

Caracterización biológica de composites de Titanio-Hidroxiapatita sinterizados a baja temperatura

R. Comín¹, M. P. Cid², L. Grinschpun³, C. Oldani³, R. Taborda⁴ y N. A. Salvatierra²

¹Departamento de Química, Ingeniería Biomédica. Facultad de Ciencias Exactas Físicas y Naturales. Universidad Nacional de Córdoba. Argentina.

²IIBYT-CONICET. Argentina.

³Laboratorio de Ensayos. Centro de Vinculación Materiales y Tecnología. Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales. Universidad Nacional de Córdoba. Argentina

⁴LIAD (Laboratorio de Investigación Aplicada y Desarrollo). Facultad de Ciencias Exactas Físicas y Naturales. Universidad Nacional de Córdoba. Argentina.

romicomín@gmail.com

Abstract. Bone tissue loss caused by severe injury or disease is a critical problem in orthopedic clinics, and involves bone repairs and substitutes. At present, several devices and biomaterials in the treatment of these defects are used. Increased interest in the use of titanium and hydroxyapatite composites for biomedical applications has been observed in recent years due to a good combination of the hydroxyapatite bioactivity and the favorable mechanical properties of metals. Powder metallurgy is a method that uses powder from titanium and hydroxyapatite to obtain composites having hydroxyapatite phases in metallic matrix. One of the steps of this method includes a sintering stage ranged 1000-1300°C. However, in this system the presence of titanium accelerated dehydroxylation and the decomposition of hydroxyapatite to form tetracalcium phosphate and calcium oxide and these were detected at a temperature as low as 800°C. This imposes certain limitations on the thermal conditions for the manufacture of composites from a mixture of titanium and hydroxyapatite. In this work, we obtained a titanium-hydroxyapatite composite sintered at 800°C and evaluated its *in vitro* biocompatibility. The MTT assay was carried out to assess cytotoxicity on Vero and NIH 3T3 cell lines in accordance to ISO 10993 Standard. In addition, the cell morphology and adhesion on composite surface were analyzed using fluorescence and SEM microscopy. Our data show that the extracts from sintered composite at 800°C did not produce toxicity on Vero or NIH 3T3 cells neither affected the morphology and density of cells grown. Finally, the NIH 3T3 cells were adhered and proliferated on entire surface covering titanium-hydroxyapatite composite at day 4 of cell culture. These results provide *in vitro* evidence of good biocompatibility and bioactivity of this titanium-hydroxyapatite composite sintered at low temperature.

1. Introducción

La pérdida de tejido óseo provocada por una lesión grave o una enfermedad es un problema crítico en la clínica ortopédica e implica la reparación ósea y la utilización de sustitutos. Auto, aloinjertos e injertos sintéticos son los principales enfoques para reparar los defectos óseos o reemplazar el hueso perdido. La hidroxiapatita ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) (HA) es uno de los materiales más utilizados como implante para los tejidos humanos duros debido a la similitud química y de su estructura cristalográfica con el componente mineral de los huesos y los dientes de mamíferos [1, 2, 3]. Como resultado, la HA además de ser no tóxica es biocompatible, es decir, no es reconocida como material extraño en el cuerpo y exhibe un comportamiento bioactivo[4]. Estas propiedades fisicoquímicas producen un enlace íntimo entre los implantes y el tejido óseo, denominado osteointegración[5]. Sin embargo, las principales limitaciones de utilizar HA como biocerámicas de carga son sus propiedades mecánicas, ya que son frágiles y con una resistencia pobre a la fatiga [6, 7]. Por lo tanto, se utiliza principalmente como relleno y revestimiento en aplicaciones biomédicas, haciendo imposible utilizarla para la reparación de grandes defectos. Por otro lado, el titanio (Ti) es un metal biocompatible y sus propiedades mecánicas son mejores para los implantes que suponen grandes reparaciones óseas, pero su biocompatibilidad no es tan buena como HA. La interfaz entre el titanio y el hueso huésped es una unión sencilla de enclavamiento, que puede conducir a la pérdida y al eventual fracaso del implante [8]. Así, materiales que combinen la bioactividad de HA y las propiedades mecánicas de Ti son considerados dentro de un grupo promisorio para el desarrollo de biomateriales con propiedades mejoradas. Se han probado diferentes métodos para obtener estos materiales compuestos de Ti-HA (composites) donde la superficie de Ti es recubierta con HA [9, 10, 11, 12, 13, 14]. El método más utilizado es la deposición por plasma de HA sobre Ti [15, 16, 17, 18], sin embargo, diferencias en las propiedades físicas y térmicas de los dos materiales limitan inevitablemente el uso de este tipo de composites [19]. Otro método para obtener composites de Ti-HA es la pulvimetalurgia [20, 21]. Este método utiliza polvos de Ti y HA para obtener composites que tienen una fase de HA en una matriz de Ti [22]. Estos compuestos podrían interactuar mejor con el tejido óseo ya que el mismo podría crecer no sólo sobre la superficie sino también en los poros presentes en el implante. La pulvimetalurgia incluye una etapa de sinterización a temperaturas que oscilan entre 1000 y 1300°C [23]. Se ha reportado que HA pura es estable en atmósfera de argón a temperaturas de hasta 1200°C [24]. Sin embargo, en el sistema Ti-HA la presencia de Ti acelera la deshidroxilación y la descomposición de HA, para formar fosfato tetracálcico y óxido de calcio, se detectó a una temperatura tan baja como 800°C. Esto impone ciertas limitaciones a las condiciones térmicas para la fabricación de los composites mediante pulvimetalurgia. Así, el desarrollo de nuevos biomateriales requiere una evaluación sistemática y cuantitativa de la biocompatibilidad de sus componentes [25]. El comportamiento de las células en contacto con el biomaterial y en particular a la adhesión celular a su superficie está estrechamente relacionado con la biocompatibilidad. Por lo tanto, en el presente trabajo se obtuvieron composites de Ti-HA sinterizados a 800°C y se evaluaron la citotoxicidad, la adhesión y proliferación celular como correlato de su biocompatibilidad *in vitro* en líneas celulares epiteliales Vero y células fibroblásticas NIH 3T3, de acuerdo a la norma ISO 10993.

