

## Hidroxiapatita y selenio: Protagonistas emergentes en la lucha contra el cáncer

### Hydroxyapatite and selenium: Emerging players in the fight against cancer

**<sup>1</sup>Susana López-Ortiz, <sup>2</sup>Daniela Salado-Leza**

<sup>1</sup>Instituto de Física, Universidad Autónoma de San Luis Potosí, Av. Chapultepec No. 1570, Privadas del Pedregal, C. P. 78210, San Luis Potosí, S.L.P., México. Correo electrónico: sus0792lo@gmail.com ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4344-400X>

<sup>2</sup>Investigadoras e Investigadores por México, CONAHCYT, C. P. 03940, Alcaldía Benito Juárez, Ciudad de México, México. Correo electrónico: daniela.salado@uaslp.mx ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9576-0560>

\*Autor para correspondencia

Recibido: 17 de abril del 2023

Aceptado: 23 de octubre del 2023

Publicado: 31 de enero del 2024

<https://doi.org/10.33064/iycuaa2024914268>  
e4268

### Resumen

La hidroxiapatita sintética (sHap) es un material biomimético con propiedades remarcables; es biocompatible y biodegradable, por lo que es asimilado por el cuerpo humano. Además de sus conocidas aplicaciones en ingeniería de tejidos, la sHap han mostrado ser una candidata prometedor para combatir el cáncer, actuando principalmente como una matriz para otros agentes terapéuticos. Presenta una estructura química con gran potencial para sustitución iónica con el objetivo de incrementa sus características y propiedades de manera sostenida, prolongada y dirigida contra el cáncer. La incorporación de elementos específicos, como el selenio (Se), coadyuva en la inhibición del crecimiento y propagación de células cancerosas, además de favorecer una respuesta inmunitaria, y prevención. Este documento es una revisión actual de los métodos de obtención de la sHap y su dopaje con Se. Discutimos aspectos de biocompatibilidad y citotoxicidad, además de su efecto documentado tanto en células sanas como cancerosas.

**Palabras clave:** Hidroxiapatita, selenio, cáncer, nanopartículas, citotoxicidad, síntesis.

### Abstract

Synthetic hydroxyapatite (sHap) is a biomimetic material with remarkable properties; it is biocompatible and biodegradable, so it is assimilated by the human body. In addition to its known applications in tissue engineering, sHap have shown to be a promising candidate to combat cancer, acting mainly as a matrix for other therapeutic agents. It has a chemical structure with great potential for ionic substitution that increases its characteristics and properties in a sustained, prolonged and targeted manner against cancer. The incorporation of specific elements, such as selenium (Se), helps inhibit the growth and propagation of cancer cells, favors the immune

response, and prevents metastasis. This document is a current review of the methods for obtaining sHap and its doping with Se. We discuss aspects of biocompatibility and cytotoxicity, in addition to its documented effect on both healthy and cancer cells.

**Keywords:** Hydroxyapatite, selenium, cancer, nanoparticles, cytotoxicity, synthesis.

## Introducción

El cáncer es un grupo de enfermedades que pueden presentarse en la sangre, piel, órganos internos o glándulas del cuerpo. Existen más de 100 tipos distintos de cáncer, que por definición comparten ciertas características, pero que a su vez son diferente entre sí. Se produce por la formación de células anormales en exceso, que iniciaron de una célula que pudo mutar por múltiples factores y sigue multiplicándose hasta formar lo que se conoce como tumor. A nivel mundial, cada año, existen 18 millones de nuevos casos de cáncer y se presentan 9.5 millones de muertes derivadas de esta enfermedad. En México, se reportan 190 mil casos nuevos de cáncer y ocurren más de 83 mil muertes anuales. En los próximos 20 años, estudios epidemiológicos estiman que los casos aumentarán en un 70% (Futakuchi, Fukamachi, and Suzui 2016; Sottnik et al. 2015). Un estudio realizado en el año 2022, menciona que el cáncer de mama es la enfermedad que más se diagnostica en mujeres (Giaquinto et al. 2022) y el cáncer de próstata es la segunda causa de muertes en los hombres. Actualmente los tratamientos para la erradicación de esta enfermedad son cirugía, quimioterapia, radioterapia, terapia hormonal, inmunoterapia y trasplante de células madre (medula ósea) (Silva et al. 2020).

Hoy por hoy la creciente investigación sobre nuevos biomateriales con propiedades que apoyen la eliminación o reducción de la proliferación del cáncer es alentadora (Barbanente et al. 2021). Como es el caso de la hidroxiapatita por su fórmula general  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ , es el principal componente de dientes y huesos humanos (Kongsri et al. 2013; Pai et al. 2020). Por sus características de biocompatibilidad, baja toxicidad, capacidad osteoinductora e inductora se puede usar para el injerto y reemplazo óseo en ortopedia, implantología, medicina regenerativa, cirugía dental, para la obtención de imagen celular, administración de fármacos, tratamiento de aguas, ente otros (Hartatiek et al. 2019; Poinern et al. 2009; Utara and Klinkaewnarong 2015). Además, es bien conocida por su capacidad para unirse a una amplia variedad de moléculas y agentes terapéuticos (Broome et al. 2004).

La estructura de la sHap posee la capacidad de introducir iones y mejorar con esto propiedades e incrementar sus aplicaciones, por ejemplo, al  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$  para reducir la adhesión de osteoblastos (Lv et al. 2022), by  $\text{Sr}^{2+}$ ,  $\text{Eu}^{3+}$  como material fluorescente para biodetección (Robles-Águila, Reyes-Avenidaño, and Mendoza 2017). Actualmente se enfoca la atención al selenio (Se),

por inducir el crecimiento de células normales, y estimular la reducción de tumores vía apoptosis celular. La incorporación de Se en la estructura de Hap puede prevenir la recurrencia del cáncer mientras promueve el crecimiento óseo, es decir, esta unión tiene doble función, la reparación del tejido y como terapia adyuvante contra el cáncer (Kargozar et al. 2022).

Los investigadores Lei He y et al. (2019) pusieron a prueba células de osteoblastos de rata adheridas y esparcidas en partículas de Hap/Se. El selenio liberado de las partículas inhibió eficazmente el crecimiento de células osteosarcoma humano (cáncer en los huesos) al inducir la muerte celular. Asimismo, presento la propiedad de reparación de los defectos oseos después de extirpar el tumor, ofreciendo seguridad y ataque hacia algún crecimiento de célula tumoral (He et al. 2019). Barbanete y et al. (2021) realizaron pruebas estudios biológicos (HEPES), ajustando su acidez (pH) a 7.4 7 6.5 a diferentes tiempos (1, 24, 48 y 72 horas, 7,14 y 30 días). Recolectando alícuotas de 10 mL de sobrenadante para determinar las concentraciones de selenio, calcio y fosfato. Sin importar el pH, los tres primeros días las muestras liberaron selenio más rápido y posteriormente se fue haciendo lenta la liberación y constante (3-30 días). Posteriormente se realizaron estudios de viabilidad celular (ensayo CCK-8) ensayo colorimétrico no radiactivo y sensible para detectar el número de células viables, después de 24 y 72 horas de exposición. Concluyen con estas pruebas que las partículas de Hap-Se, presenta una buena compatibilidad con las células, mientras que una alta dosis de Se ejerce una fuerte actividad toxica con células enfermas (Barbanete et al. 2021).

