibilidad.....	71
4.7.2	Análisis imagenológico.....	73
4.7.3	Análisis histológico.....	79
5.	Discusión.....	82
5.1	Producción.....	82
5.2	Caracterización primaria.....	82
5.3	Citotoxicidad.....	83
5.4	Estudio <i>In Vivo</i> .....	84
5.5	Aplicación Clínica.....	86
5.6	Limitaciones en la investigación.....	87
6.	Conclusiones.....	88

7. Bibliografía.....	90
8. Anexos.....	94
8.1 Anexo 1 Detalle de los exámenes bioquímicos del estudio <i>in vivo</i> a los 15, 30 y 60 días.....	94
8.2 Anexo 2 Pauta de evaluación de HAPS en contexto clínico.....	101
8.3 Anexo 3 Artículo 1.....	102
8.4 Anexo 4 Artículo 2.....	121
8.5 Anexo 5 Conflictos de interés.....	142
8.6 Anexo 6 Financiación.....	143

## LISTA DE FIGURAS Y TABLAS

### Figuras

Figura 1 Diagrama de bloques del proceso de producción de hidroxiapatita.....	23
Figura 2 Técnica de sembrado celular.....	28
Figura 3 Pruebas de aglutinación con L-PRF.....	31
Figura 4 Preparación del instrumental quirúrgico y del animal para la intervención quirúrgica.....	33
Figura 5 Secuencia de la intervención quirúrgica para el injerto del defecto craneal en ratas.....	34
Figura 6 Adquisición de las imágenes tridimensionales del defecto óseo.....	35
Figura 7 Espectros de Raman para HAPS de optimización de desproteínización.....	38
Figura 8 Espectros de Raman para HAPS de optimización de deslipidificación.....	39
Figura 9 Espectros de Raman para HAPS de optimización de calcinación.....	41
Figura 10 Gráfico de superficie de respuesta para Rendimiento.....	43
Figura 11 Gráfico de superficie de respuesta para cristalinidad.....	44
Figura 12 Espectro de Raman de HAPS obtenida mediante protocolo 1.....	45
Figura 13 Espectro de Raman de HAPS obtenida mediante protocolo 2.....	45
Figura 14 Espectro de Raman de HAPS obtenida mediante protocolo 3.....	45
Figura 15 Difractograma de HAPS obtenida mediante protocolo 1.....	46
Figura 16 Difractograma de HAPS obtenida mediante protocolo 2.....	46
Figura 17 Difractograma de HAPS obtenida mediante protocolo 3.....	47
Figura 18 TGA de HAPS obtenida mediante protocolo 1.....	49
Figura 19 TGA de HAPS obtenida mediante protocolo 2.....	49
Figura 20 TGA de HAPS obtenida mediante protocolo 3.....	49
Figura 21 SEM de hidroxiapatita de protocolo 1.....	50



Figura 22 SEM de hidroxiapatita de protocolo 2.....	51
Figura 23 SEM de hidroxiapatita de protocolo 3.....	51
Figura 24 Resultados de compresión de las muestras obtenidas para cada protocolo.....	53
Figura 25 Resultados de viabilidad y proliferación celular en presencia de HAPS a las 24 horas.....	54
Figura 26 Resultados de viabilidad y proliferación celular en presencia de HAPS a las 48 h.....	55
Figura 27 Imágenes (10x) de células mesenquimales a 21 días de diferenciación.....	56
Figura 28 Gráfico de superficie de respuesta para volumen específico vacío.....	58
Figura 29 Distribución de tamaño HAPS con molienda de 2 segundos.....	59
Figura 30 Distribución de tamaño HAPS con molienda de 6 segundos.....	59
Figura 31 Distribución de tamaño HAPS con molienda de 10 segundos.....	60
Figura 32 Microscopía de luz HAPS calcinada a 800°C con molienda por 2 segundos.....	60
Figura 33 Microscopía de luz HAPS calcinada a 900°C con molienda por 2 segundos.....	61
Figura 34 Microscopía de luz HAPS calcinada a 1000°C con molienda por 2 segundos.....	61
Figura 35 Microscopía de luz HAPS calcinada a 800°C con molienda por 10 segundos.....	61
Figura 36 Microscopía de luz HAPS calcinada a 900°C con molienda por 10 segundos.....	62
Figura 37 Microscopía de luz HAPS calcinada a 1000°C con molienda por 10 segundos.....	62
Figura 38 HAPS Protocolo 1 en contexto clínico.....	63
Figura 39 HAPS Protocolo 2 en contexto clínico.....	64

Figura 40 HAPS Protocolo 3 en contexto clínico.....	64
Figura 41 Difractograma de HAPS 1X.....	65
Figura 42 Difractograma de HAPS 10X.....	66
Figura 43 TGA de HAPS 1X.....	67
Figura 44 TGA de HAPS 10X.....	67
Figura 45 SEM de HAPS 1X.....	67
Figura 46 SEM de HAPS 10X.....	68
Figura 47 Resultados de compresión de HAPS 1X.....	69
Figura 48 Resultados de compresión de HAPS 10X.....	69
Figura 49 HAPS 1X en contexto clínico.....	71
Figura 50 HAPS 10X en contexto clínico.....	71
Figura 51 Imagen microscópica con tinción de hematoxilina-eosina.....	81

## Tablas

Tabla 1 Experimentos para optimización de proceso de producción de HAPS...	24
Tabla 2 Diseño de experimento de optimización de proceso de producción de hidroxapatita.....	25
Tabla 3 Diseño de experimento de optimización de proceso de manufactura de hidroxapatita.....	30
Tabla 4 Rendimientos para obtención de hidroxapatita en fase de desproteización.....	37
Tabla 5 Rendimientos para obtención de hidroxapatita en fase de deslipidificación.....	39
Tabla 6 Rendimientos para obtención de hidroxapatita en optimización de descalcificación.....	40

Tabla 7 Rendimiento, cantidad y cristalinidad de hidroxiapatita de los protocolos seleccionados.....	44
Tabla 8 Grupos funcionales de cada peak para hidroxiapatita en espectro de Raman.....	46
Tabla 9 Resultados cuantitativos de las HAPS obtenida mediante difracción de rayos X.....	47
Tabla 10 Composición química de HAPS de protocolo 1, 2 y 3, mediante análisis EDX.....	51
Tabla 11 Densidad de las HAPS a partir de los protocolos seleccionados.....	52
Tabla 12 Pendiente y fuerza máxima obtenidos para los protocolos seleccionados.....	53
Tabla 13 Resultados de evaluación de HAPS en contexto clínico.....	63
Tabla 14 Resultados de rendimiento escalado de HAPS 1X y 10X.....	65
Tabla 15 Composición de HAPS 1X y escalada a 10X.....	66
Tabla 16 Composición química de HAPS 1X y 10X.....	68
Tabla 17 Densidad de HAPS 1X y 10X.....	69
Tabla 18 Pendiente y fuerza máxima de HAPS 1X y 10X.....	69
Tabla 19 Resultados de evaluación de HAPS 1X y 10X en contexto clínico.....	70
Tabla 20 Perfil bioquímico y hematológico de ratas implantadas con injerto HAPS y comercial.....	72
Tabla 21 Diámetros de defectos óseos medidos en tomografía computarizada de haz cónico.....	74
Tabla 22 Resultados imagenológicos para los injertos usados.....	75 a 78
Tabla 23 Resultados de histología para los injertos usados.....	79

## 1. INTRODUCCIÓN

La hidroxiapatita (HAP) ( $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ ) es un mineral de fosfato de calcio que se encuentra en los huesos y que actualmente se utiliza para la producción de materiales biocerámicos, utilizados en el tratamiento de tejido óseo dañado, debido a su alta osteoconducción (10). En la actualidad las cerámicas de fosfato de calcio con HAP, como principal fase constituyente, se utilizan como material de relleno para sustituir huesos y como recubrimiento sobre implantes para promover el desarrollo óseo debido a su semejanza en cuanto a composición química y estructural (20). Hoy en día, se comercializa hidroxiapatita, proveniente de diversas fuentes, como lo son de hueso humano, porcino, bovino y sintética. La demanda por soluciones que requieren de biomateriales de injerto óseo a partir de la hidroxiapatita es creciente y abarca desde procedimientos cotidianos y de baja complejidad como son la preservación de alvéolo (46) hasta cirugías reconstructivas maxilofaciales en el contexto del trauma y de la oncología reconstructiva.

Sin embargo, todas las opciones de hidroxiapatita actualmente existentes presentan algún tipo de limitación, planteando un problema para miles de clínicos en el mundo que ven limitada su capacidad para entregar soluciones de manera oportuna y eficiente a sus pacientes.

La hidroxiapatita sintética ni siquiera es considerada como una solución en muchas partes del mundo por su bajo rendimiento biológico al no permitir formación de nuevo hueso en el tejido injertado. Por otra parte, la hidroxiapatita humana es restringida en muchos países debido a consideraciones legales relacionadas con el sensible tema de donación de órganos. Soluciones en base a hidroxiapatita de origen bovino están limitadas en países como el Reino Unido o Francia, solo por nombrar algunos, debido a riesgo de contaminación por priones, situación que ha trascendido recientemente a través de los mediáticos casos asociados con el denominado “mal de las vacas locas”. En el caso de la hidroxiapatita de origen porcino, las limitaciones y restricciones de uso están dadas por consideraciones religiosas y culturales en vastas zonas geográficas como el Medio Oriente, la India y en aquellos lugares del mundo donde existen comunidades Kosher y Halal.

Independiente de su origen, la totalidad de las soluciones para injertos óseos en base a hidroxiapatita tienen una limitación en común: el precio. 1 CC de injerto en base a hidroxiapatita puede llegar a costar entre U\$100 y U\$200. Considerando que, dependiendo de la complejidad del caso y de la técnica utilizada, las necesidades de biomaterial para injerto pueden llegar a 20, 30 o incluso 40 CC por procedimiento (46), esto puede suponer un importante problema para millones de pacientes en el mundo que ven limitado su acceso a este tipo de soluciones debido al alto costo del biomaterial. Del mismo modo, son miles los clínicos que a diario experimentan la frustración de entregar soluciones subestándar producto del alto costo de este tipo de biomateriales. Si bien es cierto, el problema del costo es real en todo el mundo, se hace

especialmente crítico en áreas geográficas como Latinoamérica, África y grandes extensiones de Asia.

En términos comerciales, el mercado mundial de la hidroxiapatita es de 2.8 billones de dólares y se espera que crezca a 3.2 para el año 2030 (VII Informe de sostenibilidad 2022, Salmón Chile, [www.salmonchile.cl/sustentabilidad/](http://www.salmonchile.cl/sustentabilidad/)) ofreciendo oportunidades para la innovación y desarrollo de nuevas alternativas.

En Chile, la salmonicultura es la principal actividad de cultivo de la acuicultura, posicionándose en una de las industrias más importantes del país (solamente superada por la del Cobre, aportando 4% del PIB) y el segundo productor de salmónes del mundo, abasteciendo a un amplio número de mercados cada año (VII Informe de sostenibilidad 2022, Salmón Chile, [www.salmonchile.cl/sustentabilidad/](http://www.salmonchile.cl/sustentabilidad/)). Los residuos del salmón (escamas, piel y esquelón) son descartados por las empresas locales. Estos desperdicios son peligrosos, representando una amenaza para el ecosistema y un riesgo para la salud del ser humano (4). En base a esto, resulta fundamental valorizar los desechos de dicha industria para obtener subproductos que aporten en diversas áreas, mejorando la calidad de vida de la población, y a la vez, generando un impacto positivo en el medioambiente a través de una actividad rentable como referente de economía circular. Adicionalmente una actividad que dé valor agregado al proceso de rescate de parte de los desechos generados por la industria impacta positivamente a través del fortalecimiento de las comunidades locales que se verían beneficiadas ya sea directa o indirectamente por un proceso productivo de alto valor agregado como lo es una hidroxiapatita derivada del hueso de salmón.

El objetivo general de este proyecto es producir un nuevo biomaterial, en base a hidroxiapatita, extraída desde hueso de salmón (HAPS) y demostrar sus capacidades osteogénicas tanto *in vitro*, como *in vivo*.

Para ello se organizó el proyecto en tres áreas bien definidas: 1) Parametrización y Caracterización de la HAPS en el proceso productivo, 2) Citotoxicidad, proliferación y diferenciación *in vitro* en presencia de HAPS y 3) Capacidad Osteogénica de la HAPS *in vivo*. El desarrollo del trabajo fue concebido con un criterio lineal y progresivo donde resulta indispensable la finalización de una etapa para poder seguir adelante con la siguiente, observando la coherencia tanto cronológica como técnica en un proceso que busca crear un nuevo biomaterial y explorar sus posibles aplicaciones clínicas. El primer artículo denominado “*A novel Chilean salmon fish backbone-based nanoHydroxyApatite functional biomaterial for potential use in bone tissue engineering*” (4) desarrolla los conceptos de parametrización de los procesos de producción de HAPS y la caracterización de las diferentes HAPS obtenidas. El segundo artículo denominado “*Efficient Hydroxyapatite Extraction from Salmon Bone Waste: An Improved Lab-Scaled Physico-Chemico-Biological Process*” (47) investiga la determinación de bioactividad de HAPS *in vitro*, analizando viabilidad, proliferación y diferenciación celular en presencia de HAPS, además del desarrollo de un prototipo del biomaterial para su combinación con L-PRF y posterior uso en contexto clínico, el escalamiento del

bioproceso con condiciones parametrizadas y la caracterización de HAPS bajo condiciones escaladas y parametrizadas. Finalmente, y como corolario adicional, se abordó el desarrollo de un prototipo de biomaterial producido bajo condiciones escaladas y parametrizadas para uso en contexto clínico. Este concepto no ha sido llevado al formato de artículo aún y por lo tanto no forma parte de la presente tesis por compendio, sin perjuicio de que en el futuro pueda ser divulgado a través de la literatura científica correspondiente.

## 2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

### 2.1 Hipótesis

2.1.1 H0. No es posible obtener hidroxiapatita de salmón cuyas características físicas, químicas y biológicas permitan su eventual utilización como biomaterial osteoconductor, como alternativa al aloinjerto en presencia de L-PRF en técnicas de remodelación ósea.

2.1.2 H1. Es posible obtener hidroxiapatita de salmón cuyas características físicas, químicas y biológicas permitan su eventual utilización como biomaterial osteoconductor, como alternativa al aloinjerto en presencia de L-PRF en técnicas de remodelación ósea.

### 2.2 Objetivo General

Parametrizar el proceso de producción de un nuevo biomaterial, en base a hidroxiapatita, extraída desde hueso de salmón (HAPS) y demostrar sus capacidades osteogénicas en presencia de L-PRF.

### 2.3 Objetivos específicos

2.3.1. Realizar la parametrización de procesos de producción de hidroxiapatita a partir de hueso de salmón.

2.3.2. Caracterizar la HAPS producida bajo condiciones parametrizadas.

2.3.3. Determinar la bioactividad *in vitro* de HAPS producida bajo condiciones parametrizadas.

2.3.4. Desarrollar un prototipo de biomaterial para su combinación con fibrina rica en plaquetas y leucocitos (L-PRF) y uso en contexto clínico.

2.3.5. Establecer un escalamiento de procesos de producción de HAPS.

2.3.6. Realizar una caracterización de HAPS producida bajo condiciones escaladas y parametrizadas.

2.3.7. Evaluar las propiedades osteogénicas *in vivo* de HAPS.

2.3.8. Desarrollar un prototipo de biomaterial producido bajo condiciones escaladas para uso en contexto clínico.

### 3. MATERIAL y MÉTODOS

#### 3.1 Proceso de producción de HAPS

La Figura 1 muestra el diagrama de bloques del proceso inicial de producción de HAPS, desarrollado en el laboratorio, con sus respectivas operaciones unitarias.

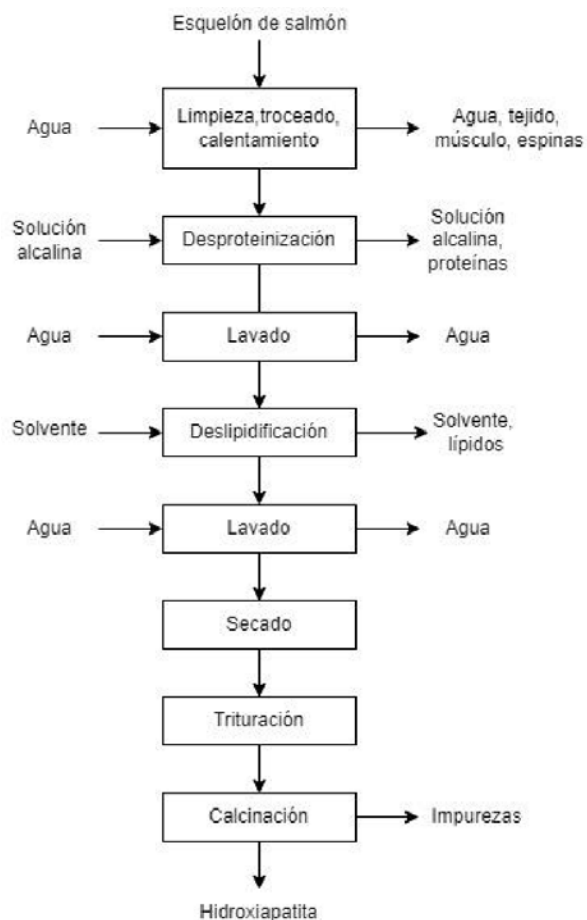


Figura 1. Diagrama de bloques del proceso de producción de hidroxapatita seleccionado.

El rendimiento de este proceso inicial es  $16,6 \pm 1,6 \%$  y la duración del proceso completo corresponde a 70 h, aproximadamente.

El rendimiento del proceso se obtiene, a partir de esquelón limpio, de la Ecuación 1.

$$\text{Rendimiento del proceso} = \frac{\text{Masa del producto a la salida del proceso}}{\text{Masa del producto a la entrada del proceso}} \times 100$$



### 3.2 Optimización del proceso de producción de HAPS

#### 3.2.1 Optimización inicial

A partir de los datos previos, y en conjunto con literatura científica especializada, se identificaron las etapas de desproteinización, deslipidificación y calcinación como las principales operaciones que podrían afectar las características de la HAPS obtenida (5,6). A partir de esto, se realizó un diseño de experimentos, para estas 3 operaciones unitarias, con el fin de mejorar las condiciones de proceso en relación con tiempos, rendimiento y características de HAPS. Se realizó una caracterización preliminar de las HAPS obtenidas mediante espectroscopía de Raman.

A continuación, en la Tabla 1, se presentan las condiciones y características de los experimentos llevados a cabo en primera instancia.

Operación Unitaria	Concentración solución alcalina (M)	Solvente	Temperatura (°C)	Tiempo (h)	N° de experimentos
Desproteinización	2 concentraciones (C1 y C2)	N/A	2 condiciones (T1 y T2)	Fijo	4
Deslipidificación	N/A	2 tipos (S1 y S2)	Fija	2 condiciones (t1 y t2)	4
Calcinación	N/A	N/A	3 condiciones (T1, T2 y T3)	3 condiciones (t1, t2 y t3)	9

Tabla 1. Experimentos para optimización de proceso de producción de HAPS (C1 y C2: Concentración baja y alta; S1 y S2: Solvente 1 y solvente 2; T1 y T2: Temperatura baja y alta; t1, t2 y t3: Tiempos de menor a mayor).

#### 3.2.2 Diseño experimental estadístico

En base a la información obtenida a partir de la optimización inicial, se propuso el siguiente diseño de experimentos estadístico, el cual tuvo como finalidad los siguientes objetivos:

1. Determinar qué variables influyen de forma significativa una respuesta de interés.
2. Identificar las variables para obtener una estimación aproximada de la superficie de respuesta por medio de modelos factoriales.
3. Usar la superficie de respuesta como guía para variar gradualmente los factores controlables que afectan a la respuesta de manera tal que se mejore el valor de esta.

El modelo fue creado mediante el programa Statgraphics 16.1.03 (Statpoint Technologies Inc., Estados Unidos), utilizando un diseño de experimentos factorial  $3^2$ , de superficie de respuesta. Se especificaron 2 factores experimentales. El diseño seleccionado tiene 12 ejecuciones, con 1 una muestra para ser tomada en cada ejecución. Los experimentos se muestran a continuación, en la Tabla 2.

N° de experimentos	Factores		Variables de respuesta
	Concentración de solución alcalina (M)	Temperatura (°C)	
12	0,1-0,4	800-1000	Rendimiento (%) Cantidad de HAPS (% p/p) Cristalinidad (%)

Tabla 2. Diseño de experimento de optimización de proceso de producción de hidroxiapatita.

El modelo tiene como variables principales la concentración de solución alcalina, utilizada para la desproteínización, y la temperatura de calcinación. La variable tiempo se fijó para ambas operaciones. La deslipidificación no fue incluida en base a los resultados de optimización inicial. Las variables de respuesta corresponden a rendimiento del proceso (% de biomaterial obtenido por esquelón limpio de salmón), cantidad de HAPS en el biomaterial y cristalinidad, las cuales se determinarán por difracción de rayos x (sección 3.3.2).

### 3.3 Caracterización de HAPS

#### 3.3.1 Espectroscopía de Raman

Una primera caracterización de las muestras obtenidas, en relación con grupos funcionales característicos de la HAPS, se llevó a cabo mediante espectroscopía de Raman, la cual se realizó utilizando el equipo XploRA™ PLUS (Horiba Scientific, Francia), en rango espectral de 400 a 1200  $\text{cm}^{-1}$  y un lente objetivo de 10x. El tiempo de exposición correspondió a 20 s, con un número de 3 acumulaciones. Se utilizó una rejilla de 1200 gr/mm y un filtro del 50%. El láser del equipo corresponde a una longitud de onda de 785 nm, y una abertura de 100  $\mu\text{m}$ . Se realizaron 5 réplicas por cada medición. La normalización de los datos se llevó a cabo mediante el programa Origin Pro 8.5 (OriginLab®, Estados Unidos), con el método de normalización de [0,1].

#### 3.3.2 Difracción de rayos X (XRD)

La cristalinidad de las muestras fue determinada mediante XRD. El análisis fue realizado en un difractómetro de rayos-X de polvo (Bruker, Alemania), modelo D8 Advance, con una tensión de 40 KV y 30 mA, con radiación Cu K $\alpha$ 1. El rango de medida desde los 2 a 80°, en el ángulo 2 $\theta$ , con un tamaño de paso de 0,02° y tiempo de conteo de 0,3 s por paso. La geometría del equipo correspondió a Bragg-Brentano y el filtro fue de níquel. El software utilizado para realizar la identificación de fases fue DIFFRAC.EVA (Bruker, Alemania), utilizando la base de datos PDF-2. El método de cuantificación usado fue el de Rietveld, mientras que el software para ello fue DIFFRAC.TOPAS (Bruker, Alemania). El método de Rietveld se utiliza para el refinamiento de una estructura cristalina y consiste en un ajuste teórico del patrón de difracción, aplicando un modelo que incluye factores estructurales. Dicho análisis produce un modelo de estructura cristalina, refinado, para todas las fases presentes en la muestra, permitiendo la cuantificación de éstas.

### 3.3.3 Análisis termogravimétrico (TGA)

El análisis termogravimétrico se realizó para investigar la estabilidad térmica de las HAPS obtenidas. Los análisis se realizaron en el equipo TGA Q50 V20.10 Build 36 (Thermal Analysis, Estados Unidos). Cada muestra de aproximadamente 9 mg fue calentada en un rango de 50 a 800 °C, a una velocidad de 10 °C/min. El flujo de nitrógeno gas de la muestra correspondió a 60 ml/min, mientras que el gas de balance, a 40 ml/min.

### 3.3.4 Microscopía electrónica de barrido, acoplada con espectroscopía de rayos X dispersiva (SEM-EDX)

Para evaluar la morfología de las muestras, en conjunto con su composición química elemental superficial, se utilizó el microscopio electrónico Phenom Pro X (Thermo Fisher Scientific, Estados Unidos), equipado con filamento de CeB<sub>6</sub>, un detector de electrones secundarios (SD) y retrodifundidos (BSD). Adicionalmente posee un analizador de composición mediante energía dispersiva de rayos X (EDS). Para cada medición, se depositó una muestra sobre papel aluminio y se impregnó sobre un porta muestras de 1,2 cm de diámetro, recubierto con una película de carbono adhesivo. Mediante aire a presión, se retiró el material no adherido previo a insertar la muestra en el equipo.

### 3.3.5 Picnometría de gases

El picnómetro de gases se utilizó para medir la densidad y el volumen específico de las muestras de HAPS. El análisis fue llevado a cabo en el equipo AccuPyc II

1340 Series (Micromeritics, Estados Unidos). El gas empleado correspondió a nitrógeno, con una presión de llenado de purga igual a 19,5 psig. La velocidad de equilibrio fue de 0,005 psig/min, mientras que la cantidad de ciclos fue de 5. La medición fue llevada a temperatura ambiente. Cada medición fue realizada en triplicado.

### 3.3.6 Texturómetro

Se utilizó el equipo TA.XT Plus (Stable microsystems, Reino Unido) para realizar pruebas de compresión de las muestras. Se empleó una celda de carga de 30 Kg.f. y se agregaron muestras de 0,2 mL a un contenedor cilíndrico confinado de 10 mm de diámetro a temperatura ambiente que fueron comprimidas utilizando una sonda de 10mm de diámetro (P/10 Delrin, con un área de contacto equivalente a 78,54 mm<sup>2</sup>). Se registró la fuerza en Newton (N) y la distancia en milímetros (mm). Para la determinación de la pendiente entre fuerza y distancia, y la fuerza máxima se consideraron valores de fuerza hasta los 2 mm de compresión. El valor medio de los resultados obtenidos en cada grupo experimental fue analizado en Excel, calculando sus desviaciones estándar. Cada medición fue realizada en triplicado.

## 3.4 Bioactividad de HAPS in vitro

### 3.4.1 Cultivo de células mesenquimales gingivales

Las células mesenquimales de origen gingival, obtenidas de pacientes sanos, fueron cultivadas en DMEM (por la sigla en inglés de *Dulbecco's modified eagle medium*) suplementado con 10 % de suero fetal bovino (SFB), 1% piruvato de sodio y 1 % penicilina-estreptomicina (DMEMsup) en una atmósfera húmeda con 5 % CO<sub>2</sub> a 37 °C (Figura 2). El medio de cultivo fue cambiado cada 2 días, hasta cuando las células alcanzan una confluencia sobre el 80-90 %. Posteriormente, las células fueron des adheridas de la placa utilizando trypLE Gibco (Thermo Fisher, Estados Unidos) y sembradas en placas de 96 pocillos fondo plano, para medir viabilidad y proliferación, o en placas de 4 pocillos, para inducir su diferenciación.

### 3.4.2 Viabilidad y proliferación celular

Las células se cultivaron en DMEMsup en presencia HAPS (Hidroxiapatita obtenida a partir de protocolo 1, 2 y 3), con una concentración de 200 µg/ml, y se evaluó su viabilidad y proliferación a las 24 y 48 horas. Como controles se

utilizaron células en cultivo sin ningún biomaterial, células en presencia del aloinjerto OraGRAFT® (considerado como *gold standard* para cirugías osteogénicas) y xenoinjerto bovino Bioss® (también utilizado en cirugías osteogénicas). Para esto se utilizó una sal de tetrazolio (MTT, por la sigla en inglés 3-(4, 5-dimethyl-2-thiazolyl)-2, 5-dimethyl tetrazolium bromide). El kit utilizado correspondió al *CellTiter 96 non-Rad Cell Prolif Assay* (Promega Corporation, Estados Unidos). Para esto, luego de 24 o 48 h, se cambió medio por 100  $\mu$ L de DMEMsup fresco y se añadió 15  $\mu$ L de “Dye solution” a cada pozo. Las células fueron incubadas durante 4 horas en oscuridad, en una atmósfera húmeda con 5 % CO<sub>2</sub> a 37°C. Posteriormente, se agregaron 100  $\mu$ L de “Solubilization/Stop solution” y se incubó 1 hora a 4°C. La lectura se realizó midiendo la absorbancia a 570 nm en un espectrofotómetro, utilizando una onda de referencia a 700 nm. Los resultados fueron expresados en cantidad de células (N° de células), utilizando una curva de calibración realizada previamente. Cada prueba fue realizada en triplicado.

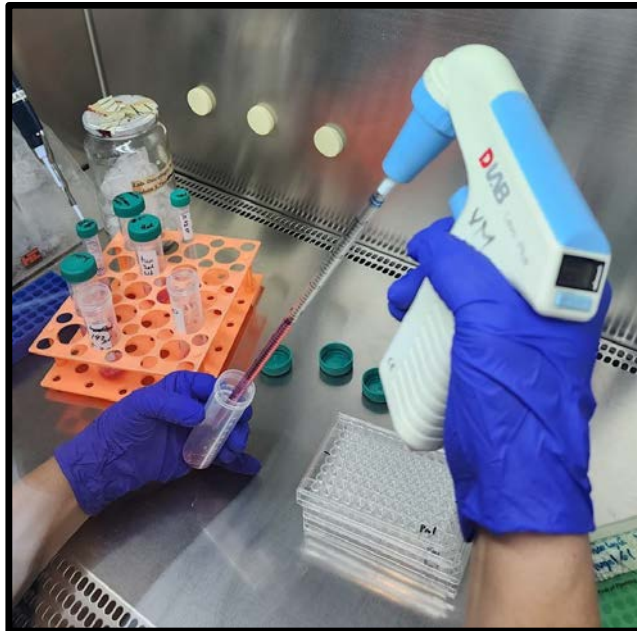


Figura 2. Técnica de sembrado celular para la etapa de evaluación de proliferación y diferenciación celular.

### 3.4.3 Diferenciación celular

Las células se cultivaron en medio de diferenciación (DMEM suplementado con 50  $\mu$ g/mL de ácido ascórbico, 3mM fosfato sódico y 100 nM dexametasona) durante 21 días en presencia de HAPS, durante los cuales se realizó recambio de medio cada 2 días. Como controles se utilizaron células sin diferenciar, células sin ningún

biomaterial, células en presencia del aloinjerto OraGRAFT® *gold standard* y células en presencia xenoinjerto bovino Bioss®. Finalizado los 21 días, los depósitos de calcio generados por las células diferenciadas fueron detectados utilizando Rojo de alizarina (40 mM). Se tomaron imágenes utilizando un microscopio óptico con un aumento de 10x.

### 3.5 Evaluación de microestructura adecuada para manejo clínico de HAPS

#### 3.5.1 Diseño experimental estadístico para la estimación de la porosidad del biomaterial

Este diseño experimental tuvo como objetivo producir HAPS bajo condiciones que permitan determinar el proceso de manufactura de esta e identificar porosidad adecuada para su manejo clínico. Se seleccionaron la temperatura en la operación de calcinación y el tiempo de molienda en la trituración del biomaterial como los factores de este diseño, mientras que su variable respuesta fue el volumen específico vacío ( $V_{espV}$ ) y tamaño de partícula ( $\mu\text{m}$ ) del biomaterial a partir de las distintas condiciones planteadas. Dicho volumen fue calculado a partir de la Ecuación 2.

$$V_{espV} = \frac{\text{Volumen de la muestra} - \text{Volumen específico de la muestra}}{\text{Masa de la muestra}}$$

Ecuación 2. Fórmula de volumen específico vacío.

El  $V_{espV}$  puede ser relacionado con la porosidad de HAPS, ya que representa el volumen vacío o fracción de huecos del biomaterial por cantidad de masa. El volumen de la muestra engloba el volumen “ideal” de la muestra, obtenida cuando el material es contenido en un recipiente de volumen conocido. Por otro lado, el volumen específico de la muestra corresponde al valor entregado por el picnómetro de gas (inverso de la densidad), que considera la porosidad externa del material. Además, se midió la distribución de tamaño de partícula de HAPS, mediante un set de mini tamices manual (Sigma Aldrich, Estados Unidos).

El modelo fue creado a partir el programa Statgraphics 16.1.03 (Statpoint Technologies Inc., Estados Unidos), mediante un diseño de experimentos factorial  $3^2$ , de superficie de respuesta. Se especificaron 2 factores experimentales. El diseño seleccionado tuvo 12 ejecuciones, con una muestra para ser tomada en cada ejecución y 3 puntos centrales. Los experimentos se muestran a continuación, en la Tabla 3.

N° de experimentos	Factores		Variables de respuesta
	Tiempo (s)	Temperatura (°C)	
12	2-10	800-1000	$V_{espV}$ (cm <sup>3</sup> /g) Tamaño de partícula de HAPS (µm)

Tabla 3. Diseño de experimento de optimización de proceso de manufactura de hidroxiapatita.

Para complementar los datos obtenidos, se evaluó morfología y microestructura de HAPS mediante microscopía de luz polarizada (DM500, Leica, Alemania) acoplada a una cámara digital (ICC50 W, Leica, Alemania). Las imágenes se obtuvieron utilizando un aumento de 4x utilizando el software LAS EZ (Leica).

### 3.5.2 Combinación con L-PRF y uso en contexto clínico

Se produjeron HAPS a partir de los 3 protocolos seleccionados con microestructura ajustada y adecuada a partir de los datos obtenidos en la sección 2.5.1, y se evaluó en contexto clínico, mezclando las HAPS con I-PRF (por su sigla en inglés, *injectable platelet-rich fibrin*) y L-PRF. El objetivo de este estudio fue formar una sustancia llamada “*Sticky Bone*”, similar a la obtenida al juntar I-PRF y L-PRF con los productos comerciales utilizados en los tratamientos para ortodoncia osteogénica acelerada. Se utilizó I-PRF en este proceso, ya que aporta concentraciones elevadas de factor de crecimiento vascular endotelial, transformante  $\beta$ , y derivado de plaquetas, entre otras proteínas que inician y coordinan el proceso óseo reparativo (7) y L-PRF, ya que es rico en proteínas, como fibronectina y vitronectina, y se utiliza para hidratar injertos y biomateriales. Para esto se extrajeron de 4 a 8 tubos de sangre, de 10 ml cada uno, a través de una venopunción, y se centrifugaron antes de que coagulasen espontáneamente a 1200 RPM, por 12 minutos, a 70° de inclinación en una centrífuga modelo IntraSpin (Intra-Lock, España), para obtener plasma correspondiente al I-PRF (3 minutos de centrifugado), separado del coágulo sanguíneo, el cual corresponde al L-PRF (12 minutos de centrifugado). Dicho coágulo fue comprimido para formar membranas delgadas que, en la práctica, se usan para cubrir el injerto en el paciente durante la cirugía, pero puesto que este estudio fue una prueba pre-clínica, sólo se evaluó la formación del *Sticky bone* formado a partir de la mezcla de HAPS con I-PRF y exudado de L-PRF, obtenido a partir de la compresión de las membranas. Se mezcló 1 gramo de cada muestra de HAPS con 1 ml de I-PRF

y 1 ml de exudado de L-PRF y se evaluaron los atributos de la mezcla formada según los criterios de manipulación del cirujano, hidrofobicidad, agregación y consistencia (Figura 3).

En el Anexo 2 se presenta la pauta de evaluación de HAPS en contexto clínico. El mayor puntaje obtenido para el biomaterial corresponde al valor de 20 puntos (puntaje total obtenido, si se consigue el valor más alto, es decir, 5 puntos, en cada uno de los criterios). El material *Gold Standard* utilizado como control, corresponde al aloinjerto OraGRAFT® y este tiene 20 puntos como puntaje total obtenido, ya que cumple satisfactoriamente con todos los atributos estudiados en el contexto clínico.

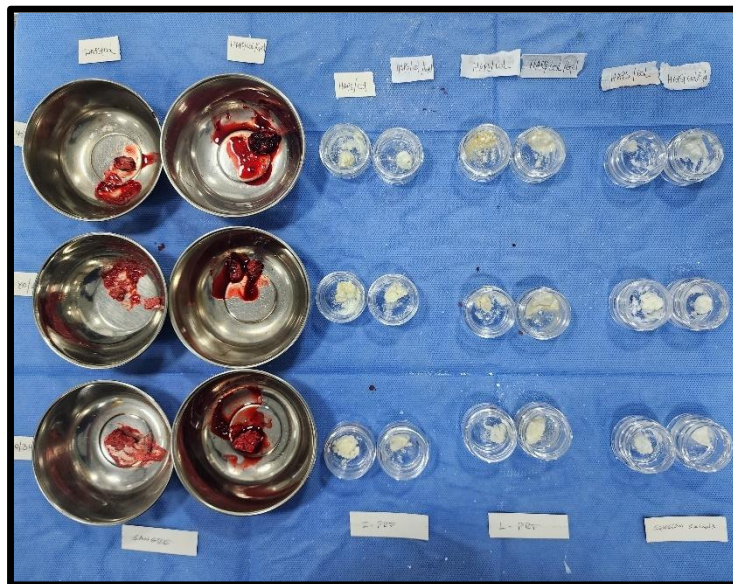


Figura 3. Pruebas de aglutinación con L-PRF y su rendimiento comparado con aglutinación en presencia de sangre no centrifugada, solución salina y agua destilada

### 3.6 Escalamiento de HAPS bajo condiciones parametrizadas

Esta etapa de la investigación consideró replicar el proceso de producción de HAPS a una escala 10X. El protocolo seleccionado para esto correspondió al protocolo 1, puesto que presentó mejores resultados en la caracterización con respecto a los otros protocolos de producción de HAPS, sin embargo, fue necesario ajustar los volúmenes de soluciones utilizadas en la etapa de desproteización y deslipidificación, en las cuales inicialmente se utilizaba una proporción fija de 1:30 (masa:volumen). Dado esto, se evaluaron las proporciones en la escala inicial (cc) 1X en las proporciones 1:30, 1:20 y 1:10 para determinar si el rendimiento y la pureza del material se veía afectado por la disminución de estas proporciones. Puesto que se obtuvieron los mismos resultados al disminuir



la proporción a 1:10, se utilizó esta última para la desprotección y en la deslipidificación, disminuyendo el volumen de residuos a generar durante el escalamiento. Adicionalmente, dado el aumento del volumen durante el escalamiento, fue necesario cambiar el método de agitación de un agitador magnético, previamente usado a menor escala, a un agitador vertical.

Finalmente, el biomaterial obtenido a partir del escalamiento se caracterizó con la misma metodología mencionada en la sección 3.3.

### 3.7 Bioactividad de HAPS *in vivo*

#### 3.7.1 Procedimiento quirúrgico

Para los siguientes experimentos se utilizaron ratas Sprague Dowley. Se llevó a cabo una aleatorización de 21 ratas macho sanas, las cuales fueron divididas en 3 grupos principales de 7 ratas cada uno. Se realizaron pruebas a los 15, 30 y 60 días, utilizando 7 ratas de cada grupo principal en cada intervención.

Para la cirugía de implantación de injertos, se dispuso anestesia con ketamina (100 mg/kg) y xilazina (10 mg/kg) vía intraperitoneal. Calculando la dosis dependiendo del peso del animal, se aplicó una concentración de 1  $\mu$ L de la mezcla de anestésico por cada gramo de peso del animal. La anestesia suministrada antes de realizar cualquier incisión fue una mezcla de isoflurano con oxígeno, mediante nebulización a través de una máscara facial. Además, se inyectó anestésico local en base a Lidocaína 2%, en concentración de 2 mg/kg vía subcutánea. Se monitorizó la profundidad de la anestesia a través del reflejo pupilar ausente y el reflejo de la extremidad ausente ante el pellizco de esta. Se protegieron los ojos con ungüento oftalmológico.

La cirugía contempló la realización una incisión lineal en la piel, previamente depilada siguiendo la proyección de la sutura media craneal utilizando bisturí con hoja 15 y retractores hasta lograr identificar y exponer el hueso parietal. Un solo defecto crítico de 5 mm de diámetro se generó utilizando un micromotor quirúrgico (NSK SurgiPro, Japón) con fresa redonda número #3, a una velocidad controlada de 800 rpm, bajo irrigación constante con solución salina estéril. Después de retirar el fragmento óseo procurando no perforar la duramadre, se rellenó el defecto en su totalidad con los diferentes tipos de injertos óseos (C-0: Control Negativo, E-1: Hidroxiapatita de origen sintético (SHA) (Sigma Aldrich®, Alemania), E-2: Xenoinjerto de origen porcino (PHA) (The Graft, Pure Biologics, Estados Unidos), E-3: Xenoinjerto de origen bovino (BHA) (Mineross Cortical X, Biohorizons, Estados Unidos), E-4: Aloinjerto humano (HHA) (OraGraft Mineralized Cortical, Lifenet Health, Estados Unidos), E-5 Xenoinjerto de salmón (SAHA). El control negativo consistió en no rellenar el defecto óseo con ningún tipo de injerto

óseo particulado para evaluar el proceso de regeneración natural. Los animales de control base no fueron intervenidos. Después del tratamiento quirúrgico, el tejido subcutáneo y piel fueron suturados con hilo de nylon 3.0 y se suministró medicación analgésica (Tramadol, 20 a 40 mg/kg) mediante vía subcutánea cada 12 horas, durante 48 horas, comenzando con la primera dosis en el momento de la anestesia. Además, se aplicó una profilaxis antibiótica (Enrofloxaciono, 10 mg/kg) subcutánea, cada 12 horas en dos dosis; una previa y otra postoperatoria. Los experimentos mencionados fueron autorizados por el Comité Ético Científico de la Universidad de los Andes.



Figura 4. Preparación del instrumental quirúrgico y del animal para la intervención quirúrgica consistente en el injerto óseo del defecto craneal crítico.