2. Materiales y métodos

2.1. Preparación de los composites.

Los composites de Ti-HA se prepararon mediante pulvimetalurgia. TiH_2 98% (Sigma, St Louis, EE.UU.) de malla-325 (partículas de tamaño menor a 43 μm) se mezcló con 20 % p/p de HA bovina (Inbiomed SA, Córdoba, Argentina). La mezcla de Ti-HA fue homogeneizada en un mezclador en Y durante 30 min. El polvo se compactó sin adición de lubricante a 490 MPa y se obtuvieron muestras

de 8 mm de diámetro y 2 mm de altura. A continuación, se realizó el sinterizado en atmósfera de argón a 800°C durante 2 h. El hidrógeno presente en TiH₂ se liberó durante el comienzo de la sinterización manteniendo la temperatura a 500°C durante 30 min. Discos de Ti puro (Ti) y Ti poroso (Ti-P) se prepararon de la misma manera. Ti-P se obtuvo a partir de una mezcla de Ti con 20 % p/p de NH₄Cl. Todos los compuestos se limpiaron ultrasónicamente en acetona al 100% y agua destilada, durante 10 minutos en cada paso y se esterilizaron en estufa a 140°C durante 2 h.

2.2. Preparación de los extractos de los composites.

Se prepararon extractos de Ti-HA, Ti y Ti-P para evaluar el potencial efecto citotóxico de las muestras. Las condiciones de extracción se llevaron a cabo de acuerdo con la norma ISO 10993, 2012 [26]. Los composites esterilizados se pusieron en recipientes estériles, químicamente inertes y cerrados. Se añadió medio de cultivo Dulbeccos Eagle modificado (DMEM) (Gibco, Invitrogen, Auckland, NZ) en una proporción de 0,1g/mL (masa de disco/volumen de DMEM). Las muestras se incubaron en una atmósfera humidificada de 5% de CO₂ en aire a 37°C durante 72 h. Los discos se retiraron de los medios de cultivo y luego de la adición de suero fetal bovino (SFB) (PAA, Pasching, Austria) a una concentración final de 10% se obtuvo el extracto al 100% (100-extracto). Para el ensayo de citotoxicidad se prepararon adicionalmente diluciones del extracto: 75%, 50% y 25% (75, 50, 25-extracto). Los extractos se usaron inmediatamente después de la preparación para evitar la sorción en el recipiente de extracción u otros cambios en la composición.

2.3. Cultivo celular.

Células epiteliales Vero y células fibroblásticas NIH 3T3 se cultivaron en DMEM suplementado con 10% de SFB, 4 mM de L-glutamina (Gibco, Invitrogen, Auckland, NZ), 4 mM de Piruvato de sodio (Sigma, St Louis, EE.UU.) y 10.000 UI/ml de penicilina-10000 µg/ml de estreptomycin a 37°C en una atmósfera humidificada de 5% de CO₂ en aire. El medio de cultivo se renovó cada 3 días. El uso de células provenientes de la línea Vero es recomendado para estudios de citotoxicidad e interacciones célula-sustrato en investigaciones sobre biomateriales (ISO 10993, 2009b). Las células NIH 3T3 también se utilizaron en este trabajo debido a que comparten un origen fibroblástico similar con las células osteoblásticas.