Se realizó una búsqueda sistemática en Google académico (base de datos de libre acceso), de trabajos publicados desde el año 2017 a la fecha. La indagación tuvo como ideas principales las siguientes palabras clave en inglés: a) hydroxyapatite, b) cancer, c) selenium, d) nanoparticles, haciendo énfasis en sobre trabajos e investigaciones de la liberación y evaluación biológica del material Hap-Se. Su comportamiento en células sanas y enferma principalmente de cáncer de próstata y mama. Así mismo sobre los métodos de obtención y caracterización morfología, fase y características de la obtención de la Hap.

## **1. Características de la hidroxiapatita**

La hidroxiapatita, es una apatita de fosfato cálcico similar al mineral del tejido óseo (Barry et al. 2013). Está formada por átomos de calcio, fósforo e hidrógeno, de acuerdo con la fórmula  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$  con una relación calcio/fósforo de 1.6. Constituye al hueso humano y están compuestos por una matriz con células dispersas, constituida por 69% de hidroxiapatita, 9% de agua y 22% de materia orgánica que en su mayoría corresponde a colágeno. Se depositan por cristalización en el entramado formado por las fibras de colágeno, durante el proceso de

calcificación o mineralización, y la estructura entre la Hap y los sustratos orgánicos determinan las propiedades elásticas y mecánicas de los tejidos (Wang and Yeung 2017).

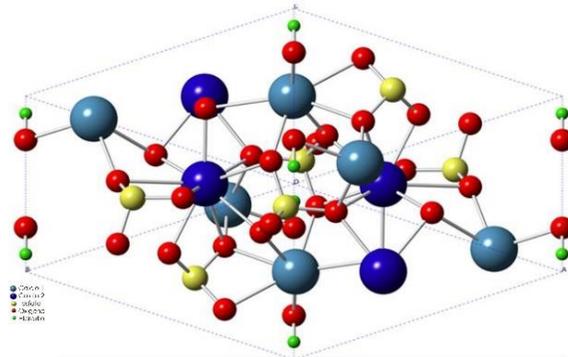


Figura 1 Estructura cristalina hidroxiapatita hexagonal  
Fuente: Esteban-Gómez et al. 2017

Se conocen dos estructuras cristalinas para Hap sintética: la fase hexagonal (grupo espacial  $p6_3/m$ ) con parámetros de celda  $a=9.4302 \text{ \AA}$ ,  $c=6.8911 \text{ \AA}$ ,  $\gamma=120^\circ$  y la estructura monoclinica (grupo espacial  $P2_1/b$ ) con parámetros de celda  $a=9.8421 \text{ \AA}$ ,  $b=2a$ ,  $c=6.8814 \text{ \AA}$  y  $\gamma=120^\circ$ , como se observa en la figura 1, la cual representa la fase hexagonal simulada con datos reales de sHap sintetizada por el método hidrotermal. En general, ambas estructuras se describen por la interacción de aniones tetraédricos ( $PO_4^{-3}$ ) que están ordenados a lo largo del eje con cationes de  $Ca^{2+}$  en los sitios intersticiales y la diferencia entre ambas es la orientación del ion OH (Das and Pamu 2019; Ferraz, Monteiro, and Manuel 2004; Fihri et al. 2017; Pai et al. 2020; Tõnsuaadu et al. 2012).

### 1.1 Métodos de síntesis de hidroxiapatita

Durante la última década, se han desarrollado diversas rutas sintéticas para la producción de nanopartículas de sHap con el fin de garantizar su viabilidad y eficiencia en aplicaciones específicas; a estos métodos se les conoce como rutas de síntesis química, como se indica en la figura 2.

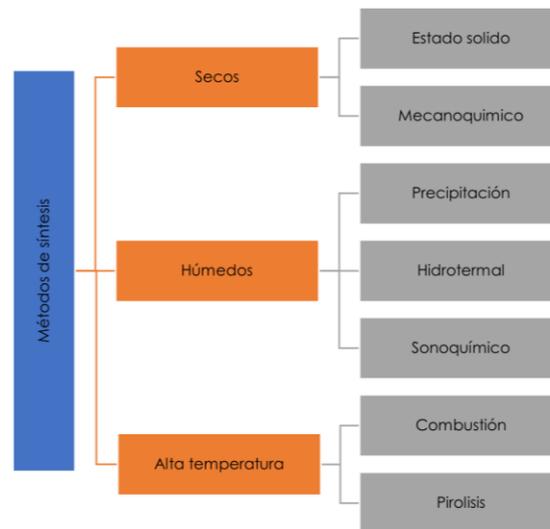


Figura 2 Clasificación de métodos para la obtención de hidroxiapatita

Fuente: Sadat-Shojai et al. 2013

Por mencionar algunos ejemplos de síntesis, los métodos secos, en general no utilizan un disolvente, las características del polvo obtenido no está influenciadas por parámetros de funcionamiento, por lo tanto, no se requieren condiciones muy controladas sobre la precisión, haciéndolos más adecuados para la producción en masa de Hap. Este tipo de método, es relativamente simple; se calcina a elevadas temperaturas los precursores de calcio y fosfato (por ejemplo 1000 °C), ocasionando con esto una estructura bien cristalizada.(Ferraz et al. 2004).

Por otra parte, el método húmedo, consiste en la separación de un componente en una mezcla de compuestos, ya sea por reactividad o bien por distinta solubilidad en un determinado disolvente. Posteriormente se utiliza la decantación o la filtración para el aislamiento, y se aplican técnicas de purificación, cromatografía por columna hasta obtener el compuesto puro (Alvarez 2012; Paz, Adrian; González, Jesús E.; López, Mónica; Becquer, Clara E.; Parodi 2010; Uskoković and Usmttkoković 2011).

Se emplean diferentes precursores como fuentes de calcio y fósforo, tales como: óxido de calcio, beta fosfato tricálcico, nitrato de calcio (Othman et al. 2016; Sadat-Shojai, Khorasani, and Jamshidi 2015) nitrato de calcio tetrahidratado (Sadat-Shojai, Atai, and Nodehi 2011), fosfato de calcio dibásico, óxido fosfórico (Salimi et al. 2012), entre otros, así mismo, se trabaja con diferentes condiciones de síntesis tales como tiempo y temperatura de reacción, concentración de precursores, variación del pH, por mencionar algunos parámetros (Jin et al. 2015; Mori and Aizawa 2017).