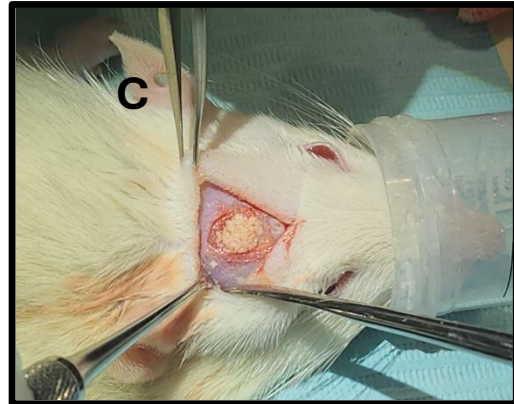
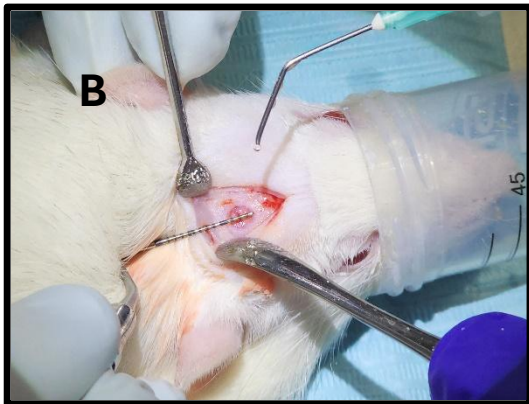
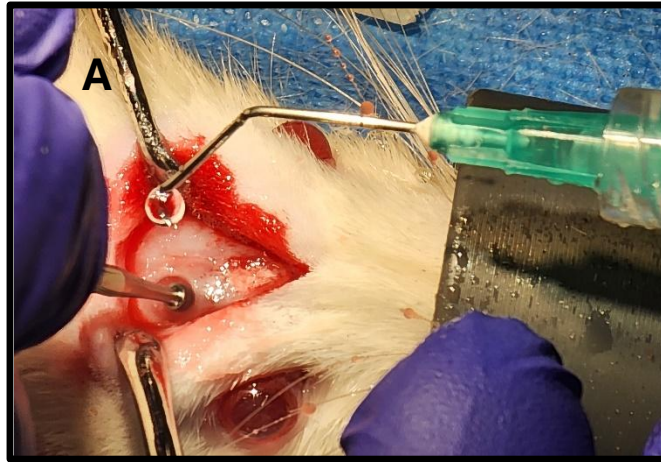


Figura 5. Secuencia de la intervención quirúrgica para el injerto del defecto crítico craneal en ratas. A) Creación del defecto crítico craneal mediante fresado quirúrgico. B) Medida del defecto crítico craneal. C) Instalación de injerto en base a HAPS en el defecto crítico craneal.

### 3.7.2 Análisis de biocompatibilidad

Se obtuvieron muestras de sangre prequirúrgicas, como control para el análisis bioquímico. Asimismo, se obtuvieron muestras pre-eutanasia a los 15, 30 y 60 días post quirúrgicos (10% volemia) ambos mediante la técnica de punción de vena safena, con aguja 20G. Esta técnica se utiliza para recolectar volúmenes de sangre bajo anestesia general con ketamina/xilazina (100/10 mg/kg). Se comenzó

posicionando al animal en decúbito supino y luego se puncionó en la parte ventral de la pata trasera levemente por superior a la articulación, aspirando un volumen inferior a 10 cc por animal. Se realizaron análisis bioquímicos séricos para determinar el nivel sérico de proteína total, albúmina, bilirrubina total, aspartato aminotransferasa (AST), alanino aminotransferasa (ALT), fosfatasa alcalina, glucosa, colesterol, triglicéridos, nitrógeno ureico en sangre (BUN), ácido láctico deshidrogenasa, creatinina, sodio, potasio, cloruro, calcio, fósforo y magnesio. Los parámetros hematológicos que consisten en eritrocitos, leucocitos, neutrófilos, linfocitos, monocitos, eosinófilos, basófilos, hemoglobina, hematocrito y plaquetas se determinaron utilizando un analizador hematológico. También se midieron niveles de proteína C reactiva (PCR) para reconocer el estado del sistema inmune general de los animales. Las muestras de sangre recogidas, como se describe anteriormente, se centrifugaron durante 10 minutos a 1000 g. El plasma se almacenó a -80°C hasta que los análisis fueron llevados a cabo.

### 3.7.3 Análisis imagenológico

Para examinar la regeneración de los defectos óseos en ratas, se utilizaron imágenes tridimensionales de tomografía de haz cónico (ConeBeam CT) (Sirona Orthophos XG, España). Antes del examen, las ratas fueron eutanasiadas y trasladadas cuidadosamente, siguiendo todas las instrucciones de bioseguridad, a la ubicación del equipo de tomografía computada de haz cónico. Las imágenes obtenidas fueron evaluadas para determinar la densidad ósea en la regeneración del defecto óseo bajo distintos parámetros quirúrgicos experimentales, tanto en los límites del defecto, como en su parte central. Para el hueso cortical, se evaluaron y registraron el área transversal total (Tt.Ar), el área del hueso cortical (Ct.Ar), el grosor cortical (Ct.Th) y la fracción de hueso cortical (Ct.Ar/ Tt.Ar). Este proceso se repitió para los grupos eutanasiados a los 15 días (R1 a R7), 30 días (S1 a S7) y 60 días (T1 a T7), posterior a la cirugía.

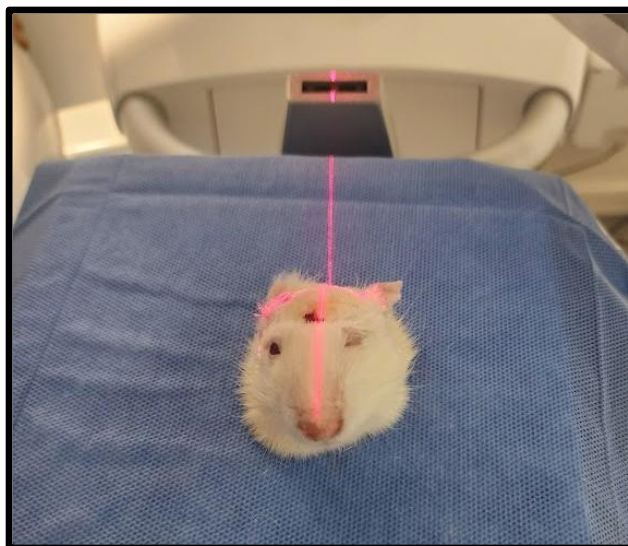


Figura 6. Adquisición de las imágenes del defecto óseo en cada uno de los especímenes utilizando Tomografía Computada de haz cónico (CBCT por sus siglas en inglés).

#### 3.7.4 Análisis histológico

Se llevó a cabo la fijación de muestras en formalina neutra al 10%, enjuagando con agua y descalcificación en una solución de ácido etilendiaminotetracético al 18%. Se dividió cada espécimen en dos bloques longitudinalmente, utilizando la línea central del defecto quirúrgico original. Luego, se seccionó a 10  $\mu\text{m}$  y se fijó en el portaobjetos de microscopía. Posteriormente, se llevó a cabo la tinción de las muestras con hematoxilina-eosina. El análisis de las muestras se realizó en un microscopio óptico acoplado a una cámara digital, siendo un solo examinador el responsable de capturar las imágenes. La formación de hueso dentro de los defectos se observó con aumento de 40x y 200x.

## 4. RESULTADOS

### 4.1 Optimización del proceso de producción de HAPS

A continuación, se presentan los resultados de la optimización inicial del proceso de producción de HAPS, en cuanto a rendimiento y caracterización del material obtenido mediante espectroscopía de Raman.

#### 4.1.1 Mejora operación de desproteínización

Para la operación de desproteínización, se obtuvieron los siguientes rendimientos:

Nº de experimento	Condiciones	Rendimiento (%)
1	C1-T1	12
2	C1-T2	6,0
3	C2-T1	7,8
4	C2-T2	-

Tabla 4. Rendimientos para obtención de hidroxiapatita a partir de esquelón limpio en fase de optimización de desproteínización.

Se determinó que, a una mayor concentración de solución alcalina (C2), el rendimiento del proceso disminuye. Además, al aumentar la temperatura (T1 a T2), en conjunto con un valor mayor de concentración (C2), el hueso de salmón precipita en forma de material particulado en la solución. Este resultado se atribuye a que el tratamiento alcalino, en combinación con altas temperaturas,

ablanda y rompe el hueso, perdiéndose la estructura característica de éste. Para el caso de la desproteínización a una temperatura T1, los huesos a simple vista no presentaron desintegración, por lo que el efecto de la temperatura podría ser preponderante en la ruptura de éstos.

Estos resultados sugieren que el efecto de la temperatura tiene una influencia abrupta en la extracción de proteínas del hueso de salmón, lo que se ve reflejado en la pérdida de masa de éste. Los resultados de rendimiento y espectroscopía de Raman para el experimento con la concentración de solución alcalina y temperatura más alta (C2-T2) no se presentan, dado su desintegración, descartando esas condiciones para el tratamiento de los huesos de salmón.

En la Figura 7 se exhiben los espectros de Raman resultantes de la optimización de la desproteínización.

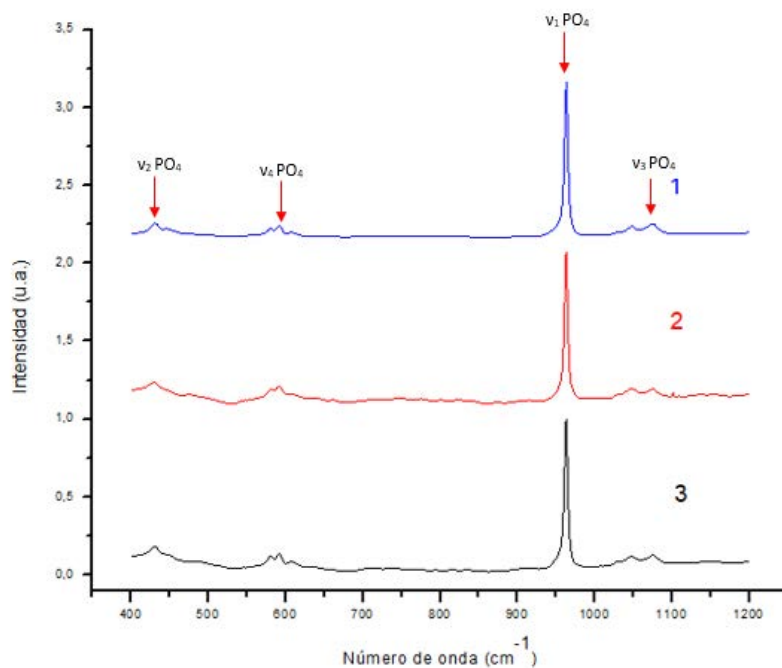


Figura 7. Espectros de Raman para HAPS de optimización de desproteínización (Las curvas corresponden a los experimentos 1,2 y 3, señalados en la Tabla 3).

Se observaron los 4 modos vibracionales asignados al grupo  $\text{PO}_4$  de apatita, los cuales corresponden a:  $v_2 \text{PO}_4$ , que se muestra en la posición 425 a  $430 \text{ cm}^{-1}$ ,  $v_4 \text{PO}_4$ , que se presenta entre la banda 569 y  $614 \text{ cm}^{-1}$ ,  $v_3 \text{PO}_4$ , correspondiente a la disposición entre  $1030$  y  $1076 \text{ cm}^{-1}$  y finalmente, el grupo  $v_1 \text{PO}_4$ , que está en la posición  $957$  a  $960 \text{ cm}^{-1}$ , aproximadamente, siendo este último, el peak característico de hidroxapatita (48). Cabe destacar que las bandas de carbonato, en apatita, se mantienen superpuestas con las de fosfato, inclusive en muestras ligeramente carbonatadas. El peak que se presenta en la zona de  $1077 \text{ cm}^{-1}$  es

una superposición del grupo carbonato  $v_1$  y el grupo fosfato  $v_3$  (Awonusi *et al.*, 2007).

En base a lo anterior, se propone probar con menores concentraciones de solución alcalina y mantener la temperatura T1 del proceso.

#### 4.1.2 Mejora operación de deslipidificación

Los rendimientos obtenidos para la optimización de deslipidificación son los siguientes:

Nº de experimento	Condiciones	Rendimiento (%)
1	S1-t1	17,8
2	S1-t2	17,7
3	S2-t1	16,0
4	S2-t2	17,0

Tabla 5. Rendimientos para obtención de hidroxiapatita a partir de esquelón limpio en fase de optimización de deslipidificación.

Se determinó que no existen mayores diferencias entre rendimientos. Con respecto al proceso de deslipidificación con S2, se generó mayor cantidad de impurezas en la calcinación. Esto podría deberse a que los lípidos extraídos con este solvente tendían a adherirse a las superficies circundantes y a decantar rápidamente, a pesar de realizar 2 lavados con dicho solvente. Luego de que las muestras fueran trituradas, para ser calcinadas posteriormente, se evidenció visualmente la presencia de este solvente en aquellas muestras en donde se utilizó.

Respecto del tiempo empleado, no se observaron mayores cambios en el rendimiento del proceso, por lo que éste, en primera instancia, no presenta mayor incidencia en la cantidad de lípidos extraídos en la operación.

Los espectros de Raman para las HAPS obtenidas en la optimización de la deslipidificación se presentan a continuación (Figura 8):



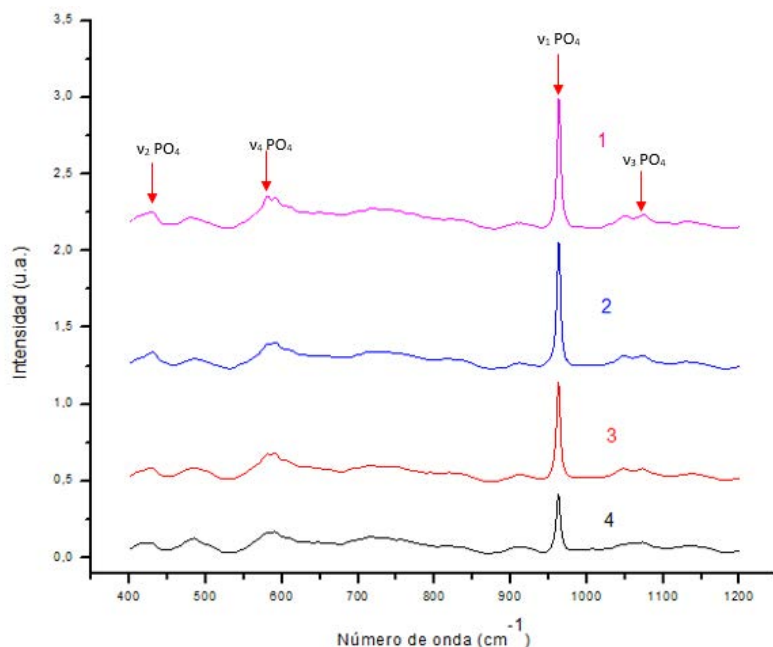


Figura 8. Espectros de Raman para HAPS de optimización de deslipidificación (Las curvas corresponden a los experimentos 1,2, 3 y 4, señalados en la Tabla 4).

Tal como se aprecia en la Figura 7, se observó gran similitud entre los peaks para hidroxiapatita producida a partir de las diferentes condiciones, además de los peaks de intensidad característica provenientes de los modos vibracionales del grupo fosfato ( $\nu_1$ ,  $\nu_2$ ,  $\nu_3$ ,  $\nu_4$ ). En base a los resultados, se descartó la deslipidificación con S2, dado que su uso fue más dificultoso, y que no se observó diferencia en los rendimientos obtenidos entre éste con S1. Respecto a los espectros de Raman, tampoco se observaron diferencias, sin embargo, se destacó la presencia de un peak de intensidad en la posición  $910 \text{ cm}^{-1}$  más marcado para los procesos con S2 y un peak de hidroxiapatita menos intenso que para las muestras con S1. En cuanto a tiempos de operación, no se presentaron mayores diferencias entre espectros, sin embargo, el espectro en donde se utilizó S2, se notaron peaks de intensidad que podrían corresponder a impurezas, en la banda  $738 \text{ cm}^{-1}$  (8).

Dado esto, se propuso usar el solvente S1 para la deslipidificación, utilizando el menor tiempo de operación ( $t_1$ ).

#### 4.1.3 Mejora operación de calcinación

Los resultados para la optimización de la operación de calcinación se presentan a continuación:

Nº de experimento	Condiciones	Rendimiento (%) (g de hidroxiapatita obtenida/ g de esquelón limpio)
1	t3-T1	18,9
2	t2-T1	18,9
3	t1-T1	19,0
4	t3-T2	18,0
5	t2-T2	18,0
6	t1-T2	18,8
7	t3-T3	18,0
8	t2-T3	18,0
9	t1-T3	18,0

Tabla 6. Rendimientos para obtención de hidroxiapatita a partir de esquelón limpio en fase de optimización de calcinación.

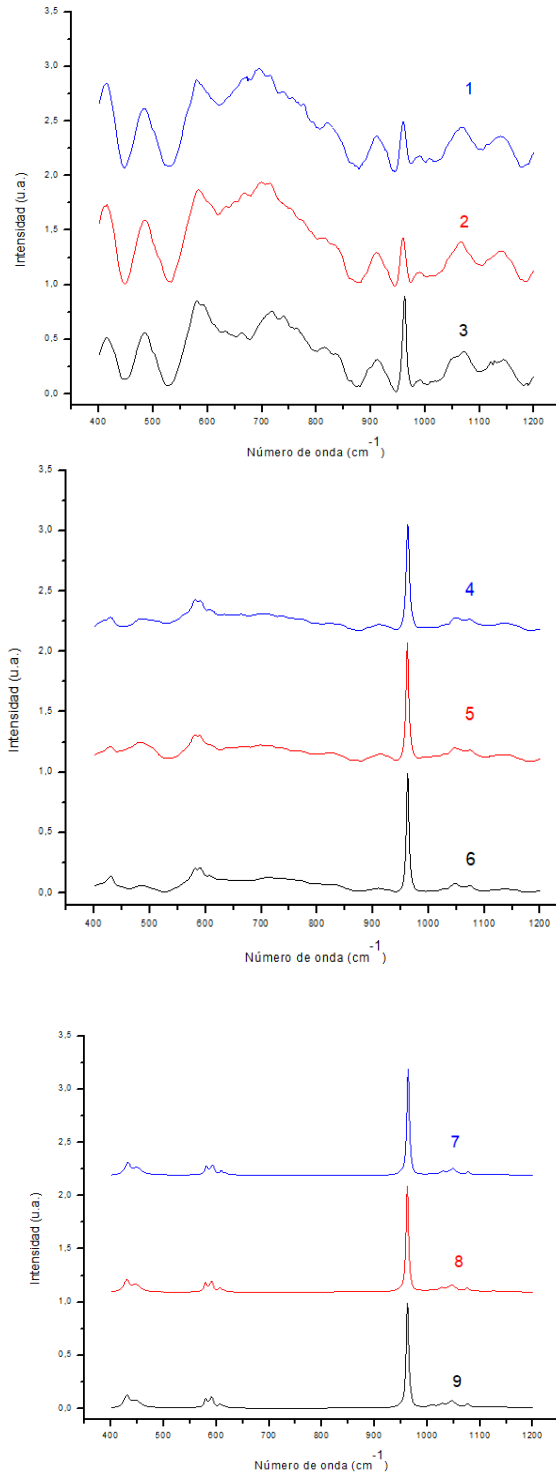


Figura 9. Espectros de Raman para HAPS de optimización de calcinación. (Las curvas corresponden a los experimentos 1,2, 3,4, 5,6,7,8 y 9, señalados en la Tabla 6).

En cuanto a los rendimientos obtenidos, para cada uno de los experimentos, éstos no presentaron mayores variaciones entre sí. El peak de intensidad característica

de HAPS se observó en todas las muestras en la posición reportada anteriormente. La variable tiempo no influyó, aparentemente, en la formación de HAPS, pues los espectros no presentaron mayores diferencias entre sí a una temperatura dada y en todos se presentaron los peaks característicos de la estructura de hidroxiapatita. Por otro lado, la temperatura sí tuvo un efecto en la pureza de HAP, observándose un espectro más definido al aumentar la temperatura (T3). Estos resultados son consistentes con aquellos obtenidos para HAPS proveniente de huesos del pez Carpa (*Cyprinus carpio*) (9).

Puesto que las diferencias en los espectros de Raman a diferentes temperaturas son grandes, se propuso volver a explorar estas temperaturas en el diseño experimental estadístico, utilizando el menor tiempo ( $t_1$ ).

En base a los resultados obtenidos, se pudo aumentar el rendimiento del proceso de un 16,6% a un 19,0 % lo que corresponde a aproximadamente un 15% de aumento además de acortar los tiempos de operación del proceso completo de 70 a 30h.

#### 4.2 Modelo de optimización de proceso de producción de HAPS

Como se explicó en la sección de metodología 3.2.2, para el diseño experimental estadístico se seleccionaron, a partir de los resultados de la optimización inicial, como variables principales la concentración de solución alcalina utilizada para la desproteínización y la temperatura de calcinación. La variable tiempo se fijó para ambas operaciones y la deslipidificación no fue incluida ya que ya se había seleccionado la condición óptima para este proceso en la optimización inicial.

##### 4.2.1 Resultado superficie respuesta para variable rendimiento

Se realizó un análisis de varianza para la variable de respuesta rendimiento mediante Statgraphics 16.1.03 (Statpoint Technologies Inc., Estados Unidos). La prueba de ajuste del modelo, mediante ANOVA (por sus siglas en inglés, *analysis of variance*), tiene un valor mayor a 0,05 ( $p > 0,05$ ), por lo que el modelo se ajusta a los datos experimentales. Se realizó una prueba de falta de ajuste para determinar si el modelo se ajusta a los datos con exactitud. Por lo general, un nivel de significancia de 0,05 es adecuado. En la Figura 10 se presenta el gráfico de superficie de respuesta para la variable mencionada.

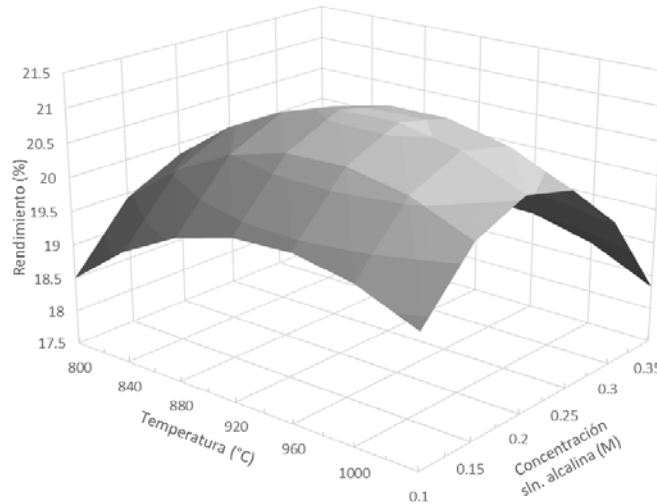


Figura 10. Gráfico de superficie de respuesta para Rendimiento.

La ecuación polinómica del modelo ajustado se presenta a continuación:

$$R = [-100,0 + 0,2 \cdot T + 25 \cdot C - 0,001 \cdot T^2 - 0,03 \cdot T \cdot C - 25,0 \cdot C^2]$$

Ecuación 3. Ecuación del modelo ajustado para rendimiento.

Donde:

R (%) =Rendimiento del proceso (biomaterial obtenido a partir de esquelón limpio).

T (°C) =Temperatura en la operación de calcinación.

C (M) =Concentración de solución alcalina en la operación de desproteinización.

#### 4.2.2 Resultado superficie respuesta para las variables concentración de hidroxiapatita y cristalinidad

Las muestras, procedentes de los experimentos del modelo estadístico, se caracterizaron mediante difracción de rayos X, para obtener más información de la composición de éstas y de la cantidad de hidroxiapatita contenida.

Nuevamente, se realizó un análisis de varianza para la variable de respuesta cantidad de hidroxiapatita y cristalinidad de la muestra. La prueba de ajuste, mediante ANOVA, tiene un valor mayor a 0,05 ( $p > 0,05$ ) para cristalinidad, por lo que el modelo es adecuado para los datos observados, sin embargo, el modelo no se ajustó para cantidad de HAPS. En la Figura 11 se presenta el gráfico de superficie de respuesta, para la variable que sí se pudo ajustar al modelo, es decir cristalinidad (%).

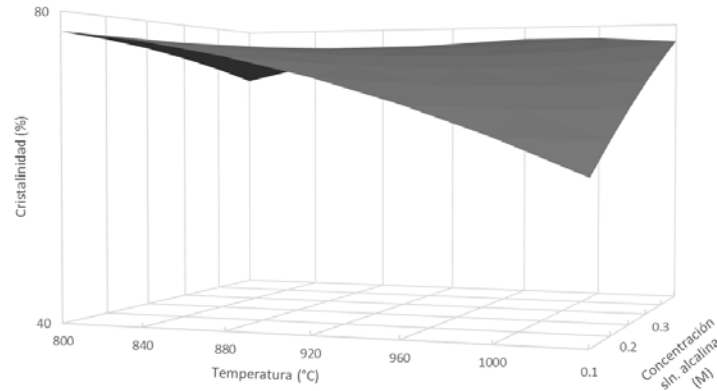


Figura 11. Gráfico de superficie de respuesta para cristalinidad.

$$Cristalinidad = [60,0 + 0,01 \cdot T - 301,0 \cdot C - 0,003 \cdot T^2 + 0,1 \cdot T \cdot C - 100,0 \cdot C^2]$$

Ecuación 4. Ecuación del modelo ajustado para cristalinidad

Donde:

Cristalinidad= Cantidad de materia no amorfa presente en el biomaterial (%)

T (°C) =Temperatura en la operación de calcinación.

C (M) =Concentración de solución alcalina en la operación de desproteización.

Para cristalinidad, maximizando esta variable, el valor óptimo corresponde a 78,3%.

A partir de estos resultados, se seleccionaron 3 HAPS, provenientes de 3 protocolos distintos, con rendimientos similares y distintas temperaturas en la operación de calcinación. Estos corresponden a:

Protocolo	Rendimiento (%)	Cantidad de Hap (%p/p)	Cristalinidad (%)
1	19,0	64,1	80,49
2	21,0	60,21	78,45
3	18,9	54,33	68,42

Tabla 7. Rendimiento, cantidad y cristalinidad de hidroxiapatita de los protocolos seleccionados.

Se seleccionaron las HAPS de los procesos mencionados, ya que, se mantiene la concentración de solución alcalina en la desproteización para todos, para así comparar entre muestras las diferencias que se presenten en los análisis posteriores, aludiendo solo a la temperatura de calcinación, siendo la mayor temperatura utilizada en el P1 y la menor en el P3.

### 4.3 Caracterización de HAPS obtenidas mediante procesos seleccionados

#### 4.3.1 Espectroscopía de Raman

En las siguientes figuras se presentan los espectros de Raman para las muestras de HAPS producidas a partir de los 3 protocolos.

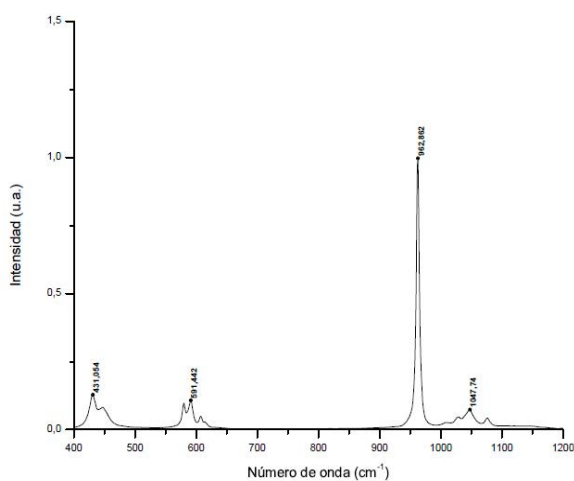


Figura 12. Espectro de Raman de HAPS obtenida mediante protocolo 1.

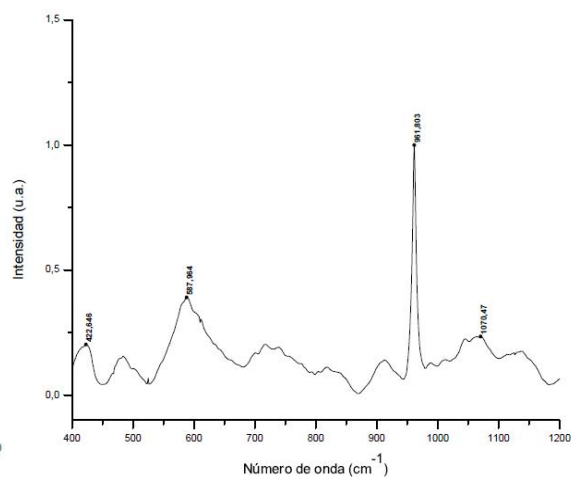


Figura 13. Espectro de Raman de HAPS obtenida mediante protocolo 2.

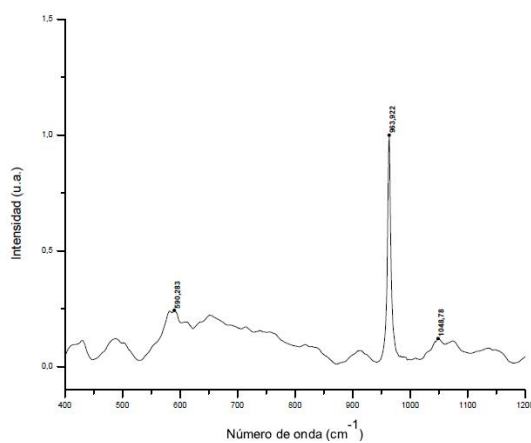


Figura 14. Espectro de Raman de HAPS obtenida mediante protocolo 3.

En la Tabla 8 se exhiben los peaks correspondientes a los grupos funcionales para hidroxiapatita.

Grupo funcional	Número de onda (cm <sup>-1</sup> )	Referencia
v <sub>1</sub> (PO <sub>4</sub> )	956-960	Londoño <i>et al.</i> (2019)
v <sub>2</sub> (PO <sub>4</sub> )	425-430	Londoño <i>et al.</i> (2019)
v <sub>3</sub> (PO <sub>4</sub> )	1030-1076	Londoño <i>et al.</i> (2019)
v <sub>4</sub> (PO <sub>4</sub> )	569-614	Londoño <i>et al.</i> (2019)
(CO <sub>2</sub> <sup>-3</sup> )	1073	Hammood <i>et al.</i> (2017)

Tabla 8. Grupos funcionales de cada peak para hidroxiapatita en espectro de Raman.

Se presentan los 4 modos vibracionales asignados al grupo fosfato (PO<sub>4</sub>) de apatita en cada uno de los espectros presentados (Figuras 12, 13 y 14), con peaks con formas más puntiagudas para el correspondiente a hidroxiapatita, producida mediante el protocolo 1, mientras que, para el biomaterial proveniente de los protocolos 2 y 3, se exhiben formas ruidosas, en conjunto con los peaks de la estructura de apatita. El peak que se presenta en la zona de 1070 cm<sup>-1</sup>, como se mencionó anteriormente, corresponde al peak del grupo carbonato que se superpone con el del grupo fosfato v<sub>3</sub>. La existencia del grupo carbonato en tejidos para injerto óseo es importante, puesto que se describe como el factor que permite simular la matriz extracelular, mejorando así, las características de osteointegración, biocompatibilidad y reabsorción (Nie *et al.*, 2017).

#### 4.3.2 Difracción de rayos X (XRD)

Los difractogramas de las muestras seleccionadas para caracterizar se muestran a continuación:

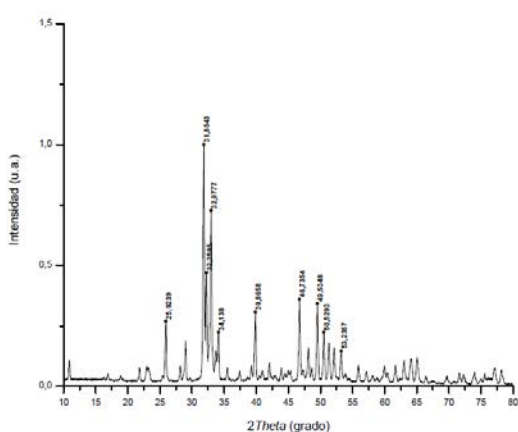


Figura 15. Difractograma de HAPS obtenida mediante protocolo 1.

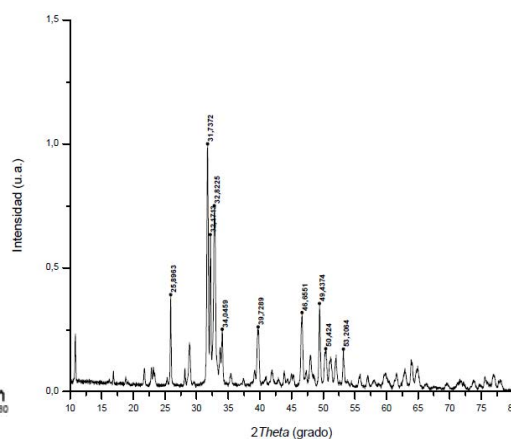


Figura 16. Difractograma de HAPS obtenida mediante protocolo 2.



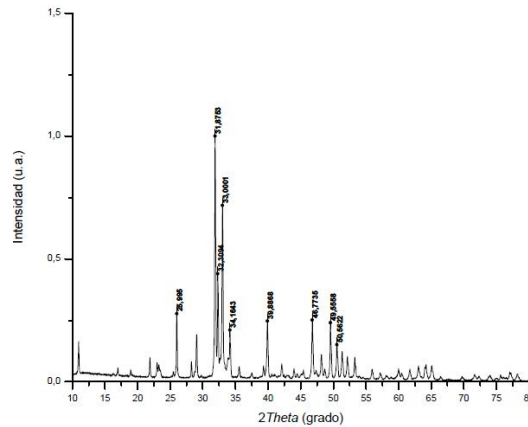


Figura 17. Difractograma de HAPS obtenida mediante protocolo 3.

A continuación, en la Tabla 9, se presentan los resultados cuantitativos de la muestra:

Protocolo/ Composición	Hap (Ca <sub>5</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>3</sub> (OH)) (% p/p)	β-renanita (β-NaCaPO <sub>4</sub> ) (% p/p)	Óxido de calcio (CaO)(% p/p)	Óxido de magnesio (MgO) (%p/p)	Material Amorfo
1	64,10	15,40	0,99	-	19,51
2	60,21	14,33	1,91	2,00	21,55
3	54,33	12,62	1,33	0,14	31,58

Tabla 9. Resultados cuantitativos de las HAPS obtenida mediante difracción de rayos X.

Según la difractografía obtenida para cada muestra, los peaks se presentaron en formas agudas, sugiriendo la remoción de materia orgánica después de calcinar, a las temperaturas dadas (10). Según Barua *et al.* (11), el ancho de los peaks de los espectros decrece a medida que se aumenta la temperatura de calcinación, mejorando la cristalinidad de las muestras, la cual también se intensifica. Los resultados anteriores también fueron congruentes con los obtenidos en la investigación de Resmim *et al.* (12). En el presente estudio, lo anterior se puede aplicar a que, la materia amorfa disminuye conforme se aumenta la temperatura utilizada en la calcinación. Todas las muestras analizadas presentaron una fracción de β-renanita, en menor cantidad que Hap. A medida que se aumentó la temperatura en la operación de calcinación, se obtuvo mayor cantidad de hidroxiapatita formada, y a su vez, menor cantidad de material amorfo. Las principales diferencias radican en las proporciones de óxido de calcio (CaO), óxido de magnesio (MgO) y material amorfo. Qing *et al.* (13) concluyeron que el CaO es el responsable de la carbonatación de la muestra, demostrando que una mayor cantidad de dicho compuesto aumentaba la intensidad de los peaks de ion

carbonato ( $\text{CO}_3^{2-}$ ) en el análisis térmico diferencial. La aparición de CaO se puede deber a la descomposición de hidroxiapatita en dicha molécula, pues la relación Ca/P aumenta por la liberación de grupos carbonato del sitio del grupo fosfato en la estructura de la apatita (14). La existencia del grupo carbonato en tejidos para injerto óseo permite simular la matriz extracelular (15), sin embargo, a una mayor cantidad de CaO, se exhibió una matriz lisa y compacta, perdiendo la microestructura del mineral (13). Por lo tanto, en base a lo anterior, la hidroxiapatita producida debe contener cantidades proporcionadas de óxido de calcio, que no interfieran en la estructura de ésta, pero que, a su vez, promueva la formación de grupos carbonato. En el estudio de Haberko *et al.* (16) se analizó el comportamiento de hidroxiapatita proveniente de hueso de cerdo con calcinación a elevadas temperaturas, en presencia de dióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ) y oxígeno ( $\text{O}_2$ ). Se encontró que bajo la atmósfera de  $\text{CO}_2$ , la descomposición de hidroxiapatita se detiene, evitándose la presencia de CaO libre y la disminución de grupos carbonato, mientras que aquellas muestras calcinadas con  $\text{O}_2$ , a elevadas temperaturas, emiten CaO y  $\text{CO}_2$ , manteniendo la estructura típica de Hap.

Por su lado, el MgO, por su naturaleza alcalina, puede neutralizar el Ph en el proceso de degradación del biomaterial, llevando a un proceso tisular, débilmente alcalino, localmente, que promueve el crecimiento de osteoblastos. Por otro lado, a un nivel molecular, los iones de  $\text{Mg}^{+2}$  están involucrados en varias reacciones enzimáticas en las células e indirectamente, puede estimular la mineralización celular al producir un aumento en la actividad de los fosfatos alcalinos (17). Adicionalmente, se ha demostrado que la incorporación de MgO en matrices de ácido poliláctico (PLA, por su sigla en inglés, *polylactic acid*) puede, significativamente, incrementar la actividad de osteoblastos, otorgando una buena fase fisiológica para la regeneración de hueso (18), por lo que podría obtener el mismo efecto en materiales de hidroxiapatita. Por las razones mencionadas anteriormente, es que los iones de  $\text{Mg}^{+2}$  han sido incorporados en varias matrices cerámicas para biomateriales, mejorando la bioactividad e integración al cuerpo humano, de éstas, transformando al MgO en una fuente interesante de dicho ion, altamente aplicable en superficies para dispositivos biomédicos.

#### 4.3.3 Análisis termogravimétrico (TGA)

A continuación, se presentan los resultados del análisis termogravimétrico realizado a las HAPS obtenidas mediante los 3 protocolos seleccionados para caracterizar.

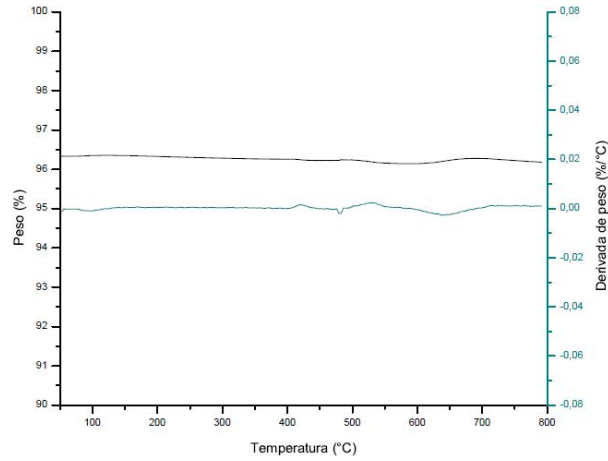


Figura 18. TGA de HAPS obtenida mediante protocolo 1.

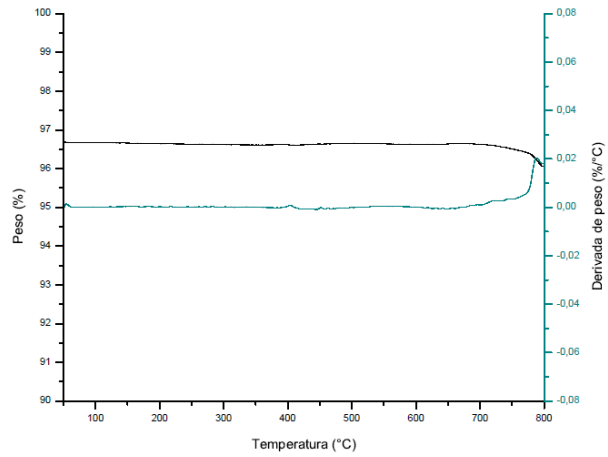


Figura 19. TGA de HAPS obtenida mediante protocolo 2.

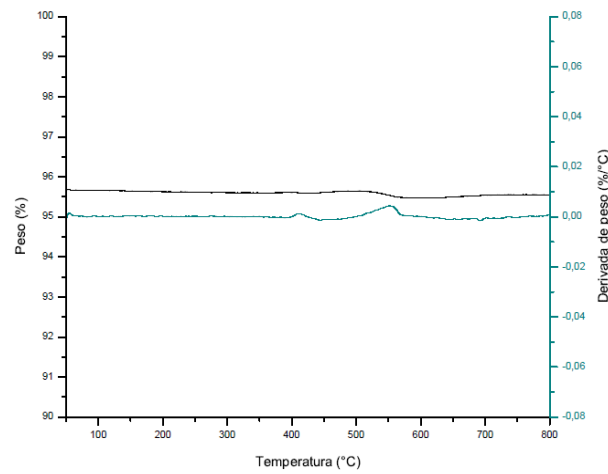


Figura 20. TGA de HAPS obtenida mediante protocolo 3.

El análisis termogravimétrico de la muestra fue realizado para conocer la estabilidad térmica de la hidroxiapatita producida a través de un rango de

temperaturas dado, el cual, para estos ensayos, varió de los 50 a los 800 °C. Según Mondal *et al.* (19), la pérdida de masa del rango de temperatura que va desde los 400 a los 500 °C, se debe mayoritariamente a la combustión de materia orgánica remanente y al comienzo del proceso, la disminución de masa se puede explicar por la eliminación de agua adsorbida en la superficie. Para la hidroxiapatita de los protocolos seleccionados no se evidenció pérdida de masa significativa, sin embargo, se pudo notar una pequeña variación desde la temperatura de los 500 a los 600 °C, tanto para el protocolo 1, como para el 2, que podría apuntar a la combustión de trazas de materia orgánica remanente en el biomaterial. Lo anterior confirma que la hidroxiapatita producida es térmicamente estable, y está libre de fracción orgánica y agua, por lo que se encuentra en su forma pura (20). Lo mencionado también indica que las muestras están libres de materia orgánica como colágeno, lípidos, sulfato de condroitina y sulfato de queratina (21).