2.4. Ensayo de citotoxicidad.

La evaluación de la citotoxicidad de los extractos de los composites se realizó mediante el ensayo de MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio bromuro), una modificación de Mosmann, 1983 [27]. El MTT es una sal de tetrazolio incolora que forma un compuesto coloreado cuando se oxida en la mitocondria de células metabólicamente activas. La intensidad de la absorbancia depende del número de células viables. Células Vero o NIH 3T3 se sembraron en DMEM suplementado en placa de 96 pocillos a una densidad de 10.000 células por pocillo. Después del cultivo celular durante 24 h, se retiró el medio y se agregaron las diluciones seriadas de los extractos (100, 75, 50 y 25-extracto). Después de 24 h, los pocillos se lavaron dos veces con PBS estéril y se agregó 50 µl de MTT 1 mg/mL en DMEM a cada pocillo y se incubó durante 1,30 h a 37°C. Se agregó alcohol isopropílico en cada pocillo para disolver los cristales de formazán. La absorbancia se cuantificó por espectrofotometría a 595 nm usando un lector Multiskan Spectrum microplate (ThermoScientific). Como control negativo de citotoxicidad (CN) se utilizó 100-extracto de polietileno de alta densidad (HDPE) (6 cm² superficie de HDPE/mL de DMEM) y como control positivo (CP) una solución de fenol 0,2%. Todos los experimentos se llevaron a cabo por sextuplicado.

2.5. Análisis de la morfología celular

Como un procedimiento adicional para estudiar la biocompatibilidad de los extractos de los composites se evaluó la morfología celular por microscopía [28]. Para células Vero se usó microscopía electrónica de barrido (microscopio modelo JEOL JSM 6480 de Marca LV, LASEM, INQUI-CONICET-unas). Las células se sembraron a una densidad de 10.000 células/cm² en cubreobjetos de vidrio y se incubaron durante 4 días en presencia de 100-extractos o medio de cultivo DMEM suplementado. Después de la incubación, las muestras se lavaron cuidadosamente con PBS y se fijaron durante toda la noche en glutaraldehído al 4% en PBS a 4°C. La morfología de las células NIH 3T3 se analizó mediante microscopía óptica. Se sembraron 10.000 células en placas de 24 pocillos. Después de 24 h de incubación con DMEM suplementado, se retiró el medio y se añadieron 100-extracto de cada composite. Se analizó la morfología celular a los 2 y 5 días, se tomaron imágenes digitales con una cámara CCD (Modelo DSU1-5MP) montado en un microscopio NIKON ECLIPSE TE-U 2000 de contraste de fase.

2.6. Evaluación de la adhesión celular

Células NIH 3T3 se cultivaron sobre la superficie de los composites colocados en placas de 24 pocillos. Los controles consistieron en células cultivadas sobre cubreobjetos de vidrio. Las células se sembraron a una densidad de 10.000 células por pocillo en DMEM suplementado.

2.6.1. Microscopía de fluorescencia. La adhesión de las células NIH 3T3 a superficies de los composite se evaluó a través de microscopía de fluorescencia mediante tinción con DAPI (4,6-diamino-2-fenilindol) para los núcleos. Cuando las células alcanzaron la confluencia (luego del cultivo celular para 96 horas) se fijaron con solución de paraformaldehído al 4% y se permeabilizaron con 0,1% Tritón X-100 en PBS a temperatura ambiente durante 10 min cada paso. Los composites se incubaron con DAPI durante 10 min a temperatura ambiente. A continuación, se examinaron las muestras en un microscopio de fluorescencia de fase inversa NIKON ECLIPSE TE-U 2000 usando filtros de 340/360 nm para DAPI. Debido a la opacidad de los discos, no hubo manera práctica para evaluar confluencia de los cultivos. Debido a esto, cuando las células alcanzaron la confluencia en los cubreobjetos de vidrio, se detuvieron los cultivos en todas las superficies.

2.6.2 Microscopía electrónica de barrido. La morfología de las células adheridas a la superficie de los composites de Ti-HA se examinó por microscopía electrónica de barrido. Después del cultivo, los composites se lavaron cuidadosamente con PBS y se fijaron con glutaraldehído al 4% en PBS a 4 ° C durante toda la noche. Después de lavar tres veces con PBS, las muestras se deshidrataron en gradiente de etanol (10-100%) durante 10 min en cada caso. Se realizó secado por punto crítico y recubrimiento con cromo. Las muestras fueron examinadas con un microscopio Sigma FE-SEM a 1 kVa distintas magnificaciones (2000 y 5000) en LAMARX, IFEG-FaMAF-UNC.

3. Resultados

3.1. Citotoxicidad

El efecto de los extractos de los composites sobre la viabilidad celular se evaluó usando el ensayo de MTT. De acuerdo a la Norma ISO 10993, las muestras se consideran no citotóxicas si la viabilidad es mayor al 70% en las células cultivadas en presencia de un 100-extracto [29]. El porcentaje de viabilidad de células Vero y NIH 3T3 incubadas en presencia del control negativo fueron $98,50\% \pm 1,44$ y $99,50\% \pm 1,52$, respectivamente (Fig. 1A y 1B). La figura 1A muestra la viabilidad de células Vero cultivadas en presencia de diluciones seriadas de los extractos de, Ti, Ti-P y Ti-HA y los controles negativo (CN) y positivo (CP). Los valores observados para los extractos de dichos

composites fueron $95,7 \pm 0,81$ (Ti), $88,83 \pm 1,84\%$ (Ti-P) y $100,11 \pm 1,35\%$ (Ti-HA). La viabilidad celular para el CP fue inferior al 70% ($9,80 \pm 0,83\%$) como se esperaba. El porcentaje de viabilidad de células NIH 3T3 cultivadas en presencia de 100-extracto de Ti-HA, Ti y Ti-P fueron $91,30 \pm 2,38$, $92,30 \pm 2,06$ y $93,24 \pm 1,64$ (Fig. 1b).