## 1.2 Aplicaciones

La sHap tiene una gran cantidad de aplicaciones, tales como: la separación y la purificación de proteínas e implantes de hueso. Sin embargo, para cada aplicación, se debe modificar las características físicas y químicas tales como: forma de partícula, tamaño del poro, dureza, pureza y cristalinidad del material (Zhong et al. 2017). Ha sido ampliamente usada como un sustituto de hueso debido a su biocompatibilidad ya que sus componentes minerales son similares a los huesos y dientes del cuerpo humano (Zhu et al. 2018). Existen productos en venta principalmente por internet, como describe la tabla 1. Productos como pastas para dientes, suplementos alimenticios o cosméticos inyectables que hacen mención de hidroxiapatita como su activo principal y aporta beneficios para combatir la sensibilidad en los dientes y mantener huesos saludables. También como material de relleno y apoyo en la migración celular con creación de nuevo sistema óseo.

Tabla 1  
Productos de venta por internet con activo principal de Hap

Producto	Marca	Costo MXN	Uso
Pasta para dientes	Davids Natural	1,200	Blanqueadora
Pasta para dientes	Perioscience White Care	1,300	Blanqueadora
Suplemento alimenticio	Now Foods	250	Fuente de Calcio Biodisponible
Suplemento alimenticio	Metagenics	800	Osteopenia y osteoporosis
Hueso humano	BONEFIX	1,900	Relleno de cavidades o defectos óseos en el área maxilofacial y cavidades alveolares.

Elaboración propia

Actualmente la Hap se vende a nivel internacional, principalmente como reactivo químico para realizar síntesis de materiales, como fertilizante y uso cosmetológico, sin embargo, como se observa en la tabla 2. Se hace una comparación entre ellas, destacando las que publicitan como hidroxiapatita, pero en su composición química, especificaciones y no poseer estudios de toxicología, pone en duda si realmente es el material mencionado. Por otra parte, se hace mención de otras, que por sus especificaciones y fichas de seguridad se comprueba la veracidad del producto y sugieren su uso como precursor de síntesis o empleo en el área biomédica. El continente asiático corresponde a la industria que más la distribuye, seguido de Norteamérica y a nivel nacional no se reporta la producción o síntesis de este material a gran escala.

Tabla 2  
 Comparativo y costos de hidroxiapatita

Marca	Pack	PRECIO USD \$	Producto/ característica	Composición	Uso	Toxicología	Referencia
AkSci X4937	100 g	27	Hidroxiapatita >24%Ca	$3\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2 \cdot \text{Ca}(\text{OH})_2$	Reactivo químico	Información no disponible	(Aksci.com, 2023)
Alfa Aesar Thermo Fisher Scientific	10-50 g	106-405	Hidroxiapatita Polvo	$\text{HCa}_5\text{O}_{13}\text{P}_3$	Fraccionamiento y purificación de proteínas, enzimas, plásmidos y ácidos nucleicos	Información no disponible	(Thermo Fisher Scientific, 2023)
Sigma-Aldrich	50 g	230- 300	Hidroxiapatita Polvo, 5 o 10 $\mu\text{m}$ , área superficial $\geq 80 \text{ m}^2/\text{g}$	$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$	Reactivo para laboratorio, síntesis de sustancias	DL50 Oral - Rata - hembra - > 2,000 mg/kg (Directrices de ensayo 423 del OECD)	(Merck KGaA, 2023)
Sigma-Aldrich	50 g	280	Hidroxiapatita Polvo, 2 $\mu\text{m}$ , área superficial $\geq 80 \text{ m}^2/\text{g}$	Información no disponible	Reactivo para laboratorio, síntesis de sustancias	DL50 Oral - Rata - hembra - > 2,000 mg/kg (Directrices de ensayo 423 del OECD)	(Merck KGaA, 2023)
Sigma-Aldrich	50 g	110-250	Hidroxiapatita Pasta acuosa, <50 nm, 5, 15 o 30 % en peso	Información no disponible	Reactivo para laboratorio, síntesis de sustancias	Información no disponible	(Merck KGaA, 2023)
Weifang Economic Hotspot Biotechnology Center	25 g	100	Hidroxiapatita Polvo, HPLC >99.5%	$\text{Ca}_5\text{HO}_{13}\text{P}_3$	Intermedios de síntesis orgánica	Información no disponible	(Alibaba.com sites, 2022)
Xi'an multihealth biotech Co.Ltd.	1 -100 kg	50-150 por kilo	Hidroxiapatita Polvo, 99% pureza, grado cosmético	$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$	Suplemento alimenticio	Información no disponible	(AliExpress, n.d.)
Wuxi Volksky new materials Co. Ltd	1-100 kg	25-40 por kilo	Hidroxiapatita Polvo, 99% pureza	$\text{Ca}_5\text{HO}_{13}\text{P}_3$	Fertilizante y aditivo para alimentos	Información no disponible	(Alibaba.com, n.d.)
Xian Season Biotechnology Co. Ltd.	1Kg	20-70	Hidroxiapatita Polvo, 95-99% pureza	$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$	Materias primas cosméticas, Productos químicos para síntesis, pasta de dientes	Información no disponible	(Alibaba.com Site, 2022)
Shaanxi Coenze Biotech Co. Ltd	1 kg	65-215	Hidroxiapatita Polvo, 20, 60, o 200 nm, 97, 99 % pureza, grado implante	$(\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$	Materiales intermediarios de síntesis, hueso implante	Información no disponible	(coneze, 2022)
Grimberg Store	0.5 ml	285	Hidroxiapatita Matriz mineral de hidroxiapatita de origen bovino, <210 $\mu\text{m}$	Información no disponible	Excelente andamio de soporte en el sitio de implante, conservando el volumen del injerto a largo plazo	Información no disponible	(Grimberg Dental Center S.A, 2015)

Elaboración propia

## **2. Selenio y sus alcances**

El selenio es un elemento, ampliamente distribuida en todo el mundo. Comúnmente se encuentra en rocas y el suelo, combinado con sulfuros o minerales de plata, cobre, plomo o níquel. Tiene una apariencia de gris metálica hasta cristales negros y se conoce como selenio elemental o polvo de selenio. También es producido de forma comercial, principalmente como producto secundario en la refinación del cobre. Se usan en artículos fotográficos, líquidos para limpiar partes metálicas de armas de fuego, plásticos, pinturas, shampoo para caspa, vitaminas y suplementos nutricionales, fungicidas y preparación de medicamentos.