La hidroxiapatita producida a partir del protocolo 3, presentó pérdida de masa a partir de los 720 °C aproximadamente, la que se hizo más notoria a medida que se aumentó la temperatura hasta los 800 °C. Lo anterior puede estar relacionado a que la hidroxiapatita producida mediante el protocolo 3, aún mantenía trazas de materia orgánica en su estructura, puesto que se calcinó a la temperatura más baja entre las propuestas.

#### 4.3.4 Microscopía electrónica de barrido, acoplada con espectroscopía de rayos X-dispersiva (SEM-EDX)

Las 3 HAPS de los protocolos seleccionados fueron enviadas a microscopía SEM-EDX. A continuación, se muestran los resultados del análisis de las muestras de hidroxiapatita a partir de los distintos protocolos.

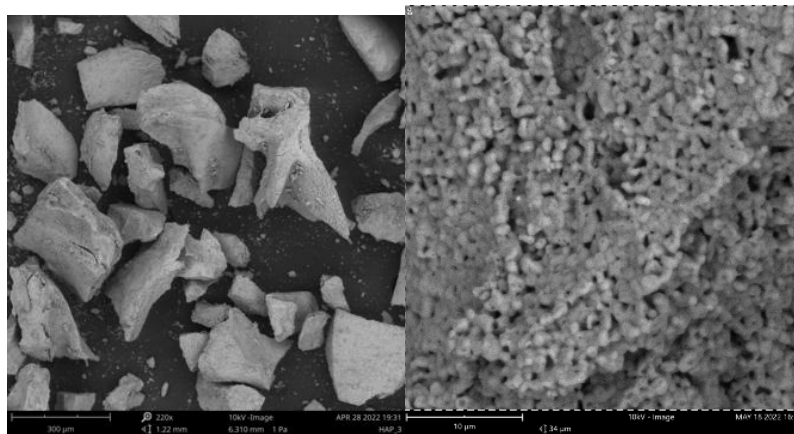


Figura 21. SEM de hidroxiapatita de protocolo 1, a menor y mayor aumento, respectivamente.

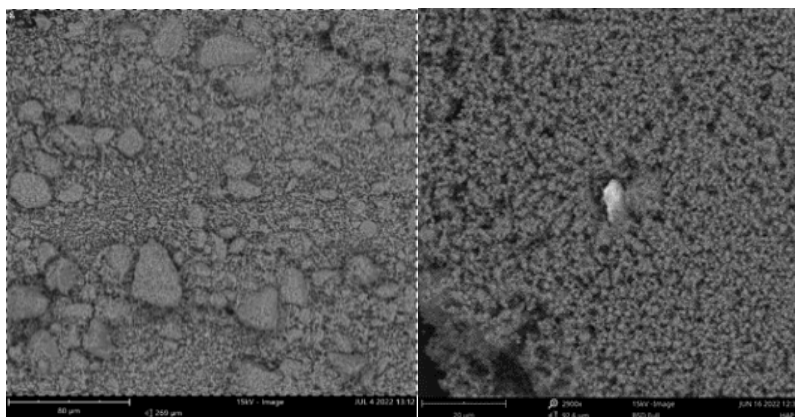


Figura 22. SEM de hidroxiapatita de protocolo 2, a menor y mayor aumento, respectivamente.

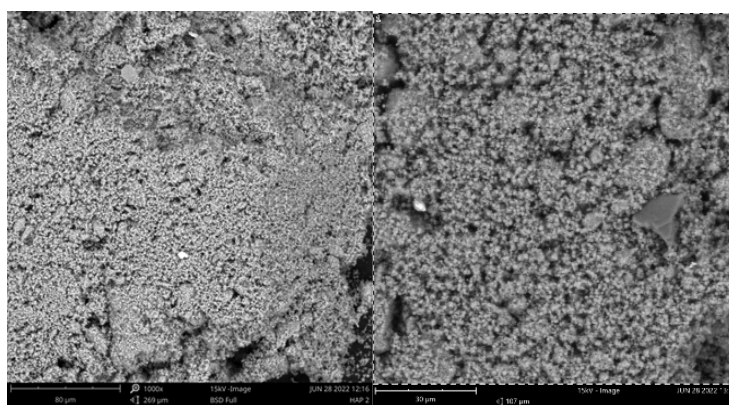


Figura 23. SEM de hidroxiapatita de protocolo 3, a menor y mayor aumento, respectivamente.

Además, se presenta la composición elemental local, extraído a partir del análisis EDX, en la Tabla 10.

<b>Símbolo químico/ Concentración atómica (%p/p)</b>	<b>Protocolo 1</b>	<b>Protocolo 2</b>	<b>Protocolo 3</b>
Ca	7,64	18,20	18,87
P	4,68	10,46	10,84
Ca/P	1,63	1,74	1,74

Tabla 10. Composición química de HAPS de protocolo 1, 2 y 3, mediante análisis EDX.

La relación Ca/P de las HAPS obtenidas bordea el valor estequiométrico de hidroxiapatita, el cual es 1,67.

Además de los elementos de la Tabla 10, se presentaron cantidades de C, O y otros elementos en cantidades inferiores, tales como Mg, Na, etc. El hueso es conocido como apatita biológica, contiene carbonato, y otros componentes iónicos

tales como Si, Mg, K, Sr, Zn, entre otros (22). La capacidad de producir hidroxiapatita de tejido óseo se ve reducida si dichos elementos no se encuentran presentes. A partir de lo anterior, la presencia de cationes y aniones en las HAPS obtenidas, las hace similares a hueso humano. Las sustituciones en la estructura de hidroxiapatita toman lugar en la posición de los iones de calcio, fosfato e ion hidroxilo. Los cationes sustituyen el ion  $\text{Ca}^{+2}$  y los aniones se ubican en la posición del grupo  $\text{PO}_4$  y  $\text{OH}^-$  (22).

Por su parte, el ion carbonato, en conjunto con el calcio y el fosfato, son los componentes naturales más abundantes del hueso. Esto hace que la hidroxiapatita carbonatada se parezca en cuanto a composición química al hueso natural. La hidroxiapatita carbonatada ha sido descrita como una biocerámica osteoconductiva y biodegradable, además, se ha demostrado que tiene mejor reabsorción que las partículas de hidroxiapatita pura.

#### 4.3.5 Picnometría de gases

Los resultados de densidad obtenidos se presentan en la siguiente tabla (Tabla 11):

N° de protocolo	Densidad ( $\text{g}/\text{cm}^3$ )	Volumen específico ( $\text{cm}^3/\text{g}$ )
1	$3,24 \pm 1,10$	$0,31 \pm 0,01$
2	$3,29 \pm 0,01$	$0,30 \pm 0,002$
3	$3,37 \pm 0,01$	$0,29 \pm 0,001$

Tabla 11. Densidad de las HAPS a partir de los protocolos seleccionados.

Las densidades registradas para la hidroxiapatita producida, a partir de cada uno de los protocolos, son bastante similares entre sí, las cuales, además, presentan semejanza con el valor de densidad teórica para dicho mineral, el cual corresponde a  $3,156 \text{ g}/\text{cm}^3$  (23). La densidad fue mayor para las muestras tratadas a menor temperatura. En la investigación de Rahimnia *et al.* (24), se midieron densidades de hidroxiapatita comercial, sintética y proveniente de fuente animal, mediante el método de Arquímedes. En dicho estudio se demostró que la densidad de los biomateriales aumentaba, acorde la porosidad disminuía. En base a esto la muestra calcinada a la misma temperatura de este estudio, podría ser la más porosa de las hidroxiapatitas producidas. Además, dicha muestra presenta la densidad que más se acerca al valor teórico para hidroxiapatita.

#### 4.3.6 Texturómetro

Se analizó la resistencia a la compresión de las muestras de cada protocolo mediante texturómetro. Las muestras se encontraban en formato en polvo, por lo

que no mantenían una forma dada. A continuación, se muestran los resultados obtenidos:

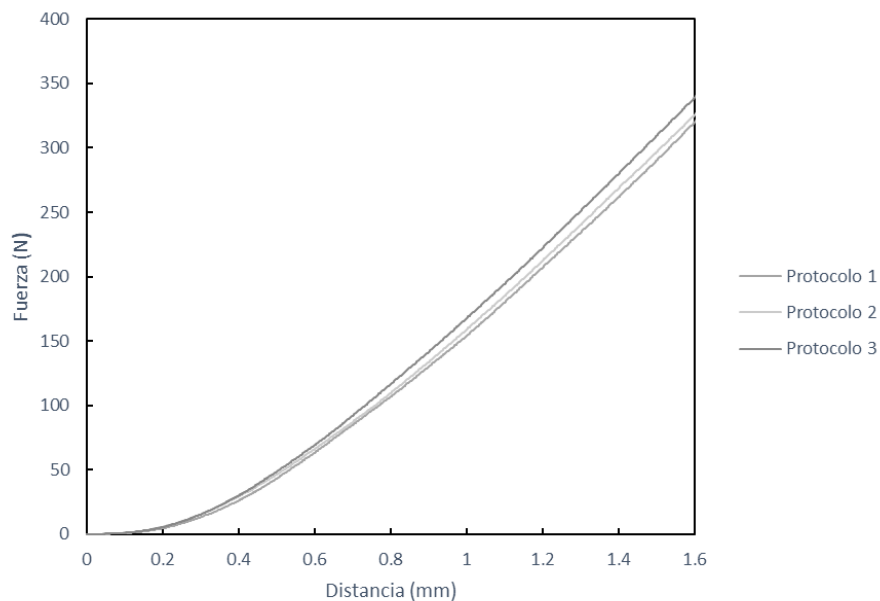


Figura 24. Resultados de compresión de las muestras obtenidas para cada uno de los protocolos.

A partir de los datos obtenidos, se consideraron 6 réplicas para cada protocolo. Las mediciones fueron realizadas con fuerza de compresión hasta los 2mm. Los cálculos de la pendiente, y determinación de fuerza máxima, fueron realizados considerando los datos desde los 0,5 hasta los 1,6 mm de compresión, y se presentan en la Tabla 12.

Muestra	Pendiente (N/mm)	Fuerza máxima (N)
Protocolo 1	264,07±8,55	320,60
Protocolo 2	265,77±14,76	326,26
Protocolo 3	273,84±11,31	339,55

Tabla 12. Pendiente y fuerza máxima obtenidos para los protocolos seleccionados

Según los resultados obtenidos, se evidenciaron valores de fuerza similares entre hidroxiapatita de los 3 protocolos hasta los 0,5 mm. Luego se presenta un incremento de la pendiente a medida que se aumenta la temperatura de calcinación en el proceso de producción de HAPS.

Anteriormente, se ha demostrado que la dureza depende de la porosidad estructural y de la presencia de otras fases en el biomaterial (20), mientras que, para el caso específico de hidroxiapatita, esta propiedad está conectada con cambios en la densidad (25). Generalmente, una baja porosidad, y medidas

pequeñas en el tamaño de partícula, incrementan las propiedades mecánicas del material (26). Lo anterior es congruente con los datos obtenidos para el análisis de densidad realizado, en conjunto con el de resistencia mecánica, puesto que, aquella muestra que presentó menor densidad (HAPS proveniente de protocolo 1), y, por ende, mayor porosidad, teóricamente, tuvo menor resistencia mecánica que las otras. Por lo tanto, una temperatura más alta, en la calcinación, en el proceso de producción de hidroxiapatita, puede interferir en la estructura resultante del biomaterial final, afectando su resistencia a la compresión, al presentar mayor porosidad.

#### 4.4 Bioactividad de HAPS *in vitro*

##### 4.4.1 Viabilidad y proliferación celular

En la Figura 25, se presentan los resultados obtenidos para viabilidad y proliferación celular a partir de ensayo con MTT.

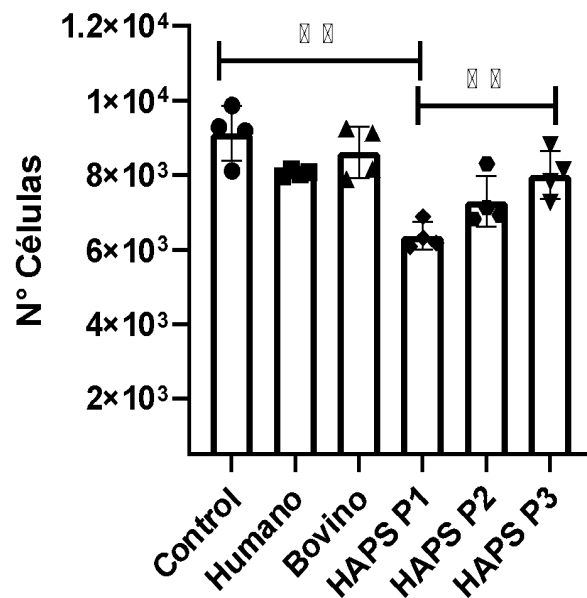


Figura 25. Resultados de viabilidad y proliferación celular obtenida en presencia de HAPS a las 24 h.\*\* representa diferencias significativas entre los grupos seleccionados ( $p < 0,01$ ).



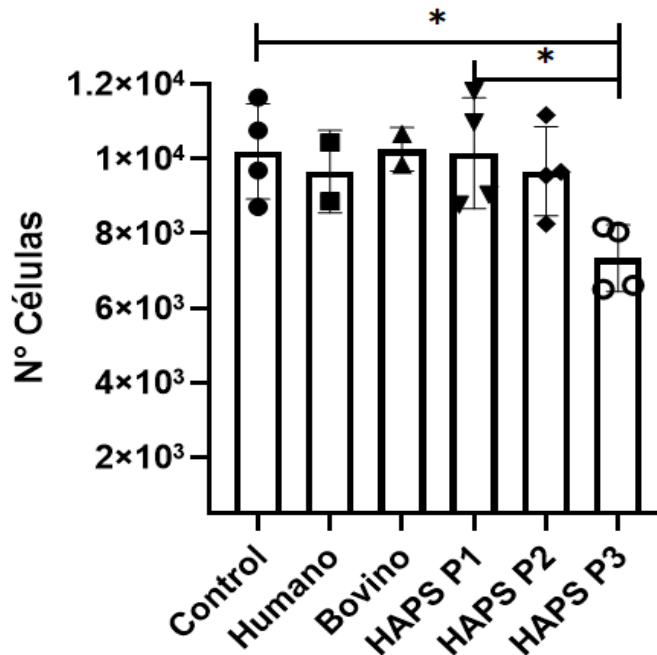


Figura 26. Resultados de viabilidad y proliferación celular obtenida en presencia de HAPS a las 48 h.\* representa diferencias significativas entre los grupos seleccionados ( $p < 0,05$ ).

La viabilidad celular es esencial para evaluar el potencial de HAPS como un tipo de material de reemplazo óseo. En la Figura 25, se observa que el número de células viables fueron similares entre todas las condiciones con excepción de HAPS P1, que presentó diferencias significativas con respecto al control y HAPS P3 ( $p < 0,01$ ) a las 24 horas. Luego, en la Figura 26, a las 48 horas, la viabilidad celular de HAPS cambió, observándose que las células tratadas con HAPS P3 no aumentaron en número en comparación con el experimento de 24 horas, mientras que las otras condiciones si aumentaron su viabilidad, llegando a un número de células similar entre sí. Estudios previos demostraron que la estructura física de la hidroxiapatita, la cual es cristalina, conlleva a una mejor adhesión y proliferación celular (27). Además, tal como se comprobó en los análisis EDX, en la caracterización de HAPS, el biomaterial producido contiene en su estructura elementos como Mg, Na, C y O, los cuales conforman iones minerales básicos, que estimulan la proliferación, diferenciación, y formación de tejido óseo (28).

Si bien, HAPS P3 mostró diferencias significativas con respecto a los controles y otras HAPS, a las 48 horas, el número de células viables siguió siendo aceptable, por lo que estos resultados sugieren que la hidroxiapatita producida a partir de hueso de salmón, considerado un desecho de la industria salmonera, tiene valor para el campo de la reparación ósea.

#### 4.4.2 Diferenciación celular

El potencial de diferenciación a tejido óseo es importante de evaluar, dado que de esta forma es posible determinar si las células mesenquimales tienen la capacidad de diferenciarse a osteoblastos, los cuales son células del tejido óseo especializadas en producir la matriz ósea, formado de cristales de Hap, compuesta principalmente por Ca y P. Las células osteoprogenitoras presentes en el paciente potencialmente pueden proliferar y diferenciarse a osteoblastos en presencia del injerto, por lo tanto, en base a lo anterior, el biomaterial debe tener actividad osteogénica y osteoinductiva, ya que debe estar relacionado con la formación de hueso, además de estimular y activar las células madre mesenquimales del tejido del huésped, respectivamente. Los resultados obtenidos respecto a la diferenciación celular en presencia de HAPS se presentan en las siguientes imágenes.

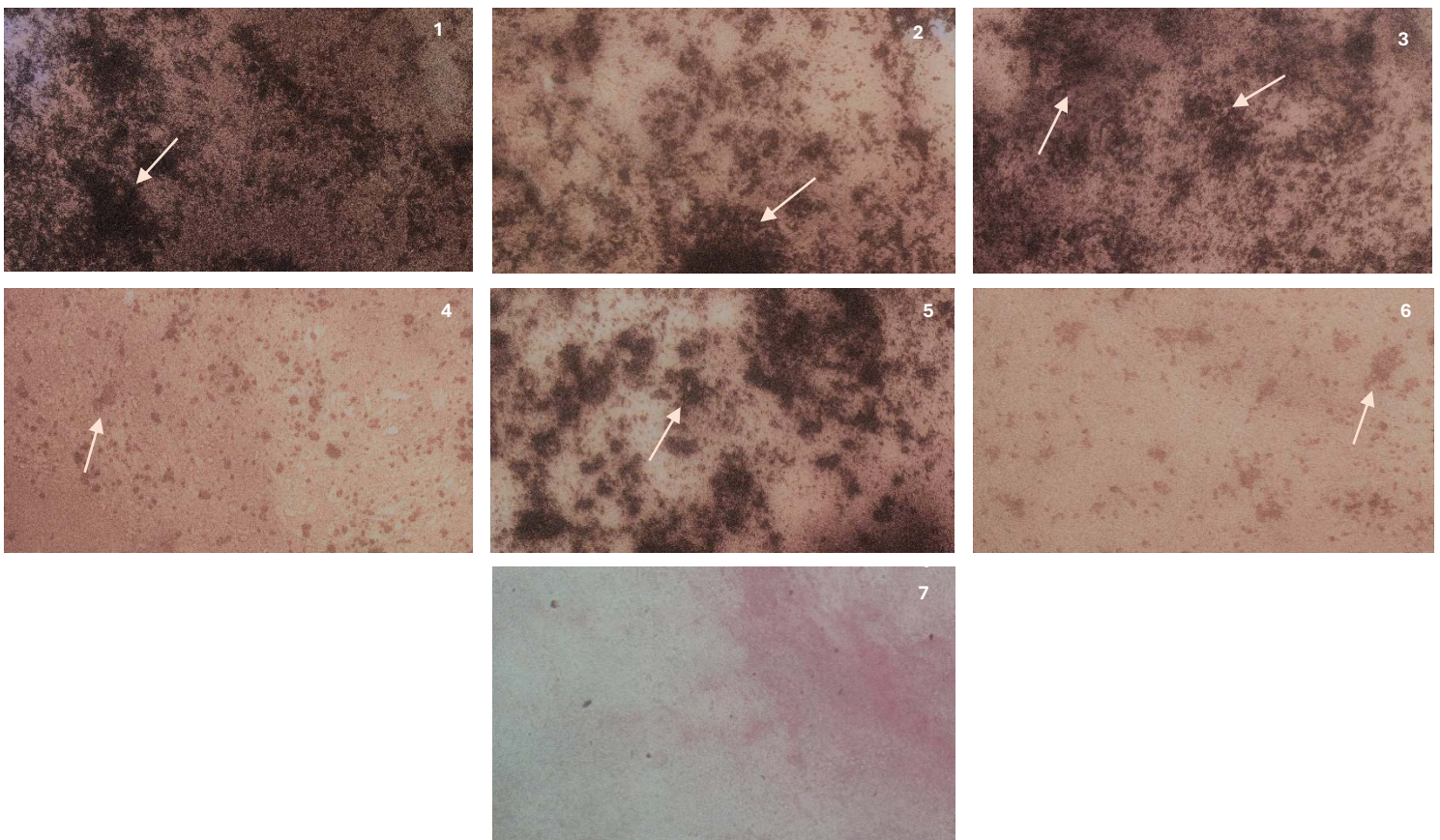


Figura 27. Imágenes (10x) de células mesenquimales después de 21 días de diferenciación teñidas con rojo de alizarina. Condiciones: en presencia de HAPS P1 (1), HAPS P2 (2), HAPS P3 (3), aloinjerto humano (4), xenoinjerto bovino (5), ausencia de biomaterial (6) y sin diferenciar (7). Las flechas indican depósitos de calcio en los diferentes cultivos.

A partir del ensayo de diferenciación celular llevado a cabo en presencia de los distintos HAPS, se determinó que los 3 protocolos de producción inducen la diferenciación de las células mesenquimales a osteoblastos, ya que se observa gran cantidad de depósitos de calcio (de coloración más oscura) aledaños a las células. Estos depósitos de calcio indican mineralización, producida sólo por células osteoblásticas, especializadas en producción de matriz ósea, por lo que se puede confirmar diferenciación celular con todas las condiciones. Tanto para HAPS P1, P2 y, en menor grado, para P3, ocurrió mineralización, bastante similar a la producida por el xenoinjerto de origen bovino, y mucho mayor que la del aloinjerto humano y las células diferenciadas en ausencia de algún material. Estos resultados muestran que los HAPS generados con cualquiera de los 3 protocolos son materiales osteoinductivos y sugiere que la diferenciación celular de células mesenquimales a osteoblastos fue posible en presencia de estos 3 materiales.

Es importante mencionar que inicialmente en el proyecto se propuso utilizar un ensayo de fosfatasa alcalina (enzima que participa en el proceso de mineralización de osteoblastos) para determinar el potencial de diferenciación de las células en presencia de las HAPS. Si bien este ensayo se encuentra en proceso en la actualidad, se decidió priorizar y realizar inicialmente el ensayo utilizando rojo de alizarina dado a que es un ensayo mucho menos complejo y más rápido, que nos permitió obtener una aproximación inicial del potencial osteogénico de las distintas HAPS.

#### 4.5 Evaluación de microestructura adecuada para manejo clínico de HAPS

##### 4.5.1 Diseño experimental estadístico para la estimación de la porosidad y tamaño del biomaterial

Se realizó un análisis de varianza para la variable de respuesta  $V_{\text{espV}}$ . La prueba de ajuste, mediante ANOVA, tiene un valor mayor a 0,05 ( $p > 0,05$ ) para dicha variable, por lo que el modelo es adecuado para los datos observados. A continuación, se presenta el gráfico de superficie de respuesta para volumen específico vacío.

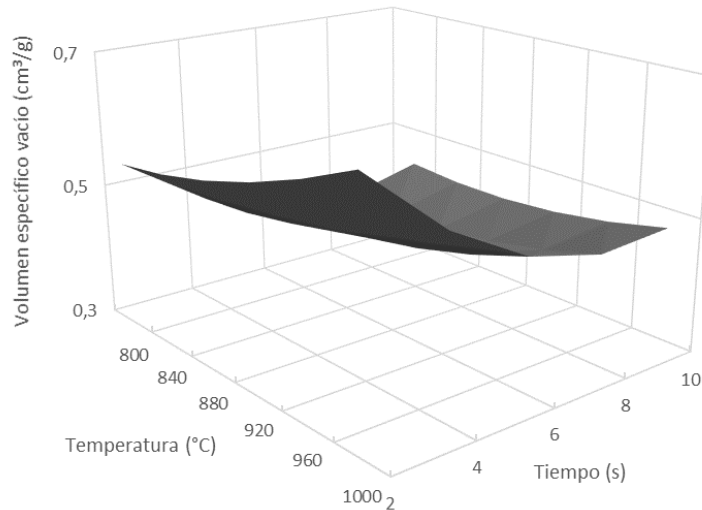


Figura 28. Gráfico de superficie de respuesta para volumen específico vacío.

$$V_{espV} = [1,0 - 0,0002 \cdot T - 0,003 \cdot t + 0,000003 \cdot T^2 - 0,00005 \cdot T \cdot t - 100,0 \cdot t^2]$$

Ecuación 5.+ Ecuación del modelo ajustado para volumen específico vacío.

Donde:

$V_{espV}$  = Volumen específico vacío del biomaterial ( $\text{cm}^3/\text{g}$ )

$T$  ( $^{\circ}\text{C}$ ) = Temperatura en la operación de calcinación.

$t$  (s) = Tiempo de molienda en la operación de disminución de tamaño del biomaterial.

A partir de los datos obtenidos fue posible determinar que para que el volumen específico vacío (“porosidad”) del biomaterial sea mayor, las condiciones de temperatura de calcinación y tiempo de molienda deben tener valores inversamente proporcionales. En este caso, el volumen específico calculado correspondió a la fracción de huecos presente en el biomaterial y representa el espacio vacío por unidad de masa, por lo que desde este punto se mencionará como porosidad del material.

Lo anterior es congruente con información obtenida anteriormente para este tipo de biomateriales, ya que aquellas muestras tratadas con una mayor temperatura en la operación de calcinación presentaron mayor porosidad, lo que previamente se había supuesto en base a las densidades extraídas con las pruebas en el picnómetro (sección 3.3.5). Por otro lado, el tiempo de molienda toma gran relevancia, puesto que la fracción de huecos o porosidad es más alta para la HAPS tratada en un menor tiempo en esta operación. El valor obtenido como el óptimo, para porosidad, es cercano a aquel reportado por Mbarki *et al.* (29), el cual

bordea el 70 % de porosidad para hidroxiapatita, situándolo como adecuado para células osteoblásticas humanas.

Los parámetros más utilizados en relación con los andamios óseos son la resistencia a la compresión y la porosidad. Se debe producir un biomaterial con tamaños de poros que permitan el transporte de células y iones, manteniendo el área superficial necesaria para la absorción de proteínas y adhesión de células osteoblásticas (30). La resistencia a la compresión del biomaterial también toma gran relevancia, ya que puede ser variada a partir de la porosidad, puesto que la HAPS con una mayor porosidad, presentó menor resistencia a la compresión en los análisis mecánicos (sección 3.3.6). En adición, la hidrofiliicidad aumenta a medida que el material es más poroso (31). La propiedad anterior es importante para que el material pueda ser usado en contacto con fluidos en un contexto clínico, ya que éste debe aglutinar en conjunto con el L-PRF, por lo que se requiere una buena absorción.

A continuación, se presentan los resultados para tamaño de partícula de HAPS:

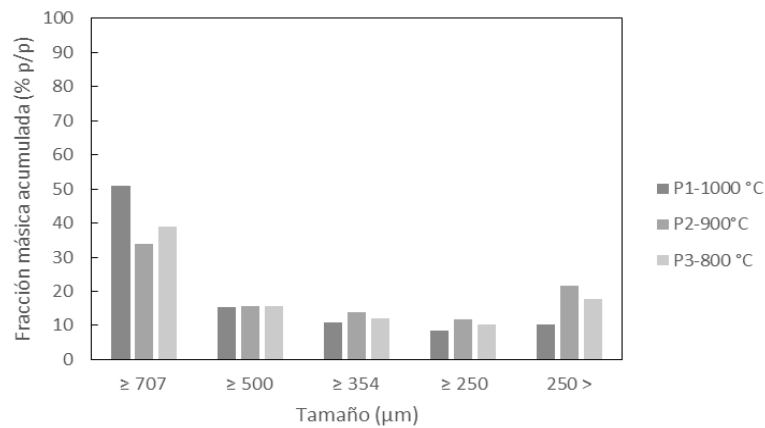


Figura 29. Distribución de tamaño HAPS con molienda de 2 s.

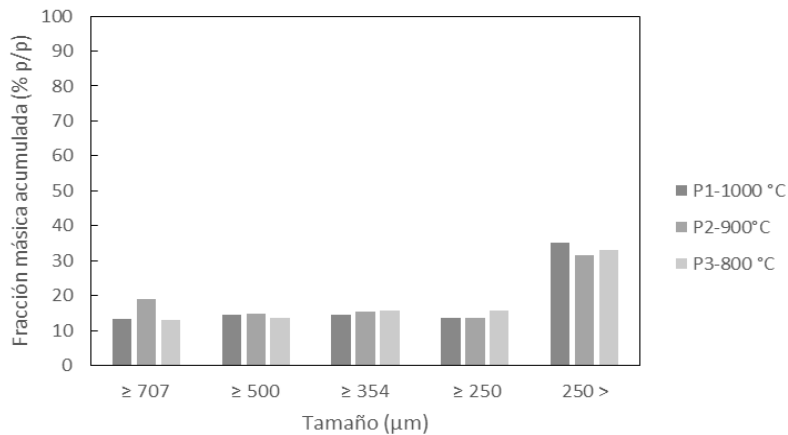


Figura 30. Distribución de tamaño HAPS con molienda de 6 s.

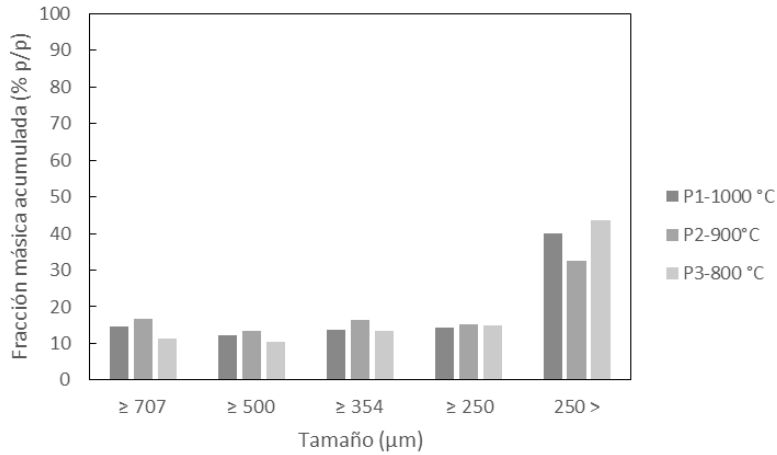


Figura 31. Distribución de tamaño HAPS con molienda de 10 s.

El tiempo de molienda resultó ser un parámetro importante en la microestructura de HAPS, pues a valores más altos de este factor, se obtiene mayor cantidad de HAPS con un tamaño menor a 250 μm. Los aloinjertos y xenoinjertos que se encuentran comercialmente disponibles toman una distribución de tamaño que va desde los 250 a 1000 μm, en base a esto, la distribución de tamaño de HAPS que más se asemeja es la obtenida mediante molienda de 2 s.

A continuación, se presentan las imágenes obtenidas por microscopía de luz polarizada, con molienda a 2 y 10 s.

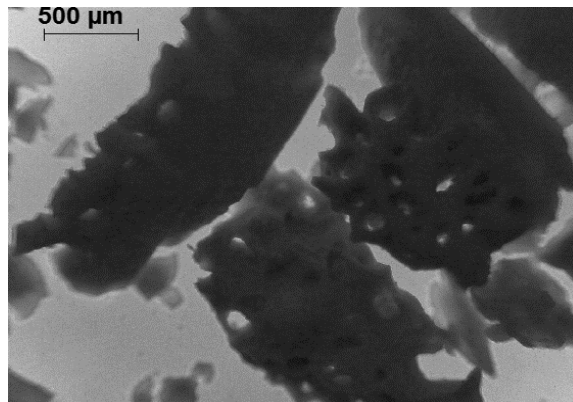


Figura 32. HAPS calcinada a 800°C, con molienda por 2 s.

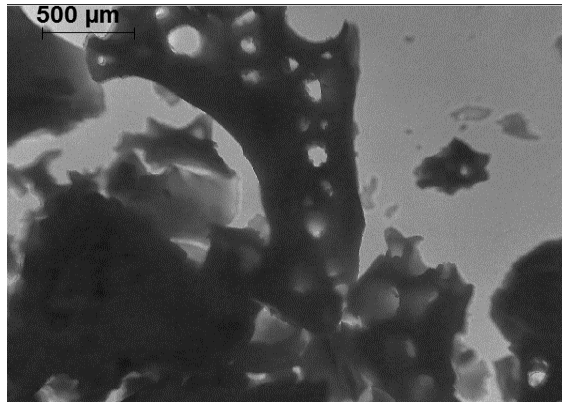


Figura 33. HAPS calcinada a 900°C, con molienda por 2 s.

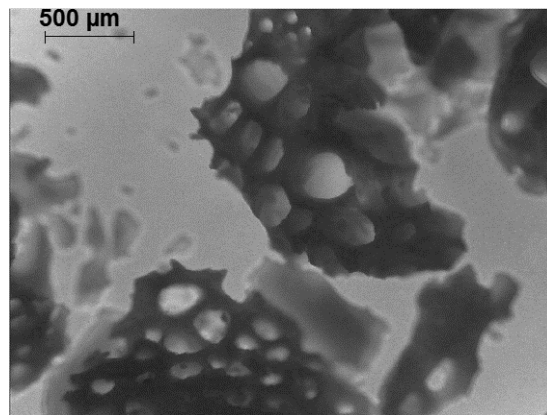


Figura 34. HAPS calcinada a 1000°C, con molienda por 2 s.

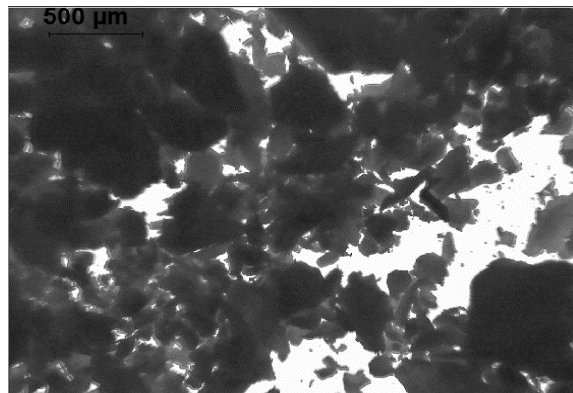


Figura 35. HAPS calcinada a 800°C, con molienda por 10 s.

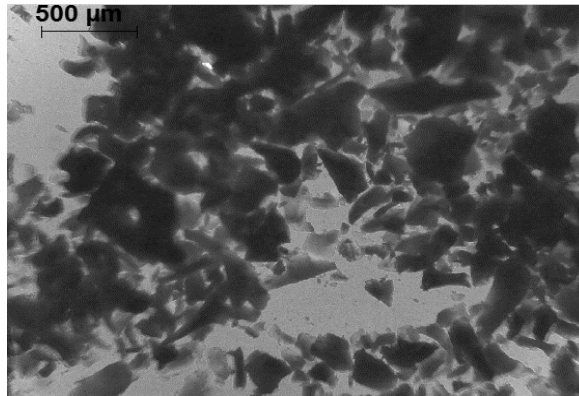


Figura 36. HAPS calcinada a 900°C, con molienda por 10 s.

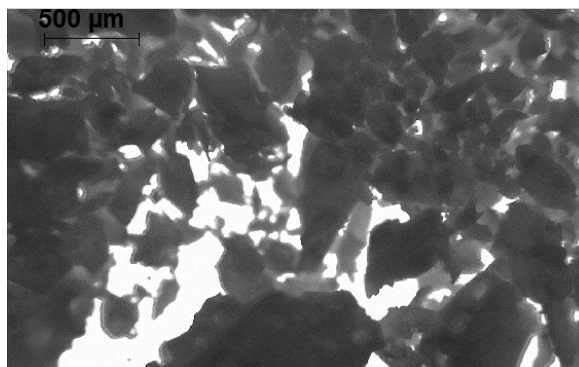


Figura 37. HAPS calcinada a 1000°C, con molienda por 10 s.

Se puede confirmar los resultados obtenidos por los otros métodos, observándose que, a un menor tiempo de molienda, mayor tamaño de partícula, manteniendo la porosidad del material, mientras que, a mayor tiempo de molienda, al ser los tamaños de partícula más pequeños, se pierde la porosidad del material (Figuras 32- 37).

Por lo tanto, a partir de los resultados anteriores, se estableció que la molienda por 2 segundos trae consigo una mejor microestructura, por lo que ésta fue la condición seleccionada para producir HAPS a partir de los protocolos anteriores (P1, P2, P3).

#### 4.5.2 Combinación de HAPS con L-PRF y evaluación de su uso en contexto clínico

A continuación, se presentan los resultados obtenidos para la prueba de las distintas HAPS en un contexto clínico:



Atributo	P1	P2	P3
<b>Manipulación del cirujano</b>	Es fácil de llevar a sitio quirúrgico, es posible darle forma deseada. Manipulación no dificultosa.	Es fácil de dar forma deseada en pequeñas porciones, fácil manipulación.	Es fácil de dar forma deseada en pequeñas porciones, fácil manipulación.
<b>Hidrofobicidad</b>	El material absorbe líquido.	El material absorbe líquido.	El material absorbe líquido.
<b>Agregación</b>	Se aglutina a los 5 min.	Material frágil, se aglutina en pequeñas porciones.	Material se aglutina, pero se separa fácilmente.
<b>Consistencia</b>	Firme, resiste a la presión.	Material blando.	Material firme que resiste poca presión.
<b>Puntaje total obtenido</b>	<b>20</b>	<b>15</b>	<b>17</b>

Tabla 13. Resultados de evaluación de HAPS en contexto clínico.

La HAPS obtenida mediante el protocolo 1 (más alta temperatura de calcinación), presentó calificación perfecta en la evaluación. Con esta hidroxiapatita no ocurrió pérdida de material al manipularse y se comportó como el injerto *Gold Standard*. Utilizando las HAPS P1 y P2 se observó exceso de I-PRF, ya que lo absorbieron, pero no en su totalidad. Adicionalmente, P1 y P2, no presentaron agregación completa, perdiéndose partículas de material. A pesar de lo anterior, HAPS P2 y P3 obtuvieron puntajes aceptables en la evaluación.

Finalmente, se presentan fotografías del uso de HAPS en contexto clínico.



Figura 38. HAPS P1 en contexto clínico.



Figura 39. HAPS P2 en contexto clínico.



Figura 40. HAPS P3 en contexto clínico.

Tal como se aprecia en las imágenes (Figura 38-40), HAPS P1 fue la hidroxiapatita que menos residuos, y por ende menos pérdidas, generó, dado a que esta formó un agregado casi en su totalidad en conjunto con el L-PRF. Luego le siguió P3 y finalmente P2, que presentó mayor dificultad para aglutinar y manipular, exhibiendo mayor cantidad de pérdida del material.

#### 4.6 Escalamiento de HAPS bajo condiciones parametrizadas

##### 4.6.1 Rendimiento de HAPS obtenido con proceso escalado

A continuación, en la Tabla 14, se presentan los rendimientos obtenidos para cada operación del proceso de producción de HAPS.

Operación/ Rendimiento (%)	1X	10X
Desproteización	83,5 ± 13,5	94,5 ± 6,1
Deslipidificación	90,5 ± 6,9	94,2 ± 2,5
Secado y trituración	42,1 ± 3,8	48,6 ± 3,1
Calcinación	60,2 ± 2,0	56,9 ± 1,4
<b>Rendimiento global</b>	<b>19,0 ± 0,4</b>	<b>24,6 ± 1,3</b>

Tabla 14. Resultados de rendimiento de HAPS 1X y 10X.

En base a los resultados obtenidos, se puede extraer que el rendimiento aumentó de un 19,0% a un 24,6% aproximadamente, manteniendo el tiempo de producción, equivalente a 30 horas.

#### 4.6.2 Difracción de rayos X

En las Figuras 41 y 42 se presenta el difractograma obtenido para HAPS 1X y 10X, respectivamente.

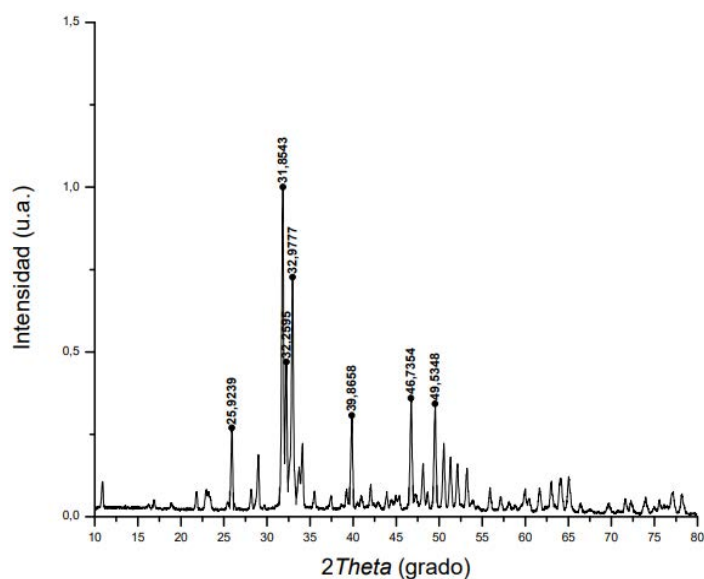


Figura 41. Difractograma de HAPS 1X.

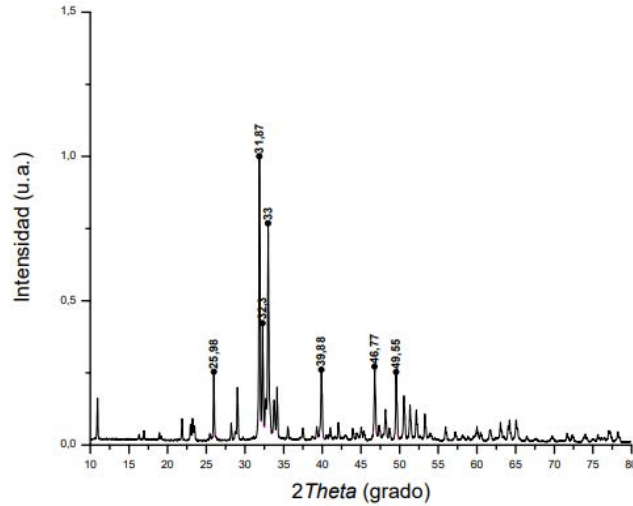


Figura 42. Difractograma de HAPS 10X.