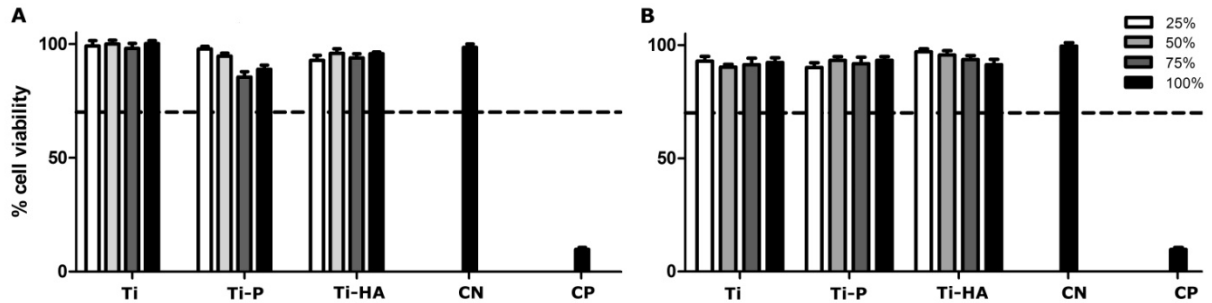


Figura 1. Porcentaje de viabilidad de células incubadas en presencia de diluciones de 25, 50, 75 y 100% de los extractos de Ti, Ti-P y Ti-HA después de 24 h de cultivo. $n = 6$. **A.** células Vero, **B.** células NIH 3T3.

3.2. Análisis de la morfología celular

La morfología de células Vero expuestas al extracto de los composites durante 4 días fueron analizados por microscopía electrónica de barrido. En todos los casos la morfología y la densidad de células cultivadas en 100-extracto fue similar a las cultivadas en DMEM suplementado (condición de control) (Figura 2 a, c, e). Luego de 4 días de cultivo celular la confluencia alcanzada fue similar para las tres condiciones: Ti-HA, Ti-P y DMEM suplementado. El extracto de los composites tampoco afectó el tamaño celular (figura 2 b, d, f).

También se analizó el efecto de los extractos en la densidad y morfología de células NIH 3T3. En la figura 3 se muestran las micrografías ópticas obtenidas a los 2 y 5 días de cultivo en la presencia de 100- extracto de Ti-HA, Ti y Ti-P. En todas las condiciones de cultivo, las células NIH 3T3 exhibieron la misma morfología que el control (Fig. 3 a, b, c, d). Adicionalmente, las células NIH 3T3 proliferaron ampliamente entre el día 2 y el día 5 de cultivo y mostraron confluencia en el día 5 (Fig. 3 e, f, g, h). Las observaciones sobre la morfología celular están de acuerdo con los resultados de citotoxicidad.