El selenio es un microelemento esencial que determina el buen funcionamiento del cuerpo humano, posee efectos antioxidantes y protege al organismo contra la acción de radicales libres y factores cancerígenos (forma redox) (Wei et al. 2017). Algunas investigaciones han demostrado que el suministro adecuado de selenio mejora la resistencia a las fracturas y retrasa el envejecimiento óseo, disminuye las enfermedades cardiovasculares, cánceres, tiroides, cerebro, tejido óseo e infecciones virales, sin embargo, la deficiencia de este elemento incrementa el desarrollo de ataques epilépticos y de enfermedades de Parkinson. Provoca problemas de coordinación sobre la fertilidad masculina ya que participa en la biosíntesis de la testosterona, así como en la formación y desarrollo de los espermatozoides, aumenta el retraso del crecimiento y afectar el metabolismo del tejido óseo (Wei et al. 2017).

El Se afecta diversos procesos celulares y vías moleculares que pueden estar involucradas en el efecto anticancerígeno de Se e incluyen (Zeng, Cao, and Combs 2013):

- Selenoenzimas que implican la reducción del daño en el ADN, el estrés oxidativo y la inflamación.
- Inducción de enzimas de conjugación de fase II que implica la desintoxicación de carcinógenos y la reducción de la formación de aductos de ADN Mejora de la respuesta inmunitaria, incluidos los linfocitos citotóxicos y la actividad de las células asesinas naturales.

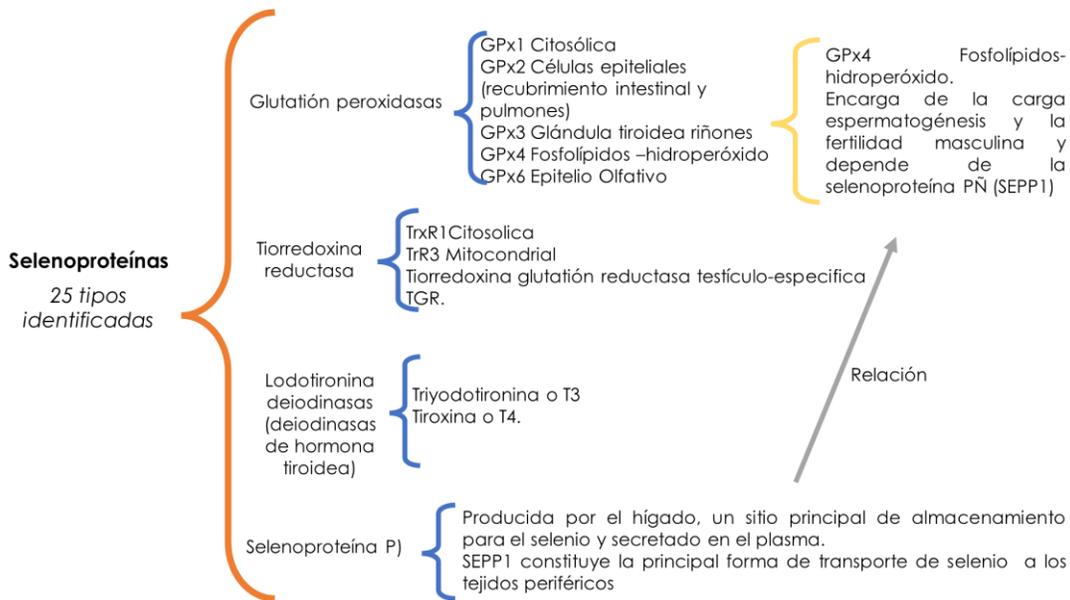


Figura 3 Algunas de las selenoproteínas con una función identificada.

Por ejemplo, se conocen veinticinco genes que codifican las selenoproteínas identificadas en los humanos (Mariotti et al. 2012). Como se menciona en la figura 3 una de ellas es el glutatiión peroxidasas, se compone de 5 enzimas GPx1-4 y GPx6. Las isoenzimas GPx son catalizadores antioxidantes que reducen a las especies reactivas de oxígeno potencialmente dañinas, como el peróxido de hidrógeno y los hidroperóxidos lipídicos, en productos inocuos como el agua y los alcoholes.

La enzima GPx4, se encarga de la espermatoogénesis y la fertilidad masculina y depende de la selenoproteína P (SEPP1), para reducir los hidroperóxidos y fosfolípidos protegiendo a los espermatozoides inmaduros contra el estrés oxidativo y la incorporación de la espiral mitocondrial del espermatozoide maduro (motricidad)(Boitani and Puglisi 2008). La SEPP1 se produce principalmente en el hígado, sitio principal de almacenamiento para el selenio y constituye la principal forma de transporte de selenio a los tejidos periféricos (Hill et al. 2012). Existen modelos con animales carentes de este gen, que se vuelven infértiles debido a la biodisponibilidad pobre de selenio en los tejidos, a la síntesis defectuosa de GPx4, y a la maduración deteriorada del esperma. Lo anterior es un ejemplo de cómo el cuerpo necesita y procesa al selenio, dándole importancia su uso y consumo (Mangiapane, Pessione, and Pessione 2014; Mariotti et al. 2012).

La ingesta diaria, recomendada por el Instituto de Medicina de los EE. UU y la Federación Europea de Asociaciones de Dietistas (EFAD), sería de 50 a 60 mg para adolescentes y adultos. Puede obtenerse de alimentos con mayor presencia de selenio, tales como, cereales integrales,

pescados y mariscos, algunos tipos de verdura (cebolla, espárragos), semillas como las de girasol, frutos secos como la nuez de Brasil o también tomando suplementos alimenticios. El selenito y el selenito de sodio son formas inorgánicas del selenio que pueden ser metabolizadas por el cuerpo y ser incorporadas en las selenoenzimas (Jane Higdon et al. 2017).

### **3. Hap/Se: lo más notable**

Como se mencionó anteriormente la estructura química de la sHap ofrece la posibilidad para el intercambio iónico en sus sitios aniónicos ( $\text{PO}_4$ , OH) y catiónicos (Ca). Esta característica hace fácil la incorporación de iones ( $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Gd}^{3+}$ ,  $\text{Se}^{2+}$ , etc.), la creación de defectos estructurales durante su proceso de síntesis, tiene como objetivo cambiar/ modificar las propiedades fisicoquímicas, tales como, brecha de banda, la carga superficial, área superficial, así como la liberación /captación de iones y por lo tanto mejorar su comportamiento biológico (c. ej. mejorar la osteogénesis).