Además, en la Tabla 15 se presentan las fases que componen el biomaterial obtenido.

Escala / Composición	Hap ( $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{OH})$ ) (% p/p)	$\beta$ -renanita ( $\beta\text{-NaCaPO}_4$ ) (% p/p)	Óxido de calcio (CaO) (% p/p)	Material Amorfo
1X	$57,5 \pm 6,5$	$17,5 \pm 2,7$	$0,8 \pm 0,7$	$24,2 \pm 7,1$
10X	$54,6 \pm 4,1$	$21,2 \pm 4,1$	$0,6 \pm 0,3$	$20,9 \pm 5,1$

Tabla 15. Composición de HAPS 1X y 10X.

En comparación con los resultados obtenidos anteriormente para HAPS a partir del protocolo 1, los difractogramas obtenidos fueron similares, presentando peaks agudos y característicos de hidroxiapatita, representando la cristalinidad del biomaterial. Por otro lado, el contenido de hidroxiapatita y otras fases dentro del biomaterial se mantuvo con respecto al producido inicialmente.

#### 4.6.3 Análisis termogravimétrico (TGA)

En las Figuras 43 y 44, se presenta el resultado del análisis termogravimétrico para HAPS 1X y 10X, respectivamente.

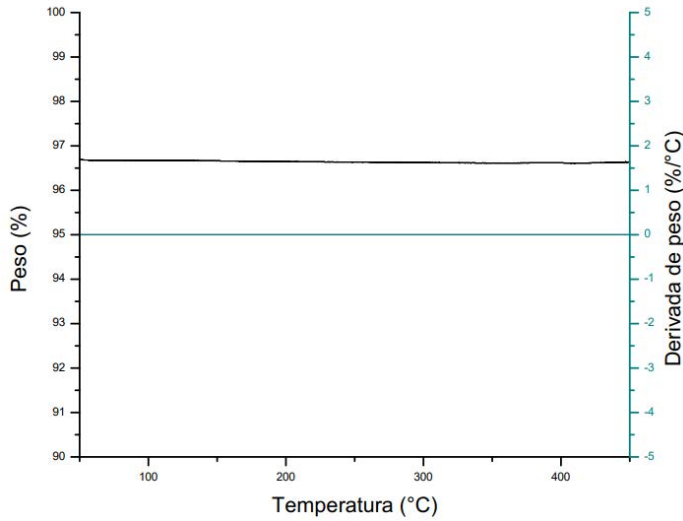


Figura 43. TGA de HAPS 1X.

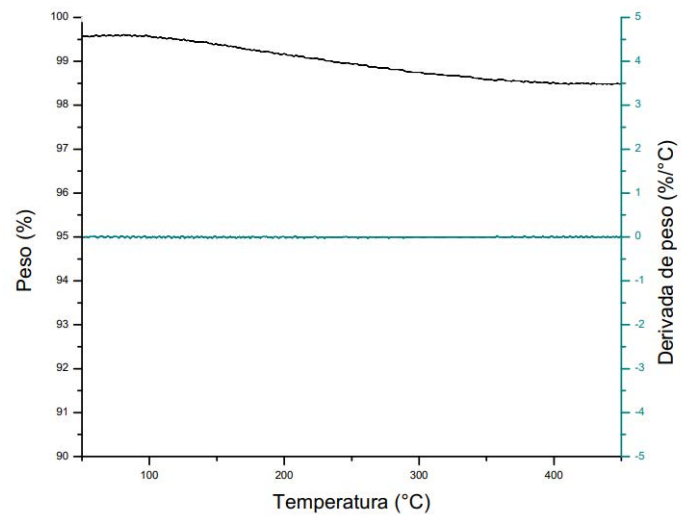


Figura 44. TGA de HAPS 10X.

Como se puede apreciar, los resultados indican que el peso de la muestra se mantuvo estable en el rango de temperatura dado (0 a 500 °C). Por lo tanto, la muestra estuvo libre de materia orgánica nuevamente.

#### 4.6.4 Microscopía electrónica de barrido, acoplada con espectroscopía de rayos X-dispersiva (SEM-EDX)

En la Figura 45 y 46 se presentan los resultados de microscopía SEM para HAPS 1X y 10X.

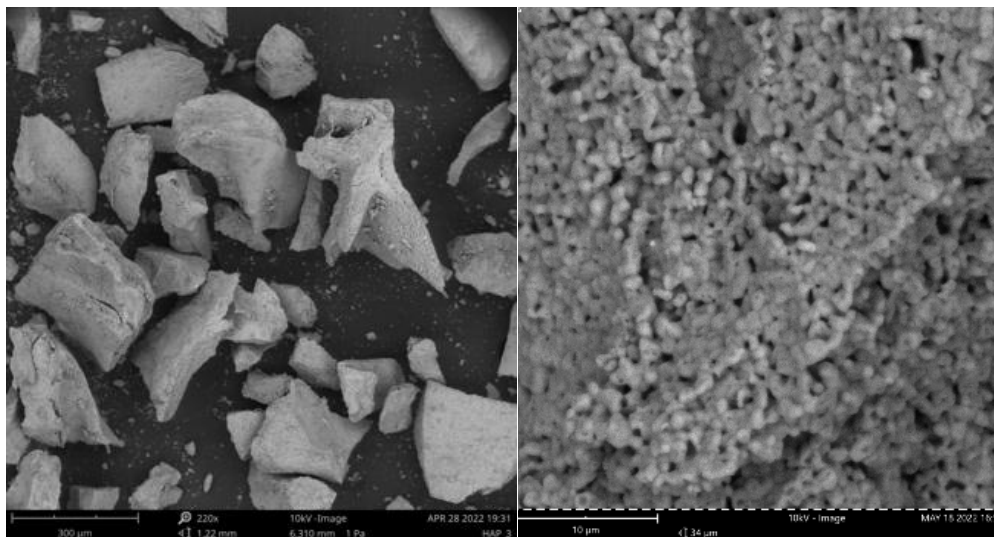


Figura 45. SEM de HAPS 1X, a menor y mayor aumento, respectivamente.

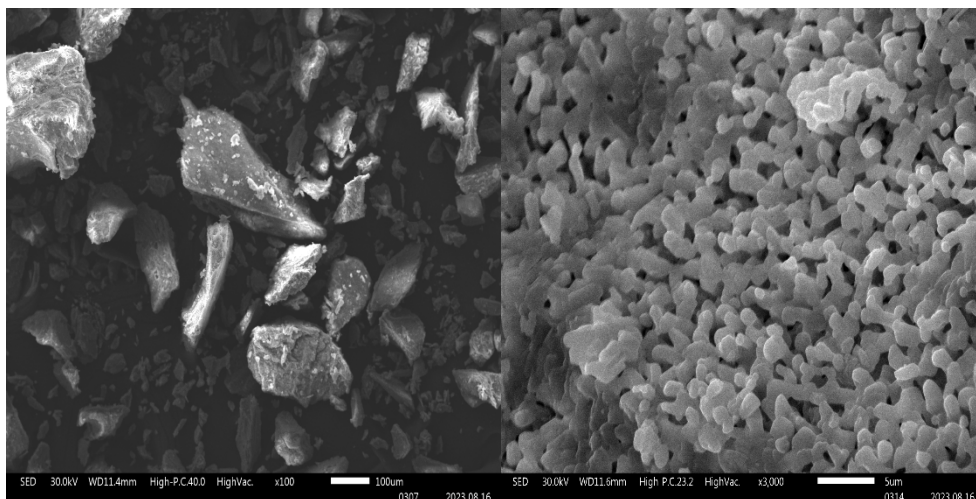


Figura 46. SEM de HAPS 10X, a menor y mayor aumento, respectivamente.

Además, en la Tabla 16 se presenta la composición elemental local a partir del análisis EDX.

Símbolo químico/ Concentración atómica (%p/p)	1X	10X
Ca	10,8 ± 4,7	9,07 ± 1,3
P	5,9 ± 1,9	6,43 ± 0,76
Ca/P	1,78 ± 0,2	1,41 ± 0,08

Tabla 16. Composición química de HAPS 1X y 10X.

Las proporciones de Ca y P variaron levemente con respecto al biomaterial obtenido en condiciones no escaladas. Se mantuvo la presencia de C y O, además de otros elementos en menores cantidades, tales como Mg y Na. Cabe destacar que la cantidad elemental es una aproximación de la concentración atómica de éstos en una superficie dada, por lo que se espera que estos valores varíen según la superficie en donde se realice el EDX, inclusive dentro de una misma muestra. Sin embargo, el valor de la proporción Ca/P se mantiene cercano al teórico de hidroxiapatita, el cual corresponde a 1,67, sin importar la zona en donde se realice el análisis.

#### 4.6.5 Picnometría de gases

Los resultados de picnometría se presentan en la Tabla 17.

Escala	Densidad (g/cm <sup>3</sup> )	Volumen específico (cm <sup>3</sup> /g)
1X	3,24 ± 1,10	0,31 ± 0,01
10X	3,04 ± 0,02	0,35 ± 0,002

Tabla 17. Densidad de HAPS 1X y 10X (n=3).

La densidad para HAPS a partir de condiciones escaladas no cambió significativamente con respecto a la producida anteriormente.

#### 4.6.6 Texturómetro

A continuación, en la Figura 47 y 48 se presenta la gráfica de compresión del biomaterial producido a escala 1X y 10X.

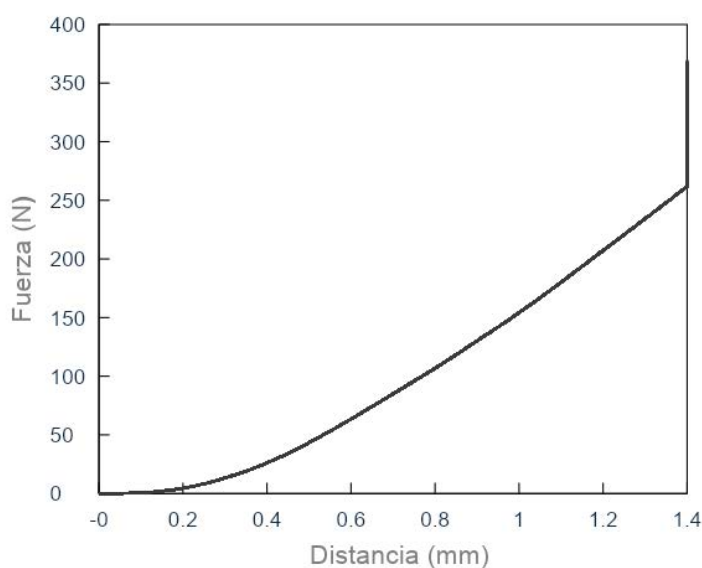


Figura 47. Resultados de compresión de HAPS 1X.

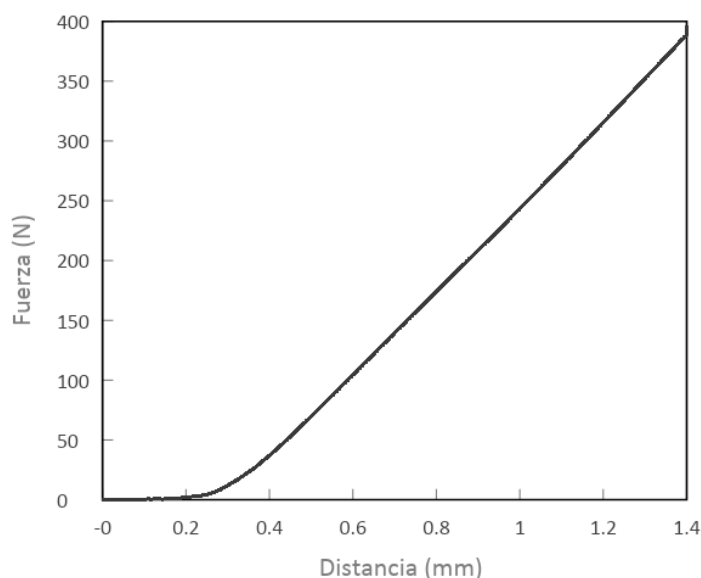


Figura 48. Resultados de compresión de HAPS 10X.

Se consideraron 3 réplicas para analizar. Las mediciones fueron realizadas con fuerza de compresión hasta los 2mm, al igual que el análisis anterior. Los cálculos de la pendiente, y determinación de fuerza máxima, fueron realizados considerando los datos desde los 0,5 hasta los 1,4 mm de compresión, y se presentan en la Tabla 18.

Escala	Pendiente (N/mm)	Fuerza máxima (N)
1X	264,07 ± 8,55	320,60
10X	351,25 ± 3,78	395,69 ± 0,77

Tabla 18. Pendiente y fuerza máxima de HAPS 1X y 10X (n=3).

Los resultados indican que la HAPS obtenida a partir del proceso escalado no varió significativamente con respecto a la producida anteriormente, en cuanto a resistencia mecánica.

#### 4.6.7 Combinación de HAPS con L-PRF y evaluación de su uso en contexto clínico

A continuación, en la Tabla 19, se presentan los resultados obtenidos para HAPS en contexto clínico.

<b>Atributo</b>	<b>1X</b>	<b>10X</b>
<b>Manipulación del cirujano</b>	Es fácil de llevar a sitio quirúrgico, es posible darle forma deseada. Manipulación no dificultosa.	Es fácil de dar forma deseada en pequeñas porciones, fácil manipulación.
<b>Hidrofobicidad</b>	El material absorbe líquido.	El material absorbe líquido.
<b>Agregación</b>	Se aglutina a los 5 min.	Material se aglutina por porciones.
<b>Consistencia</b>	Firme, resiste a la presión.	Firme, resiste a la presión.
<b>Puntaje total obtenido</b>	<b>20</b>	<b>17</b>

Tabla 19. Resultados de evaluación de HAPS 1X y 10X en contexto clínico.

La principal diferencia entre el uso de los biomateriales en contexto clínico radicó en que el obtenido mediante condiciones escaladas no aglutinó en su totalidad, dejando pequeñas cantidades residuales, lo que implicó pérdida de éste al ser manipulado. Lo anterior no se debe exclusivamente a cambios en el biomaterial, sino a cambios fisiológicos en la composición sanguínea que afectan la calidad del L-PRF del paciente, lo que podría estar interviniendo en los resultados de uso en contexto clínico. En la Figura 49 y 50 se presenta el biomaterial con L-PRF en los ensayos en contexto clínico.





Figura 49. HAPS 1X en contexto clínico.



Figura 50. HAPS 10X en contexto clínico.

## 4.7 Bioactividad de HAPS *in vivo*

### 4.7.1 Análisis de biocompatibilidad

Los siguientes exámenes fueron realizados con el objetivo de conocer el estado de salud de las ratas al día 15, 30 y 60 después de la implantación de los injertos. En la Tabla 20 se presentan los resultados de los parámetros del perfil bioquímico y hematológico más relevantes del estudio, al día 30 y 60, luego de la implantación. Los resultados completos se encuentran en el Anexo 6.2. Se midió proteína C reactiva, ya que esta corresponde a una proteína plasmática circulante que aumenta sus niveles en respuesta a la inflamación, además de niveles de creatinina y urea para denotar el funcionamiento de los riñones; y de fosfatasa alcalina, ALT, AST y bilirrubina para conocer el estado del hígado. Por último, también se cuantificó el fósforo y calcio circundantes en la sangre, puesto que éstos son componentes elementales del injerto y el nuevo hueso que se va formando en el proceso de osteogénesis.

Compuesto	Unidad	Rango	Día 30				Día 60			
			Tipo de injerto							
			Humano	Salmón	Bovino	Control	Humano	Salmón	Bovino	Control
Proteína C reactiva	ng/mL	5,5 - 25	55,6	74,3	156,3	93,5	166,3	128,9	63,5	139,6
Fósforo	mg/dL	4,9 - 8,2	12,5	13,8	20,5	14	12	12,4	10,8	14
Calcio	mg/dL	9,7 - 10,7	12,8	11,2	11,8	10,7	8,9	9,2	9,4	9,2
Creatinina	mg/dL	0,31 - 0,43	0,44	1,2	0,8	0,84	0,4	1,2	0,4	1,2
Fosfatasa alcalina	UI/L	83 - 301	512,3	408	424	344	410	448	514	620
ALT	UI/L	51 - 108	133,2	88	176	118	126	136	156,6	126
AST	UI/L	86 - 257	317,5	424	608	280	372	304	288	370
Urea	mg/dL	-	44,7	44	40	44,4	40	44	39,4	44
Bilirrubina	mg/dL	0,3 - 0,9	0,44	0,5	0,74	0,69	0,3	0,5	0,6	0,28
Hemoglobina	g/dL	12,1 - 15,7	15,8	13,1	16	15,9	14,8	13,8	15,3	12,3
Leucocitos	/uL	3100 - 18600	16200	12100	11400	6900	10800	15600	7200	6900
Trombocitos	/uL	72000 - 600000	98600	88500	156200	156400	112400	92800	186000	89300

Tabla 20. Perfil bioquímico y hematológico de ratas implantadas con injerto HAPS y comercial al día 30 y 60 después de la cirugía.

No se presentaron diferencias significativas ( $p > 0,05$ ) entre los resultados obtenidos. Sin embargo, la mayoría de los parámetros están fuera del rango normal admitido para el compuesto, impuesto por el laboratorio donde se realizaron los análisis.

La proteína C reactiva se utiliza para determinar el grado de inflamación sistemática a partir del material injertado. El nivel de dicha proteína no presentó diferencias significativas con el control, pero en todos los animales, tanto al día 30 como el 60, se evidenciaron niveles por sobre el rango admitido de este parámetro, lo cual es de esperarse dado la intervención.

Por otro lado, los niveles de fósforo y calcio se mantuvieron cercanos al rango admitido por el laboratorio para estos minerales. Se sabe que las células óseas recién formadas, llamadas osteoblastos, secretan inicialmente matriz ósea extracelular no mineralizada, compuesta principalmente de sustancias orgánicas, conocido como tejido osteoide. Luego, la matriz generada se calcifica mediante un mecanismo de biomineralización natural, que incluye la atracción de iones  $Ca^{2+}$  que se encuentran naturalmente en los fluidos corporales. Los iones de  $Ca^{2+}$  actúan a su vez como sitios de nucleación heterogéneos para iones fósforo, formando cristales de hidroxiapatita, promoviendo la calcificación de la matriz ósea orgánica (32). En base a lo anterior, los niveles de calcio y fósforo, por sobre el rango admitido para ratas, podrían indicar la biodisponibilidad y demanda de estos en la formación de hueso, fomentando la osteogénesis, ya que la presencia de éstos es crucial en el aumento continuo de áreas calcificadas de la matriz ósea orgánica.

Los niveles de creatinina y urea, que muestran el funcionamiento de los riñones, se mantuvieron sin diferencias significativas entre injertos. Se llegó a la conclusión de que los animales implantados tenían función renal normal en comparación con el grupo control. Este resultado se atribuye a que los productos de degradación de los biomateriales no provocan insuficiencia renal, como se ha decretado anteriormente (32).

Los niveles de fosfatasa alcalina, ALT, AST y bilirrubina fueron investigados para medir la actividad hepática en los ejemplares. La diferencia estadística entre los compuestos en la sangre de las ratas implantadas con injerto y grupos de control no fue significativa ( $p > 0,05$ ), lo que indica que los animales intervenidos tenían funciones hepáticas normales, similares a la del grupo control. Asimismo, se encontró que la relación ALT/AST era inferior a 1, indicador que conlleva ausencia de lesión hepática o inflamación (33).

Finalmente, los parámetros hematológicos, que incluyen hemoglobina, leucocitos y trombocitos (plaquetas) presentaron niveles dentro del rango admitido, sin diferencias significativas entre injertos con el control. Los leucocitos, también conocidos como glóbulos blancos, son parte del sistema inmunitario y forman una red de células, tejidos y órganos que colaboran para protegerlo de las infecciones, por lo que los niveles de estas células podrían indicar el funcionamiento estable del sistema inmune en respuesta al injerto implantado en los animales. Por otra parte, las plaquetas son células sanguíneas que actúan en los procesos de coagulación, por lo que niveles anormales podrían manifestar una variedad de riesgos para la salud, sin embargo, estos no se vieron afectados por ningún tipo de injerto, al igual que la hemoglobina, proteína componente esencial de eritrocitos.

En conclusión, si bien la mayoría de los parámetros medidos no se encontraron dentro del rango del análisis del ensayo, no se presentaron diferencias estadísticamente significativas entre los animales injertados y los controles, a los 30 y 60 días luego de la cirugía, por lo que se puede establecer que HAPS presenta propiedades *in vivo* similares a la de injertos comerciales, como lo es el bovino y humano, además de mantener parámetros hematológicos y bioquímicos semejantes a los de los controles, los cuales no poseían ningún tipo de injerto y denotaban el estado normal y natural del animal.

#### 4.7.2 Análisis imagenológico

Se llevó a cabo la adquisición de imágenes 3D mediante Tomografía Computarizada de Haz Cónico (CBCT) con la finalidad de documentar y analizar la regeneración de defectos óseos en un modelo experimental de ratas a los días 15, 30 y 60, posteriores a la implantación de diversos tipos de injertos. Los resultados relativos a los diámetros sagitales y transversales de dichos defectos óseos se

encuentran detallados en la Tabla 21. Además, se analizaron las variables de presencia de callo óseo y la homogeneidad del tejido óseo formado.

Tiempo (días) / tipo	Diámetro sagital / transversal (mm)											
	Salmón		Bovino		Humano		Porcino		Sintético		Sólo defecto	
<b>15</b>	2,97	2,45	2,9	2,47	3,9	3,4	3,32	2,79	4,05	3,25	4,19	3,24
<b>30</b>	2,30	1,44	0	0	3,64	3,20	0	1,64	3,60	2,33	2,67	2,30
<b>60</b>	0	1,10	2,50	1,90	0	2,93	2,98	2,79	2,79	2,76	2,32	1,76

Tabla 21. Diámetros de defectos óseos medidos en tomografía computarizada de haz cónico (CBCT).

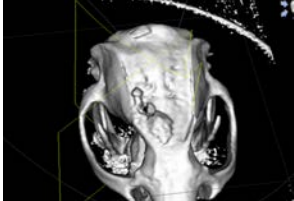
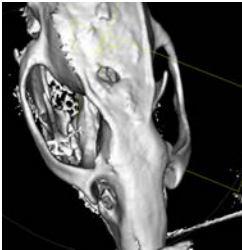
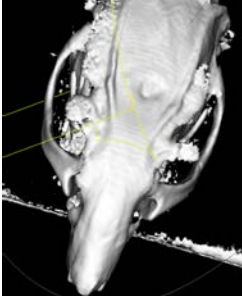
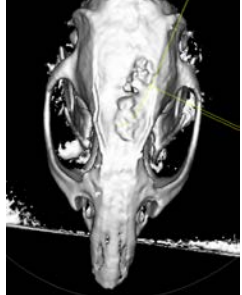
En el corto plazo de 15 días, tanto el defecto óseo tratado con xenoinjerto de salmón como el de bovino exhibieron diámetros menores en comparación con los demás grupos experimentales. Además, en ambos casos, se evidenció la formación de callo óseo, lo que insinúa un aumento en la actividad metabólica ósea asociada a estos injertos. No obstante, es importante resaltar que se observaron irregularidades en la superficie de regeneración, lo que suscita una falta de homogeneidad en el crecimiento de tejido óseo en estas áreas.

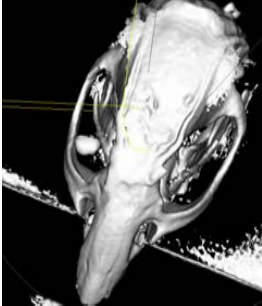

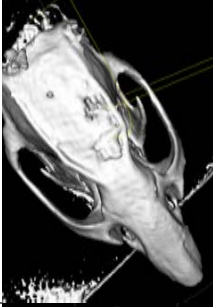
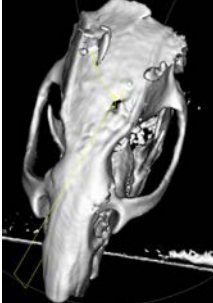
A los 60 días de observación, se constató que el defecto óseo en las ratas que recibieron el xenoinjerto de salmón presentó el menor diámetro en comparación con los demás grupos experimentales, lo que sugiere la capacidad de este material para potenciar la regeneración ósea y acelerar dicho proceso en relación con otras modalidades de injerto y el curso normal de la fisiología del animal. Es relevante destacar que se evidenció la formación de callo óseo junto a un sobre crecimiento óseo relacionado con el injerto. No obstante a lo anterior, se observó que la superficie de regeneración no mantuvo una homogeneidad en su crecimiento.

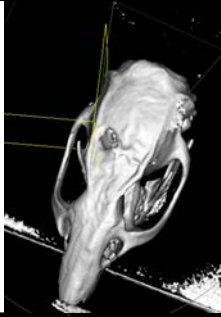
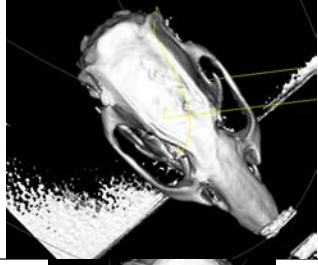
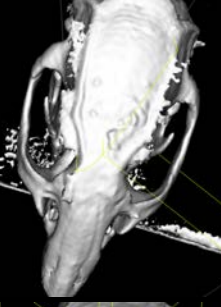
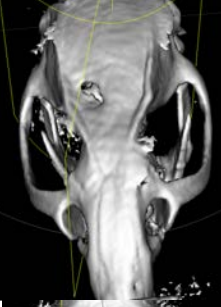
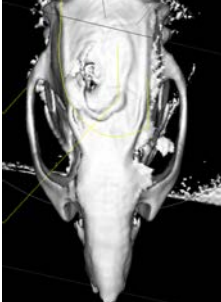
En contraste, los injertos restantes empleados para regenerar el defecto óseo manifestaron diámetros más amplios que aquellos observados en el defecto sin injerto, regenerado conforme a la fisiología normal del animal. Este hallazgo puede sugerir que la utilización de ciertas modalidades de injerto podría tener un efecto contraproducente en ratas, alargando el proceso de regeneración ósea a largo plazo. Así mismo, es posible considerar que la profundidad del defecto óseo pudiera no haber alcanzado las dimensiones adecuadas para evitar la cicatrización espontánea.

Estos hallazgos reflejan la importancia de considerar tanto el tiempo de observación como la elección de materiales de injerto en la regeneración ósea, ya que pueden tener un impacto significativo en la efectividad y calidad del proceso regenerativo.

Las figuras obtenidas a partir del CBCT presentan una imagen representativa del análisis imagenológico, en donde se puede apreciar el crecimiento óseo con biomaterial de salmón y de bovino, ambos xenoinjertos, a los 15 días posteriores a la implantación. Los resultados e imágenes completos para este ítem se encuentran en la tabla 22.

Rata	Corte sagital oblicuo vertical (mm)	Corte coronal Horizontal (mm)	Observaciones	Imagen
<b>R2 Bovino</b>	2,50	1,90	Formación de callo óseo de 3.16mm de alto, cierre parcial del defecto, partículas radiopacas, superficie no homogénea.	
<b>R3 Porcino</b>	2,98	2,79	Mineralización del defecto desde la cortical, no se observan partículas en el defecto, se observa desplazamiento de algunas partículas del defecto generando superficie no homogénea.	
<b>R4 Sintético</b>	2,79	2,76	Se observa mineralización del defecto con disminución del grosor óseo, pero sin dehiscencia zona menos mineralizada pero homogénea, no se observan partículas.	
<b>R5 Salmón</b>	Callo óseo, no se observa defecto.	1,10	Callo óseo formado en la zona del defecto de 1.44mm de alto por 4.76mm de ancho, relleno del defecto con corticalización y pequeñas dehiscencias, desplazamiento de partículas, zona no homogénea.	

<b>R6 Humano</b>	No se observa defecto, mineralización parcial del defecto.	2,93	Se observa pequeño defecto óseo, mineralización parcial del defecto con presencia de partículas radiopacas y zonas radio lúcidas, desplazamiento de partículas, zona no homogénea.	
<b>R7 Defecto</b>	2,32	1,76	Cierre parcial de defecto óseo se observan áreas de mineralización, superficie homogénea.	
<b>Rata</b>	<b>Corte sagital oblicuo vertical (mm)</b>	<b>Corte coronal Horizontal (mm)</b>	<b>Observaciones</b>	<b>Imagen</b>
<b>S1 Humano</b>	3,64	3,20	Relleno parcial del defecto desplazamiento de material.	
<b>S2 Salmón</b>	2,30	1,44	Relleno casi total del defecto en 3D, no de toda la superficie, se observa pequeño desplazamiento de injerto asociado a sutura suelta y necrosis en la zona.	

<b>S3 Sintético</b>	3,60	2,33	Se observa relleno parcial del defecto con márgenes en crecimiento pequeña protuberancias óseas asociadas a desplazamiento de material.	
<b>S4 Porcino</b>	No se observa defecto.	1,64	Defecto óseo mineralizado prácticamente en su totalidad se observa pequeña área más radio lúcida en sentido coronal.	
<b>S5 Bovino</b>	0	0	No se observa defecto, mineralización total del defecto, se observan partículas radiopacas y zonas de menor densidad en la zona del defecto.	
<b>S6 Defecto</b>	2,67	2,30	Relleno parcial del defecto, mineralización desde los bordes.	
<b>T1 Sintético</b>	4,05	3,25	Zona poco homogénea, presencia de tuberosidades, defecto poco mineralizado, desplazamiento de injerto.	

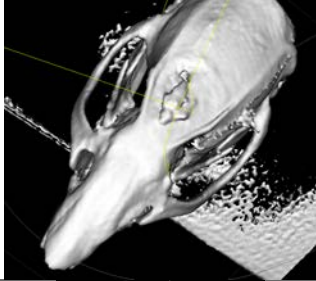
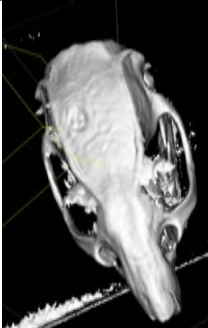
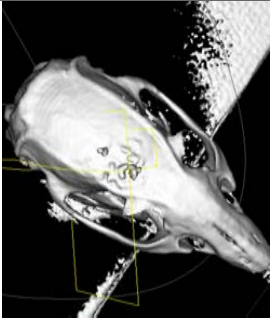
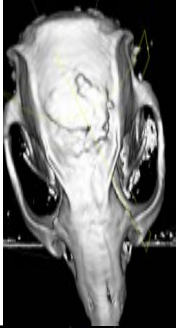
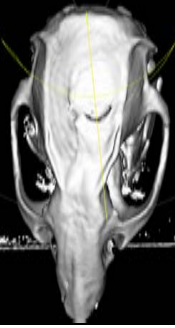
<b>T2 Salmón</b>	2,97	2,45	Se observa callo óseo de 4.41mm de alto y 4.87mm de largo, no se observa defecto en corte sagital, en corte coronal se observa pequeña dehiscencia de 1.17mm, zona no homogénea.	
<b>T3 Porcino</b>	3,32	2,79	Defecto mineralizado con poca densidad, las partículas cubren todo el defecto con áreas radiopacas y radio lúcidas, superficie poco homogénea.	
<b>T4 Bovino</b>	2,90	2,47	Presencia de partículas formando protuberancia de 4.99mm de alto, se observan partículas radiopacas y zonas radio lúcidas, defecto con relleno parcial (sin corticalización)	
<b>T5 Humano</b>	3,90	3,40	Formación de callo óseo sin mineralización (sin corticalización) partículas radiopacas y zonas radio lúcidas en relación con el defecto, desplazamiento del injerto.	
<b>T6 Defecto</b>	4,19	3,24	Defecto presente con zonas de mineralización desde los bordes, se observa zonas deformación de tejido poco mineralizado en la superficie del defecto.	

Tabla 22 Resultados imagenológicos para los injertos usados



### 4.7.3 Análisis histológico

Se realizó un análisis histológico con el objetivo de evaluar la formación ósea asociada a los distintos tipos de injertos. Las muestras fueron conservadas en formalina tamponada al 10%, sometidas a un proceso de decalcificación con EDTA al 10% durante 3 semanas y posteriormente teñidas con tinción convencional de hematoxilina-eosina. En la Tabla 23 se observa un resumen con los mayores hallazgos de histología para las muestras. En el Anexo 6.4 se encuentra la tabla completa con los resultados para todos los injertos probados.

	<b>Continuidad de hueso maduro</b>	<b>Tipo de tejido en superficie del defecto</b>	<b>Grosor del periosteo</b>	<b>Partículas de injerto encapsuladas</b>	<b>Infiltrado inflamatorio en tejido circundante al defecto</b>	<b>Células gigantes multinucleadas</b>
<b>15 días</b>						
<b>Control</b>	Continuo	Tejido adiposo	Normal	No	No	No
<b>Hueso bovino</b>	Discontinuo	Tejido fibroadiposo	Engrosado	Sí	Sí	Sí
<b>Hueso de salmón</b>	Discontinuo	Tejido fibroadiposo	Engrosado	Sí	Sí	Sí
<b>Hueso humano</b>	Discontinuo	Tejido fibroadiposo	Engrosado	Sí	Sí	Sí
<b>Defecto sin injerto</b>	Continuo	Tejido adiposo	Engrosado	No	No	No
<b>30 días</b>						
<b>Control</b>	Continuo	Tejido adiposo	Normal	No	No	No
<b>Hueso bovino</b>	Discontinuo	Tejido fibroadiposo	Engrosado	Sí	No	No
<b>Hueso de salmón</b>	Discontinuo	Tejido fibroadiposo	Engrosado	Sí	No	No
<b>Hueso humano</b>	Discontinuo	Tejido fibroadiposo	Engrosado	Sí	Sí	Sí
<b>Defecto sin injerto</b>	Discontinuo	Tejido fibroadiposo	Engrosado	No	No	No
<b>60 días</b>						
<b>Control</b>	Continuo	Tejido adiposo	Normal	No	No	No
<b>Hueso bovino</b>	Discontinuo	Tejido fibroadiposo	Engrosado	Sí	No	No
<b>Hueso de salmón</b>	Continuo	Tejido adiposo	Engrosado	Sí	No	No
<b>Hueso humano</b>	Discontinuo	Tejido fibroadiposo	Engrosado	Sí	No	No
<b>Defecto sin injerto</b>	Continuo	Tejido adiposo	Normal	No	No	No

Tabla 23. Resultados de histología para los injertos usados. En verde se destacan las características del control y los grupos de estudios que presentan características similares.

Las muestras se evaluaron a los 15, 30 y 60 días. A corto plazo (15 días), todas las muestras exhibieron signos inflamatorios importantes, destacando la presencia de células gigantes multinucleadas y a mediano plazo (30 días). Sólo la muestra con injerto de hueso humano presentó inflamación. Así mismo, esto se manifestó en el comportamiento animal donde las ratas pertenecientes a este grupo presentaron cicatrización retrasada de la herida superficial y mayores indicadores de dolor. Adicionalmente, se observaron manifestaciones histológicas de signos inflamatorios de diversas magnitudes en todas las muestras sometidas a tratamientos con injertos, en cada uno de los grupos, similar a lo descrito por Torquato *et al.* (34). A largo plazo (60 días) las muestras no presentaron inflamación aparente. La inflamación es considerada una reacción normal de una parte del cuerpo a una herida, lesión o infección y se produce a partir de un proceso en donde se liberan sustancias químicas que producen una respuesta inmunitaria para sanar o cicatrizar una herida (*National Cancer Institute USA, 2023*). Lo anterior es acorde con los resultados obtenidos, puesto que las ratas control y las que sólo tenían el defecto, sin injerto óseo, no presentaron inflamación, por lo que ésta última se puede considerar como una respuesta del organismo de las ratas a material exógeno. Cabe destacar que la inflamación sólo fue persistente con el injerto humano hasta mediano plazo, no así con los demás injertos, y que sólo se presentó en el corto plazo, como respuesta inflamatoria normal.

Las muestras con injerto óseo de todos los orígenes presentaron encapsulamiento en todos los plazos. A corto y mediano plazo, las muestras con injerto de salmón presentaron encapsulamiento de material exógeno, no obstante, a largo plazo se evidenció la presencia de tejido óseo vital dentro del encapsulamiento, junto con la persistencia de material exógeno. Este hallazgo sugiere el posible reemplazo del material exógeno de salmón en tejido óseo vital a largo plazo. El 72 % de las muestras presentaron encapsulamiento de material exógeno con y sin reacción inflamatoria asociada. Este fenómeno podría atribuirse al tamaño de partícula de estos materiales, que oscilan entre 250 y 1000  $\mu\text{m}$ . Este rango de tamaño sugiere ser considerablemente grande para la reparación de un defecto óseo de 5 mm de diámetro en una rata, estimulando la formación de una cápsula fibrosa alrededor del injerto.

Con respecto al modelo animal, los defectos realizados fueron lo suficientemente profundos, otorgando una extensa área de contacto al injerto implantado, lo que gracias al metabolismo de la rata, permite una reparación eficaz. En boca, los defectos usualmente se asocian a pérdida de una pared, haciendo que la reparación ósea sea más compleja, por lo que se hace necesario buscar un modelo más acorde con el tipo de defecto que se produce realmente en los pacientes, sin embargo, éste se ajusta bien para poder comparar correctamente entre tipos de injertos.

Finalmente, a partir del orden de tiempo y características de reparación, de más a menos eficiente, sería: 1) porcino, 2) salmón, 3) bovino y sintético, 4) humano.

En la Figura 51 se presentan fotografías de cortes histológicos realizados a los 15, 30 y 60 días a las ratas con el injerto de salmón, bovino y humano, respectivamente.

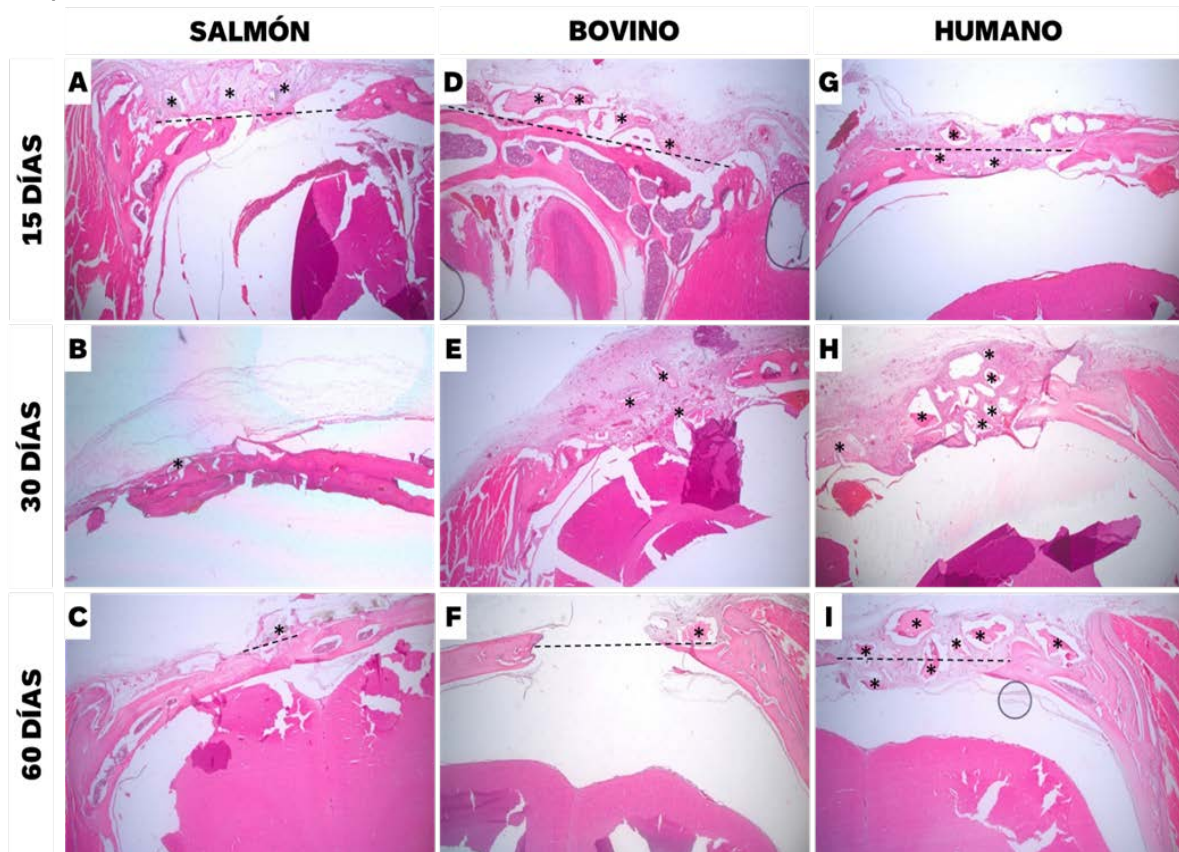


Figura 51. Imagen microscópica con tinción de hematoxilina-eosina. A,b,c) Imágenes muestran injerto de hueso de salmón a los 15, 30 y 60 días. Si bien a los 60 días aún se observa remanente de injerto, es posible observar formación de un puente óseo debajo de este, cerrando el defecto. D,f,g) Imágenes muestran injerto de hueso bovino a los 15, 30 y 60 días. Se observa la persistencia de remanente de injertos hasta el día 60, sin cierre del defecto y con una intensa respuesta fibrosa e inflamatoria al día 30. H,i,j) Imágenes muestra injerto de hueso humano a los 15, 30 y 60 días. Se observa persistencia de remanente de injertos, con un tamaño mayor de partículas y ausencia de cierre del defecto, aunque en el día 60 ha disminuido la intensa respuesta fibrosa e inflamatoria del día 30. Los remanentes de injerto son observados en las imágenes indicados con asteriscos (\*).