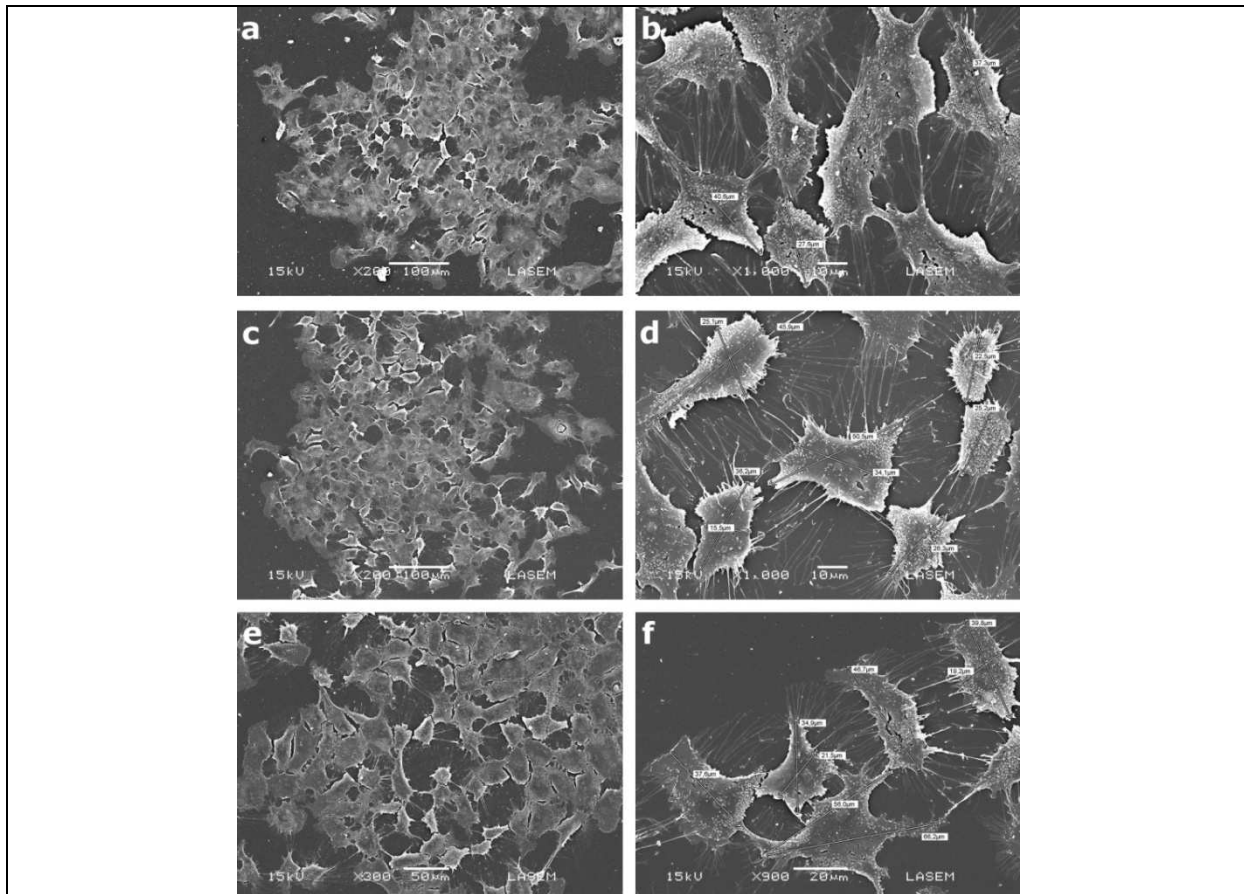


Figura 2. Micrografías electrónicas de barrido de células Ver0 expuestas a 100-extracto de los composites durante 4 días. **a-b:** Ti-HA; **c-d:** Ti-P; **e-f:** DMEM. Los paneles a y c: magnificación 200x, 1 bar: 100 µm; Panel e: magnificación 300x, 1 bar: 50 µm; paneles b y d: magnificación 1000x, 1 bar: 10 µm; Panel e: magnificación 900x, 1 bar: 20 µm.

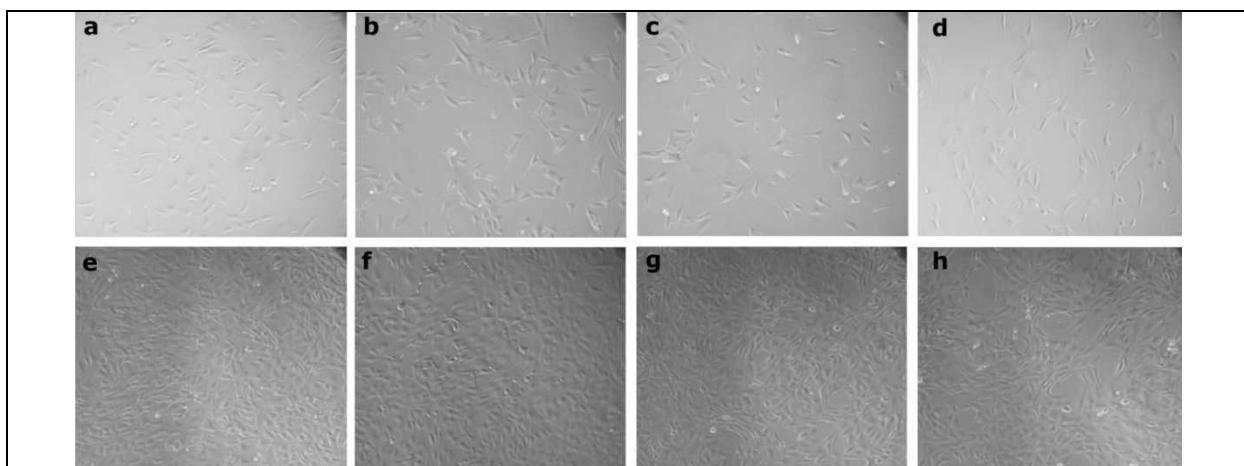


Figura 3. Imágenes de contraste de fase representativas de células NIH 3T3 cultivadas en presencia de: DMEM suplementado (**a, e**) y 100-extracto de: Ti-HA (**b, f**); Ti (**c, g**); Ti-P (**d, h**). Paneles superiores: después de 2 días de cultivo. Paneles inferiores: después de 5 días de cultivo.

3.3. Adhesión celular

Se analizó la capacidad de células NIH 3T3 para adherirse a la superficie de los composites de Ti-HA, Ti y Ti-P a través de microscopía de fluorescencia (Fig. 4). La tinción con DAPI muestra que las células NIH 3T3 fueron capaces de unirse y proliferar sobre todas las superficies, alcanzando una densidad celular similar al cuarto día de cultivo (Fig 4 b, d, f). Esto sugiere que Ti-HA, así como Ti-P y Ti fueron inocuos para las células. En la superficie de Ti-HA, las células también fueron capaces de adherirse a HA presente en composite (Fig 4b).