#### *Incorporación estructural de Hap/Se*

La Hap dopada con iones selenio, principalmente se obtiene a través de la síntesis, durante la cual los iones se incorporan a la estructura, como lo menciona Varun Prasath Padmanabhan y et al., 2020, usaron los métodos de precipitación química y por sonicación, sintetizaron compuestos de Hap sustituidos por Se. Los análisis espectroscópicos FTIR y Raman confirmaron el dopaje exitoso de Se en la matriz de Hap y con el análisis de DRX indicaron su alta cristalinidad, el análisis morfológico indicó que por el método sonoquímico se produjeron partículas en forma de bastoncillos mientras que por el de precipitación se presentaron partículas con estructuras aglomeradas (Padmanabhan et al., 2020a). En la tabla 3 se resumen algunos trabajos recientes sobre la síntesis de Hap/Se y las pruebas biológicas realizadas en este material.

Tabla 3  
 Comparativa de trabajos realizados para la síntesis de Hap y tipo de evaluación célula

Ref.	Precusores	Método de síntesis	Morfología	Células	Pruebas celulares	Aplicación
(Barbanente et al., 2021)	$H_3PO_4$ y $Na_2SeO_3$ gota a gota a $Ca(CH_3COO)_2$	Precipitación, pH9, $(NH_4)OH$	Placas 25*15 nm y 100*10 nm	PC3 (Cáncer próstata) hBMSc células sanas	Kit de células Cck-8 Células sanas hBMSc, cancerosas próstatas PC3.	Muerte celular tumoral
(Zakhireh et al., 2021)	$SeO_2$ , espina de pescado	Mecanomecánico	Esférica multiparedes 200nm	Células madre mesenquimales (MSC), celular de osteosarcoma óseo humano (KHOS-240S)	Ensayo MTT Actividad fosfatasa alcalina (ALP), tinción con rojo de alizarinas (ARS)	Tratamientos contra cáncer, regeneración ósea
(Li et al., 2019)	$Ca(NO_3)_2$ , $(NH_3)_2HPO_4$ , $(Na_2Se_2O_3)$	Térmico de dos pasos con alcohol	nanovarillas 2 micras	Viabilidad celular en células madre mesenquimales	Kit de células Cck-8	Inhibición del crecimiento de células tumorales
(Wei et al., 2017)	$Ca(NO_3)_2$ , $(NH_4)_3PO_4$ , $Na_2(SeO_3)$	Precipitación química	aguja 150-200 nm	No	No	Injerto óseo
(Sun et al., 2017)	$(NO_3)_2$ , $Ca_3PO_4$ , $Na_2SeO_3$	Solvotermal	nanovarillas/ nano agujas 100nm	Células osteoblastos embrionarios de ratón MC3T3-E1	Kit de células Cck-8	Reparador de defectos óseos
(Alkan & Durucan, 2022b)	$(Ca(NO_3)_2)$ , $(NH_4)_2HPO_4$ , $(Na_2SeO_3)$	Precipitación	Aglomerados 2um	No	No	Rellenos defectos óseos
(Padmanabhan et al., 2020b)	$Ca(NO_3)_2$ , $Na_2SeO_3$ , $(NH_4)_2HPO_4$	Precipitación / sonicación	56 nm aglomerados, 29 nm agujas	Cancerosas MG-63, sanas NIH-3T3	Prueba hemolítica, DMEM medio Eagle modificado de Dulbecco	Injerto óseo

Elaboración propia

En el trabajo realizado por Baris Alkan y et al., 2021 sintetizaron partículas de Hap incorporando Se mediante el método de precipitación acuosa usando sales de calcio y fosfato, obteniendo partículas aglomeradas. Observaron en micrografías obtenidas por TEM, cristales en forma de aguja que se pronuncian más al incrementar la cantidad de dopante, lo que sugiere un crecimiento preferencial en relación a la incorporación del Se. La estructura química de los polvos de Hap pura y dopados se investigó mediante FTIR, indicando la obtención de las bandas correspondientes a fosfatos y grupo hidroxilo características de la fase de Hap y otros modos vibracionales se atribuyen al Se (Alkan & Durucan, 2022a).

En el 2019, los investigadores Yan Li y et. al, sintetizaron nanovarillas de Hap dopadas con selenio altamente cristalinas con el método térmico en alcohol. Primero se formó una apatita amorfa de 30 nm, después de una reacción térmica en alcohol aparecieron nanovarillas que posteriormente se transformaron en nanovarillas monocristalinas a través de la cristalización. Los resultados por DRX corresponden a hidroxiapatita, esto significa que no tienen otras impurezas. El dopaje de selenio, en forma de  $\text{SeO}_3^{2-}$ , no tiene una influencia significativa sobre la fase principal de los cristales de hidroxiapatita. Los resultados por FTIR las bandas características de la Hap y los correspondientes la selenita. Por la técnica de TEM se observaron morfología de nanovarillas de 2µm de longitud y determinan que al incrementar el % de Se, se tiene una relación con el ancho de las partículas, es decir entre mayor es el dopante de Se más ancha se vuelve la nanovarillas. (Li et al. 2019).

Solmaz Zakhireh y et. al. (2021), introdujeron iones de Se en la estructura de HA utilizado el método de aleación mecanoquímica (MCA). Extrajeron HA de la espina de pescado, posteriormente la doparon con Se (Se-Hap). Se analizaron los polvos utilizando espectros de difracción de rayos X mostrando un cambio nulo en la estructura cristalográfica por el dopaje de Se. Calcularon el tamaño de cristal, obtuvieron tamaños de 87 y 78 nm para polvos HA y Se-HA, respectivamente. El cambio en las constantes de red de Hap se debió a la sustitución de átomos de fósforo por Se, así como a la formación de tensiones en la matriz. Con el aumento de la tensión, aumentan los defectos de los cristales en la matriz, lo que conduce a una disminución del tamaño de los cristallitos y de la intensidad de los picos., microscopio electrónico de barrido (MEB), determinaron morfología de esferas con tamaños aproximados de 200 nm, sin presentar algún defecto a consecuencia del dopaje con Se. Por espectroscopia infrarroja transformada de Fourier determinaron las bandas características a A y al Selenio (Zakhireh et al. 2021).