## 5. DISCUSIÓN

### 5.1 Producción

La producción de material para la regeneración ósea ha sido ampliamente investigada. Esto ha incentivado a la industria a desarrollar nuevas alternativas a pesar de los altos costos, las dificultades de producción y el almacenamiento. En este contexto, la expansión de nuevas fuentes de producción de material tipo xenoinjerto ha ido ganando terreno sobre autoinjertos, aloinjertos y materiales aloplásticos, reduciendo así costos, interacciones biológicas y aumentando la disponibilidad. En esta línea, los xenoinjertos extraídos del hueso de pescado han atraído la atención de los grupos de desarrollo de investigación. Se han reportado diferentes modalidades de producción, tales como hidrólisis con NaOH, calcinación e hidrólisis enzimática. Como se mencionó anteriormente, uno de los objetivos de esta investigación fue describir el proceso para la extracción de la fase mineral del hueso de salmón y su metodología. Para ello, se desarrolló un nuevo protocolo basado en el descrito por Shi et al. (35) para lograr las siguientes etapas principales dirigidas a eliminar la mayor cantidad de materia orgánica: limpieza a gran escala del músculo en agua a alta temperatura; procesamiento de lisis del colágeno y proteínas de la matriz ósea en concentración suficiente de NaOH; desengrasado, eliminación de lípidos de la estructura mineral en solución de acetona; finalmente, calcinación de los componentes orgánicos restantes de los procesos anteriores. Se debe tener un cuidado extremo para evitar dañar la matriz mineral ósea, ya que las cenizas restantes podrían modificar abruptamente la estructura o convertirse en un vector de contagio (20,21, 35,36). Como se reporta en este estudio, se ha propuesto un nuevo protocolo innovador para producir biocerámica de hueso de salmón. Este involucra la integración de procesos de hidrólisis alcalina, desengrasado y calcinación. La escalabilidad y los rendimientos alcanzados demostraron que es posible proponer aplicaciones industriales del protocolo aquí descrito lo que abre las puertas para considerar la transferencia tecnológica de este conocimiento a un producto comercialmente factible.

### 5.2 Caracterización primaria

Para obtener una primera aproximación respecto a la estructura del material, se realizaron espectrometría Raman y difracción de rayos X. Después de llevar a cabo una primera caracterización, su reproducibilidad puede ser confirmada debido a la coherencia obtenida entre los diferentes lotes de muestras. En cuanto a los resultados obtenidos por espectrometría Raman, se confirmó la presencia de grupos funcionales esenciales para la conformación de HA o B-

TCP (como PO<sub>4</sub>, OH o CaO<sub>3</sub>). Aunque los picos característicos de estos grupos funcionales se reportaron en todas las muestras comparadas, dos fueron hechas para el propósito de este estudio, y aquellas propuestas como controles mostraron una coincidencia prácticamente exacta, confirmando la presencia de hidroxiapatita. Esto se refleja en relación con el pico de mayor volumen asociado con una de las bandas del grupo PO<sub>4</sub>. Adicionalmente, el pico reportado entre 1421 y 1466 cm<sup>-1</sup> en Raman 2 está relacionado con la presencia de un grupo CO<sub>3</sub><sup>2-</sup>, que en la literatura se describe como uno de los elementos responsables de mejorar la biocompatibilidad de los materiales de regeneración ósea (15). Este nuevo protocolo de producción deja de mostrar similitudes con los resultados obtenidos. El proceso se llevó a cabo con HA sintética (Sigma-Aldrich) como control (14,18). Cuando se analizó mediante difracción de rayos X, aunque no fue posible encontrar una coincidencia exacta en las bases de datos utilizadas (COD y CODI), se confirmó la presencia de Ca, P y O, así como de elementos traza, como Sr o Mg, descritos como posibles contribuyentes a la biocompatibilidad del material (35). Esta característica ha sido previamente reportada en estudios similares y sería la razón por la cual el salmón se posiciona como la mejor alternativa, en comparación con otros peces ampliamente disponibles para la fabricación de materias primas, para la regeneración ósea. Además, la distribución gráfica de una estructura cristalina y un tamaño estimado de cristal fue acorde con lo descrito en la literatura y adecuado para este tipo de materiales (28).

### 5.3 Citotoxicidad

El análisis de citotoxicidad muestra resultados alentadores. La prueba se realizó en células de fibroblastos y mioblastos de ratón. Estas líneas celulares se utilizaron debido a su potencial para diferenciarse en osteoblastos. El tratamiento con la proteína morfogenética ósea 2 (BMP2) provoca un cambio en la vía de diferenciación, lo que puede ser beneficioso en estudios posteriores para evaluar la capacidad de formación ósea y la viabilidad celular en osteoblastos (20,37).

El estudio de viabilidad celular expresado en %, superó el 90% de viabilidad para sustratos de hueso de salmón en cultivo de mioblastos a las 24 horas en todas las concentraciones. Los resultados fueron aún más alentadores para el cultivo de fibroblastos en sustrato de hueso de salmón. Se evidenció un aumento en la viabilidad celular al 122% a una concentración de 50 [ug/mL], lo que fomenta la continuación de esta línea de investigación en estudios futuros. Estos resultados sugieren que el polvo de HAPS no tiene efectos tóxicos en ninguna concentración estudiada. Las propiedades físicas de la hidroxiapatita, como la densidad, la cristalización y la composición de los elementos, son probablemente factores influyentes en la viabilidad celular (38,39). Se ha descrito que el grupo funcional CO<sub>3</sub><sup>2-</sup> puede ser beneficioso para la adhesión celular y promover la proliferación celular (40). Se sugiere el estudio de los

grupos funcionales mediante espectrometría Raman para obtener más información sobre la hidroxiapatita obtenida.

Se espera que la HA derivada de materiales naturales contenga iones minerales esenciales que conduzcan a una mejor adhesión celular, proliferación, diferenciación y formación de tejido mineralizado. Todas las muestras estudiadas mediante XRD mostraron diferentes tamaños de cristal, y todas las muestras mostraron una proliferación celular aceptable. Esto puede denotar que el tamaño del cristal no es determinante para la proliferación celular; sin embargo, son necesarios estudios dirigidos para analizar la topografía de la superficie, la cual sugiere ser relevante para la adhesión y proliferación celular (41).

El análisis SEM/EDS mostró que todas las muestras presentaron valores de la relación Ca/P más altos que los reportados por Shi et al. para HA estequiométrica de 1.67. Los valores aumentados de Ca/P pueden significar un menor porcentaje de carbono presente en el material (42). La presencia de un mayor porcentaje de carbono se ha reportado en la literatura y esto puede estar relacionado con una mayor absorción selectiva de proteínas, asistiendo a la adhesión celular (40,42).

Es interesante mencionar la presencia de MgO en la HA derivada a partir del hueso de salmón en cantidades superiores al resto de las muestras analizadas, Debido a su naturaleza alcalina, el MgO puede neutralizar el Ph en el proceso de degradación del biomaterial, lo que promueve el crecimiento de osteoblastos. Por otro lado, a un nivel molecular, los iones de  $Mg^{+2}$  están involucrados en varias reacciones enzimáticas en las células e indirectamente, puede estimular la mineralización celular al producir un aumento en la actividad de los fosfatos alcalinos (17). Esta característica composicional de la HAPS podría explicar en parte los resultados más favorables obtenidos en las pruebas de proliferación y diferenciación celular en presencia de HAPS en comparación con los demás materiales de injerto analizados. Será necesaria más investigación para explorar debidamente el potencial osteogénico de la HAPS asociada a la presencia del ion Mg en mayor cantidad que en el resto de las HA disponibles hasta ahora.

#### 5.4 Estudio *In Vivo*

Las células óseas recién formadas, llamadas osteoblastos, inicialmente secretan una matriz ósea extracelular no mineralizada compuesta principalmente de sustancias orgánicas, conocida como tejido osteoide. Esta matriz posteriormente experimenta calcificación a través de un mecanismo natural de biomineralización, que implica la atracción de iones  $Ca^{2+}$  presentes de forma natural en los fluidos corporales. Estos iones  $Ca^{2+}$  actúan como sitios de nucleación heterogénea para los iones de fósforo, formando cristales de hidroxiapatita y promoviendo la calcificación de la matriz ósea orgánica (44).

Basado en este proceso, los niveles de calcio y fósforo podrían indicar la biodisponibilidad y demanda de estos elementos en la formación ósea, promoviendo la osteogénesis, ya que su presencia es crucial para el continuo incremento de áreas calcificadas en la matriz ósea orgánica.

El presente estudio determinó que los animales injertados tenían una función renal normal en comparación con el grupo de control. Este resultado se atribuye al hecho de que los productos de degradación de los biomateriales no inducen insuficiencia renal, como se ha establecido previamente (44). Además, se encontró que la relación ALT/AST era menor a 1, un indicador que sugiere la ausencia de lesión o inflamación hepática (43).

Los leucocitos, también conocidos como glóbulos blancos, son parte del sistema inmunológico y forman una red de células, tejidos y órganos que colaboran para proteger contra infecciones. Por lo tanto, los niveles de estas células podrían indicar el funcionamiento estable del sistema inmunológico en respuesta al injerto implantado en los animales. Por otro lado, las plaquetas son células sanguíneas que juegan un papel en los procesos de coagulación; niveles anormales podrían indicar diversos riesgos para la salud. Sin embargo, estos niveles no se vieron afectados por ningún tipo de injerto, al igual que la hemoglobina, un componente proteico esencial de los glóbulos rojos.

No hubo diferencias bioquímicas significativas entre los animales injertados y los controles a los 30 y 60 días después de la cirugía. Por lo tanto, se puede establecer que el HAPS exhibe propiedades in vivo similares a las de los injertos comerciales, como los injertos bovinos y humanos. Además, mantiene parámetros hematológicos y bioquímicos similares en comparación con los controles, que no tenían ningún tipo de injerto, reflejando el estado normal y natural de los animales.

El defecto óseo en ratas que recibieron el xenoinjerto de salmón tenía el diámetro más pequeño según arrojó el análisis de los resultados imagenológicos con tomografía computada de haz cónico (CBCT), lo que sugiere la capacidad de este material para mejorar la regeneración ósea y acelerar el proceso en comparación con otras modalidades de injerto y el curso normal de la fisiología animal. Es relevante notar que la formación de callo óseo fue evidente junto con el sobrecrecimiento óseo relacionado con el injerto. Sin embargo, a pesar de estas observaciones, la superficie de regeneración no mantuvo homogeneidad en su crecimiento.

En contraste, los injertos restantes utilizados para regenerar el defecto óseo mostraron diámetros mayores que los observados en el defecto sin injerto. Este hallazgo puede sugerir que el uso de ciertas modalidades de injerto podría tener un efecto contraproducente en ratas, prolongando el proceso de regeneración ósea a largo plazo. También es posible que la profundidad del defecto óseo no haya alcanzado las dimensiones adecuadas para prevenir la curación espontánea.

Estos hallazgos resaltan la importancia de considerar tanto el tiempo de observación como la elección de los materiales de injerto en la regeneración ósea, ya que pueden impactar significativamente en la efectividad y calidad del proceso regenerativo. Se observaron manifestaciones histológicas de signos inflamatorios de magnitud variable en todas las muestras sometidas a tratamientos con injerto en cada uno de los grupos, similar a lo descrito por Torquato et al. (45). La inflamación se considera una reacción normal de una parte del cuerpo ante una herida, lesión o infección y ocurre a través de un proceso donde se liberan químicos, produciendo una respuesta inmunitaria para sanar o cicatrizar una herida (*National Cancer Institute USA, 2023*). Esto es consistente con los resultados obtenidos, ya que las ratas de control y aquellas con solo el defecto, sin injerto óseo, no mostraron inflamación, haciendo que esta última sea considerada como una respuesta de los cuerpos de las ratas al material exógeno. Es importante señalar que la inflamación solo fue persistente con el injerto de origen humano (en este caso, también un xenoinjerto) a los 15 y 30 días, no así con los otros injertos, donde apareció solo como una respuesta inflamatoria normal e inicial.

Los análisis histopatológicos de las muestras obtenidas luego de las eutanasias sugieren la posible sustitución del material exógeno de salmón por tejido óseo vital a largo plazo. El 72% de las muestras tratadas con HAPS mostraron encapsulación del material exógeno con y sin reacción inflamatoria asociada. Este fenómeno podría atribuirse al tamaño de partícula de estos materiales, que varía entre 250 y 1000  $\mu\text{m}$ . Este rango de tamaño parece ser considerablemente grande para reparar un defecto óseo de 5 mm de diámetro en una rata, estimulando la formación de una cápsula fibrosa alrededor del injerto.

En cuanto al modelo animal, los defectos creados fueron lo suficientemente profundos como para proporcionar un área de contacto extensa para el injerto implantado, lo cual, debido al metabolismo de la rata, permite una reparación efectiva. En un contexto clínico, como la cavidad oral, los defectos suelen estar asociados con la pérdida de una pared, lo que hace que la reparación ósea sea más compleja. Por lo tanto, es necesario buscar un modelo más alineado con el tipo de defecto que realmente ocurre en los pacientes. Sin embargo, este modelo se adapta bien para una comparación adecuada entre tipos de injertos.

## 5.5 Aplicación Clínica

Todos los resultados obtenidos en las distintas fases de producción, parametrización, caracterización, citotoxicidad, proliferación celular, diferenciación celular y estudios *in vivo*, indican que la HAPS es un biomaterial con potencial para ser utilizado clínicamente.

En efecto, al establecerse un mecanismo de producción escalable, con rendimientos de 24%, se abre una interesante oportunidad de producción de



un nuevo biomaterial con potencial osteogénico a partir del hueso de salmón. Esto es especialmente relevante si se considera que Chile cuenta con la segunda mayor industria productora de salmón en el mundo (y la segunda a nivel nacional, superada solamente por el cobre, siendo la responsable de 4% del Producto Interno Bruto (PIB) nacional). Desde el punto de vista medioambiental, la industria produce unas 700,000 toneladas al año de las cuales aproximadamente 200,000 son desechos, entre los cuales se encuentra el hueso de salmón. El impacto positivo a nivel medioambiental no solamente beneficia al ecosistema marino y naturaleza circundante a las áreas de cultivo y producción, sino que también impacta favorablemente el desarrollo de comunidades locales y favorece el concepto de economía circular.

Haber creado un protocolo mediante el cual sea posible aprovechar parte de este material de desecho y transformarlo en un biomaterial útil para la ingeniería tisular ósea, con un alto valor agregado, otorga a Chile la posibilidad de aumentar su propuesta de valor en la industria del salmón otorgando al país la oportunidad de ampliar la utilización de este recurso desde ser un productor de *commodities* hasta transformarse en un generador de biotecnología avanzada.

La materialidad desarrollada mediante el protocolo de producción otorga al clínico la posibilidad de utilizar la HAPS en presencia de solución salina pero también de derivados plaquetarios como el L-PRF otorgando una interesante oportunidad para incorporar una nueva alternativa a las ya existentes en el mundo de la ingeniería tisular ósea. El hecho de que este nuevo biomaterial además tenga la posibilidad de ser producido a bajo costo y que esté libre de las limitaciones medicolegales, religiosas y culturales propias de los demás injertos óseos existentes, ofrece una opción real y concreta de avanzar en el desarrollo de una futura solución eficiente, segura y competitiva en el desafiante mundo de la ingeniería tisular ósea.

## 5.6 Limitaciones de la investigación

Como todo trabajo de investigación, el presente no está ausente de tener limitaciones. Dentro de la más relevante está el limitado acceso a experimentación en animales debido a las crecientes políticas de mayor regulación en este aspecto. Así pues, aún cuando la revisión de la literatura sugería el uso de conejos New Zealand para estudiar defectos críticos en fémures de estos animales, durante el período que duró este proyecto fue imposible acceder a estos especímenes en ningún animalario en Chile con el consecuente cambio al modelo ya descrito en ratas Sprague Dowley. El defecto crítico factible de lograr en el cráneo de este animal es poco profundo lo que limita de manera significativa la obtención de resultados de mejor calidad, específicamente en cuanto a osteogénesis se refiere. Futuras investigaciones deben privilegiar el uso de modelos animales que permitan una aproximación más real a lo que implica la observación del comportamiento de

este nuevo biomaterial en lo que se refiere a regeneración de defectos críticos, tales como pueden ser los conejos New Zealand o los perros Beagle.

## 6. CONCLUSIONES

Con los resultados obtenidos en las investigaciones realizadas con motivo de este Proyecto de Tesis Doctoral se rechaza la Hipótesis Nula (H0) y se confirma la Hipótesis Alternativa (H1), y se obtienen las siguientes conclusiones:

1. El proceso de parametrización permitió obtener un biomaterial compuesto de hidroxiapatita y  $\beta$ -renanita, ambos minerales a base de P y Ca, con una estructura y densidad similar a la esperada de hidroxiapatita, y con una composición química similar a la del hueso humano.
2. Los ensayos *in vitro* detectaron viabilidad y proliferación de células mesenquimales humanas en presencia de HAPS a las 24 y 48 h. Se obtuvieron valores similares de viabilidad celular entre HAPS P1 y P2 con el *Gold Standard*, sugiriendo que el biomaterial no presentó citotoxicidad.
3. Los resultados de diferenciación celular en presencia de HAPS, sugirieron que las HAPS poseen actividad osteogénica y osteoinductora, dado que las células mesenquimales fueron capaces de diferenciarse a osteoblastos y generar depósitos de calcio con los 3 protocolos, incluso en mayor medida que el *gold standard* comercial.
4. Fue posible establecer un protocolo de molienda para la obtención de HAPS con tamaño y porosidad adecuado para su uso clínico, el cual fue validado determinando que los 3 protocolos de producción de HAPS tienen potencial uso clínico en combinación con L-PRF, siendo HAPS P1 el mejor candidato con una puntuación perfecta en la escala de atributos establecidos a base del *gold standard* comercial que es utilizado en la actualidad.
5. La fase de escalamiento confirmó que con el aumento de los volúmenes de producción no se observaron cambios importantes en las propiedades del biomaterial.
6. El estudio *in vivo*, demostró que el material posee buena biocompatibilidad y es capaz de promover la osteogénesis, obteniendo resultados similares a los productos comerciales que se utilizan en la actualidad para regeneración ósea. Cabe destacar que el biomaterial en base a hueso de salmón indujo la neoformación ósea a una mayor velocidad que los otros injertos, disminuyendo el tiempo de cicatrización a largo plazo, sin embargo, también se detectaron limitaciones relacionadas con la inflamación presente en tejido del huésped, presentada con todos los injertos usado.

7. La creación de este nuevo biomaterial tiene el potencial para aportar a la economía circular del país con una alternativa innovadora, generando una nueva alternativa en el campo de la ingeniería tisular ósea, potencialmente competitivo, a partir de un desecho de la industria, con bajo valor hoy en día, pero con gran factibilidad de ser usado como materia prima para la producción de biomateriales, no sólo en aplicaciones odontológicas, sino que también en otras áreas biomédicas que impliquen la utilización de injertos óseo.

## 7. BIBLIOGRAFÍA

1. Venkatesan J, Lowe B, Manivasagan P, Kang KH, Chalisserry EP, Anil S, et al. Isolation and Characterization of Nano-Hydroxyapatite from Salmon Fish Bone. *Mater Basel Switz*. 21 de agosto de 2015;8(8):5426-39.
2. Shi P, Liu M, Fan F, Yu C, Lu W, Du M. Characterization of natural hydroxyapatite originated from fish bone and its biocompatibility with osteoblasts. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. 1 de septiembre de 2018; 90:706-12.
3. Muñoz F, Jiménez C, Espinoza D, Vervelle A, Beugnet J, Haidar Z. Use of leukocyte and platelet-rich fibrin (L-PRF) in periodontally accelerated osteogenic orthodontics (PAOO): Clinical effects on edema and pain. *J Clin Exp Dent*. 2016;8(2): e119-24.
4. Muñoz F, Haidar ZS, Puigdollers A, Guerra I, Padilla MC, Ortega N and García MJ (2024) A novel Chilean salmon fish backbone-based nanoHydroxyApatite functional biomaterial for potential use in bone tissue engineering. *Front. Med*. 11:1330482. doi: 10.3389/fmed.2024.1330482
5. Gardin C, Ricci S, Ferroni L, Guazzo R, Sbricoli L, De Benedictis G, et al. Decellularization and Delipidation Protocols of Bovine Bone and Pericardium for Bone Grafting and Guided Bone Regeneration Procedures. *PloS One*. 2015;10(7): e0132344.
6. Venkatesan J, Zhong-Ji Q, Bomi R, Thomas N, Kim S. A comparative study of thermal calcination and an alkaline hydrolysis method in the isolation of hydroxyapatite from *Thunnus obesus* bone. *Biomed Mater Bristol Engl*. 13 de abril de 2011; 6:035003.
7. Correa, A., Alister, J. & Manterola, C. (2019). *Use of Injectable Platelet-Rich Fibrin (i-PRF) in Infra Osseous Defects in Non-Surgical Periodontal Therapy. Report of Two Cases*. *International journal of odontostomatology*, 13, n° 3.
8. Torres, P., Vieira, S., Cerqueira, A., Pina, S., Da Cruz Silva, O., Abrantes, J. & Ferreira, J. (2014). *Effects of Mn-doping on the structure and biological properties of  $\beta$ -tricalcium phosphate*. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 136, pp.57-66.
9. Hammood, A., Hassan, S., Alkhafagy, M. & Jaber, H. (2019). *Effect of calcination temperature on characterization of natural hydroxyapatite prepared from carp fish bones*. *SN Applied Sciences*, 436, pp. 1-12.
10. Shi, P., Liu, M., Fan, F., Yu, C., Lu, W. & Du, M. (2018). *Characterization of natural hydroxyapatite originated from fish bone and its biocompatibility with osteoblasts*. *Materials Science & Engineering C*, 90, pp. 706-712.
11. Barua, E., Das, A., Pamu, D., Deoghare, A., Deb, P., Das, S. & Chatterjee, S. (2019). *Effect of thermal treatment on the physico-chemical properties of bioactive hydroxyapatite derived from caprine bone bio-waste*. *Ceramics International*, 45, pp. 23265–23277.
12. Resmim, C., Dalpasquale, M., Vielmo, N., Mariani, F., Villalba, J., Anaissi, F., Caetano, M. & Tusi, M. (2019). *Study of physico-chemical properties and in vitro antimicrobial activity of hydroxyapatites obtained from bone calcination*. *Progress in Biomaterials*, 8, pp. 1-9.
13. Qing, L., Shaokang, S., Zhen, J., Junxiang, W. & Xianjun, L. (2021). *Effect of CaO on hydration properties of one-part alkali-activated material prepared from tailings through alkaline hydrothermal activation*. *Construction and Building Materials*, 308, pp. 1-10.
14. Goto, T. & Sasaki, K. (2014). *Effects of trace elements in fish bones on crystal characteristics of hydroxyapatite obtained by calcination*. *Ceramics international*, 40, pp. 10777-10785.

15. Nie, W., Peng, C., Zhou, X., Chen, L., Wang, W., Zhang, Y., Ma, P. & He, C. (2017). *Three-dimensional porous scaffold by self-assembly of reduced graphene oxide and nano-hydroxyapatite composites for bone tissue engineering*. Carbon, 116, pp. 325-337.
16. Haberkro, K., Búcko, M., Mozgawa, W., Pyda, A., Brzezinska-Miecznik, J. & Carpentier, J. (2009). *Behaviour of bone origin hydroxyapatite at elevated temperatures and in O<sub>2</sub> and CO<sub>2</sub> atmospheres*. Ceramics International, 35, pp. 2537–2540.
17. Xu, D., Xu, Z., Cheng, L., Gao, X., Sun, J. & Chen, L. (2022). *Improvement of the mechanical properties and osteogenic activity of 3D-printed polylactic acid porous scaffolds by nano-hydroxyapatite and nano-magnesium oxide*. Heliyon, 8, pp. 1-10.
18. Aničić, N., Kurtjak, M., Jeverica, S., Suvorov, D. & Vukomanović, M. (2021). *Antimicrobial Polymeric Composites with Embedded Nanotextured Magnesium Oxide*. Polymers, 13, pp. 1-18.
19. Mondal, S., Mondal, A., Mandal, N., Mondal, B., Mukhopadhyay, S., Dey, A. & Singh, S. (2014). *Physico-chemical characterization and biological response of Labeo rohita-derived hydroxyapatite scaffold*. Bioprocess and Biosystems Engineering, 37, pp. 1233–1240.
20. Bas, M., Dagligar, S., Kalkandelen, C. & Gunduz, O. (2020). *Use of Waste Salmon Bones as a Biomaterial*. Institute of Electrical and Electronics Engineers, pp. 1-4.
21. Venkatesan, J. & Kim, S. (2010). *Effect of Temperature on Isolation and Characterization of Hydroxyapatite from Tuna (Thunnus obesus) Bone*. Materials, 3, pp. 4761-4772.
22. Siddiqi, S. & Azhar, U. (2020). *6 - Carbonate substituted hydroxyapatite*. Handbook of Ionic Substituted Hydroxyapatites, -, pp. 149-173.
23. Bulina, N., Makarova, S., Baev, S., Matvienko, A., Gerasimov, K., Logutenko, O. & Bystrov, V. (2021). *A Study of Thermal Stability of Hydroxyapatite*. Minerals, 11, pp. 1-15.
24. Rahimnia, A., Hesarikia, H., Rahimi, A., Karami, S. & Kaviani, K. (2021). *Evaluation and comparison of synthesised hydroxyapatite in bone regeneration: As an in vivo study*. Journal of Taibah University Medical Sciences, 16, pp. 878-886.
25. Ramesh, S., Natasha, A., Tan, C., Bang, L., Ramesh, S., Ching, C. & Chandran, H. (2016). *Direct conversion of eggshell to hydroxyapatite ceramic by a sintering method*. Ceramics International, 42, pp. 7824–7829.
26. Dorozhkin, S. (2013). *Calcium orthophosphate-based bioceramics*. Materials, 6, pp. 3840–3942.
27. Karakas Aydinoglu, A., Yoruc, A., Erdogan, D. & Doğan, M. (2012). *Effect of different calcium precursors on biomimetic hydroxyapatite powder properties*. Acta Physica Polonica A, 121, pp.236-239.
28. Toppe, J., Albrechtsen, S., Hope, B., & Aksnes, A. (2007). *Chemical composition, mineral content and amino acid and lipid profiles in bones from various fish species*. Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology, 146, pp. 395–401.
29. Mbarki, M., Sharrock, P., Fiallo, M. & ElFeki, H. (2017). *Hydroxyapatite bioceramic with large porosity*. Materials Science and Engineering: C, 76, pp. 985–990.
30. Deb, P., Barua, E., Das, L. & Deoghare, A. (2019). *Synthesis of hydroxyapatite from Labeo rohita fish scale for biomedical application*. Materials Today: Proceedings, 15, pp. 277-283.
31. Kanhed, S., Awasthi, S., Goel, S., Pandey, A., Sharma, R., Upadhyaya, A. & Balani, K. (2017). *Porosity distribution affecting mechanical and biological behaviour of hydroxyapatite bioceramic composites*. Ceramics International, 43, pp. 10442-10449.

32. Mahmoud, E. M., Sayed, M., El-Kady, A. M., Elsayed, H. & Naga, S. M. (2020). *In vitro and in vivo study of naturally derived alginate/hydroxyapatite bio composite scaffolds*. International Journal of Biological Macromolecules, 165, pp. 1346-1360.
33. Naga, S. M., Mahmoud, E. M., El-Maghraby, H. F., El-Kady, A. M., Arbid, M. S., Killinger, A. & Gadow, R. (2018). *Porous scaffolds based on biogenic poly ( $\epsilon$ -caprolactone)/hydroxyapatite composites: in vivo study*. Advances in Natural Sciences: Nanoscience and Nanotechnology, 9, 045004.
34. Torquato, L., Suárez, E., Bernardo, D., Pinto, I., Mantovani, L., Silva, T., Jardini, M., Santamaria, M. & De Marco, A. (2021). *Bone repair assessment of critical size defects in rats treated with mineralized bovine bone (Bio-Oss®) and photobiomodulation therapy: a histomorphometric and immunohistochemical study*. Lasers in Medical Science, 36, pp. 1515–1525.
35. Shi P, Liu M, Fan F, Yu C, Lu W, Du M. Characterization of natural hydroxyapatite originated from fish bone and its biocompatibility with osteoblasts. Mater Sci Eng C Mater Biol Appl. 1 de septiembre de 2018; 90:706-12.
36. Idowu AT, Benjakul S, Sinthusamran S, Sae-leaw T, Suzuki N, Kitani Y, et al. Effect of Alkaline Treatment on Characteristics of Bio-Calcium and Hydroxyapatite Powders Derived from Salmon Bone. Applied Sciences. 1 de junio de 2020;10(4141):4141.
37. Kotak DJ, Devarajan PV. Bone targeted delivery of salmon calcitonin hydroxyapatite nanoparticles for sublingual osteoporosis therapy (SLOT). Nanomedicine. febrero de 2020; 24:102153.
38. Fillingham YA, Lenart BA, Gitelis S. Function after injection of benign bone lesions with a bioceramic. Clin Orthop Relat Res. julio de 2012;470(7):2014-20.
39. Tortolini P, Rubio S. Diferentes alternativas de rellenos óseos. Avances en Periodoncia. diciembre de 2012;24(3):133-8.
40. Koutsopoulos S. Synthesis and characterization of hydroxyapatite crystals: a review study on the analytical methods. J Biomed Mater Res. 15 de diciembre de 2002;62(4):600-12.
41. Liou S-C, Chen S-Y, Lee H-Y, Bow J-S. Structural characterization of nano-sized calcium deficient apatite powders. Biomaterials. enero de 2004;25(2):189-96.
42. Xu JL, Khor KA, Dong ZL, Gu YW, Kumar R, Cheang P. Preparation and characterization of nano-sized hydroxyapatite powders produced in a radio frequency (rf) thermal plasma. Materials Science and Engineering: A. junio de 2004;374(1-2):101-8.
43. Naga, S. M., Mahmoud, E. M., El-Maghraby, H. F., El-Kady, A. M., Arbid, M. S., Killinger, A. & Gadow, R. (2018). *Porous scaffolds based on biogenic poly ( $\epsilon$ -caprolactone)/hydroxyapatite composites: in vivo study*. Advances in Natural Sciences: Nanoscience and Nanotechnology, 9, 045004.
44. Mahmoud, E. M., Sayed, M., El-Kady, A. M., Elsayed, H. & Naga, S. M. (2020). *In vitro and in vivo study of naturally derived alginate/hydroxyapatite bio composite scaffolds*. International Journal of Biological Macromolecules, 165, pp. 1346-1360.
45. Torquato, L., Suárez, E., Bernardo, D., Pinto, I., Mantovani, L., Silva, T., Jardini, M., Santamaria, M. & De Marco, A. (2021). *Bone repair assessment of critical size defects in rats treated with mineralized bovine bone (Bio-Oss®) and photobiomodulation therapy: a histomorphometric and immunohistochemical study*. Lasers in Medical Science, 36, pp. 1515–1525

46. Araujo, Ricardo, Polcyn Michael, Schulp A. Mateus, Octávio Jacobs, Louis Gonçalves, A Morais. "A new elasmosaurid from the early Maastrichtian of Angola and the implications of girdle morphology on swimming style in plesiosaurs." Araújo et al 2015 S0016774614000444sup014.
47. Muñoz F, Haidar ZS, Puigdollers A, Guerra I, Padilla MC, Ortega N, Balcells M and García MJ (2024). Efficient Hydroxyapatite Extraction from Salmon Bone Waste: An Improved Lab-Scaled Physico-Chemico-Biological Process. *Molecules* 024, 29 (17)
48. Sandra M Londoño-Restrepo, Rodrigo Jeronimo-Cruz, Beatriz M Millán-Malo, Eric M Rivera-Muñoz, Mario E Rodríguez-García. Effect of the Nano crystal size on the X-ray diffraction patterns of biogenic hydroxyapatite from human, bovine, and porcine bones, *Sci. Rep.* 9 (2019) 1–12



## 8. ANEXOS

### Anexo 1

Detalle de los exámenes bioquímicos del estudio *in vivo* a los 15, 30 y 60 días

	UNIDA D	SINTÉTICO		SALMÓN		PORCINO		BOVINO		HUMANO		DEFECTO		CONTROL	
		2°	1°	2°	1°	2°	1°	2°	1°	2°	1°	2°	1°	2°	1°
COMPUESTO		T1	T1	T2	T2	T3	T3	T4	T4	T5	T5	T6	T6	T7	T7
TRIGLICÉRIDO S	mg/dL	168,3	194	144	120,8	135,5	163,5	122,3	108	136	126,8	106	119,5	128,6	184,8
LDH LACTATO DESHIDROGENASA	UI/L	622,7	924	1120,6	1490	856,6	879,3	1196	1892	2230	987,6	1386	503,6	2860	2891
PROTEÍNA C REACTIVA	ng/mL	66,1	112,3	128,9	88,1	32,8	125,8	63,5	123,6	166,3	79,2	109,3	52,3	139,6	125,3
MAGNESIO SANGRE O FLUIDOS	ug/mL	3,9	3,9	3,7	3,8	3,8	4,6	3,3	4,2	4,9	3,2	3,9	3,2	4,1	5,4
GLUCOSA SIN FLUORURO	mg/dL	101,5	140	102	160	50	142,3	42	120	96	128,6	98,3	113,6	94	88
COLESTEROL TOTAL	mg/dL	90,5	90	80	90,4	55,8	112,9	50	60	52	98,4	83	106,2	74	86,8
PROTEÍNAS TOTALES	g/dL	5,1	8	6,7	8	6,8	4,3	6,4	7,6	5,6	4,9	4,7	5,4	6,4	6,7
ALBÚMINA	g/dL	2,1	5,2	4,4	4,8	4,6	2,3	4,2	4,4	4	2,8	2,6	2,5	4,6	4,4
GLOBULINAS	g/dL	3	2,8	2,3	3,2	2,2	2	2,2	3,2	1,6	2,1	2,1	2,9	1,8	2,3
FÓSFORO	mg/dL	9,2	18	12,4	14,8	12,6	15,5	10,8	12,8	12	9,1	15,3	9,2	14	13,6
CALCIO	mg/dL	11,3	9,6	9,2	11,1	9,1	14,3	9,4	9,2	8,9	10,6	11,8	9,1	9,2	8,4
NUS NITRÓGENO UREICO SANGUÍNEO	mg/dL	21,3	26,2	20,6	18,2	18,7	22,7	18,4	20,6	18,7	15,2	18,9	18,8	20,6	17
CREATININA	mg/dL	0,4	0,4	1,2	0,4	0,6	0,57	0,4	0,4	0,4	0,34	0,5	0,33	1,2	0,4
FOSFATASA ALCALINA	UI/L	644,1	704	448	428	365,6	653,2	514	432	410	586,2	324,8	524,8	620	376
ALT ALANINO AMINO TRANSFERASA	UI/L	201,3	132,5	136	180	124	241,8	156,6	128,6	126	89,5	202,3	133	126	126,3
AST ASPARTATO AMINO TRANSFERASA	UI/L	244,3	280	304	278	102,6	277,3	288	225,6	372	278,3	220,8	317,6	370	226,5
GGT GAMMA GLUTAMILTRANSFERASA	UI/L	5,3	5,8	5,4	5,2	7	5,9	5,2	6	6,3	5,8	6,1	3,5	5,9	6,9
UREA SANGRE O FLUIDOS	mg/dL	45,6	56	44	39	40	48,6	39,4	44	40	32,5	40,4	40,3	44	36,4
BILIRRUBINA TOTAL	mg/dL	0,9	0,65	0,5	0,5	0,7	0,56	0,6	0,68	0,3	0,42	0,31	0,34	0,28	0,8
ERITROCITOS	x10 <sup>6</sup> /μL	7,62	7,83	7,45	6,36	6,53	6,7	8,38	6,95	6,31	7,86	6,9	7,68	5,67	6,19
HEMATOCRITO	%	46,5	47	40,7	42	39,5	43,2	44,9	39,5	44,2	45,6	35,6	41,6	36,7	42,7
HEMOGLOBINA	g/dL	16,2	16,7	13,8	14,3	13,4	15,1	15,3	13,4	14,8	16,4	10,8	13,9	12,3	12,4
V.C.M.	fL	61	60	54,6	66	60,5	64,5	53,6	56,8	70	58	51,6	54,2	64,7	69
H.C.M.	pg	21,2	21,3	18,6	22,4	20,6	22,6	18,2	19,3	23,4	20,9	15,7	18,2	21,7	20
C.H.C.M.	g/dL	34,8	35,5	34	34	34	35	34	34	33,5	36	30,4	33,5	33,5	29
%RETICULOCITOS	%	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6	0,5	0,6	0,6

RETICULOCITOS	/uL	45738	47000	44725	38182	39174	40186	50261	1	37886	47172	41395	38376	34034	37130
MORFOLOGÍA ERITROCITOS		NOR MAL ES AL FROTIS	NOR MAL ES AL FROTIS	NOR MAL ES AL FROTIS	NOR MAL ES AL FROTIS	NORMALES AL FROTIS	NOR MAL ES AL FROTIS	NORMALES AL FROTIS	NOR MAL ES AL FROTIS	NOR MAL ES AL FROTIS	NORMALES AL FROTIS	NOR MAL ES AL FROTIS	NORMALES AL FROTIS	NORMALES AL FROTIS	NOR MAL ES AL FROTIS
LEUCOCITOS RECuento	/uL	9100	4100	15600	7100	8100	4800	7200	7800	10800	11600	9900	8200	6900	4600

Continuación tabla.

		SINTÉTICO		SALMÓN		PORCINO		BOVINO		HUMANO		DEFECTO		CONTROL	
		2°	1°	2°	1°	2°	1°	2°	1°	2°	1°	2°	1°	2°	1°
COMPUESTO	UNIDAD	T1	T1	T2	T2	T3	T3	T4	T4	T5	T5	T6	T6	T7	T7
% BLASTOS	%	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
BLASTOS	/uL	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
% MIELOCITOS	%	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
MIELOCITOS	/uL	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
% JUVENILES	%	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
JUVENILES	/uL	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
% BACILIFORMES	%	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
BACILIFORMES	/uL	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
% NEUTRÓFILOS	%	18	15	17	12	18	13	22	25	22	19	31	16	21	17
NEUTRÓFILOS	/uL	1638	615	2652	852	1458	624	1584	1950	2376	2204	3069	1312	1449	782
% LINFOCITOS	%	76	80	79	84	77	82	70	69	70	76	66	78	71	78
LINFOCITOS	/uL	6916	3280	12324	5964	6237	3936	5040	5382	7560	8816	6534	6396	4899	3588
% MONOCITOS	%	4	4	2	4	4	3	3	2	3	3	2	3	3	3
MONOCITOS	/uL	364	164	312	284	324	144	216	156	324	348	198	246	207	138
% EOSINÓFILOS	%	2	1	2	0	1	2	5	4	5	2	1	3	5	2
EOSINÓFILOS	/uL	182	41	312	0	81	96	360	312	540	232	99	246	345	92
% BASÓFILOS	%	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
BASÍFILOS	/uL	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
TOTAL %		100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
MORFOLOGÍA LEUCOCITOS		NEUTRÓFILOS HIPE RSEGME NTAD OS	NEUTRÓFILOS CON SIGNOS DEGRATIVOS	NEUTRÓFILOS CON SIGNOS DEGRATIVOS	NEUTRÓFILOS CON SIGNOS DEGRATIVOS	NORMALES AL FROTIS	NEUTRÓFILOS CON SIGNOS DEGRATIVOS	NORMALES AL FROTIS	NEUTRÓFILOS CON SIGNOS DEGRATIVOS	NEUTRÓFILOS CON SIGNOS DEGRATIVOS	NEUTRÓFILOS CON SIGNOS DEGRATIVOS	NEUTRÓFILOS CON SIGNOS DEGRATIVOS	NORMALES AL FROTIS	NEUTRÓFILOS CON SIGNOS DEGRATIVOS	NEUTRÓFILOS CON SIGNOS DEGRATIVOS
TROMBOCITOS RECuento		118300	89300	92800	89400	155200	144300	186000	130200	112400	186000	99400	165000	89300	166200
MORFOLOGÍA TROMBOCITOS		NOR MAL ES AL FROTIS	NOR MAL ES AL FROTIS	NOR MAL ES AL FROTIS	NOR MAL ES AL FROTIS	NORMALES AL FROTIS	NOR MAL ES AL FROTIS	NORMALES AL FROTIS	NOR MAL ES AL FROTIS	NOR MAL ES AL FROTIS	NORMALES AL FROTIS	NOR MAL ES AL FROTIS	NORMALES AL FROTIS	NORMALES AL FROTIS	NOR MAL ES AL FROTIS
SODIO	mEQ/L	161,3	155,6	159,4	149,2	146,8	166,2	149,3	155,6	155,3	155,3	152,2	144,3	150,3	155,1

POTASIO	mEQ/L	4,6	3,9	4,9	3,9	3,9	4,8	5,1	5,6	4,1	3,3	4,9	5,5	4,8	3,8
CLORO	mEQ/L	118,9	116,8	119,8	110,9	110,8	124,7	110,5	112,8	119,8	115,8	117,2	107,6	120,3	121,2

A los 30 días:

		HUMANO		SALMÓN		SINTÉTICO		PORCINO		BOVINO		DEFECTO		CONTROL	
		2°	1°	2°	1°	2°	1°	2°	1°	2°	1°	2°	1°	2°	1°
COMPUESTO	UNIDAD	S1	S1	S2	S2	S3	S3	S4	S4	S5	S5	S6	S6	S7	S7
TRIGLICÉRIDOS	mg/dL	159,6	168,3	126,8	156,8	156,5	152,3	119,3	123,5	106,3	122,3	112	102,8	116	99,7

Continuación tabla.