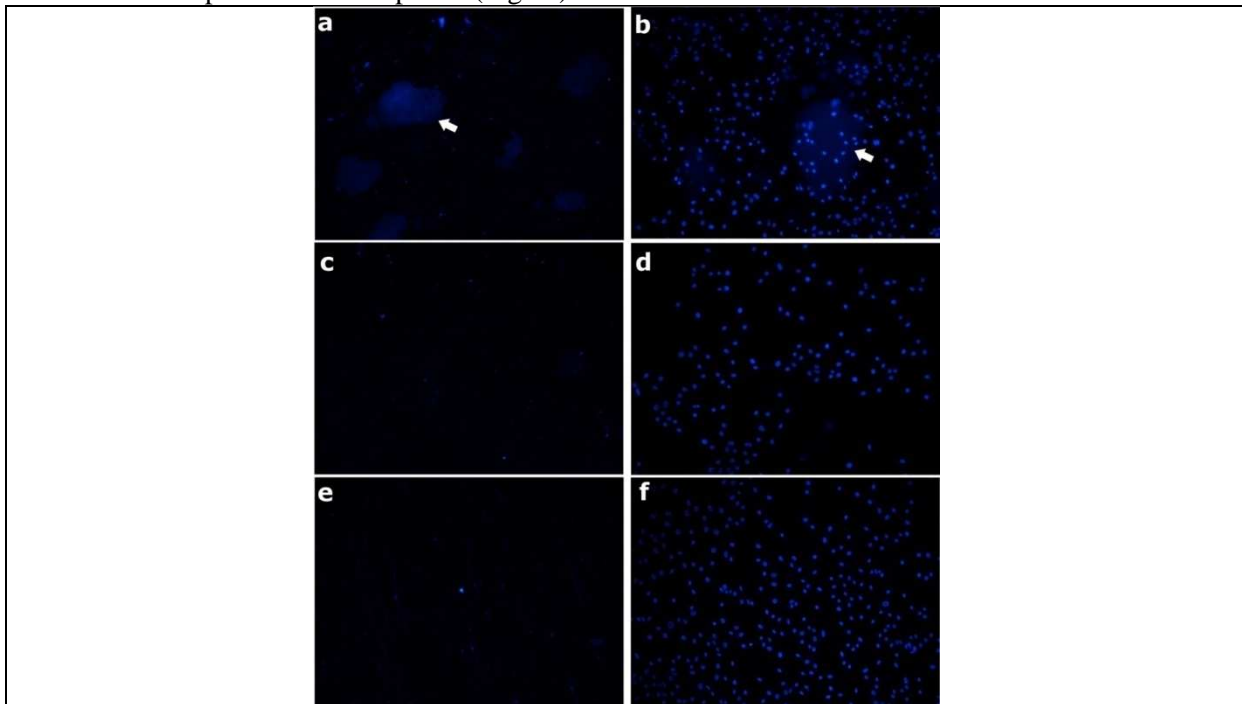


Figura 4. Microscopía de fluorescencia de las células NIH 3T3 cultivadas durante 96 h sobre la superficie de los composites: **b.** Ti-HA; **d.** Ti; **f:** Ti-P. Paneles **a,** **c** y **e:** Ti-HA, Ti, Ti-P sin células. Flecha: cristales de HA presente en el composite.

Para analizar la morfología de las células adheridas a la superficie del composite de Ti-HA se realizó microscopía electrónica de barrido. Las células pudieron extenderse a través de la superficie del composite con extensiones que llegaron hasta las 10 micras de largo (Fig. 5 a, b). Más aún, las células crecieron en los poros presentes en la superficie del compuesto (Fig. 5 c).

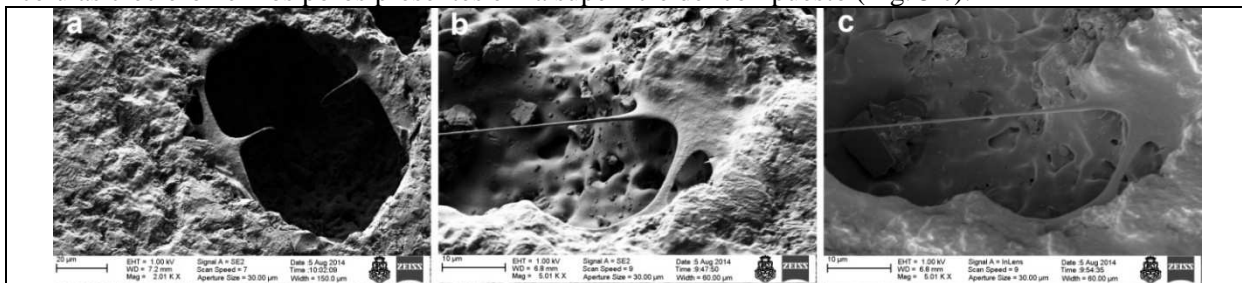


Figura 5. Micrografías electrónicas de barrido de células NIH 3T3 sobre la superficie Ti-HA después de 4 días de cultivo. **Panel a.:** magnificación 2000x, bar: 20 µm; **Panel b.:** magnificación 5000x, bar: 10 µm; **Panel c:** la ampliación: 5000x, bar: 10 µm.