#### *Evaluación biológica Hap/Se*

Barbanete y et. al. (2021) Realizaron prueba HEPES, ajustando a dos pH (7.4, 6.5), en diferentes tiempos (1, 24, 48 y 72 horas, y 7, 14 y 30 días. Recolectando alícuotas de 10 mL de sobrenadante

para determinar las concentraciones de Se, P y Ca. Sin importar el pH, los tres primeros días las muestras liberaron selenio más rápido y posteriormente una etapa de liberación lenta y constante (3-30 días). Sugieren que en la primera etapa se liberaron iones de selenita de la capa superficial hidratada de los nanocristales seguida de la disolución gradual de las NPHap, liberando iones de  $\text{SeO}_3^{2-}$ , influenciadas primeramente por el pH de la solución (6.5). Los resultados de viabilidad celular (ensayo CCK-8 después de 24 h y 72 h de tiempo de exposición) mencionan que el tratamiento con selenito de sodio  $10 \mu\text{M}$  (después de 24 h) redujo la viabilidad de las células MDA-MB-231eGFP de manera más efectiva que las células PC3 (células cáncer de próstata), mientras que el selenito redujo la viabilidad de hBMSc (células sanas) a una concentración de  $5 \mu\text{M}$ . Curiosamente, después de 72 h, el selenito de sodio muestra un efecto sustancial en las células PC3 a  $5 \mu\text{M}$ . Por lo tanto, podría afirmarse que las células MDA son más sensibles al selenito de sodio, en comparación con PC3 después de 24h de tiempo de exposición, pero después de 72 h observamos una tendencia opuesta. Concluyen que las pruebas celulares in vitro mostraron que suspensiones de HASE NP con una baja concentración de Se presentan buena compatibilidad con las células, mientras que las HASE con una alta concentración de Se ejercen una fuerte actividad citotóxica sobre las células cancerosas, pero provocan un aumento en los niveles de toxicidad de hBMSc (Barbanente et al. 2021). En la evaluación de la actividad citotóxica utilizando células cancerosas de próstata, mama y células saludables de medula ósea, encontraron que existe buena citocompatibilidad a bajas concentraciones de Se y ejerce buena citotoxicidad en el cáncer, pero también en las células sanas (Barbanente et al. 2021).

Solmaz Zakhireh y et. al. (2021), observaron buen comportamiento de adhesión celular y forma de osteoblastos en el andamio Se-HA. Los resultados de la diferenciación osteogénica demostraron una actividad fosfatasa alcalina (ALP) sinérgicamente mejorada. Además, los resultados de la prueba de Western blot mostraron que la diferenciación de hAD-MSc hacia tejido óseo aumentó hasta en un 50 % mientras se dopaba con selenio. En el análisis de ensayo de viabilidad celular (actividad metabólica) por reducción del compuesto MTT) utilizaron la línea celular de osteosarcoma óseo humano (KHOS-240S) y como resultados de la prueba después de 3, 5 y 7 días de cultivo comprobaron que la presencia de Se en la estructura de Hap tuvo un efecto aditivo sobre la proliferación de células madre mesenquimales (MSC). Además, hubo un aumento de casi el 30 % en la expansión celular en las muestras de Se-HA después de 7 días en comparación con las muestras de HA pura. El Se ejerce un efecto proliferativo sinérgico en la Hap células a través de iones  $\text{Ca}^{2+}$  mejorados en el andamio Se-Hap. El dopante Se tiene un efecto citotóxico selectivo sobre las hAD-MSc y la línea celular de osteosarcoma óseo humano (KHOS-240S). Esta doble actividad hace que el andamio Se-Hap sea un candidato potencial para su uso

en defectos de osteosarcoma. reveló la actividad antiproliferativa del andamio Se-Hap contra las células cancerosas óseas. La calcificación la evaluaron en tinción para determinar la cantidad de depósito de calcio en hAD-MSC. Presentaron imágenes microscópicas de las MSC después de colorear con ARS en los medios de cultivo celular que incluyen Hap, Se-Hap y muestras de control. El ARS, como compuesto orgánico, hace que la matriz inorgánica de calcio cambie a rojo. Si la superficie está roja después de usar ARS, significa que la superficie está llena de calcio. En cuanto a las imágenes, la intensidad del color rojo se elevó por el dopaje de Se en la Hap lo que fue motivo de mayor existencia de calcio compuestos en la superficie. Los autores de esta investigación, basados en sus resultados concluyen que la línea celular de osteosarcoma óseo (KHOS-240S) reveló la propiedad anticáncer óseo del dopante Se, lo que indica su utilidad potencial como andamio bifuncional para la terapia tumoral y la regeneración ósea simultáneas. (Zakhireh et al. 2021)

Se prevé que en un futuro continúe la investigación y estudio de la interacción entre partículas de Hap-Se y el efecto tiene sobre células cancerígenas. Sin embargo, debemos puntualizar su importancia sobre el efecto que presenta sobre el cáncer, tipos y mecanismos para que en un futuro se logre innovar con un material, que tenga la capacidad suficiente de erradicar esta enfermedad sin modificar o influir en las células sanas.

## **Conclusiones**

La hidroxiapatita ha ampliado considerablemente su gama de aplicaciones biomédicas más allá de la reparación ósea gracias a la modificación de su estructura, con dimensiones nanométricas logrando interactuar con biomoléculas como células y tejidos, siendo una nueva arma principalmente contra el cáncer.

La combinación de Hap de tamaño nanométrico con fármacos para atacar células cancerígenas, así como el potencial dopaje con iones metálicos, tal como el caso del selenio, son áreas de investigación que merecen una mayor exploración para disminuir el uso de quimioterapéuticos convencionales que generan efectos secundarios al paciente enfermo.

Asimismo, toda la investigación anterior nos abre un gran panorama sobre un biomaterial que tiene las características y propiedades ideales, para en un futuro, se puedan sustituir los tratamientos convencionales para la erradicación del cáncer e incrementar la salud de la población que es afectada por este padecimiento.

## Referencias

- Alkan, Baris, and Caner Durucan. 2022. "Complete Chemical and Structural Characterization of Selenium-Incorporated Hydroxyapatite." *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* 33(1). doi: 10.1007/s10856-021-06631-6.
- Alvarez, Katerine Quintero. 2012. "Síntesis de Cordierita a Partir de Hidroxihidrogeles Bajo Tratamiento Hidrotermal." 1–110.
- Esteban-Gómez, S., A. Sánchez-Catillo, E. Salinas-Rodríguez, M. I. Reyes-Valderrama, and V. Rodríguez-Lugo. 2017. "SIMULACIÓN ESTRUCTURAL DE HIDROXIAPATITA CON BASE EN LA TEORIA DEL FUNCIONAL DE LA DENSIDAD." 4.
- Barbanente, Alessandra, Barbara Palazzo, Lorenzo Degli Esposti, Alessio Adamiano, Michele Iafisco, Nicoletta Ditaranto, Danilo Migoni, Francesca Gervaso, Robin Nadar, Pavlo Ivanchenko, Sander Leeuwenburgh, and Nicola Margiotta. 2021. "Selenium-Doped Hydroxyapatite Nanoparticles for Potential Application in Bone Tumor Therapy." *Journal of Inorganic Biochemistry* 215. doi: 10.1016/j.jinorgbio.2020.111334.
- Barry, J. N., B. Twomey, A. Cowley, L. O'Neill, P. J. McNally, and D. P. Dowling. 2013. "Evaluation and Comparison of Hydroxyapatite Coatings Deposited Using Both Thermal and Non-Thermal Techniques." *Surface and Coatings Technology* 226:82–91. doi: 10.1016/j.surfcoat.2013.03.039.
- Boitani, Carla, and Rossella Puglisi. 2008. "Selenium, a Key Element in Spermatogenesis and Male Fertility." *Advances in Experimental Medicine and Biology* 636. doi: 10.1007/978-0-387-09597-4\_4.
- Broome, Caroline S., Francis Mcardle, Janet Am Kyle, Francis Andrews, Nicola M. Lowe, Anthony Hart, John R. Arthur, and Malcolm J. Jackson. 2004. *An Increase in Selenium Intake Improves Immune Function and Poliovirus Handling in Adults with Marginal Selenium Status* 1-3.
- Das, Apurba, and D. Pamu. 2019. "A Comprehensive Review on Electrical Properties of Hydroxyapatite Based Ceramic Composites." *Materials Science and Engineering C* 101 (March):539–63. doi: 10.1016/j.msec.2019.03.077.
- Ferraz, M. P., F. J. Monteiro, and C. M. Manuel. 2004. "Hydroxyapatite Nanoparticles : A Review Of." *Journal of Applied Biomaterials and Biomechanics* 2(2):74–80.
- Fihri, Aziz, Christophe Len, Rajender S. Varma, and Abderrahim Solhy. 2017. "Hydroxyapatite: A Review of Syntheses, Structure and Applications in