		HUMANO		SALMÓN		SINTÉTICO		PORCINO		BOVINO		DEFECTO		CONTROL	
		2°	1°	2°	1°	2°	1°	2°	1°	2°	1°	2°	1°	2°	1°
COMPUESTO	UNIDAD	S1	S1	S2	S2	S3	S3	S4	S4	S5	S5	S6	S6	S7	S7
LDH LACTATO DESHIDROGENASA	UI/L	513,8	510,6	845,2	610,6	118,3	812,6	915,3	812,3	3210	699,3	2561	685,6	1856	388,3
PROTEÍNA C REACTIVA	ng/mL	55,6	44,6	74,3	54,9	92,8	76,5	62,3	66,9	156,3	55,6	118,3	69,5	93,5	33,6
MAGNESIO SANGRE O FLUIDOS	ug/mL	3,4	3,3	4,3	4,1	3,8	5,1	3,5	3,9	4,9	3,5	3,8	3,9	3,3	2,9
GLUCOSA SIN FLUORURO	mg/dL	102,5	123,8	146	119,5	92,5	113,5	88,9	106,5	150	139,3	96	98,8	112	112,6
COLESTEROL TOTAL	mg/dL	104,3	1	48	119,8	106,3	112,5	189,9	128,3	72	98,3	47	98,8	68	108,3
PROTEÍNAS TOTALES	g/dL	5,3	5,5	5,6	5,4	4,2	5,4	5,9	5,7	8	4,8	6,2	5,3	6,4	5,1
ALBÚMINA	g/dL	2,4	2,4	4	2,8	2,1	2,5	3,5	2,8	4,4	2,8	4,4	2,8	4,3	2,8
GLOBULINAS	g/dL	2,9	3,1	1,6	2,6	2,1	2,9	2,4	2,9	3,6	2	1,8	2,5	2,1	2,3
FÓSFORO	mg/dL	12,5	9,5	13,8	7,9	13,8	15,8	9,7	9,1	20,5	8,5	11,6	13,5	14	3,9
CALCIO	mg/dL	12,8	12,2	11,2	12,8	11,9	12,1	11,3	11,6	11,8	13,5	11,2	11,9	10,7	10,4
NUS NITRÓGENO UREICO SANGUÍNEO	mg/dL	20,9	20,8	20,6	17,7	20,9	19,1	10,8	15,8	18,7	18,3	19,9	19,7	20,7	15,7
CREATININA	mg/dL	0,44	0,38	1,2	0,41	0,45	0,41	0,38	0,45	0,8	0,31	1,6	0,44	0,84	0,44
FOSFATASA ALCALINA	UI/L	512,3	377,8	408	559,5	-	448,3	411,3	321,3	424	388,2	468	513,2	344	344,8
ALT ALANINO AMINO TRANSFERASA	UI/L	133,2	138,6	88	188,9	156,8	156,6	168,6	145,6	176	132,5	132,5	189,3	118	115,6
AST ASPARTATO AMINO TRANSFERASA	UI/L	317,5	266,8	424	244,6	217,6	238,9	228,6	302,3	608	266,6	296	244,8	280	214,8
GGT GAMMA GLUTAMILTRANSFERASA	UI/L	6,5	6,5	12	6,9	6,7	7,9	12	6,1	12	6,2	6	5,5	10	5,8
UREA SANGRE O FLUIDOS	mg/dL	44,7	44,6	44	37,9	44,7	40,8	23,1	33,8	40	39	42,6	42,2	44,4	33,7
BILIRRUBINA TOTAL	mg/dL	0,44	0,51	0,5	0,44	0,47	0,44	0,68	0,49	0,74	0,54	0,3	-	0,69	0,45
ERITROCITOS	x10 <sup>6</sup> /μL	7,42	6,45	5,73	7,95	7,03	7,57	6,61	6,68	6,42	6,69	6,43	7,73	6,5	6,37
HEMATOCRIT O	%	44,5	44,5	37,5	46,5	40,8	52,6	39,5	44,5	45,6	44,5	45	43	44,5	44,9
HEMOGLOBINA	g/dL	15,8	15,1	13,1	16,3	12,6	16,8	13,8	14,7	16	15,1	14,9	14,1	15,9	16,2
V.C.M.	fL	60	69	65,5	58,5	58	69,5	59,8	66,6	71	66,5	70	55,6	68,5	70,5
H.C.M.	pg	21,3	23,5	22,9	20,5	18	22,2	20,9	22	24,9	22,6	23,2	18,2	24,5	25,4



		FRO TIS	FRO TIS	FROTI S	FROTI S	FRO TIS	FRO TIS	FROTI S	FRO TIS	FROTI S	FROTI S	FROTI S	FRO TIS	FRO TIS	
SODIO	mEQ/L	157,4	155	148,6	159,8	155,5	156,8	142,9	158,3	166,6	156,3	142,2	156,3	144,9	148,4
POTASIO	mEQ/L	5	4,5	5,6	4,6	4,5	4,9	6,3	5,3	4,3	4,2	5,6	4,9	5,5	4,5
CLORO	mEQ/L	122,2	112	102,3	117,9	114,9	119,4	110,4	122,8	119,2	115,6	102,3	118,3	105,8	107,6

A los 60 días:

		CONTROL		BOVINO		PORCINO		SINTÉTICO		SALMÓN		HUMANO		DEFECTO	
		2°	1°	2°	1°	2°	1°	2°	1°	2°	1°	2°	1°	2°	1°
COMPUESTO	UNIDA D	R1	R1	R2	R2	R3	R3	R4	R4	R5	R5	R6	R6	R7	R7
TRIGLICÉRIDOS	mg/dL	92,3	135,2	110	139,2	128,6	131,5	126	117,3	110,6	94,3	210,8	98,2	134	122,6
LDH LACTATO DESHIDROGEN ASA	UI/L	1354	386,6	1189,5	520,6	1320	512,6	1542	651,3	1282	689,6	3256	438,6	1640	518,6
PROTEÍNA C REACTIVA	ng/mL	112,6	18,6	123,8	33,5	128,9	20,8	118,6	46,8	80,7	33,6	138,5	32,2	85,6	22,9
MAGNESIO SANGRE O FLUIDOS	ug/mL	4,4	2,9	4,8	3,5	3,8	3,7	4,3	3,4	4,7	3,5	5,5	3,8	4,7	3,4

Continuación tabla.

		CONTROL		BOVINO		PORCINO		SINTÉTICO		SALMÓN		HUMANO		DEFECTO	
		2°	1°	2°	1°	2°	1°	2°	1°	2°	1°	2°	1°	2°	1°
COMPUESTO	UNIDA D	R1	R1	R2	R2	R3	R3	R4	R4	R5	R5	R6	R6	R7	R7
GLUCOSA SIN FLUORURO	mg/dL	112	112,3	130	128,3	192	117,5	262	98,3	212	110,8	133,9	134,8	189	87,6
COLESTEROL TOTAL	mg/dL	60,00	98,40	108,60	96,60	84	98,8	62	105,3	60	105,3	109,5	102,8	87,3	106,8
PROTEÍNAS TOTALES	g/dL	5,20	5,90	5,10	4,90	5,2	4,8	6,2	5,9	6,2	5,1	5,7	5,4	5,1	5,6
ALBÚMINA	g/dL	3,00	2,80	2,80	2,40	3,8	2,8	4,4	3,1	4,2	2,8	3,7	2,8	2,6	3,1
GLOBULINAS	g/dL	2,20	3,10	2,30	2,50	1,4	2	1,8	2,8	2	2,3	2	2,6	2,5	2,5
FÓSFORO	mg/dL	18,40	7,20	13,30	7,90	8,2	6,5	8	6,5	8,5	7,9	9,8	7,6	12,8	8,1
CALCIO	mg/dL	6,80	9,80	9,70	11,10	9,7	10,9	10	10,8	9,7	10,8	10,8	11,8	11,1	12,8
NUS NITRÓGENO UREICO SANGUÍNEO	mg/dL	18,30	18,00	15,90	20,70	16,8	22,3	18,7	16,4	17,5	18,2	20,6	15,8	21	21
CREATININA	mg/dL	1,20	0,32	0,49	0,35	0,4	0,38	0,4	0,34	0,4	0,48	0,31	0,41	0,49	0,44
FOSFATASA ALCALINA	UI/L	978,10	271,00	578,30	421,30	341,3	384,4	426	321,3	524	354,6	412,3	346,5	354,6	398,9
ALT ALANINO AMINO TRANSFERASA	UI/L	140,00	119,70	123,80	98,60	156,3	135,5	119,3	104,5	176	102,8	116,5	108,9	165,1	98,6
AST ASPARTATO AMINO TRANSFERASA	UI/L	566,50	247,90	354,30	188,60	228	228,9	245,6	223,8	236	266,8	308,9	224,6	268,2	266,9
GGT GAMMA GLUTAMILTRA NSFERASA	UI/L	7,00	5,60	5,70	4,80	6	6,7	5,1	6,1	6,9	6	6,5	5,8	7	5,8
UREA SANGRE O FLUIDOS	mg/dL	39,20	38,50	34,00	44,30	36	47,8	40	35,1	37,4	39	44	33,8	45	44,9
BILIRRUBINA TOTAL	mg/dL	0,40	0,37	0,64	0,38	0,4	0,54	0,3	0,49	0,5	0,45	0,8	0,38	0,9	0,56
ERITROCITOS	$\times 10^6/\mu$ L	6,90	8,47	6,42	7,58	7,43	7,22	6,72	8,26	5,76	7,41	6,37	8,2	5,87	7,25
HEMATOCRITO	%	44,50	49,90	39,8	45,5	44,2	44,6	39,3	45,9	38,5	49,6	44,9	48,8	35,6	48,3
HEMOGLOBINA	g/dL	15,60	18,50	13,9	15,5	13,5	14,9	13	16,8	12,9	18,6	15,6	27,3	10,3	16,7

V.C.M.	fL	64,50	58,90	62	60	59,5	61,8	58,5	55,6	66,8	66,9	70,5	59,5	60,6	66,6
H.C.M.	pg	22,60	21,80	21,7	20,4	18,1	20,7	19,3	20,3	22,4	25,1	24,5	33,3	17,5	23
C.H.C.M.	g/dL	35,00	37,00	35	34	30,5	33,5	33	36,5	33,5	37,5	34,8	56	28,9	34,5
%RETICULOCITOS	%	0,50	0,60	0,6	0,5	0,6	0,6	0,6	0,4	0,6	0,4	0,6	0,5	1	0,4
RETICULOCITOS	/uL	34496,00	50832,00	38516	37917	44571	43301	40308	33022	34681	29656	38213	41008	58746	29009
MORFOLOGÍA ERITROCITOS		NOR MALES AL FROTIS	SIGNOS DE HEMOCENTRACIÓN	NOR MALES AL FROTIS	NOR MALES AL FROTIS	NOR MALES AL FROTIS	NORMAL AL FROTIS	NORMALES AL FROTIS	NORMAL AL FROTIS	NORMALES AL FROTIS	NOR MALES AL FROTIS	NOR MALES AL FROTIS	NORMAL AL FROTIS	NORMALES AL FROTIS	NORMAL AL FROTIS
LEUCOCITOS RECUENTO	/uL	9800,00	24400,00	10700	12200	8800	9100	6800	8400	9100	19400	7200	9200	10900	7900
% BLASTOS	%	0,00	0,00	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
BLASTOS	/uL	0,00	0,00	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
% MIELOCITOS	%	0,00	0,00	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
MIELOCITOS	/uL	0,00	0,00	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
% JUVENILES	%	0,00	0,00	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
JUVENILES	/uL	0,00	0,00	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
% BACILIFORMES	%	0,00	0,00	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

**Continuación tabla.**

		CONTROL		BOVINO		PORCINO		SINTÉTICO		SALMÓN		HUMANO		DEFECTO	
		2°	1°	2°	1°	2°	1°	2°	1°	2°	1°	2°	1°	2°	1°
COMPUESTO	UNIDAD	R1	R1	R2	R2	R3	R3	R4	R4	R5	R5	R6	R6	R7	R7
BACILIFORMES	/uL	0,00	0,00	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
% NEUTRÓFILOS	%	18,00	12,00	29	54	21	23	27	20	20	28	25	11	21	28
NEUTRÓFILOS	/uL	1764,00	2928,00	3103	6588	1848	2093	1836	1680	1820	5432	1800	1012	2289	2212
% LINFOCITOS	%	78,00	76,00	67	41	75	73	69	73	75	69	70	84	72	65
LINFOCITOS	/uL	7644,00	18544,00	7169	5002	6600	6643	4692	6132	6825	13386	5040	7728	7848	5135
% MONOCITOS	%	3,00	12,00	3	3	3	4	3	3	2	2	3	2	5	3
MONOCITOS	/uL	294,00	2928,00	321	366	264	364	204	252	182	388	216	184	545	237
% EOSINÓFILOS	%	1,00	0,00	1	2	1	0	1	4	3	1	2	3	2	4
EOSINÓFILOS	/uL	98,00	0,00	107	244	88	0	68	336	273	194	144	276	218	316
% BASÓFILOS	%	0,00	0,00	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
BASÓFILOS	/uL	0,00	0,00	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
TOTAL %		100,00	100,00	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
MORFOLOGÍA LEUCOCITOS		NEUTROFILOS CON SIGNOS DEGENERATIVOS S1+	NORMALES AL FROTIS	NEUTROFILOS CON SIGNOS DEGENERATIVOS S1+	NOR MALES AL FROTIS	NEUTROFILOS CON SIGNOS DEGENERATIVOS S1+	NORMAL AL FROTIS	NEUTRÓFILOS HIPERMEN TADOS	NORMAL AL FROTIS	NEUTRÓFILOS HIPERMEN TADOS	NEUTROFILOS CON SIGNOS DEGENERATIVOS S1+	NEUTROFILOS CON SIGNOS DEGENERATIVOS S1+	NORMAL AL FROTIS	NEUTRÓFILOS HIPERMEN TADOS	NORMAL AL FROTIS
TROMBOCITOS RECUENTO		121300	331000	129000	65200	123200	126100	119000	189000	156200	136000	168200	156200	118200	188900

MORFOLOGÍA TROMBOCITOS		NOR	NORMA	NOR	PLA	NOR	NO	NORM	NO	NORM	NOR	NOR	NO	NORM	NOR	
		MALE	LES AL	MALE	QUE	MALE	RM	ALES	RM	ALES	MALE	MALE	RM	ALES	ALES	MALE
		SAL	LES AL	SAL	TAS	SAL	AL	AL	AL	SAL	SAL	SAL	AL	AL	SAL	SAL
		FROT	FROTIS	FROT	DIS	FROT	FR	FR	FR	FROTIS	FROTIS	FROTIS	FR	FR	FROTIS	FROTIS
		IS		IS	MIN	IS	OTI	OTI	OTI				OTI			IS
					UID		S	S	S				S			
					AS											
<b>SODIO</b>	mEQ/L	161,3	146,3	159,8	146,9	154,3	149,9	156,6	148,3	145,6	144,3	151,6	145,9	155,2	144,2	
<b>POTASIO</b>	mEQ/L	5,3	4,8	3,8	4,9	3,8	3,9	4,7	4,2	3,9	3,9	4,9	4,2	5	4,5	
<b>CLORO</b>	mEQ/L	122,8	106,2	118,9	108,9	116,3	110,8	114	110,3	108,7	108,3	116,9	112,8	117,3	106,8	

## Anexo 2

### Pauta de evaluación de HAPS en contexto clínico

	5	4	3	2	1	Puntaje
<b>Manipulación del cirujano</b>	Es fácil de llevar a sitio quirúrgico, es posible darle una forma deseada, fácil manipulación.	Es fácil de llevar a sitio quirúrgico, es posible darle una forma deseada en pequeñas porciones, fácil manipulación.	Es fácil de llevar a sitio quirúrgico, no es posible darle una forma deseada, manipulación difícil.	Material difícil de manipular y llevar a sitio quirúrgico, material consistencia de arena, se pierde material en manipulación.	Difícil manipulación, material se disgrega y se pierde material, difícil de llevar a sitio quirúrgico.	
<b>Hidrofobicidad</b>	Material absorbe líquido fácilmente.	Material absorbe una pequeña parte del líquido.	Material necesita manipulación para absorber líquido.	Material necesita mayor cantidad de líquido, saturar el medio.	Material no absorbe líquido.	
<b>Agregación</b>	Se aglutina.	Material se aglutina, pero se separa fácilmente.	Material frágil, se aglutina en pequeñas porciones.	Material se aglutina poco conteniendo mucho líquido.	Material no se aglutina.	
<b>Consistencia</b>	Firme, resiste a la presión.	Material firme que resiste poca presión.	Material blando.	Material con consistencia de arena.	Material disgregado sin consistencia (partículas en líquido).	
<b>PUNTAJE TOTAL OBTENIDO</b>						<b>__/20</b>



## Anexo 3

Muñoz F, Haidar ZS, Puigdollers A, Guerra I, Padilla MC, Ortega N and García MJ (2024) A novel Chilean salmon fish backbone-based nanoHydroxyApatite functional biomaterial for potential use in bone tissue engineering. *Front. Med.* 11:1330482.

doi: [10.3389/fmed.2024.1330482](https://doi.org/10.3389/fmed.2024.1330482)

Frontiers in Medicine

Factor de impacto: 3.1

Índice de citación: 5.1

Cuartil 1

Mi contribución en este artículo fue en el análisis de la literatura, trabajo de campo directamente involucrado en la experimentación, obtención de los fondos y redacción del manuscrito



## OPEN ACCESS

## EDITED BY

Madhappan Santha Moorthy, Yeungnam University, Republic of Korea

## REVIEWED BY

S. Sebastianm,al,

Holy Cross College, Nagercoil, India

A. Lesly Fathima,

Manonmaniam Sundaranar University, India

## \*CORRESPONDENCE

Z. S. Haidar zhaidar@uandes.cl



M. J. García mjgarcia12@miuandes.cl



†These authors have contributed equally to this work

RECEIVED 30 October 2023

ACCEPTED 08 April 2024

PUBLISHED 07 May 2024

## CITATION

Muñoz F, Haidar ZS, Puigdollers A, Guerra I, Padilla MC, Ortega N and García MJ (2024) A novel Chilean salmon fish backbone-based nanoHydroxyApatite functional biomaterial for potential use in bone tissue engineering. *Front. Med.* 11:1330482.

doi: 10.3389/fmed.2024.1330482

## COPYRIGHT

© 2024 Muñoz, Haidar, Puigdollers, Guerra, Padilla, Ortega and García. This is an open-access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License \(CC BY\)](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

# A novel Chilean salmon fish backbone-based nanoHydroxyApatite functional biomaterial for potential use in bone tissue engineering

F. Muñoz<sup>1,2†</sup>, Z. S. Haidar<sup>2,3,4,5,6\*†</sup>, A. Puigdollers<sup>7</sup>, I. Guerra<sup>1</sup>,

M. Cristina Padilla<sup>3,4,8,9</sup>, N. Ortega<sup>8</sup> and M. J. García<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Facultad de Odontología, Universidad Internacional de Cataluña, Barcelona, Spain, <sup>2</sup>Laboratorio

BioMAT'X R&D&I (HAIDAR I+D+i LAB), Universidad de los Andes, Santiago, Chile, <sup>3</sup>Centro de Investigación e Innovación Biomédica (CiiB), Universidad de los Andes, Santiago, Chile, <sup>4</sup>Programa de Doctorado en BioMedicina, Facultad de Medicina, Universidad de los Andes, Santiago, Chile,

<sup>5</sup>Programa de Doctorado en Ciencias Odontológicas, Facultad de Odontología, Universidad de los Andes, Santiago, Chile, <sup>6</sup>Facultad de Odontología, Universidad de los Andes, Santiago, Chile, <sup>7</sup>Área de Ortodoncia, Facultat Internacional de Catalunya, Barcelona, Spain, <sup>8</sup>Laboratorio de Investigación e Ingeniería de Biopolímeros (BiopREL), Universidad de los Andes, Santiago, Chile, <sup>9</sup>Escuela de Nutrición y Dietética, Facultad de Medicina, Universidad de los Andes, Santiago, Chile

**Introduction:** Given the ensuing increase in bone and periodontal diseases and defects, *de novo* bone repair and/or regeneration strategies are constantly undergoing-development alongside advances in orthopedic, oro-dental and cranio-maxillo-facial technologies and improvements in bio-/nano-materials. Indeed, there is a remarkably growing need for new oro-dental functional biomaterials that can help recreate soft and hard tissues and restore function and aesthetics of teeth/ dentition and surrounding tissues. In bone tissue engineering, HydroxyApatite minerals (HAp), the most stable *CaP/Calcium Phosphate*

bioceramic and a widely-used material as a bone graft substitute, have been extensively studied for regenerative medicine and dentistry applications, including clinical use. Yet, limitations and challenges owing principally to its bio-mechanical strength, exist and therefore, research and innovation efforts continue to pursue enhancing its bio-effects, particularly at the nano-scale.

**Methods:** Herein, we report on the physico-chemical properties of a novel nanoHydroxyApatite material obtained from the backbone of Salmon fish (*patent-pending*); an abundant and promising yet under-explored alternative HAp source. Briefly, our nanoS-HAp obtained via a modified and innovative alkaline hydrolysis–calcination process was characterized by X-ray diffraction, electron microscopy, spectroscopy, and a cell viability assay.

**Results and Discussion:** When compared to control HAp (synthetic, human, bovine or porcine), our nanoS-HAp demonstrated attractive characteristics, a promising biomaterial candidate for use in bone tissue engineering, and beyond.

KEYWORDS

biomaterials, hydroxyapatite, nanotechnology, osteointegrative, osteoconduction, osteoinduction, salmon bone, bioengineering

# 1 Introduction

Bone is a complex yet dynamic structure with an exceptional regenerative potential (1). Consequently, Bone Tissue Engineering (1, 2) continues to be a popular sub-field of study in regenerative medicine and dentistry, also due to the accruing scientific and bone biology knowledge, expertise and technological advances in materials, pharmaceuticals, and nano-scaled strategies to achieve *de novo* osseo- regeneration, in simple as well as critical-sized defects (3–5). Indeed, with more than 2 million bone grafting procedures performed annually, around the World, bone tissue is the 2nd most common transplant after blood transfusion (6). Yet, despite critical limitations including supply and quality of host bone (limited bone mass), donor site morbidity, and immunogenicity, autologous and allograft bone grafting materials, respectively, are generally considered the clinical standard-of-care (gold standard) (7). Furthermore, while various synthetic bone graft substitutes are commercially-available, delayed and/or compromised healing remains a significant clinical challenge, today (8). Henceforth, there are still no *ideal* materials available with simultaneously good biocompatibility, biodegradability, porous three- dimensionally, and osseo-conduction, –induction, and-genesis capabilities (9). In this context, the development of *novel* alternatives for safe and effective bone repair, reconstruction, restoration, replacement and/or regeneration is one of the most clinically important long-term goals of R&D&I within the field of mineralized tissues (10). Herein, biomaterials have been established to induce active bio-mineralization owing to their capacity and ability to conduct and induce bone growth; osteo-conduction and-induction, respectively (11, 12). Bone contains about 45–70 wt.% of calcium phosphate (CaP mineralization produces hydroxyapatite in the bone and skeleton formation process), 10 wt.% of water and the remaining is collagen (13). Hydroxyapatite (HAp) minerals, chemically represented as  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ , have been extensively studied in the last decades, as is almost identical (close resemblance), to the inorganic portion of the human bone matrix (14). HAp is well-known for its excellent biocompatibility, osteo-conductive and-integrative properties, and thus, is commonly used as a bone graft in orthopedic, oro-dental and cranio-maxillo-facial surgeries (15). In recent years, its potential to apophyse new bone as well as induce the transformation (osteogenic differentiation) of un-differentiated stem cells into osteoblasts (osteo-induction), have been receiving more attention for its application in bone tissue engineering (16, 17), nonetheless, despite being considered the most stable calcium phosphate ceramic material (in terms of temperature, pH and composition of the intra-vascular fluid), critical mechanical (rheological) and safety (biodegradation/ resorption over time) issues including low resistance to fracture, fatigue failure, brittleness, high calcium:phosphate ratio and crystallinity, persist. In view of such significant drawbacks or limitations of traditional HAp-based treatments, the search for a novel biomaterial suitable for safe and efficacious bone regeneration, continues. Recent advances in nanoscience and nanotechnology (nanomaterials can be natural, synthetic or composites/hybrids, with a scale of <100 nm) have opened new doors and avenues for designing, formulating, characterizing, optimizing, evaluating, and manufacturing superior nano-scaled bone grafting biomaterials. When compared to traditional porous HAp, nano-scaled HAp has earned considerable attention owing to better bioactivity, superior

bone integration ability, physico-chemico-mechanical stability, safety, and biodegradability control, over time. Although HAp can be obtained from animal and human bones, the percentage of the mineral content can vary between species, henceforth, fish bone has been suggested as a good alternative (and sustainable) source. This is especially significant considering that the fishing industry produces billions of tons of fish bone “waste,” annually; a rather major environmental problem. Today, fish bone is processed to be used as feed and a source of calcium for livestock (and protein hydrolysates), however the final products obtained from these wastes may have low value and require higher energy consumption (18, 19). On the other hand, fish sources are presumably much safer than other animal sources, and the wide evolutionary gap between fish and humans suggests a low risk of disease transmission (16). Furthermore, fish by-products are readily-abundant and at a lower cost. Thereby, obtaining HAp from the salmon fish back bone to elaborate new biomaterials can be considered an opportunity and a benefit, helping to reduce the negative environmental impact that the fishing industry waste products present (17, 20). As Chile is the World’s second-largest producer of farmed salmon (estimated at 32% of global production), the waste and pollution problem(s), resource opportunity and potential benefit via innovating a novel inexpensive nano-material as a bio-effective alternative to traditional bone grafts is rather attractive and desirable. When compared to tuna and/or cod fish, salmon can be used to obtain adequate amounts of HAp from their back bones (16, 17, 21). Furthermore, obtaining or producing HAp from the salmon back bone is comparatively an inexpensive process that enables the development of bone grafts with less risk of crossed infection and morbidity, and counteracts any ethical, cultural, or religious issues related to acceptance of other bone grafts, such as xenografts (xenogeneic bone), from bovine or porcine sources. For all of the aforementioned issues and considerations, in this multi- centered collaborative study, we opted to efficiently extract HAp from the back bones of Chilean salmon fish through a modified alkaline hydrolysis – calcination process, conceived in our participating research laboratories, in a simple, reproducible and sustainable manner. The resultant HAp, termed henceforth as nanoS-HAp or SAHA for short (*patent-pending*), was characterized for its physico- chemico-mechanical properties by X-ray diffraction (XRD), scanning electron microscopy (SEM) and energy dispersive X-ray spectroscopy (EDX). Then, the *in vitro* cellular behavior/proliferation and biocompatibility (or cytocompatibility) of the produced nanoS-HAp was tested (17) using a cell viability assay (MTT). Briefly, HAp produced with a nano-scale size, possesses an ultra-structure suitable for a higher absorbability and can provide a higher surface bio-activity favoring biological performance and exhibiting advanced cellular responses (in terms of proliferation and differentiation of osteogenic- related cells for bone regeneration), when compared with traditional HAp. This is a *proof-of-concept* pre-clinical study hypothesizing that nanoS-HAp is a suitable, stable, safe and potentially bio-efficacious bone grafting material alternative to commercially-available natural, synthetic and/or composite hybrid products. It can be expected, in a sequel work (*presently ongoing*), to combine the advantages of our nanoS-HAp with different materials and clinically-relevant conditions, rendered necessary to achieve a better or superior

(boosted and accelerated) clinical effect and prognosis, when compared to other formulations and commercially-available products, which often

include bone regenerative biomaterials incorporating bio-polymeric, bio-ceramic (inorganic non-metallic materials), calcium phosphates (in powder or cement formats, including  $\alpha$ - and  $\beta$ -tricalcium phosphate and tetracalcium phosphate, among others), nano-scaled structures and/or biodegradable matrices with bioactive and easily resorbable fillers; a modern class of bone defect repair, restoration, reconstruction and replacement biomaterials for optimal osseous tissue regeneration, permitting the creation of functional tissue (including soft) substitutes that integrate with the host tissue and restore natural structure and function; a step forward toward developing new or alternative safe and effective (including cost) tissue engineering strategies for routine use in clinical practice, principally, in dentistry, oral surgery, maxilla-facial and cranio-facial surgical interventions.

It is perhaps worth mentioning herein that although many authors have reported on nano-sized or-scaled HAp derived from salmon backbone, our approach deviates via presenting an innovative, simplified, reproducible and sustained method to produce nanoHAp. This process results in an ultra-structure that promotes higher absorbability and greater surface bioactivity. Furthermore, our study provides a pre-clinical proof-of-concept suggesting that nanoS-HAp is a safe/biocompatible, stable, and potentially more effective alternative bone grafting material when compared to other commercially-available products. Our ongoing research aims at combining the advantages of nanoS-HAp with different clinically-relevant materials and conditions, with the goal of achieving improved or superior clinical effects compared to current formulations and bio-products available on the market.

## 2 Materials and methods

### 2.1 Extraction

Salmon fish bone waste was obtained from a local/national industrial fish farm and the skeleton cut into small pieces with muscle and fat removed, manually. Skeleton pieces were then washed with distilled water at 95°C and stirred constantly at 200 rpm for 1 h to re-move impurities such as lipids and proteins. Next, the residual water and tissues were all removed, and the samples left to dry. The remaining bone was cleaned with distilled water 3 times for 2 min under 200 rpm stirring. Finally, the treated bones were added to a HCl solution (1:6 ratio, set at 4°C) for 15 h under 150 rpm stirring.

### 2.2 Synthesis

HA extraction from the salmon bones, has been previously described in the literature (17). Herein, modifications were made to the protocol, mainly for viability reasons. Briefly, 100 grams of salmon skeleton were treated through an alkaline hydrolysis – calcination process to obtain HA. The skeleton was dried out at 60°C for 12 h prior to calcination. The sample was then crushed in a Foss KN 95

Knifetec®

mill and subjected to a calcination process at 650°C in a heated muffle for 5 h, then stored in a laboratory freezer at -80°C, essentially to prevent moisture absorption by the sample(s). Finally, a total of 7.34 grams of HA was obtained and then stored to be further characterized and used afterwards.

## 2.3 Characterization

### 2.3.1 Biological test for *in vitro* cytocompatibility: MTT and WST-1 spectrophotometric assays

To determine the cell proliferation and differentiation capacity of the hydroxyapatite samples obtained from the salmon bone, a cell viability colorimetric assay/test (MTT) was performed evaluating the cell metabolic activity of the cultures (17). A fresh stock of each type of sub-stratum [salmon (SAHA), human (HHA), bovine (BHA), porcine (PHA) and synthetic (SHA)] was prepared before each *in vitro* test. The concentration of each stock was set at 5 mg/mL. This solution was then sonicated for 10 min. All stocks were autoclaved and then made up to their total volume using sterile distilled water and adding DMSO (Dimethylsulfoxide, CH<sub>3</sub>SOCH<sub>3</sub>) at 0.1% v/v. Dilutions were prepared with final concentrations of substrates, as follows: 0; 50; 100; 150; 200; 250 and 300 µg/mL, prepared in cell culture medium. The test was performed on 2 different cell lines/cultures, as is briefly described below:

- C2C12 cells (myoblasts: immortalized mouse myoblast cell line) were cultured in DMEM culture medium (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) supplemented with 10% FBS (fetal bovine serum), 2 mM glutamine and antibiotics (100 U/mL penicillin and 100 µg/mL streptomycin).
- MEF cells (fibroblasts: murine embryonic fibroblast cell line) were cultured in DMEM culture medium supplemented with 15% FBS, 2 mM glutamine, 1 mM pyruvate and antibiotics (100 U/mL penicillin and 100 µg/mL streptomycin).

The cells were cultured with 5% CO<sub>2</sub> and incubated at 37°C. The viable cell concentration was then determined using spectrophotometry using the commercial WST-1 Cell Proliferation kit (Roche). The relative cell viability (percentage %) was determined after 24 h of being in contact with the substrate:

*viable cells after 24 hrs of*

$$\text{Viability}\% = \frac{\text{contact with substrate}}{\text{without substrate}} \times 100$$

*viable cells after 24 hrs*

*without substrate*

All experiments were done in triplicate, and results are reported as mean ± standard error.

### 2.3.2 Physical tests for structural properties: XRD, SEM, EDS, and RAMAN testing

X-ray powder diffraction (XRD) was performed to analyze the anatomical and molecular structure of the obtained/produced HA crystals (16, 17, 20–25). XRD analysis was performed using an X-ray diffractometer (Phillips X'Pert Pro, United Kingdom) equipped with a CuK $\alpha$  radiation source set at a wavelength of 1,5,409 Å. Studies were run at a current of 30 mA and an accelerating voltage of 40 Kv, over the 2 $\theta$  diffraction angle range of 2° to 80° using a step size of 0.02°. The patterns obtained were analyzed using the Origin pro 2019b software (OriginLab Corp., United States). Further, scanning electron microscopy (SEM) and energy dispersive X-ray spectroscopy (EDS) were used to evaluate the Ca/P ratio of the samples. A Carl Zeiss scanning electron microscope (EVO MA

10, Oberkochen, Germany) equipped with energy dispersive spectroscopy (EDS) was used to analyze local chemical composition of samples. Finally, the nano-milled powder was then collected and centrifuged to separate n-HAp particles followed by drying, another milling/grinding round, and samples were labeled for further use and analysis. Raman scattering spectroscopy measurements of the HA obtained by mechanical alloying were obtained. Briefly, the Raman spectra were measured using a triple monochromator micro-Raman spectrometer, equipped with a charged coupled device (CCD) detector, and using the 4,880 Å exciting line of the Ar-laser. All the aforementioned assessments were performed at the CiiB.

### 2.3.3 Control group(s)

For this *in vitro* study, controls included hydroxyapatite powder samples of distinct origins (Figure 1): hydroxyapatite of

synthetic origin (Sigma Aldrich®), Germany), xenograft of porcine origin (The Graft, Puro Biologics, United States), human allograft (OraGraft Mineralized Cortical, Lifenet Health, United States) and bovine xenograft (Mineross Cortical X, Biohorizons, United States), for a most-possible comparative analysis.

## 3 Results

As displayed in Figure 1, we were successful in obtaining/producing nanoS-HAp/SAHA, in-House, with comparative characteristics to commercially-available Ca/P-based variations and at usable quantities. The determination of the general cellular activity is important to verify that the material obtained from salmon bone can be used as a possible bone replacement material, safely. Findings of the *in vitro* cyto-viability/–toxicity test are demonstrated in Figures 2A,B. The 5 substrates (SHA, BHA, PHA, HHA and SAHA) were evaluated at different concentrations over a period of 24 h, with both, C2C12 cells (myoblasts) and in MEF cells (fibroblasts). The results obtained for the myoblast cell cultures indicate that the substrate corresponding to salmon bone *significantly* promoted the cell viability of the myoblasts at a concentration of 100 [ug/mL] and more, showing the highest cell viability for this substrate at a concentration of 200 [ug/mL] similar to previous reports in the literature (26–28). On the other hand, the substrate corresponding to HHA showed cell viability below 80% at concentrations of 200 [ug / mL] and more. A yield over 90% viability was demonstrated for porcine, bovine, and synthetic samples at concentrations of 100 [ug/ mL]. The results obtained herein for the cytotoxicity test in fibroblasts



**HHA**



**SHA**

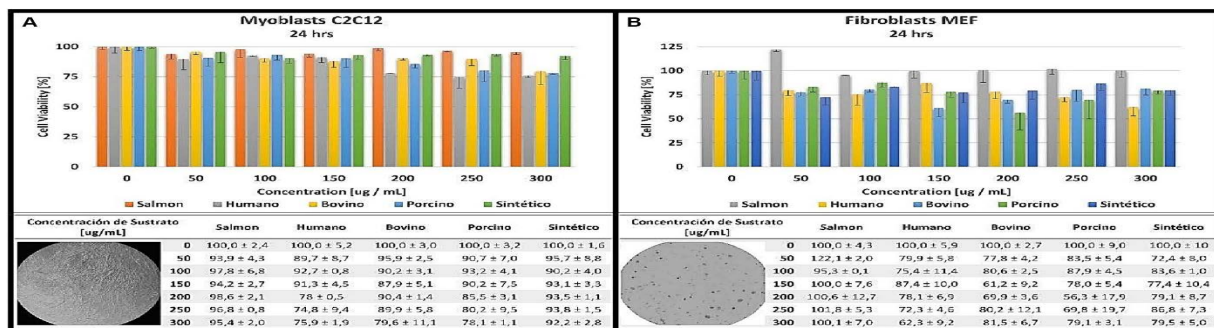


**BHA**



**SAHA**





turned out to be highly-comparable to those obtained in myoblasts. The highest cell viability was reached in the substrate corresponding to SAHA at a concentration of 50 [ug/mL]. It was evidenced that the porcine substrate at concentrations of 150 [ug/mL] and more, does not have obvious or clear promoter effects on cellular viability and proliferation during the culture period. Henceforth, the substrate based on our salmon bone corresponds to the substrate with the highest percentage of viability and proliferation in all concentrations, throughout the monitored period.

Then, the crystallite size was studied using XRD and the size was further analyzed using the Scherrer equation. Sizes ranged from 8.8 nm to 60.38 nm (Figure 3; Table 1), with the smallest crystallite size being the HHA at 8.8 nm and the largest being 60.38 nm for the SAHA sample, similar to the previously reported literature (26–28). Likewise, the crystallite size found in the synthetic sample corresponds to 35.29 nm, indeed, similar to that reported by Venkatesan et al. (1, 12), further verifying our experimental protocol.

Using SEM/EDS analysis, the Ca/P ratio for SHA, HHA, BHA, PHA and SAHA samples was obtained/determined (Figure 4; Table 2). The lowest values obtained were for SHA and BHA with 1.94 and 1.98 respectively, similar to what is often presented in the literature for the stoichiometric value of HA (at 1.67). However, all the samples displayed values higher than commonly reported in the literature. Finally, samples were placed on a glass slide and were focused by the Ar-laser beam prior to acquiring the spectrum. Spectra were obtained for a small area and averaged for interpretation. Characteristic peaks for each sample were obtained depicting distinct peaks for the SAHA. Using Raman spectroscopy analysis, the peaks corresponding to each functional group were carefully identified and analyzed. Herein, peaks at 961 were consistently observed across all samples, indicating the presence of the phosphate (PO<sub>4</sub>) groups (Figure 5). Additionally, the yielded peaks at 1449 and 608, corresponding to (PO<sub>4</sub>) and (CO<sub>3</sub>)

respectively, were detected in the HHA sample, suggesting the presence of the classical or typical hydroxyapatite structure

(1,5,12), as to be expected. Conversely, and interestingly, no peaks indicative of CO<sub>3</sub> and OH groups were found in the salmon bone samples.

## 4 Discussion

Distinguishing between osteoconductivity and osteoinductivity within the realm of biomaterials, such as the novel and *patent-pending* Chilean salmon fishbone-based hydroxyapatite material investigated in this study, holds significant implications, particularly in light of our presented *preliminary/proof-of-concept* research findings. To recap, osteoconduction, characterizes the ability of a material to passively facilitate the infiltration of host capillaries, perivascular tissue, and mesenchymal stem cells. Our assessment of cellular viability performed/conducted in two distinct cell lines, in conjunction with advanced characterization techniques including SEM, XRD, Raman spectroscopy, and EDS, revealed that our SAHA possess structural similarities to cancellous bone. This observation has important implications for their application in bone tissue engineering. Notably, osteoconductive materials, such as the one we have examined, offer an alternative biomaterial/matrix candidate upon which osteoblasts and osteoclasts can firmly anchor, migrate, proliferate, and collaborate. Our findings thus underscore the potential of these materials to actively foster bone cell attachment, growth, and repair. Furthermore, our findings suggest that the extracted Chilean salmon fishbone-based hydroxyapatite material also exhibits qualities of osteoinductivity. Osteoinductivity encompasses the capacity of a biomaterial to actively induce the differentiation of MSCs into osteoblasts, thereby stimulating bone formation. Our analysis, including the assessment of cellular viability and the advanced techniques employed, indicates the potential of this biomaterial to potentially serve as an osteoinductive agent and/or matrix. Henceforth, this study, supported by the employed suite of in-House available techniques, extends our understanding of the intricate interplay between biomaterials, cellular

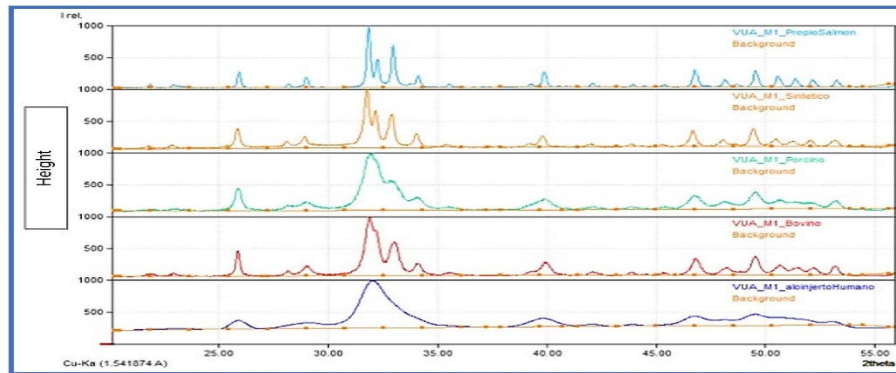


TABLE 1 Crystallite size obtained by XRD for SHA, HHA, BHA, PHA, and SAHA samples.

Sample	Crystallite size (nm)
Synthetic HA (SHA)	35.29
Human HA (HHA)	8.8
Bovine HA (BHA)	22.26
Porcine HA (PHA)	12.25
Salmon HA (SAHA)	60.38

HA, hydroxyapatite; SHA, synthetic HA; HHA, human HHA; BHA, bovine HA; PHA, porcine HA; SAHA, salmon HA.

osteoblasts, a pivotal cell type in bone formation. Notably, the introduction of bone morphogenic protein 2 (recombinant human BMP-2) induced a notable shift in the differentiation pathway, a development that holds considerable promise for future investigations

viability, and physico-chemical characteristics in the context of tissue engineering, opening new avenues for innovative clinical uses.