4. Discusión

En el presente trabajo se obtuvieron composites de Ti-HA sinterizados a 800°C que no mostraron toxicidad en cultivos de células epiteliales Vero y fibroblásticas NIH 3T3. Además, ambos tipos celulares mostraron una morfología similar a aquellas cultivadas en presencia de DMEM suplementado demostrando una biocompatibilidad de los extractos del composite de Ti-HA sinterizado a baja temperatura.

El ensayo de citotoxicidad, recomendado en primer lugar por la Norma ISO 10993 para ser realizado en los análisis de Biocompatibilidad, fue el ensayo de MTT [26] que ha sido validado como un indicador preciso de la toxicidad potencial por numerosas pruebas con una variedad de agentes citotóxicos conocidos [32]. La figura 1 muestra que la viabilidad celular para células Vero o NIH 3T3 expuestas a los extractos del composite fueron mayores al 70%. Esto indica que el composite de Ti-HA sinterizado a baja temperatura no mostró efectos tóxicos en cultivo celular para ninguna de las dos líneas celulares. Por otra parte, la morfología y la densidad de las células cultivadas en 100-extracto de los composites de Ti-HA analizadas por microscopía electrónica de barrido para células Vero o por microscopía óptica para células NIH 3T3 fueron similares a las células cultivadas en medio de cultivo suplementado (control). Esto sugiere que los extractos no afectan a la proliferación ni la viabilidad celular. Por otro lado, está consensuado que la biocompatibilidad *in vitro* de los biomateriales está muy estrechamente relacionado con el comportamiento de las células en contacto con ellos y en particular a la adhesión celular a su superficie. Las Fig. 4 y 5 muestran que células NIH 3T3 tuvieron la capacidad de adherirse a la superficie del composite Ti-HA así también como a la superficie de Ti y Ti-P, proliferando sobre la superficie de los composites hasta cubrirlos completamente al cuarto día de cultivo. Más aún, estas células también pudieron crecer en los poros del composite como puede observarse en la Fig. 5. Estos hallazgos sugieren que los composites de Ti-HA sinterizados a baja temperatura podrían ser indicados para inducir la fijación biológica del implante, ya que el crecimiento interno de tejido se produce en los poros presentes en la superficie del implante. Por otro lado, la porosidad de la superficie está considerada como uno de los requisitos para un andamio ideal ya que los poros en su superficie permiten una difusión exitosa de nutrientes y oxígeno esenciales para la supervivencia celular [33]. Por lo tanto, los resultados obtenidos en este trabajo demuestran mediante estos ensayos *in vitro* la buena biocompatibilidad del composite de Ti-HA sinterizado a baja temperatura.

5. Bibliografía

- [1] Lowenstam HA, Weiner S. *On Biomineralization*; Oxford University Press: Oxford, UK, 1989; p. 324.
- [2] Weiner S, Wagner HD Material bone: Structure-mechanical function relations. *Ann. Rev. Mater. Sci.* 1998;28, 271-298.
- [3] Dorozhkin S.V. Calcium orthophosphates in nature, biology and medicine. *Materials*. 2009;2:399–498. doi: 10.3390/ma2020399.
- [4] Cao W., Hench L.L. Bioactive materials. *Ceram. Int.* 1996;22:493–507. doi: 10.1016/0272-8842(95)00126-3.
- [5] Ong J.L., Chan D.C.N. Hydroxyapatite and their use as coatings in dental implants: A review. *Crit. Rev. Biomed. Eng.* 1999;28:667–707.
- [6] Jarcho M. Calcium phosphate ceramics as hard tissue prosthetics. *Clin Orthop Relat Res* 1981;157:259–78.
- [7] Gautier S, Champion E, Bernache-Assollant D, Chartier T. Rheological characteristics of alumina platelet–hydroxyapatite composite suspension. *J Eur Ceram Soc* 1999;19:469–77.
- [8] Albrektsson T, Hansson HA. An ultrastructural characterization of the interface between bone and sputtered titanium or stainless steel surfaces. *Biomaterials* 1986;7:201–5
- [9] Wang CK, Lin JH, Ju CP, Ong HC, Chang RP: Structural characterization of pulsed laser-deposited hydroxyapatite film on titanium substrate. *Biomaterials* 1997, 18(20):1331–1338.