Heterogeneous Catalysis." *Coordination Chemistry Reviews* 347:48–76. doi: 10.1016/j.ccr.2017.06.009.

- Futakuchi, Mitsuru, Katsumi Fukamachi, and Masumi Suzui. 2016. "Heterogeneity of Tumor Cells in the Bone Microenvironment: Mechanisms and Therapeutic Targets for Bone Metastasis of Prostate or Breast Cancer." *Advanced Drug Delivery Reviews* 99:206–11.
- Giaquinto, Angela N., Hyuna Sung, Kimberly D. Miller, Joan L. Kramer, Lisa A. Newman, Adair Minihan, Ahmedin Jemal, and Rebecca L. Siegel. 2022. "Breast Cancer Statistics, 2022." *CA: A Cancer Journal for Clinicians* 72(6):524–41. doi: 10.3322/caac.21754.
- Hartatiek, P. Dwiasih, Yudyanto, N. Hidayat, R. Kurniawan, and Masruroh. 2019. "Sonochemical Synthesis of Nano-Hydroxyapatite/Chitosan Biomaterial Composite from Shellfish and Their Characterizations." in *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering*. Vol. 515. Institute of Physics Publishing.
- He, Lei, Hongyu Li, Xingyu Chen, Taotao Xu, Tong Sun, Hao Huang, Mengjie Lu, Yiran Yin, Jianhua Ge, Jie Weng, Naiqiang Zhuo, and Ke Duan. 2019. "Selenium-Substituted Hydroxyapatite Particles with Regulated Microstructures for Osteogenic Differentiation and Anti-Tumor Effects." *Ceramics International* 45(11):13787–98. doi: 10.1016/j.ceramint.2019.04.075.
- Hill, Kristina E., Sen Wu, Amy K. Motley, Teri D. Stevenson, Virginia P. Winfrey, Mario R. Capecchi, John F. Atkins, and Raymond F. Burk. 2012. "Production of Selenoprotein P (Sepp1) by Hepatocytes Is Central to Selenium Homeostasis." *Journal of Biological Chemistry* 287(48). doi: 10.1074/jbc.M112.421404.
- Jane Higdon, Ph. D., Ph. D. Victoria J. Drake, Ph. D. Barbara Delage, and Ph. D. ,. MPH Petra A. Tsuji. 2017. "Selenio." *Instituto Linus Pauling*.
- Jin, Xiaoying, Jiangzhou Zhuang, Zhi Zhang, Huiling Guo, and Junjun Tan. 2015. "Hydrothermal Synthesis of Hydroxyapatite Nanorods in the Presence of Sodium Citrate and Its Aqueous Colloidal Stability Evaluation in Neutral PH." *Journal of Colloid and Interface Science* 443:125–30. doi: 10.1016/j.jcis.2014.12.010.
- Kargozar, Saeid, Sahar Mollazadeh, Farzad Kermani, Thomas J. Webster, Simin Nazarnezhad, Sepideh Hamzehlou, and Francesco Baino. 2022. "Hydroxyapatite Nanoparticles for Improved Cancer Theranostics." *Journal of Functional Biomaterials* 13(3).

- Kongsri, Supalak, Kanogporn Janpradit, Keerati Buapa, Suchila Techawongstien, and Saksit Chanthai. 2013. "Nanocrystalline Hydroxyapatite from Fish Scale Waste: Preparation, Characterization and Application for Selenium Adsorption in Aqueous Solution." *Chemical Engineering Journal* 215–216:522–32. doi: 10.1016/j.cej.2012.11.054.
- Li, Yan, Hang Hao, Zhengyu Zhong, Mengdie Li, Jiaqi Li, Yingying Du, Xiaodan Wu, Jianglin Wang, and Shengmin Zhang. 2019. "Assembly Mechanism of Highly Crystalline Selenium-Doped Hydroxyapatite Nanorods via Particle Attachment and Their Effect on the Fate of Stem Cells." *ACS Biomaterials Science and Engineering* 5(12):6703–14. doi: 10.1021/acsbomaterials.9b01029.
- Lv, Yirui, Xian Song, Ting Lei, and Ping Yin. 2022. "Structural and Antibacterial Properties of Doped Zinc Oxide and Their Composites with Hydroxyapatite." *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 651:129706. doi: <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2022.129706>.
- Mangiapane, Erika, Alessandro Pessione, and Enrica Pessione. 2014. "Selenium and Selenoproteins: An Overview on Different Biological Systems." *Current Protein & Peptide Science* 15(6). doi: 10.2174/1389203715666140608151134.
- Mariotti, Marco, Perry G. Ridge, Yan Zhang, Alexei V. Lobanov, Thomas H. Pringle, Roderic Guigo, Dolph L. Hatfield, and Vadim N. Gladyshev. 2012. "Composition and Evolution of the Vertebrate and Mammalian Selenoproteomes." *PLoS ONE* 7(3). doi: 10.1371/journal.pone.0033066.
- Mori, Yuki, and Mamoru Aizawa. 2017. "Control of Ca/P Molar Ratio of Plate-Shaped Hydroxyapatite Powders With an  $\alpha$ ( $\beta$ )-Axis Orientation and Their Thermal Stability." *International Journal of Metallurgical & Materials Engineering* 3(1). doi: 10.15344/2455-2372/2017/132.
- Othman, Radzali, Zaleha Mustafa, Chong Wee Loon, and Ahmad Fauzi Mohd Noor. 2016. "Effect of Calcium Precursors and PH on the Precipitation of Carbonated Hydroxyapatite." *Procedia Chemistry* 19:539–45. doi: 10.1016/j.proche.2016.03.050.
- Padmanabhan, Varun Prasath, Ravichandran Kulandaivelu, Vijayaraj Venkatachalam, Sarath Chandra Veerla, Faruq Mohammad, Hamad A. Al-Lohedan, Won Chun Oh, Romana Schirhagl, Prasanna Kumar Obulapuram, Md Enamul Hoque, and Suresh Sagadevan. 2020. "Influence of Sonication on the Physicochemical and Biological Characteristics of Selenium-Substituted

Hydroxyapatites." *New Journal of Chemistry* 44(40):17453–64. doi: 10.1039/d0nj03771k.