The incorporation of various hydroxyapatite variants has been a subject of global research, extensively documented in existing literature. The employment of this mineral type in bone tissue engineering offers a promising prospect for mending both straightforward and intricate defects. Hydroxyapatite, a calcium phosphate mineral naturally occurring in bone, has garnered significant attention. Notably, fish bones, hitherto regarded as waste material, have been unveiled as a valuable and potentially cost-effective, sustainable source of hydroxyapatite with promising applications in the realm of bone repair.

The conducted cyto-viability/–toxicity analysis has yielded promising results, demonstrating the potential of our biomaterial. We conducted tests on mouse fibroblast and myoblast cells, chosen in this study for their capacity to differentiate and proliferate into pre–/

focused on bone formation ability and cellular viability within osteoblasts (29–33). In our imminent formulation, osteogenic proteins can be incorporated to boost/accelerate function.

The evaluation of cell viability, expressed as a percentage, exceeded 90% for our Chilean salmon fish bone-based substrates in myoblast culture at all concentrations after 24 h. Moreover, the results were even more encouraging when culturing the murine fibroblasts on those substrates, where a remarkable 122% increase in cell viability was

observed at a *low* concentration of 50 [ $\mu\text{g}/\text{mL}$ ], further highlighting and/or confirming their contributory potential, when compared to the other commercially-available materials. These outcomes also underscore the non-toxic nature of our SAHA powder across all studied concentrations. Importantly, it appears that physical properties of hydroxyapatite, including factors such as density, crystallization, and elemental composition, significantly influence cell viability (1, 12). Notably, the presence of functional groups, like  $\text{CO}^{3-2,x}$ , has been associated with enhanced cell adhesion and proliferation, potentially promoting the formation of mineralized tissue (34). To gain deeper insights into the acquired hydroxyapatite, *in vivo* preclinical studies are warranted and ongoing.

Our research also indicated and confirmed that hydroxyapatite derived from natural sources is likely to contain the essential mineral ions that contribute to improved cell adhesion, proliferation, differentiation, and the formation of mineralized tissue. Intriguingly, our XRD analysis revealed variations in crystallite size among all samples, yet all exhibited acceptable levels of cell proliferation, suggesting that crystallite size may not be the sole determinant for cell proliferation (35). Herein, additional studies focusing on surface topography and its relevance in cell adhesion and proliferation are considered. Nonetheless, our performed SEM/EDS analysis further revealed that all samples exhibited higher values of the Ca/P ratio when compared to stoichiometric HA (hydroxyapatite) with a ratio of 1.67, similar to several previous literature reports. It is noteworthy that

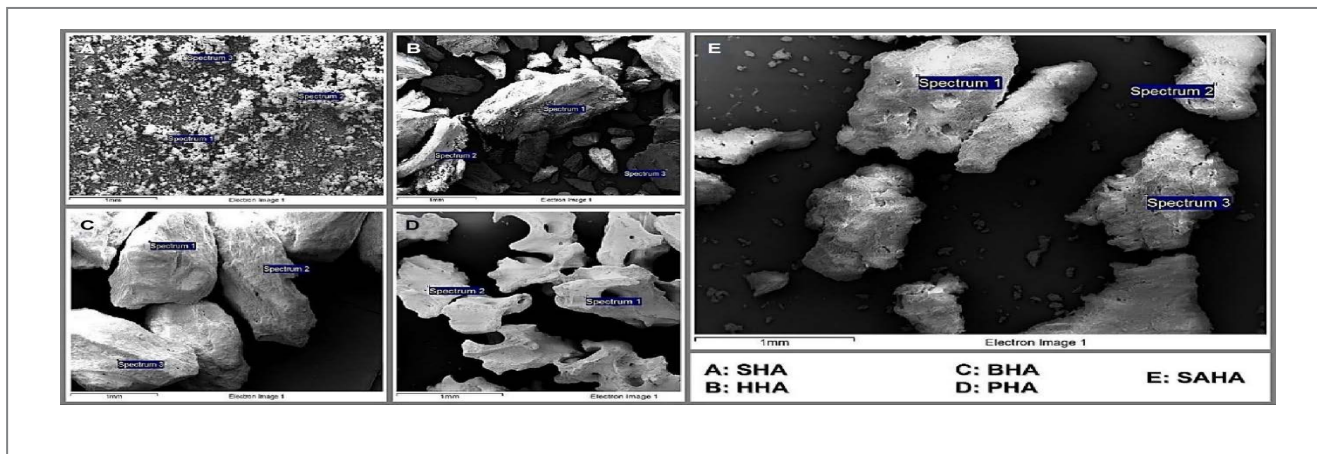


TABLE 2 Ca/P ratio obtained by SEM/EDS for SHA, HHA, BHA, PHA, and SAHA samples.

Sample	Ca/P RATIO
Synthetic HA (SHA)	1.94
Human HA (HHA)	5.85
Bovine HA (BHA)	1.98
Porcine HA (PHA)	3.13
Salmon HA (SAHA)	2.61

HA, hydroxyapatite; SHA, synthetic HA; HHA, human HHA; BHA, bovine HA; PHA, porcine HA; SAHA, salmon HA.

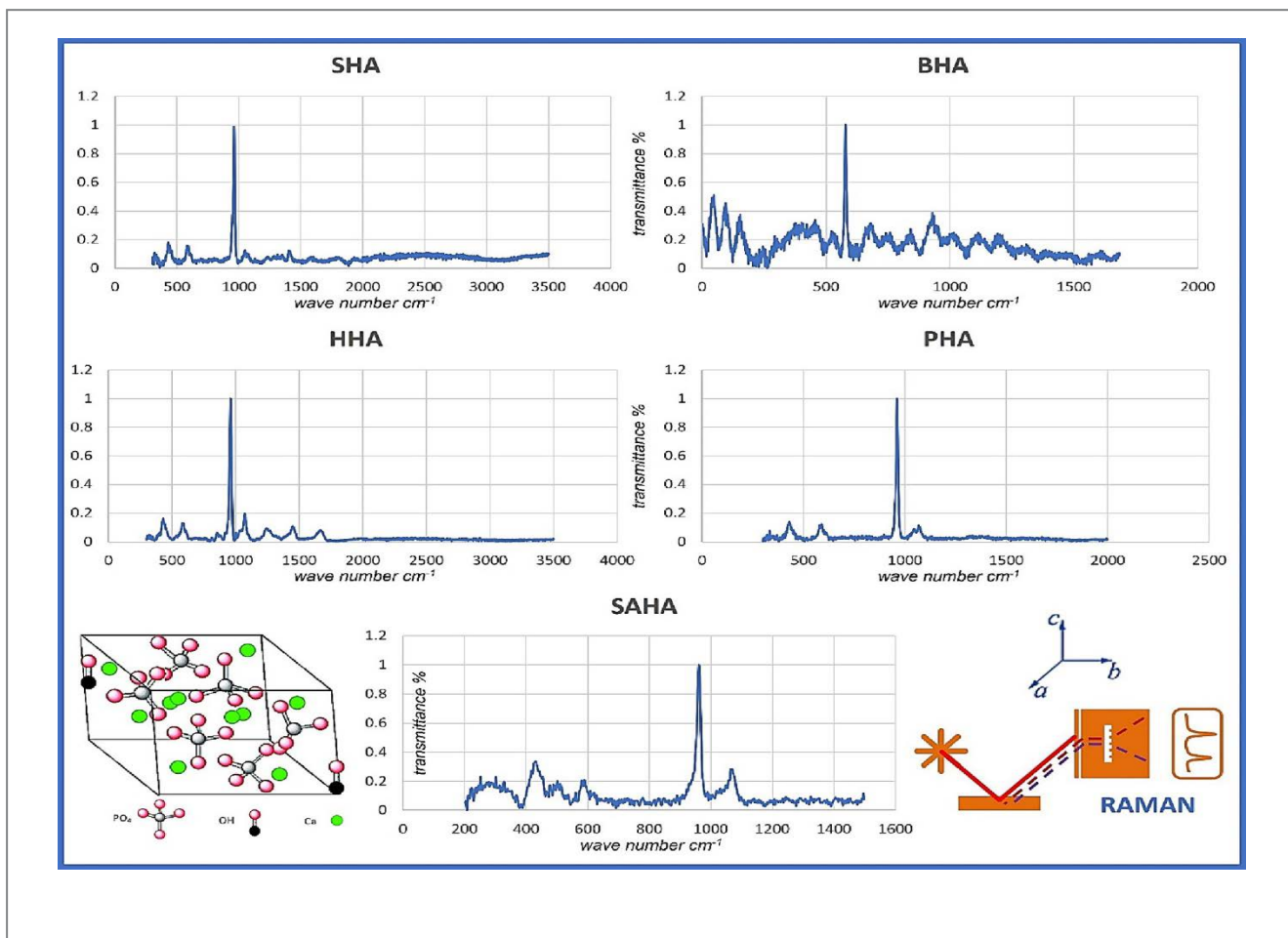
elevated Ca/P ratios can be indicative of reduced carbon content within the material. Intriguingly, a heightened presence of carbon has previously been correlated with a phenomenon known as *selective* protein adsorption, suggesting its potential role in fostering specific protein interactions that, in turn, facilitate enhanced cellular adhesion to the substrate (35–40). This phenomenon of selective protein adsorption may provide valuable insights into the complex interplay between material composition and cellular response. Our ongoing *in vivo* study is designed to further explore the underlying signaling pathway(s).

## 5 Conclusion

Today, bone tissue engineering continues to stand as an exciting frontier in medicine and therapy, brimming with opportunities for

research, development, and innovation. Its primary objective is the restoration, repair, reconstruction, replacement, and regeneration of bone structure and function following injury, disease, or surgical intervention. In light of the relentless progress in the fields of

biomaterials, polymers, nanotechnology, tissue engineering, and regenerative medicine, scientists and clinicians continue to explore novel approaches that promise to enhance the healing process while devising novel bone substitutes that satisfactorily mimic the intricacies of natural soft and hard tissue(s). Amid this landscape of innovation, fish and fish bone waste emerge as a noteworthy player due to its significant content of calcium phosphate. Salmon bone, in particular, has emerged as a sustainable and potentially transformative source of hydroxyapatite. This remarkable substance possesses the unique capacity to foster the growth and differentiation of bone cells, positioning it as a promising and viable alternative biomaterial with broad applications in both, biomedical and dental tissue engineering. Our preliminary *proof-of-concept* work presented herein underscores the similarity between salmon backbone particulate and bone hydroxyapatite mineral, both in biological and physico-structural properties. This likeness is not only encouraging yet also suggests that this biomaterial is non-cytotoxic, physically stable, and amenable to modulation and customization/personalization. As a testament to its potential, a patent application has been submitted, marking the first step in the journey toward realizing its full utility and translation to the clinic and the end-user. However, it is deemed vital to acknowledge that challenges and limitations continue to persist in the utilization of fish waste-derived hydroxyapatite. Standardized extraction methods must be established, and the absence of contaminants assured. Henceforth, our ongoing studies delve into biocompatibility and bio-degradation characterization alongside the histopathological and immune-histochemical profile of SAHA, *in vivo*, in order to offer a more valuable comparative perspective on the rate of *de novo* bone tissue formation. In this context, the horizon of tissue engineering holds the promise of not only innovative biomaterials but also a deeper understanding of the complex interplay between materials and biology, inspiring the ongoing quest for medical therapy advancements that will revolutionize tissue repair and regeneration.



## Data availability statement

The raw data supporting the conclusions of this article will be made available by the authors, without undue reservation.

## Ethics statement

Ethical approval was not required for the studies on animals in accordance with the local legislation and institutional requirements because only commercially available established cell lines were used.

## Author contributions

FM: Conceptualization, Data curation, Formal analysis, Funding acquisition, Investigation, Project administration, Resources, Writing – original draft. ZH: Conceptualization, Data curation, Formal analysis, Funding acquisition, Methodology, Project administration,



Resources, Supervision, Validation, Writing – original draft, Writing – review & editing. AP: Investigation, Writing – original draft. IG: Investigation, Writing – original draft. MP: Investigation, Writing – original draft. NO: Investigation, Writing – review & editing. MG: Investigation, Writing – original draft.

## Funding

The author(s) declare financial support was received for the research, authorship, and/or publication of this article. This research work was supported by operating grants provided to the HAI DAR R&D&I LAB/BioMAT'X (Laboratorio de Biomateriales, Farmacéuticos y Bioingeniería de Tejidos Cráneo Máxilo-Facial), member of CiiB (Centro de Investigación e Innovación Biomédica), Faculties of Medicine and Dentistry, Universidad de los Andes, Santiago de Chile, through the ANID-NAM (Agencia Nacional de Investigación y Desarrollo, Chile and National Academy of Medicine, USA) Grant código # NAM21I0022 (2020–2022), CORFO Crea y

Valida I+D+i Grant código # 21CVC2-183649 (2021–2023), CORFO Crea y Valida -Proyecto de I+D+i Colaborativo - Reactivate" Grant código # 22CVC2-218196 (2022–2024), and FONDEF Concurso IDEA de I+D, ANID, Grant código # ID22I10215 (2022–2024).

Finally, the authors are pleased to particularly acknowledge the awarded CORFO Crea y Valida I+D+i Grant dedicated to Salmon bone código # 21CVC2-183641 (2022–2024).

## Acknowledgments

The authors wish to acknowledge veterinarian Ms. Nataly Quezada, a member of our CiiB team at the Universidad de los Andes in Santiago de Chile, for her invaluable and continuous support to this work.

## References

1. Venkatesan J, Lowe B, Manivasagan P, Kang KH, Chalisserry EP, Anil S, et al. Isolation and characterization of Nano-hydroxyapatite from Salmon fish bone. *Materials (Basel)*. (2015) 8:5426–39. doi: 10.3390/ma8085253
2. Shi P, Liu M, Fan F, Yu C, Lu W, Du M. Characterization of natural hydroxyapatite originated from fish bone and its bio-compatibility with osteoblasts. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. (2018) 90:706–12. doi: 10.1016/j.msec.2018.04.026
3. Malde MK, Graff IE, Siljander-Rasi H, Venäläinen E, Julshamn K, Pedersen JJ, et al. ORIGINAL ARTICLE: fish bones – a highly available calcium source for growing pigs. *J Anim Physiol Anim Nutr*. (2010) 94:e66–76. doi: 10.1111/j.1439-0396.2009.00979.x
4. Kaewsahnguan T, Noitang S, Sangtanoo P, Srimongkol P, Saisavoey T, Reamtong O, et al. A novel angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptide derived from the trypsin hydrolysates of salmon bone proteins. *PLoS One*. (2021) 16:e0256595. doi: 10.1371/journal.pone.0256595
5. Pon-On W, Suntornsaratoon P, Charoenphandhu N, Thongbunchoo J, Krishnamra N, Tang IM. Hydroxyapatite from fish scale for potential use as bone scaffold or regenerative material. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl mayo de*. (2016) 62:183–9. doi: 10.1016/j.msec.2016.01.051
6. Starch-Jensen T, Deluiz D, Deb S, Bruun NH, Tinoco EMB. Harvesting of autogenous bone graft from the ascending mandibular ramus compared with the Chin region: a systematic review and Meta-analysis focusing on complications and donor site morbidity. *J Oral Maxillofac Res*. (2020) 11:e1. doi: 10.5037/jomr.2020.11301
7. Gardin C, Ricci S, Ferroni L, Guazzo R, Sbricoli L, De Benedictis G, et al. Decellularization and Delipidation protocols of bovine bone and pericardium for bone grafting and guided bone regeneration procedures. *PLoS One*. (2015) 10:e0132344. doi: 10.1371/journal.pone.0132344
8. Starch-Jensen T, Deluiz D, Bruun NH, Tinoco EMB. Maxillary sinus floor augmentation with autogenous bone graft alone compared with alternate grafting materials: a systematic review and Meta-analysis focusing on Histomorphometric outcome. *J Oral Maxillofac Res*. (2020) 11:e3. doi: 10.5037/jomr.2020.11302
9. Enrione J, Pino-Lagos K, Pępczyńska M, Brown D, Ortiz R, Sanchez E, et al. A novel biomaterial based on salmon-gelatin and its in-vivo evaluation as sterile wound-dressing. *Mater Lett*. (2017) 212, 159–64. doi: 10.1016/j.matlet.2017.10.049
10. Haugen HJ, Lyngstadaas SP, Rossi F, Perale G. Bone grafts: which is the ideal biomaterial? *J Clin Periodontol*. (2019) 46:92–102. doi: 10.1111/jcpe.13058
11. Piccirillo C, Pullar RC, Costa E, Santos-Silva A, Pintado MME, Castro PML. Hydroxyapatite-based materials of marine origin: a bioactivity and sintering study. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. (2015) 51:309–15. doi:

## Conflict of interest

The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

## Publisher's note

All claims expressed in this article are solely those of the authors and do not necessarily represent those of their affiliated organizations, or those of the publisher, the editors and the reviewers. Any product that may be evaluated in this article, or claim that may be made by its manufacturer, is not guaranteed or endorsed by the publisher.

10.1016/j.msec.2015.03.020

12. Venkatesan J, Zhong-Ji Q, Borni R, Thomas N, Kim S. A comparative study of thermal calcination and an alkaline hydrolysis method in the isolation of hydroxyapatite from *Thunnus obesus* bone. *Biomed Mater*. (2011) 6:035003. doi: 10.1088/1748-6041/6/3/035003

13. American Type Culture Collection. Product Sheet C2C12 (ATCC CRL1772TM). PRODUCT SHEET – Dated 2024-03-16 (last update), Available at: <https://www.atcc.org/products/crl-1772>

14. American Type Culture Collection. Product Sheet MEF (CF1) (ATCC SCRC\_1040TM). PRODUCT SHEET – Dated 2024-02-12 (last update), Available at: <https://www.atcc.org/products/scrc-1040>

15. Haberko K, Bućko MM, Brzezińska-Miecznik J, Haberko M, Mozgawa W, Panz T, et al. Natural hydroxyapatite—its behaviour during heat treatment. *J Eur Ceram Soc*. (2006) 26:537–42. doi: 10.1016/j.jeurceramsoc.2005.07.033

16. Dos Santos EA, Farina M, Soares GA, Anselme K. Chemical and topographical influence of hydroxyapatite and  $\beta$ -tricalcium phosphate surfaces on human osteoblastic cell behavior. *J Biomed Mater Res A*. (2009) 89A:510–20. doi: 10.1002/jbm.a.31991

17. Rupani A, Hidalgo-Bastida LA, Rutten F, Dent A, Turner I, Cartmell S. Osteoblast activity on carbonated hydroxyapatite. *J Biomed Mater Res A*. (2012) 100A:1089–96. doi: 10.1002/jbm.a.34037
18. Atik İ, Atik A, Akarca G, Denizkara AJ. Production of high-mineral content of ayran and kefir – effect of the fishbone powder obtained from garfish (*Belone belone*). *Int J Gastron Food Sci*. (2023) 33:100786. doi: 10.1016/j.ijgfs.2023.100786
19. Boronat Ö, Sintés P, Celis F, Díez M, Ortiz J, Aguiló-Aguayo I, et al. Development of added-value culinary ingredients from fish waste: fish bones and fish scales. *Int J Gastron Food Sci*. (2023) 31:100657. doi: 10.1016/j.ijgfs.2022.100657
20. Wang JK, Çimenoglu Ç, Cheam NMJ, Hu X, Tay CY. Sustainable aquaculture side-streams derived hybrid biocomposite for bone tissue engineering. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. (2021) 126:112104. doi: 10.1016/j.msec.2021.112104
21. Granito RN, Muniz Renno AC, Yamamura H, de Almeida MC, Menin Ruiz PL, Ribeiro DA. Hydroxyapatite from fish for bone tissue engineering: a promising approach. *Int J Mol Cell Med*. (2018) 7:80–90. doi: 10.22088/IJMCM.BUMS.7.2.80
22. Granke M, Does MD, Nyman JS. The role of water compartments in the material properties of cortical bone. *Calcif Tissue Int*. (2015) 97:292–307. doi: 10.1007/s00223-015-9977-5
23. Georgiadis M, Müller R, Schneider P. Techniques to assess bone ultrastructure organization: orientation and arrangement of mineralized collagen fibrils. *J R Soc Interface*. (2016) 13:20160088. doi: 10.1098/rsif.2016.0088
24. Danilchenko S, Kalinkevich A, Zhovner M, Li H, Kochenko A, Danylchenko P, et al. X-ray diffraction studies of a partially demineralized oriented cortical bone with the controlled depth of analysis. *Heliyon*. (2023) 9:e17809. doi: 10.1016/j.heliyon.2023. e17809
25. Niu Y, Du T, Liu Y. Biomechanical characteristics and analysis approaches of bone and bone substitute materials. *J Funct Biomater*. (2023) 14:212. doi: 10.3390/jfb14040212
26. Ytteborg E, Todorovic M, Krasnov A, Takle H, Kristiansen IØ, Ruyter B. Precursor cells from Atlantic salmon (*Salmo salar*) visceral fat holds the plasticity to differentiate into the osteogenic lineage. *Biol Open*. (2015) 4:783–91. doi: 10.1242/bio.201411338
27. Duran BOS, Góes GA, Zanella BTT, Freire PP, Valente JS, Salomão RAS, et al. Ascorbic acid stimulates the in vitro myoblast proliferation and migration of pacu (*Piaractus mesopotamicus*). *Sci Rep*. (2019) 9:2229. doi: 10.1038/s41598-019-38536-4
28. Hue I, Capilla E, Rosell-Moll E, Balbuena-Pecino S, Goffette V, Gabillard JC, et al. Recent advances in the crosstalk between adipose, muscle and bone tissues in fish. *Front Endocrinol (Lausanne)*. (2023) 14:1155202. doi: 10.3389/fendo.2023.1155202
29. Jawadi Z, Yang C, Haidar ZS, Santa Maria PL, Massa S. Bio-inspired Muco-adhesive polymers for drug delivery applications. *Polymers (Basel)*. (2022) 14:5459. doi: 10.3390/polym14245459
30. Panotopoulos GP, Aguayo S, Haidar ZS. Nonmotile single-cell migration as a random walk in nonuniformity: the "extreme dumping limit" for cell-to-cell communications. *J Healthc Eng*. (2018) 2018:9680713. doi: 10.1155/2018/9680713
31. Zumarán CC, Parra MV, Olate SA, Fernández EG, Muñoz FT, Haidar ZS. The 3 R's for platelet-rich fibrin: a "super" tri-dimensional biomaterial for contemporary naturally-guided Oro-Maxillo-facial soft and hard tissue repair, reconstruction and regeneration. *Materials (Basel)*. (2018) 11:1293. doi: 10.3390/ma11081293
32. Rana D, Ramasamy K, Leena M, Jiménez C, Campos J, Ibarra P, et al. Surface functionalization of nanobiomaterials for application in stem cell culture, tissue engineering, and regenerative medicine. *Biotechnol Prog*. (2016) 32:554–67. doi: 10.1002/btpr.2262

## Anexo 4

Muñoz F, Haidar ZS, Puigdollers A, Guerra I, Padilla MC, Ortega N, Balcells M and García MJ (2024). Efficient Hydroxyapatite Extraction from Salmon Bone Waste: An Improved Lab-Scaled Physico-Chemico-Biological Process

Molecules 024, 29(17)

doi: 10.3390/molecules29174002

Molecules

Factor de impacto: 4.2

Índice de citación: 7.4

Cuartil 1

Mi contribución en este artículo fue en el análisis de la literatura, trabajo de campo directamente involucrado en la experimentación, obtención de los fondos y redacción del manuscrito



Article

# Efficient Hydroxyapatite Extraction from Salmon Bone Waste: An Improved Lab-Scaled Physico-Chemico-Biological Process

Francisco Muñoz <sup>1,†</sup>, Ziyad S. Haidar <sup>2,3,4,5,\*</sup> , Andreu Puigdollers <sup>6,7</sup> , Ignacio Guerra <sup>8</sup>, María Cristina Padilla <sup>9,10</sup>, Nicole Ortega <sup>11</sup>, Mercedes Balcells <sup>10,11</sup> and María José García <sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup> Facultad de Odontología, Universidad Internacional de Cataluña, 08029 Barcelona, Spain

<sup>2</sup> Laboratorio BioMAT'X R&D&I (HAiDAR I+D+i LAB), Universidad de los Andes, Santiago 7550000, Chile

<sup>3</sup> Centro de Investigación e Innovación Biomédica (CiiB), Universidad de los Andes, Santiago 7550000, Chile

<sup>4</sup> Programa de Doctorado en BioMedicina, Facultad de Medicina, Universidad de los Andes, Santiago 7550000, Chile

<sup>5</sup> Programa de Doctorado en Ciencias Odontológicas, Facultad de Odontología, Universidad de los Andes, Santiago 7550000, Chile

<sup>6</sup> Facultad de Odontología, Universidad de los Andes, Santiago 7550000, Chile

<sup>7</sup> Área de Ortodoncia, Facultat Internacional de Catalunya, 08195 Barcelona, Spain

<sup>8</sup> Laboratorio de Investigación e Ingeniería de Biopolímeros (BiopREL), Universidad de los Andes, Santiago 7550000, Chile

<sup>9</sup> Escuela de Nutrición y Dietética, Facultad de Medicina, Universidad de los Andes, Santiago 7550000, Chile

<sup>10</sup> Institut Quimic de Sarria, Ramon Llull University, 08017 Barcelona, Spain; merche@mit.edu

<sup>11</sup> MIT Institute for Medical Engineering and Science, Massachusetts Institute of Technology, Cambridge, MA 02139-4307, USA

\* Correspondence: zhaidar@uandes.cl (Z.S.H.); mjgarcia12@miauandes.cl (M.J.G.); Tel.: +56-962216694 (Z.S.H.); +56-996615939 (M.J.G.)

† These authors contributed equally to this work.

Received: 8 July 2024

Revised: 18 August 2024

Accepted: 23 August 2024

Published: 24 August 2024



**Citation:** Muñoz, F.; Haidar, Z.S.; Puigdollers, A.; Guerra, I.; Padilla, M.C.; Ortega, N.; Balcells, M.; García,

M.J. Efficient Hydroxyapatite Extraction from Salmon Bone Waste: An Improved Lab-Scaled

Physico-Chemico-Biological Process. *Molecules* **2024**, *29*, 4002. <https://doi.org/10.3390/molecules29174002>

Academic Editors: Giuseppe Cirillo and David Barker



**Copyright:** © 2024 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative

**Abstract:** The demand for novel tissue grafting and regenerative wound care biomaterials is growing as traditional options often fall short in biocompatibility, functional integration with human tissue, associated cost(s), and sustainability. Salmon aquaculture generates significant volumes of waste, offering a sustainable opportunity for biomaterial production, particularly in osteoconduction/- induction, and de novo clinical/surgical bone regeneration. Henceforth, this study explores re-purposing salmon waste through a standardized pre-treatment process that minimizes the biological *waste* content, followed by a treatment stage to remove proteins, lipids, and other compounds, resulting in a mineral-rich substrate. Herein, we examined various methods—alkaline hydrolysis, calcination, and NaOH hydrolysis—to better identify and determine the most efficient and effective process for producing bio-functional nano-sized hydroxyapatite. Through comprehensive chemical, physical, and biological assessments, including Raman spectroscopy and X-ray diffraction, we also optimized the extraction process. Our modified and innovative alkaline hydrolysis–calcination method yielded salmon-derived hydroxyapatite with a highly crystalline structure, an optimal Ca/P ratio, and excellent biocompatibility. The attractive nano-scale cellular/tissular properties and favorable molecular characteristics, particularly well-suited for bone repair, are comparable to or even surpass those of synthetic, human, bovine, and porcine hydroxyapatite, positioning it as a promising candidate for use in tissue engineering, wound healing, and regenerative medicine indications.

**Keywords:** hydroxyapatite; salmon bone; waste; bone repair; biomaterial; osseoregenerate; process

---

## 1. Introduction

Despite the availability of various FDA-approved bone regeneration therapies—including autografts, allografts, and synthetic bone grafts, alongside the recent and continuously accruing advancements in growth factors and bioactive molecules—there remains an ongoing demand for more innovative, efficient, effective, malleable, and sustainable solutions [1].

---

This need is driven by the search for alternatives that match the quality of autografts in terms of osteoconductivity, osteoinductivity, and osteogenicity. Indeed, in the realm of modern medicine and dentistry, the quest to address simple and complex bone defects arising from a myriad of causes, including disease and trauma, stands as a paramount and growingly demanding challenge [1,2]. Today, this collective endeavor has spurred extensive research into the development of novel biomaterials tailored for bone (and soft tissue) repair and regeneration, in particular, with a profound impact on our day-to-day clinical and surgical practice [2,3]. It is imperative to remember and comprehend that in the landscape of bone grafting techniques, given the diverse array of patients, each presents unique clinical and surgical needs [1–4]. Thus far, bone grafts can be categorized into four primary groups—autografts, allografts, allografts/alloplastics, and xenografts, each bearing distinct properties tailored to specific indications and applications: osteoconduction, osteoinduction, osteogenesis, and structural support. In fact, the pursuit of safe and effective bone grafting solutions is driven by a substantial demand, with millions (statistically estimated at >2 million cases in the United States of America, alone) of bone graft procedures performed globally every year (*a substantially costly burden*) [1,4,5].

Briefly, autografts have long been regarded as the ‘*gold standard*’ for de novo bone regeneration due to their superior histocompatibility and all-encompassing characteristics as an *ideal* hard tissue graft. They offer osteoinduction, osteoconduction, and cellular histocompatibility [1–3]. However, they are not without their limitations, as they often entail extensive morbidity associated with the donor site, necessitating longer and more expensive hospital admissions than the grafting procedure itself [2–5]. Allografts, depending on their production methods, serve as osteoconductive biomaterials or even exhibit osteoinductive properties [1,4,6]. Their increased availability compared to autografts positions them as viable alternatives; however, they often fall short in achieving full regeneration and are scrutinized for the potential transmission of viruses and other infectious agents [7]. Also, some religious beliefs preclude the use of allografting [1–3,6]. In contrast, synthetic alloplastic materials, while lacking osteogenic and osteoinductive potential, excel in promoting osteoconduction by serving as a scaffold and/or matrix for hard tissue regeneration and repair. Herein, the level of porosity, re-absorption capacity, and crystallinity, pivotal features of biomaterials, hinges predominantly on the manufacturing and production process(es) [1,8]. Lastly, xenografts, devoid of intrinsic osteogenic potential, face varying levels of acceptance depending on the species they originate (or, are sourced) from, with some faiths/religions, traditions, customs, and cultures opposing their use [9]. Despite these limitations, shortcomings, and/or drawbacks, scaffold osteoconduction remains effective and widely available and acceptable, circumventing the limiting complications often associated with the use of allografts and autografts [8], whilst awaiting better alternatives.

Hydroxyapatite (HA) is widely utilized in tissue regeneration and repair due to its exceptional biocompatibility, bioactivity, and structural similarity to the mineral components of human bone [1,2,4,6]. Various types of HA can be obtained from multiple sources through diverse extraction methods, each influencing the characteristics and performance of the resulting material *in vitro*, *in vivo*, and in the clinic [1,2,6,8]. Briefly, human-derived HA closely mimics autografts in functionality, offering superior biocompatibility and bioactivity; however, its application is constrained by limited availability and ethical concerns. Synthetic HA provides high purity and customizable properties; however, it may lack the innate bioactivity found in biological sources. On the other hand, whilst bovine- and porcine-derived HA offer a natural architecture and porosity that facilitate cell growth and tissue integration, they pose potential risks of disease transmission and immunogenic responses [1–6,8]. Fish-derived HA, particularly from salmon, presents a sustainable alternative with desirable nanoscale features and high bioactivity, making it a compelling candidate for tissue regeneration applications [1–6,8–12]. Consequently, it is noteworthy that the selection of a suitable HA type depends on specific clinical requirements, desired material properties, and ethical considerations, as each variant presents its own set of pros and cons. Indeed, in the domain of bioceramic materials, diversity reigns,

---

contingent upon the specific species of origin from which they are sourced. To uncover the optimal characteristics while simultaneously streamlining production costs, relentless efforts have been invested in the production and creation of osteoconductive and osteoinductive biomaterials derived from various species, including but not limited to bovine, porcine, mollusks, and fish [6–10]. Within this perpetual quest, a notable breakthrough has recently emerged—namely, the isolation, extraction, and production of HA from the bones of salmon fish (*waste*), as aforementioned, offering a two-fold advantage: sustainability and biocompatibility. Indeed, the salmon industry predominantly focuses on the commercialization of salmon fillets, resulting in a surplus of by-products, encompassing heads, entrails, scales, and bones, which are often disproportionately discarded into the environment, causing ecological (eco-system) harm/damage [11–15]. This surplus of waste represents a *novel* opportunity for sustainable waste management and re-purposing. Notably, R&D&I (research, development and innovation) findings have thus far indicated that this HA bioceramic material demonstrates impressive biocompatibility, as evidenced by in vitro tests revealing an absence of cytotoxicity [12]. Moreover, Shi et al. underscored an additional advantage, wherein salmon-derived HA is enriched with vital mineral ions that foster enhanced cell proliferation, differentiation, adhesion, and the formation of mineralized tissue. This stark contrast to bioceramics obtained from other fish species, such as tuna or cod, suggests an innovative edge for salmon-based bioceramics [12]. In addition, Venkatesan et al. emphasized that the significant evolutionary gap between humans and fish considerably diminishes the risk of disease transmission, thus further augmenting the appeal of salmon-derived bioceramics [13–16]. Henceforth, in essence, R&D&I has showcased the multi-faceted potential of salmon fish backbone HA, heralding a new era of sustainable molecules and biomaterials that also align with stringent biocompatibility standards, marking a significant stride in the field of regenerative medicine and dentistry, an ongoing *hot* topic in our collaborative laboratories. Indeed, we have recently reported the physicochemical properties of our *patent-pending* nano-scaled HA material obtained from the backbone of salmon fish [15]. Briefly, our nanoS-HAp is obtained via a modified and innovative alkaline hydrolysis–calcination process that we also optimized for safe and efficient HA extraction. Following the extensive chemical, physical, mechanical, and biological assessments, including X-ray diffraction, electron microscopy, spectroscopy, and the relevant cell viability assays, our optimized extraction and production process(es) yielded salmon-derived HA with a highly crystalline structure, an optimal Ca/P ratio, and excellent biocompatibility. The attractive nano-scale cellular/tissular properties and favorable molecular characteristics—particularly well-suited for simple and complex bone regeneration and repair applications—are comparable to or even surpass those of synthetic, human, bovine, and porcine hydroxyapatite, positioning it as a promising candidate for use in tissue bio-engineering, wound healing, and regenerative medicine indications [15].

The principal aim of the present study is to investigate mechanisms for the efficient and cost-effective laboratory-scaled isolation and extraction of hydroxyapatite from salmon fish bones, yielding workable and clinically malleable biomaterials with osteoinductive potential. This would also contribute to the more sustainable utilization of waste generated by the salmon industry, a prominent Chilean resource. Henceforth, salmon fish bones consist of two primary phases: (1) organic and (2) mineral. The mineral phase is isolated during the HA extraction process. The organic phase of salmon fish bones, primarily composed of proteins, lipids, and other organic compounds, is typically removed during the HA extraction process. This removal is essential to isolate the mineral phase, which is the target for producing high-purity HA for applications in biomaterials. Herein, we conducted distinctive protocols within our participating and collaborative laboratories, drawn from relevant literature [12,14,17,18], for proper comparative purposes. These were then carefully replicated and subjected to lab-scaled characterization via Raman spectrometry followed by X-ray diffraction to both ensure reproducibility and gain initial insights into the physical attributes of the resultant biomaterial, thereby reporting a novel, simplified, efficient, lab-scaled, and *patent-pending* nanoS-Hap prep protocol [15].



## 2. Results

### 2.1. Characterization

In the present study, two essential characterization tests, namely Raman spectrometry and X-ray powder diffraction, were employed to assess the obtained salmon fish bone bio-ceramic. The Raman scattering spectroscopy measurements of the HA obtained via mechanical alloying were obtained. Briefly, the Raman spectra were measured using a triple monochromator micro-Raman spectrometer, equipped with a charged coupled device (CCD) detector, and using the 4880 Å exciting line of the Ar-laser. XRD was also performed using an X-ray diffractometer (Phillips X'Pert Pro, Malvern, UK) equipped with a CuK $\alpha$  radiation source set at a 1541 Å wavelength, to analyze the anatomical and molecular structure of the obtained HA crystals. Studies were performed at a current of 30 mA and an accelerating voltage of 40 Kv, over the 2 $\theta$  diffraction angle range of 2° to 80° using a step size of 0.02°. The patterns obtained were analyzed using Origin pro 2019b software (OriginLab Corp., USA, all mentioned equipment are in our labs). Further, scanning electron microscopy (SEM) and energy dispersive X-ray spectroscopy (EDS) were used to evaluate the Ca/P ratio within samples (Figure 1). Briefly, a Carl Zeiss scanning electron microscope (EVO MA 10, Oberkochen, Germany) equipped with energy dispersive spectroscopy was used to analyze the chemical compositions of the samples. All these analyses were performed at our laboratories within CiiB.



**Figure 1.** Prepared control and experimental HA samples (Left) before characterization and analysis. SEM micrographs of control and experimental HA samples (Top Right). Crystal size control and experimental HA samples obtained via XRD and the Ca/P ratio (atomic weight %) for control and experimental HA samples obtained via SEM/EDS (Bottom Right). The crystal size, studied using XRD and further analyzed using the Scherrer equation, reported sizes ranging from 8.8 nm to 60.38 nm. Using SEM/EDS analysis, the Ca/P ratio (atomic weight %) for the samples determined the lowest values for our salmon HA and bovine HA with 1.94 and 1.98, respectively, yet these were similar/close to what is often presented in the literature (*the theoretically stoichiometric value of HA was set at 1.67*), validating our experimental protocol. It is noteworthy that all other HA yielded values higher than those commonly reported in the literature. The Ca/P ratio (calcium-to-phosphorus ratio) in terms of the atomic weight percentage (%) is calculated by dividing the atomic weight % of calcium (Ca) by the atomic weight % of phosphorus (P). The atomic weights of Ca and P are approximately 40.08 g/mol and 30.97 g/mol, respectively. As mentioned, human HA has a Ca/P ratio close to 1.67 in its ideal form. Any deviations from this ratio can indicate changes in the bone mineral density and quality.

The initial phase of the analysis involved Raman spectrometry (Raman 1), aimed at evaluating the replicability of the material and confirming the presence of hydroxyapatite functional groups (Figure 2). A commercially available synthetic HA sample obtained from Sigma-Aldrich (St. Louis, MI, USA) served as a reference control, for the comparison. This test provided an initial insight into the characteristics of the obtained material while validating the existence of HA functional groups in the control. To ensure the consistency and reliability of the obtained data and findings, the experimental protocol was accurately duplicated, and the resulting sample underwent a secondary round of Raman spectrometry analysis (Raman 2). Additionally, X-ray diffraction (XRD 1) was carried out, using the synthetic HA sample from Sigma-Aldrich as a control for reference (Figure 3). These multiple/repeated characterization tests, to the best of our knowledge, collectively, provided a comprehensive evaluation of the composition and properties of this salmon fish bone HA bioceramic.

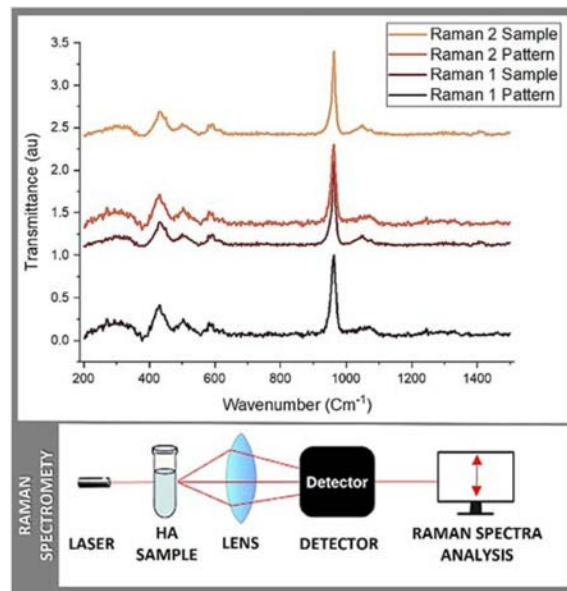


Figure 2. Raman spectrometry: Raman 1 and Raman 2 measurements.

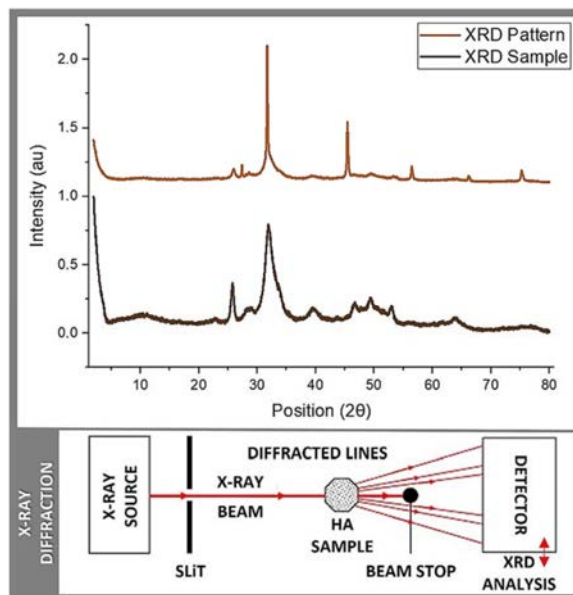


Figure 3. XRD: XRD pattern and sample measurements.