- [10] Kim HW, Kim HE, Knowles JC: Fluor-hydroxyapatite sol-gel coating on titanium substrate for hard tissue implants. *Biomaterials* 2004,25(17):3351–3358.
- [11] Roy M, Balla VK, Bandyopadhyay A, Bose S: Compositionally graded hydroxyapatite/tricalcium phosphate coating on Ti by laser and induction plasma. *Acta Biomater* 2011, 7(2):866–873. doi:10.1016/j.actbio.2010.09.016.
- [12] Prosecká E, Buzgo M, Rampichová M, Kocourek T, Kochová P, Vysloužilová L, Tvrdík D, Jelínek M, Lukáš D, Amler E: Thin-layer hydroxyapatite deposition on a nanofiber surface stimulates mesenchymal stem cell proliferation and their differentiation into osteoblasts. *J Biomed Biotechnol* 2012,428503:10. doi:10.1155/2012/428503.
- [13] Hannora AE, Mukasyan AS, Mansurov ZA: Nanocrystalline hydroxyapatite/si coating by mechanical alloying technique. *Bioinorg Chem Appl* 2012,390104:14. doi:10.1155/2012/390104.
- [14] Eraković S, Janković A, Veljović D, Palcevskis E, Mitrić M, Stevanović T, Janačković D, Mišković-Stanković V: Corrosion stability and bioactivity in simulated body fluid of silver/hydroxyapatite and silver/hydroxyapatite/lignin coatings on titanium obtained by electrophoretic deposition. *J Phys Chem B* 2013, 117(6):1633–1643. doi:10.1021/jp305252a.
- [15] Eunsung P., Robert A., Condrate S. Graded coating of hydroxyapatite and titanium by atmospheric plasma spraying, *Materials Letters* 40 (1999) 228–234.
- [16] Ramires P.A., Romito A., Cosentino F., Milella E. The influence of titania/hydroxyapatite composite coatings on in vitro osteoblasts behaviour, *Biomaterials* 22 (2001) 1467–1474.
- [17] Yu-Peng L., Mu-Sen L., Shi-Tong L., Zhi-Gang W., Rui-Fu Z., Plasma sprayed hydroxyapatite titania composite bond coat for hydroxyapatite coating on titanium substrate, *Biomaterials* 25 (2004) 4393–4403.
- [18] Polo-Corrales L, Latorre-Esteves M, Ramirez-Vick JE: Scaffold design for bone regeneration. *J Nanosci Nanotechnol* 2014, 14(1):15–56.
- [19] Jansen J, Vande Waerden JPCM, Wolke JGC, De Groot K. Histologic evaluation of the osseous adaptation to titanium and hydroxyapatite-coated titanium implants. *J Biomed Mater Res* 1991;25:973–89
- [20] Karanjai M, Sundaresan R, Rao G V N, Mohan T R R, Kashyap BP. Development of titanium based biocomposite by powder metallurgy processing with in situ forming of Ca-P phases. *Materials Science and Engineering A* 447 (2007) 19–26
- [21] Ning C and Zhou Y, 2008. Correlations between the in vitro and in vivo bioactivity of the Ti/HA composites fabricated by a powder metallurgy method. *Acta Biomaterialia* 4 (2008) 1944–1952
- [22] Comín R., Reyna Musso L. A., Cid M. P., Oldani C. R. y Salvatierra N. A. Citotoxicidad de Hidroxiapatita y su morfología en composites con Ti. *IEEE Latin American Transactions*, 2013, 11 (1), 103-106
- [23] Salman S., Gunduz O., Yilmaz S., Ovecoglu M.L., Snyder R L., Agathopoulos S., Oktar F.N.. Sintering effect on mechanical properties of composites of natural hydroxyapatites and titanium. *Ceramics International* 35 (2009) 2965–2971
- [24] Ye H., Liu X.Y., and Hong H., Characterization of Sintered Titanium/Hydroxyapatite Biocomposite Using FTIR Spectroscopy, *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, 2009, doi: 10.1007/s10856-008-3647-3.
- [25] International Organization for Standardization, ISO 10993-1, Biological Evaluation of Medical Devices. Part 1: Evaluation and testing in the risk management process, 2009.
- [26] International Organization for Standardization, ISO 10993-12, Biological Evaluation of Medical Devices. Part 12: Sample preparation and reference materials, 2012.
- [27] Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*. 1983 ;65 (1-2):55-63.
- [28] Modglin VC, Brown RF, Jung SB, Day DE. Cytotoxicity assessment of modified bioactive glasses with MLO-

- A5 osteogenic cells in vitro. *J Mater Sci Mater Med*. 2013 May;24(5):1191
- [29] International Organization for Standardization, ISO 10993-5, Biological Evaluation of Medical Devices. Part 5: Tests for Cytotoxicity: in Vitro Methods, 2009.
- [30] Weng J., Liu X., Zhang X., Ma Z., Ji X. and Zyman Z. Further studies on the plasma-sprayed amorphous phase in hydroxyapatite coatings and its deamorphization. *Biomaterials* 1993;14:578–82
- [31] Trombe J.C. and Montel G. Some features of the incorporation of oxygen in different oxidation states in the apatitic lattice—III Synthesis and properties of some oxygenated apatites. *J. Inor. Nucl. Chem.* 1978; 40: 27-30.
- [32] Burton JD. The MTT assay to evaluate chemosensitivity. *Methods Mol Med*. 2005;110:69–78.
- [33] Bose S, Roy M, Bandyopadhyay A. Recent advances in bone tissue engineering scaffolds. *Trends Biotechnol.* 2012 Oct;30(10):546-54.