---

## 2.2. Raman Spectrometry

Raman spectrometry is a versatile technique used for the analysis of molecular vibrations in a wide range of materials, from solids to liquids and gases. It is a non-invasive and non-destructive method widely used in research, industry, and various scientific disciplines. It provides valuable information about the chemical composition, molecular structure, and crystal symmetry. Briefly, each chemical bond in a molecule vibrates at specific frequencies, and these vibrations are detected in the Raman spectrum, allowing for chemical identification. Hence, Raman spectroscopy provides insights into the molecular structure and symmetry of a material by revealing details about bond lengths, angles, and the arrangement of atoms within molecules. Further, it can distinguish between different phases of a material, including polymorphs, crystal structures, and amorphous phases. It is useful for materials science and crystallography. Raman spectrometry can also be used to investigate the stress and strain in a material where changes in vibrational frequencies can indicate mechanical stresses within the sample. Last yet not least, it is often employed for quality control assessments and process monitoring in various industries, including pharmaceuticals, food, and bio-materials sciences. Raman spectrometry was principally used in this study to identify the functional groups in the prepared sample(s) in order to establish an approximation of the HA structure and to confirm the calcium phosphate (CaP) basic structure units. The results obtained from Raman 1 and Raman 2 are reported in Table 1 and Figure 2. Briefly, hydroxide (OH), phosphate ion (PO<sub>4</sub>), and carbon trioxide (CO<sub>3</sub>) were present in both batches of samples, as in most CaP. In addition, different bands, such as 623 cm<sup>-1</sup>, 759 cm<sup>-1</sup>, 819 cm<sup>-1</sup>, 845 cm<sup>-1</sup>, and 882 cm<sup>-1</sup>, corresponding to the reference spectra reported in the literature were detected/measured [19,20]. These ranges showed exact coincidences and other significant peaks. The first zone of exact coincidence showed common peak ranges, oscillating between 580 cm<sup>-1</sup> and 589 cm<sup>-1</sup>, with an average of 580 cm<sup>-1</sup>. This range (i.e., 580 cm<sup>-1</sup>) corresponds to a symmetric P-O stretching vibration (*simultaneous vibration of two bonds, in which the bonds elongate together and contract together*) n<sub>4</sub> [19,20], typical of the functional group PO<sub>4</sub> and characteristic of tetrahedral *biological* apatites [20,21] often reported in the literature [21–23]. A second zone of exact coincidence corresponds to a 961 cm<sup>-1</sup> peak, with the highest spectrum intensity, described as the PO<sub>4</sub> groups bending mode and PO<sub>4</sub> vibrations [24]. Associated with this same functional group, a lower intensity peak formed around 1070 cm<sup>-1</sup>–1074 cm<sup>-1</sup> is described as PO<sub>4</sub> band stretching vibration [24–26]. Additionally, some peaks were present only in a few samples. The obtained peaks of 595 cm<sup>-1</sup> (Raman1) and 623 cm<sup>-1</sup> (Raman 2) correlate with 602 cm<sup>-1</sup>–603 cm<sup>-1</sup> or 632 cm<sup>-1</sup>–635 cm<sup>-1</sup> belonging to the OH groups [21,23]. Stretching and liberation modes of OH are typical of HA crystallite structures [21,25]. Finally, a 1460 cm<sup>-1</sup> peak is reported in Raman 2, which could be related to the presence of a CO<sub>3</sub> group. Research shows that this peak can occur between 1421 cm<sup>-1</sup> and 1466 cm<sup>-1</sup>. Its presence in bone graft materials is described as a factor that allows the extracellular matrix (ECM), the intricate network of proteins and minerals found in native bone tissue, to be simulated, which in turn would improve osseointegration, biocompatibility, and *early* osseous resorption [26]. Herein, similar to porosity, a critically important factor that allows for the simulation of the ECM whereby controlled porosity is introduced into bone graft materials, it becomes possible to replicate the natural structure of the ECM by serving as a scaffold that promotes cell attachment, proliferation, and differentiation whilst allowing for the ingrowth of blood vessels and the formation of new or de novo bone tissue [27]. Indeed, the presence of this ECM-like porosity in bone graft materials enhances osseointegration and the bone tissue regenerative outcome, as it provides a mechanically supportive and biomimetic environment suitable for the interaction (effective fusion) among the host cells, native bone, and the graft material [26–28]. It also improves biocompatibility by mimicking the natural bone micro-environment (more conducive to cell adhesion, proliferation, and differentiation, closely resembling the natural bone micro-environment of the patient) [26,27]. In addition, controlled porosity (intra-channels) can lead to *early* bone resorption, as mentioned above, a desirable feature in bone graft materials, as well as in

other regenerative and reparative biomaterials [28,29], as it allows the material to gradually bio-degrade and be substituted by the own bone tissue of the patient during the healing processes [26–30].

**Table 1.** Sample description and functional group interpretation according to the KnowItAll® HORIBA Edition software (“LabSpec 6 Software Suite”) and Raman database with over 1500 spectra for a comparative analysis, SearchIt™ for database spectral searching, MineIt™ for database visualization and mining, and Mixture Analysis for individual component(s) ID-ing in a mixture spectrum, through a database search.

Raman 1 Pattern	Raman 1 Sample	Raman 2 Pattern	Raman 2 Sample	HORIBA Scientific Raman Database *
307,572	-	307,572	-	δ(CC) aliphatic chains
-	269,532	-	269,532	δ(CC) aliphatic chains
-	292,969	-	292,969	υ(Se-Se)
-	313,404	-	313,404	υ(Se-Se)
428,881	-	428,881	-	υ(S-S)
-	431,74	-	431,74	υ(S-S)
448,8075	-	448,8075	-	υ(Si-O-Si)
499,951	-	499,951	-	υ(Si-O-Si)
-	502,777	-	502,77	υ(Si-O-Si)
580,40886	581,35	589,707	581,35	υ(C-Cl)
614,708	-	-	623,019	υ(C-I)
727,278	-	-	759,819	υ(C-S) aliphatic
961,748	961,748	961,748	961,748	ν 1 (PO4 3-)/(A/E2)
1049,81	-	1049,81	-	υ(C=S)
1074,87223	1071,03918	1074,87223	1070,33	υ(C=S)
-	1244,80409	-	1244,23	υ(C=S)

\* KnowItAll® Informatics System: a spectra database covering many applications, available for data mining and analytical and comparative studies, from HORIBA Scientific, Kyoto, Japan.

### 2.3. X-ray Diffraction

The main objective of X-ray diffraction (XRD) is to determine the atomic and molecular structure (phase) of a crystalline material. XRD helps in identifying hydroxyapatite and distinguishing it from other calcium phosphate phases, such as tricalcium phosphate and dicalcium phosphate, where each phase has a unique diffraction pattern. In this context, XRD is a powerful characterization tool and a widely used analytical technique in materials science, chemistry, and related fields. It involves shining X-rays onto a crystalline sample and observing the resulting diffraction pattern, which is caused by the interference of X-rays scattered by the crystal lattice. Indeed, XRD can determine the crystal composition and structure of a material, which describes the arrangement of atoms or molecules within the crystal lattice. It reveals the unit cell dimensions, atomic positions, and symmetry of the crystal. Moreover, XRD is used to identify the different phases present in a sample, which is crucial for material characterization. It can differentiate between various polymorphs or crystal structures of the same material. Further, XRD can quantify the degree of crystallinity (degree of crystallinity is a measure of the fraction of a material that is crystalline compared to the amorphous or non-crystalline phase. It significantly influences the physical properties of the material, such as mechanical strength, thermal stability, and chemical resistance; i.e., higher crystallinity usually indicates better stability and mechanical strength) in a sample, providing information about the order or disorder of the crystal lattice. XRD also measures the lattice parameters, which include the lengths of the edges of the unit cell (a, b, and c) and the angles between them (α, β, and γ). These parameters are fundamental in defining the crystal structure and can provide significant insights into the properties and behavior of the material/biomaterial. Henceforth, XRD can be used to assess the stress and strain within a crystal lattice, which is important in materials engineering and quality control. Last yet not least, XRD is deemed a vital tool in providing critical information about the size and distribution of crystalline particles in a biomaterial.

In this context, Table 2 and Figure 3 display the results obtained from the conducted quantitative analysis, in which the following spectra were compared: the sample obtained in this study, a JCPDS 74-0565 (*standards compiled by the Joint Committee on Powder Diffraction Standards*) pattern, the sample reported by Shi et al. [12] based on salmon fish bone, and the control sample corresponding to commercially available HA (Sigma-Aldrich). In relation to the data obtained, five bands of transversal coincidence were found for the four spectra, all in the range between 20 and 60 2Theta (2 $\theta$ ; atomic spacing), which belong to the characteristic peaks of CaP (calcium phosphates) that are located at 25, 31, 39, 46, 49, and 53 2Theta.

**Table 2.** XRD spectra of bio-ceramics obtained from salmon fish bone compared with the spectra of synthetic HA (Sigma-Aldrich) and the spectra reported in JCPDS 74-0565 and Shi et al. [12], respectively.

JCPDS 74-0565 *	Shi et al. [12] Natural HA	HA Sigma Aldrich	Salmon Fish Bone Bio-Ceramic
-	-	10.8	10.43
25.882	25.845	25.81	25.9
-	-	28.08	28.37
-	-	28.89	28.5
-	-	29.64	29.16
31.765	31.792	31.73	31.6
32.194	32.142	32.13	-
32.896	32.935	32.86	-
34.062	34.055	34	-
39.79	39.816	39.74	39.46
-	-	45.25	45.41
46.693	46.698	46.61	46.72
-	-	48.01	48.04
49.489	49.496	49.39	49.42
50.474	50.568	50.42	-
-	-	51.21	51.41
53.218	53.183	53.1	53.27
-	-	57.8	56.43
-	-	62.93	63.84
-	-	66.26	66.17
-	-	75.49	75.25

\* JCPDS 74-0565: Joint Committee on Powder Diffraction Standards.

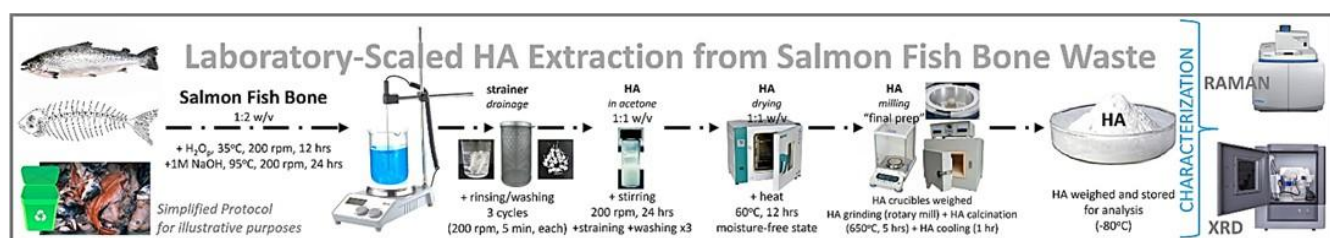
The obtained spectra have the characteristic defined and sharp shape, proper for crystalline structures. In addition, when contrasting the samples against the Crystallography Open Database (COD) and COD inorganic compounds only (CODI), using Match 3! Software (version 4.0 Build 306), *an easy-to-use software for phase analysis using powder diffraction data and compares the diffraction pattern of your sample to a database*, the presence of Ca, P, and O in different structural combinations was confirmed. The analyzed samples correspond to the essential sub-units of CaP, yet more studies are required to better define their arrangement and the Ca:P ratio. Along with this, traces of elements, such as Sr and/or Mg, were found, potentially beneficial for the biocompatibility of bone graft materials [21,31]. Regarding the conducted qualitative analysis of the samples obtained, the crystal size was measured using the Scherrer equation, which resulted in an average crystal size of 130.1 Å for the bio-ceramics obtained from the salmon fish bone. For the HA control sample (Sigma-Aldrich), an average value of a crystal size of 285.8 Å was obtained. Both crystal sizes, when transformed into nm, corresponded to 13.01 and 25.58 nm, respectively, which are close to the values reported in literature for this type of material [12–15] (*please re-visit data in Table 2*).

### 3. Material and Methods

The HA extraction and production process involved, primarily, an extensive literature review of articles between the period of 2015 to 2024, wherein the bioceramic extraction

process from salmon fish bone (of any type) was described. Henceforth, three published studies [12,14,17] were finally selected to assess the described protocols and if they could be replicated in various facilities at the CiiB of Universidad de los Andes, Santiago de Chile. Modification, customization, and calibration of the final *prep* protocol then followed.

A preliminary bone pre-treatment protocol (to achieve deep cleaning of the raw material; i.e., market/industry-discarded salmon bones) was executed, initiated by submerging the bone in purified water obtained through reverse osmosis ( $H_2O_p$ ; p for purified) and maintaining it *heated* at a temperature of  $35^\circ C$  for a duration of 12 h (hrs). Subsequently, the removal process entailed manually extracting the spines and larger voluminous muscle pieces. The vertebrae were then segregated/separated and preserved in storage within the temperature range of  $-18^\circ C$  to  $-25^\circ C$ . This protocol encompassed six sequential steps. Following an adapted and a modified version of Shi et al.'s protocol (Figure 4), the salmon fish bone underwent separation, thawing, and weighing. A 1:2 weight-to-volume ratio (bone weight to water volume;  $w/v$ ) of  $H_2O_p$  was heated to  $95^\circ C$  and stirred at 200 revolutions per minute (rpm) using a magnetic stirrer (Dlab; MS-H-Pro+; Beijing, China).



**Figure 4.** Illustrating the *Prep* protocol for HA extraction from salmon bone waste and analytics. HA is a calcium phosphate compound,  $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$ , that serves as the main inorganic element composition in the bone and teeth. HA extracted from fish bone is considered to be an alternative to synthetic HA from chemicals. Different regions have access to various fish species, leading to the utilization of locally abundant fish waste for HA powder production. These species yield HA with distinct morphologies, porosities, and purities, which makes the choice of the fish source crucial in the process. The selection is often influenced by regional availability, the specific properties of the fish bones, and the goals of sustainability and innovation in material synthesis [31,32]. Fish, such as catfish (*Pangasius hypophthalmus*), cod, tilapia (*Oreochromis* sp.), seabass (*Lates calcarifer*), yellowfin tuna (*Thunnus albacares*), rainbow trout, Whitemouth croaker, and, more recently, red big-eye snapper (*Priacanthus tayenus*), are among the wide range of aquatic or marine animals used in these studies. This growing interest underscores the dual advantage of converting bio-waste into valuable and adaptable HA while addressing environmental pollution challenges. This approach not only promotes sustainable biomaterial synthesis and environmental management, but it also possibly offers cost-effective and eco-friendly processes with a strong potential for industrial-scale applications, providing a greener alternative to traditional HA production methods and protocols [15,18,31,32].

Once the desired temperature was attained, the bone was then introduced/added, and the specified temperature and stirring conditions were consistently maintained for 1 hr. Subsequently, the liquid was separated through drainage using a fine metal strainer (Ilko<sup>®</sup>; 10 cm Inox. Shunyi District, Chongqing, China). A rinsing/washing step/process was carried out three times in a standard magnetic stirrer with  $H_2O_p$ , maintaining the 1:2  $w/v$  ratio, while continuously/constantly agitating at 150 rpm for 5 min, each time. Following the drainage and removal of the liquid using the strainer, a 1 Molar (M) solution of Merck<sup>®</sup> sodium hydroxide (NaOH) (Merck is a brand, NaOH provided via a local supplier) was added at the standard 1:2  $w/v$  ratio and left to react for 24 h, with constant stirring at 200 rpm (alkaline treatment via the use of an alkaline NaOH solution is basically to de-proteinize the bone sample and remove the majority of the organic matter, i.e., proteins). Afterwards, the liquid was once again separated using the described strainer, and the resultant material was subjected to three incessant washing cycles inside the magnetic stirrer with  $H_2O_p$ , maintaining a 1:1  $w/v$  ratio and agitating it at 200 rpm for 5 min in each cycle. The bone was

---

subsequently immersed/submerged in acetone (Sigma-Aldrich, Sigma-Aldrich is globally known, with representatives in countries, so acetone was obtained thru a local vendor) at a 1:1 *w/v* ratio and placed on the magnetic stirrer operating at 200 rpm for 24 h. The solution was then decanted with the aid of the strainer and underwent three sequential washing cycles with H<sub>2</sub>O, carefully preserving the 1:1 *w/v* ratio, using a regular yet controlled laboratory bench-top magnetic stirrer rotating at 250 rpm for 5 min, for each cycle.

The resulting material was then subjected to a drying process in an oven (Horizontal flow; WOF-105; Shanghai, China) set at 60 °C for a period of 12 h. The crucibles used in the process were also dried in the oven set at 60 °C for 30 min. Upon reaching/achieving a dry and moisture-free state, the crucibles were weighed and measured using a Shimadzu (AUX 120; Columbia, MD 21046, USA) analytical balance. Subsequently, the grinding procedure was carried out using a rotor mill (Foss; KN 295 Knifetec; Santiago, Chile), consisting of four pulses, each lasting 2 s. Following this, the electric Muffle Furnace (XL-1000c/1200c/1600c; Santiago, Chile) was pre-heated to 650 °C. Once the desired temperature was attained, the sample (i.e., *samples*) was subjected to calcination for 5 h (to ensure that the biomaterial was, free of organic residues), after which it was allowed to cool within the Muffle Furnace for an additional 60 min.

Finally, the resultant final material and sample(s) was/were weighed, labeled, and properly stored in an environment devoid of moisture, maintained at -80 °C and shielded from any exposure to light. It is noteworthy herein that to ensure the reproducibility of the HA extraction procedure, the designed and performed protocol was duplicated on two separate occasions, under the same conditions. The samples were subsequently subjected to Raman spectrometry. This protocol was once again replicated and then underwent a comprehensive characterization through both Raman spectrometry and X-ray diffraction, following the pre-established methodologies [12–17,21], manufacturer's instructions and protocols, and the introduced/applied standardizations at our R&D&I laboratories.

## 4. Discussion

### 4.1. Production

Hydroxyapatite (HA) is a widely used biomaterial in tissue regeneration and repair due to its biocompatibility, bioactivity, and similarity to the mineral component of human bone [1,2,4,6]. Different types of HA can be derived from various sources and through diverse extraction methods, each influencing the characteristics of the extracted and produced HA and its performance, *in vitro*, *in vivo*, and in the clinic [1,2,6,8]. Briefly, human-derived HA closely resembles autografts in function, delivering excellent biocompatibility and bioactivity, though its use is limited by availability and ethical concerns. Synthetic HA offers high purity and customization options; however, it may lack the natural bioactivity inherent to biological HAs. On the other hand, whilst bovine- and porcine-derived HAs provide a natural architecture and porosity that support cell growth and tissue integration, they carry potential risks of disease transmission and immunogenicity [1–6,8]. Fish-derived HA, such as that obtained from salmon, combines sustainability with desirable nanoscale properties and high bioactivity, positioning it as a strong candidate for bone regeneration [1–6,8–12]. Henceforth, each type of HA presents unique benefits and limitations, and the choice of material depends on the specific clinical application, desired properties, and ethical considerations. Table 3 summarizes some of the extraction methods, their characteristics and main observations often reported in the accruing literature.

Today, the realm of osseo-regenerative and -reparative material production has seen substantial R&D&I efforts, with an accruing drive towards developing much more cost-effective and readily available alternatives to better address the persistent challenges of high production costs and storage, amongst others. This pursuit has led to the exploration of novel sources for xenograft-type materials, which have the potential to reduce expenses, enhance biocompatibility, improve cellular and biological interactions, and increase availability. In this context, fish bone-derived xenografts, particularly those sourced from bio-waste, captured the interest of R&D&I groups/laboratories, including our own.

**Table 3.** HA is a widely used biomaterial in tissue regeneration due to its biocompatibility, bioactivity, and similarity to the mineral component of human bone. Different types of HA can be derived from various sources and via diverse extraction methods, each influencing the characteristics of the extracted and produced HA and its reported performance in the available and accruing literature.

HA	Extraction and/or Production Method	Main Characteristics	Main Effects in Pre-Clinical Studies
			<b>in vitro:</b> Supports robust cell attachment and
Human-derived	Auto-/Allo-graft obtained from human donor bone, typically through demineralization, sterilization, and sometimes freeze-drying to produce a bone graft material.	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Highly similar to the patient's own bone in composition and structure.</li> <li>- Contains natural bone matrix proteins that may enhance osteo-induction.</li> </ul>	differentiation, often better than synthetic or animal-derived HA due to its bioactive matrix. <b>in vivo:</b> Excellent biocompatibility and osteointegration, with reduced risk of immune
Synthetic	Synthesized through chemical precipitation, sol-gel processes, hydrothermal methods, and other wet chemical techniques.	<ul style="list-style-type: none"> <li>- High purity and controlled particle size.</li> <li>- Tailorable crystallinity and porosity depending on the synthesis conditions.</li> <li>- Generally, lacks the organic components found in natural HA.</li> </ul>	rejection. Yet, availability and ethical considerations limit its use. <b>in vitro:</b> Excellent biocompatibility, supports cell attachment and proliferation. Bioactivity can vary depending on the crystallinity and surface area. <b>in vivo:</b> Often shows good integration with host tissue, but may have slower resorption rates compared to natural HA. Absence of organic
Bovine-derived	Derived from bovine bone through calcination or enzymatic treatment to remove organic components while preserving the mineral phase.	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Naturally occurring HA structure with some residual organic matrix.</li> <li>- High porosity and similar architecture to human bone.</li> </ul>	components may reduce its osteoinductive potential. <b>in vitro:</b> Promotes cell attachment and differentiation. Natural porosity enhances nutrient exchange.
Porcine-derived	Similar to bovine HA, obtained through thermal or chemical processing of porcine bone to isolate the mineral phase.	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Comparable to bovine HA in terms of structure and composition.</li> <li>- May have slightly different mineral content and porosity due to species-specific differences.</li> </ul>	<b>in vivo:</b> Shows good osteoconductivity and integration, but there may be concerns regarding disease transmission and immune response, although these are typically minimal after proper processing.
Fish-Derived	Extracted from fish bones (e.g., Chilean salmon) through processes, such as alkaline hydrolysis, calcination, or enzymatic treatment.	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Contains a highly crystalline mineral phase with a favorable Ca/P ratio.</li> <li>- Often exhibits nano-scale features and a higher surface area compared to mammalian sources.</li> </ul>	<b>in vitro:</b> Supports cellular activities, such as adhesion, proliferation, and differentiation. <b>in vivo:</b> Demonstrates good biocompatibility and osteoconductivity, but similar to bovine HA, it may present a risk of immunogenicity or disease transmission. <b>in vitro:</b> Excellent biocompatibility, promoting cell adhesion and proliferation. The nano-scale structure may enhance bioactivity and osteoinductive potential. <b>in vivo:</b> Demonstrates promising osteoconductivity and integration with host tissue. The sustainable sourcing from fish waste offers an eco-friendly alternative to traditional sources.

Various methods for producing these xenografts, such as NaOH-based hydrolysis, calcination, and enzymatic hydrolysis, have been reported in the accruing literature. The aim of our present study was to study and describe the process for extracting the mineral phase from salmon fish bones, for the development of a new reproducible protocol based largely on the framework previously proposed by Shi et al. [12], deemed most suitable and practical. Indeed, this protocol focuses on *key* elements, factors and stages designed to eliminate a significant portion of organic matter. This involved the thorough cleaning and removal/elimination of large-scale muscle tissue at elevated temperatures, enzymatic lysis of collagen and proteins in the bone matrix using an appropriate concentration of NaOH, removal of lipids and fats through de-fating in an acetone solution, and finally, the calcina-



---

tion process to eliminate residual (from previous processes/stages) organic components. Herein, it is crucial to exercise extreme caution to avoid/prevent any damage to the bone mineral matrix, as any remaining residues could potentially alter the structural integrity or act as a vector for contamination [12–18,21]. As presented in our study, we proposed, designed, and developed an innovative and patent-pending experimental preparation protocol for extracting and producing HA and nano-scaled HA bio-ceramic material from salmon fish bones, which co-integrates alkaline hydrolysis, de-fattening, and calcination processes. This simplified and reproducible approach offers a simple, safe, efficient, reproducible and inexpensive method/protocol for advancing the extraction, formulation and production of novel bone regeneration biomaterials from sustainable and readily available resource(s), possibly impacting the field of functional biomaterials and beyond.

#### 4.2. Parametric Analysis

To obtain preliminary insight into the structure of the extracted material, we conducted Raman spectrometry and XRD analyses. Following the initial/primary characterization, we verified the reproducibility of our results, observing a high degree of consistency and satisfactory coherence across the different sample batches. In our Raman spectrometry results, we confirmed the presence of the essential functional groups crucial for the formation of HA or beta-tricalcium phosphate ( $\beta$ -TCP), such as  $\text{PO}_4$ , OH, and  $\text{CaO}_3$ . Notably, the characteristic peaks corresponding to these functional groups were consistently detected in all compared samples. To ensure precision and confirm the presence of HA, we performed two sets of comparisons with the selected controls, revealing a very close match. This was particularly evident in the peak with the highest volume, associated with one of the  $\text{PO}_4$  functional group bands. Additionally, the presence of a  $\text{CO}_3^{2-}$  group, reported in the  $1421\text{ cm}^{-1}$ – $1466\text{ cm}^{-1}$  peak range (in the Raman 2 set), is linked, in the literature, to enhanced biocompatibility in bone regeneration materials. As a point of reference, herein, we employed synthetic and commercially available HA (Sigma-Aldrich) as a control [19–27,30–32]. The XRD analysis confirmed the presence of key elements, like Ca, P, and O, as well as trace elements, including Sr and Mg. These trace elements have been identified as potential contributors to the biocompatibility of the regenerative material, consistent with previous research and literature. It is perhaps noteworthy that although we did not find an exact match in the databases (COD and CODI) used, our findings do align with the expected distribution of a crystalline structure and an estimated crystal size, as described in the literature and suitable for osseoregenerative and reparative materials of this type [26–30]. Collectively, these results support the further exploration and use of salmon-derived materials for tissue (hard and potentially, soft) repair and regeneration, hereby, indicating their potential advantages over alternatives derived from other fish species and highlighting their practical promise as a valuable resource for the development of new tissue engineering biomaterial(s), an ongoing pre-clinical assay in our labs.

To recap, this study aspired to significantly contribute and advance the sustainability and biocompatibility of biomaterial production through the development of a novel HA derived from Chilean salmon fish bones, a natural resource and biowaste challenge. By leveraging biowaste from the salmon industry, the study not only addresses environmental challenges associated with waste management but also provides a sustainable source of high-quality biomaterial. The extraction/production process is both cost-effective and environmentally friendly, highlighting its potential for large-scale applications. The salmon-derived HA exhibits exceptional functional properties that are critical for the reconstruction of bone tissue defects. The material features a highly crystalline structure, an optimal calcium-to-phosphorus or Ca/P ratio, and excellent biocompatibility. These attributes contribute to its ability to support bone regeneration effectively. The nano-scale cellular and molecular properties of this HA facilitate cell adhesion, proliferation, and differentiation, which are essential for promoting de novo bone formation and integration with existing bone tissue. In today's clinical indications and applications, this HA can serve as a malleable and effective bone graft material and/or as a supplier (drug delivery vehicle/carrier/system) of peptides, cytokines and growth factors, in/for various therapeutic uses [23–30,32]. Its high bioactivity and favorable molecular characteristics make it an excellent candidate for enhancing tissue bio-engineering, wound healing, and regenerative medicine. By improving the functional performance of bone grafts and regenerative treatments, this material holds potential to significantly enhance patient outcomes and quality of life. Henceforth, integrating this new salmon-derived nano-sized HA into medical practice not only supports sustainable and ethical biomaterial production but also offers a promising solution for addressing simple, as well as complex, tissue repair challenges, ultimately contributing to an improved human health and well-being, aesthetically and functionally. To summarize, based on the results obtained during this characterization, a microscopic and structural resemblance can be established with other bio-ceramic materials derived from salmon fish bone, as reported in the existing literature.

These materials are primarily composed of HA,  $\beta$ -TCP, or a combination of both. However, to gain a comprehensive understanding of the properties, additional physical characterization tests should be conducted on our produced material. For example, in addition to the conducted SEM recommended to define the surface topography, surface morphology, pore size, and its Ca/P ratio, other microscopy techniques can also be employed. Furthermore, conducting compression tests would provide insights into its compressive strength and compaction potential [12,21,24,26]. In terms of the chemical analysis, thermogravimetric analysis can help assess the purity of the sample by quantifying the organic content and moisture. This analysis will be valuable in determining the composition of the final material [12,18,21,24,27,30], a step to be included in our future reports. To evaluate its suitability for biological applications, it is essential to conduct biological tests designed for assessing cyto-/bio-compatibility and efficacy. These tests may include analyses of cell proliferation and alkaline phosphatase activity to determine the ability of the material to support cell proliferation and differentiation, respectively. Such experiments are ongoing in our labs, including pre-clinical in vivo assays using suitable models. Until these thorough assessments are performed, we cannot provide an exact composition or behavior prediction of the material upon clinical/surgical use. However, the lab-scale material we have obtained, under controlled conditions, presents itself as a promising candidate for use in bone tissue repair and regeneration. Its similarities to the various employed control materials, as well as other reported materials in the literature, suggest its potential for such compound application(s).

## 5. Conclusions

Globally, statistics reveal that approximately 2.2 millions of bone graft procedures are conducted annually, with costs estimated at US\$ 664 million as of 2021, according to the US-FDA. Furthermore, the number of surgical procedures aimed at repairing bone defects is projected to increase by approximately 13% each year. The *patent-pending* isolated functional biomaterial derived from Chilean salmon fish bones demonstrates promising biochemical properties, including bioactive HA with essential mineral ions. This positions it as a viable candidate for producing laboratory-scaled xenografts suitable for tissue engineering, wound healing, and regenerative medicine, including simple and complex bone repair and regeneration applications, in particular. The described and presented extraction/production process, herein, is straightforward, reproducible, and cost-effective, offering an environmentally sustainable alternative solution to the rising challenge of managing bio-waste from the salmon sector and the broader marine and aquatic industries. Indeed, our modified alkaline hydrolysis–calcination method produced salmon-derived HA with a highly crystalline structure, optimal Ca/P ratio, and excellent biocompatibility. Its nano-scale cellular and molecular properties are particularly well-suited for bone repair and compare favorably to or even surpass those of human, synthetic, bovine, and porcine HA. Further in-depth characterization is key to weigh the full pre-clinical and clinical potential of the biomaterial for/in various bio-medical and -dental applications in tissue regeneration, a focus of the ongoing R&D&I endeavors in our labs.

## 6. Patents

Patent Cooperation Treaty (PCT)—(International) has been filed by the co-authors of this article.

**Author Contributions:** Conceptualization, F.M. and Z.S.H.; Methodology, F.M., A.P. and Z.S.H.; Investigation, I.G., M.C.P., M.J.G., N.O. and Z.S.H.; Writing—original draft preparation, F.M., M.B.,

M.J.G. and Z.S.H.; Writing—review and editing, Z.S.H.; Final version review/editing, Z.S.H. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This research work was supported by operating grants provided to the HAIDAR R&D&I LAB/BioMAT'X (Laboratorio de Biomateriales, Farmacéuticos y Bioingeniería de Tejidos Cráneo Máxilo-Facial), member of CiiB (Centro de Investigación e Innovación Biomédica), Faculties of Medicine and Dentistry, Universidad de los Andes, Santiago de Chile, through the ANID-NAM (Agencia Nacional de Investigación y Desarrollo, Chile and National Academy of Medicine, USA) Grant coded # NAM21I0022 (2020–2022), CORFO Crea y Valida I+D+i Grant coded # 21CVC2-183649 (2021–2023), CORFO Crea y Valida—“Proyecto de I+D+i Colaborativo-Reactive” Grant coded # 22CVC2-218196 (2022–2024), and FONDEF Concurso IDeA de I+D, ANID, Grant coded # ID22110215 (2022–2024). The authors are pleased to particularly acknowledge the awarded CORFO Crea y Valida I+D+i Grant devoted to Chilean Salmon Fish Bone; code # 21CVC2-183641 (2022–2024).

**Institutional Review Board Statement:** Not applicable.

**Informed Consent Statement:** Not applicable.

**Data Availability Statement:** All raw data underlying the results are included herein, and no additional source data are required.

**Acknowledgments:** The authors wish to acknowledge the contributions of veterinarian Nataly Quezada, a member of our CiIB team, for her invaluable support of this work.

**Conflicts of Interest:** The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

## References

1. Gillman, C.E.; Jayasuriya, A.C. FDA-approved bone grafts and bone graft substitute devices in bone regeneration. *Mater. Sci. Eng. C Mater. Biol. Appl.* **2021**, *130*, 112466. [[CrossRef](#)]
2. Haidar, Z.S. nanoBONE: Re-visiting Osseo-Reconstruction and -Repair... with a nanoTwist. *J. Oral Res.* **2021**, *10*, 1–6. [[CrossRef](#)]
3. Zumarán, C.C.; Parra, M.V.; Olate, S.A.; Fernández, E.G.; Muñoz, F.T.; Haidar, Z.S. The 3 R's for Platelet-Rich Fibrin: A “Super” Tri-Dimensional Biomaterial for Contemporary Naturally-Guided Oro-Maxillo-Facial Soft and Hard Tissue Repair, Reconstruction and Regeneration. *Materials* **2018**, *11*, 1293. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Haidar, Z.S.; Di-Silvio, L.; Noujeim, Z.E.F.; Davies, J.E.; Cuisinier, F.; Banerjee, A. Engineering Solutions for Cranio-Maxillo-Facial Rehabilitation and Oro-Dental Healthcare. *J. Heal. Eng.* **2019**, *2019*, 5387305. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Damsaz, M.; Castagnoli, C.Z.; Eshghpour, M.; Alamdari, D.H.; Alamdari, A.H.; Noujeim, Z.E.F.; Haidar, Z.S. Evidence-Based Clinical Efficacy of Leukocyte and Platelet-Rich Fibrin in Maxillary Sinus Floor Lift, Graft and Surgical Augmentation Procedures. *Front. Surg.* **2020**, *7*, 537138. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Fillingham, Y.; Jacobs, J. Bone grafts and their substitutes. *Bone Jt. J.* **2016**, *98-B* (1 Suppl. A), 6–9. [[CrossRef](#)]
7. Gómez-Barrena, E.; Ehrnthaller, C. Long bone uninfected non-union: Grafting techniques. *EFORT Open Rev.* **2024**, *9*, 329–338. [[CrossRef](#)]
8. Maria, O.M.; Heram, A.; Tran, S.D. Bioengineering from the laboratory to clinical translation in oral and maxillofacial reconstruction. *Saudi Dent. J.* **2024**, *36*, 955–962. [[CrossRef](#)]
9. Barreto, M.E.V.; Medeiros, R.P.; Shearer, A.; Fook, M.V.L.; Montazerian, M.; Mauro, J.C. Gelatin and Bioactive Glass Composites for Tissue Engineering: A Review. *J. Funct. Biomater.* **2022**, *14*, 23. [[CrossRef](#)]
10. Seyhan, S.A.; Alkaya, D.B.; Cesur, S.; Oktar, F.N.; Gunduz, O. Preparation and characterization of pure natural hydroxyapatite derived from seashells for controlled drug delivery. *J. Aust. Ceram. Soc.* **2022**, *58*, 1231–1240. [[CrossRef](#)]
11. Malde, M.K.; Graff, I.E.; Siljander-Rasi, H.; Venäläinen, E.; Julshamn, K.; Pedersen, J.I.; Valaja, J. ORIGINAL ARTICLE: Fish bones—a highly available calcium source for growing pigs. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.* **2010**, *94*, e66–e76. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Shi, P.; Liu, M.; Fan, F.; Yu, C.; Lu, W.; Du, M. Characterization of natural hydroxyapatite originated from fish bone and its biocompatibility with osteoblasts. *Mater. Sci. Eng. C Mater. Biol. Appl.* **2018**, *90*, 706–712. [[CrossRef](#)]
13. Venkatesan, J.; Ryu, B.; Sudha, P.N.; Kim, S.-K. Preparation and characterization of chitosan-carbon nanotube scaffolds for bone tissue engineering. *Int. J. Biol. Macromol.* **2012**, *50*, 393–402. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Venkatesan, J.; Lowe, B.; Manivasagan, P.; Kang, K.-H.; Chalisserry, E.P.; Anil, S.; Kim, D.G.; Kim, S.-K. Isolation and Characterization of Nano-Hydroxyapatite from Salmon Fish Bone. *Materials* **2015**, *8*, 5426–5439. [[CrossRef](#)]
15. Muñoz, F.; Haidar, Z.S.; Puigdollers, A.; Guerra, I.; Padilla, M.C.; Ortega, N.; García, M.J. A novel Chilean salmon fish backbone-based nanoHydroxyApatite functional biomaterial for potential use in bone tissue engineering. *Front. Med.* **2024**, *11*, 1330482. [[CrossRef](#)]
16. Hoyer, B.; Bernhardt, A.; Heinemann, S.; Stachel, I.; Meyer, M.; Gelinsky, M. Biomimetically mineralized salmon collagen scaffolds for application in bone tissue engineering. *Biomacromolecules* **2012**, *13*, 1059–1066. [[CrossRef](#)]
17. Idowu, A.T.; Benjakul, S.; Sinthusamran, S.; Sae-leaw, T.; Suzuki, N.; Kitani, Y.; Sookchoo, P. Effect of Alkaline Treatment on Characteristics of Bio-Calcium and Hydroxyapatite Powders Derived from Salmon Bone. *Appl. Sci.* **2020**, *10*, 4141. [[CrossRef](#)]
18. Kotak, D.J.; Devarajan, P.V. Bone targeted delivery of salmon calcitonin hydroxyapatite nanoparticles for sublingual osteoporosis therapy (SLOT). *Nanomedicine* **2020**, *24*, 102153. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
19. Koutsopoulos, S. Synthesis and characterization of hydroxyapatite crystals: A review study on the analytical methods. *J. Biomed. Mater. Res.* **2002**, *62*, 600–612. [[CrossRef](#)]
20. Diez-Escudero, A.; Espanol, M.; Ginebra, M.P. High-aspect-ratio nanostructured hydroxyapatite: Towards new functionalities for a classical material. *Chem. Sci.* **2023**, *15*, 55–76. [[CrossRef](#)]
21. Bas, M.; Daglilar, S.; Kuskonmaz, N.; Kalkandelen, C.; Erdemir, G.; Kuruca, S.E.; Tulyaganov, D.; Yoshioka, T.; Gunduz, O.;

Ficai, D.; et al.

Mechanical and Biocompatibility Properties of Calcium Phosphate Bioceramics Derived from Salmon Fish Bone Wastes. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, 8082. [[CrossRef](#)]

22. Liou, S.-C.; Chen, S.-Y.; Lee, H.-Y.; Bow, J.-S. Structural characterization of nano-sized calcium deficient apatite powders. *Biomaterials* **2004**, *25*, 189–196. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Vu, A.A.; Burke, D.A.; Bandyopadhyay, A.; Bose, S. Effects of surface area and topography on 3D printed tricalcium phosphate scaffolds for bone grafting applications. *Addit. Manuf.* **2021**, *39*, 101870. [[CrossRef](#)]
24. Xu, J.L.; Khor, K.A.; Dong, Z.L.; Gu, Y.W.; Kumar, R.; Cheang, P. Preparation and characterization of nano-sized hydroxyapatite powders produced in a radio frequency (rf) thermal plasma. *Mater. Sci. Eng. A* **2004**, *374*, 101–108. [[CrossRef](#)]
25. Terzioğlu, P.; Ögüt, H.; Kalemtas, A. Natural calcium phosphates from fish bones and their potential biomedical applications. *Mater. Sci. Eng. C Mater. Biol. Appl.* **2018**, *91*, 899–911. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Nie, W.; Peng, C.; Zhou, X.; Chen, L.; Wang, W.; Zhang, Y.; Ma, P.X.; He, C. Three-dimensional porous scaffold by self-assembly of reduced graphene oxide and nano-hydroxyapatite composites for bone tissue engineering. *Carbon* **2017**, *116*, 325–337. [[CrossRef](#)]
27. Liang, H.; Wang, Y.; Chen, S.; Liu, Y.; Liu, Z.; Bai, J. Nano-Hydroxyapatite Bone Scaffolds with Different Porous Structures Processed by Digital Light Processing 3D Printing. *Int. J. Bioprint* **2022**, *8*, 502. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
28. Haidar, Z.S. *Biomechanics and Functional Tissue Engineering*; IntechOpen: London, UK, 2021; pp. 1–268.
29. Jawadi, Z.; Yang, C.; Haidar, Z.S.; Santa Maria, P.L.; Massa, S. Bio-Inspired Muco-Adhesive Polymers for Drug Delivery Applications. *Polymers* **2022**, *14*, 5459. [[CrossRef](#)]
30. Mo, X.; Zhang, D.; Liu, K.; Zhao, X.; Li, X.; Wang, W. Nano-Hydroxyapatite Composite Scaffolds Loaded with Bioactive Factors and Drugs for Bone Tissue Engineering. *Int. J. Mol. Sci.* **2023**, *24*, 1291. [[CrossRef](#)]
31. Nam, P.V.; Nguyen, V.H.; Trang, S.T. Properties of hydroxyapatites prepared from different fish bones: A comparative study. *Ceram. Int.* **2019**, *45*, 20141–20147. [[CrossRef](#)]
32. Jindapon, N.; Klinmalai, P.; Surayot, U.; Tanadchangsaeng, N.; Pichaiakrit, W.; Phimolsiripol, Y.; Vichasilp, C.; Wangtueai, S. Preparation, Characterization, and Biological Properties of Hydroxyapatite from Bigeye Snapper (*Priacanthus tayenus*) Bone. *Int. J. Mol. Sci.* **2023**, *24*, 2776. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

## Anexo 5: Conflictos de interés

El presente proyecto no presenta conflictos de interés ni de su autor principal ni de los coautores de los trabajos publicados, el cual se encuentra explicitado en documentos oficiales aportados a la Dirección Académica de Doctorado de la Universidad Internacional de Cataluña.

## Anexo 6: Financiación

El presente proyecto contó con financiación del proyecto CORFO I+D Empresarial código 21CVC2-183641 el cual se encuentra concluido y debidamente rendido.