- Pai, Shraddha, Srinivas M Kini, Raja Selvaraj, and Arivalagan Pugazhendhi. 2020. "A Review on the Synthesis of Hydroxyapatite, Its Composites and Adsorptive Removal of Pollutants from Wastewater." *Journal of Water Process Engineering* 38. doi: 10.1016/j.jwpe.2020.101574.
- Paz, Adrian; González, Jesús E.; López, Mónica; Becquer, Clara E.; Parodi, Ma Belén. 2010. "Obtención de Nanopartículas de Hidroxiapatita Empleando Disoluciones Con Elevado Contenido de Iones Calcio y Fosfato Manufacture of Hydroxyapatite Nanoparticles Using Solutions with High Content of Calcium and Phosphate Ions Centro Nacional de Investigaci." *Revista CENIC*.
- Poinern, Gérard Eddy, Ravi Krishna Brundavanam, Nicholas Mondinos, and Zhong Tao Jiang. 2009. "Synthesis and Characterisation of Nanohydroxyapatite Using an Ultrasound Assisted Method." *Ultrasonics Sonochemistry* 16(4):469–74. doi: 10.1016/j.ultsonch.2009.01.007.
- Robles-Águila, M. J., J. A. Reyes-Avenidaño, and M. E. Mendoza. 2017. "Structural Analysis of Metal-Doped (Mn, Fe, Co, Ni, Cu, Zn) Calcium Hydroxyapatite Synthesized by a Sol-Gel Microwave-Assisted Method." *Ceramics International* 43(15):12705–9. doi: 10.1016/j.ceramint.2017.06.154.
- Sadat-Shojai, Mehdi, Mohammad Atai, and Azizollah Nodehi. 2011. "Design of Experiments (DOE) for the Optimization of Hydrothermal Synthesis of Hydroxyapatite Nanoparticles." *Journal of the Brazilian Chemical Society* 22(3):571–82. doi: 10.1590/S0103-50532011000300023.
- Sadat-Shojai, Mehdi, Mohammad Taghi Khorasani, Ehsan Dinpanah-Khoshdargi, and Ahmad Jamshidi. 2013. "Synthesis Methods for Nanosized Hydroxyapatite with Diverse Structures." *Acta Biomaterialia* 9(8):7591–7621. doi: 10.1016/j.actbio.2013.04.012.
- Sadat-Shojai, Mehdi, Mohammad Taghi Khorasani, and Ahmad Jamshidi. 2015. "3-Dimensional Cell-Laden Nano-Hydroxyapatite/Protein Hydrogels for Bone Regeneration Applications." *Materials Science and Engineering C* 49:835–43. doi: 10.1016/j.msec.2015.01.067.
- Salimi, M. Nabil, Rachel H. Bridson, Liam M. Grover, and Gary A. Leeke. 2012. "Effect of Processing Conditions on the Formation of Hydroxyapatite Nanoparticles." *Powder Technology* 218:109–18. doi: 10.1016/j.powtec.2011.11.049.

- Silva, D., P. Abreu-Mendes, C. Mourato, D. Martins, R. Cruz, and F. Mendes. 2020. "Cáncer de Próstata, Nuevas Opciones de Tratamiento: Inmunoterapia." *Actas Urológicas Españolas* 44(7):458–68. doi: 10.1016/J.ACURO.2020.01.009.
- Sottnik, Joseph L., Jinlu Dai, Honglai Zhang, Brittany Campbell, and Evan T. Keller. 2015. "Tumor-Induced Pressure in the Bone Microenvironment Causes Osteocytes to Promote the Growth of Prostate Cancer Bone Metastases." *Cancer Research* 75(11):2151–58. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-14-2493.
- Tõnsuaadu, Kaia, Karlis Agris Gross, Liene Pluduma, and Mihkel Veiderma. 2012. "A Review on the Thermal Stability of Calcium Apatites." *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry* 110(2):647–59. doi: 10.1007/s10973-011-1877-y.
- Uskoković, Vuk, and Dragan P. Uskoković. 2011. "Nanosized Hydroxyapatite and Other Calcium Phosphates: Chemistry of Formation and Application as Drug and Gene Delivery Agents." *Journal of Biomedical Materials Research - Part B Applied Biomaterials* 96 B(1):152–91. doi: 10.1002/jbm.b.31746.
- Utara, Songkot, and Jutharatana Klinkaewnarong. 2015. "Sonochemical Synthesis of Nano-Hydroxyapatite Using Natural Rubber Latex as a Templating Agent." *Ceramics International* 41(10):14860–67. doi: 10.1016/j.ceramint.2015.08.018.
- Wang, Wenhao, and Kelvin W. K. Yeung. 2017. "Bone Grafts and Biomaterials Substitutes for Bone Defect Repair: A Review." *Bioactive Materials* 2(4):224–47. doi: 10.1016/j.bioactmat.2017.05.007.
- Wei, Luxi, Dongwen Pang, Liyong He, and Chunlin Deng. 2017. "Crystal Structure Analysis of Selenium-Doped Hydroxyapatite Samples and Their Thermal Stability." *Ceramics International* 43(18):16141–48. doi: 10.1016/j.ceramint.2017.08.189.
- Zakhireh, Solmaz, Khosro Adibkia, Younes Beygi-Khosrowshahi, and Mohammad Barzegar-Jalali. 2021. "Osteogenesis Promotion of Selenium-Doped Hydroxyapatite for Application as Bone Scaffold." *Biological Trace Element Research* 199(5):1802–11. doi: 10.1007/s12011-020-02309-2.
- Zeng, Huawei, Jay J. Cao, and Gerald F. Combs. 2013. "Selenium in Bone Health: Roles in Antioxidant Protection and Cell Proliferation." *Nutrients* 5(1):97–110.
- Zhong, Shengnan, Jingdi Chen, Qian Li, Zihao Wang, Xuetao Shi, Kaili Lin, and Qiqing Zhang. 2017. "Assembly Synthesis of Spherical Hydroxyapatite with Hierarchical Structure." *Materials Letters* 194:1–4. doi: <https://doi.org/10.1016/j.matlet.2017.01.146>.

- Zhu, Yan, Lingling Xu, Chenhui Liu, Caoning Zhang, and Nan Wu. 2018. "Nucleation and Growth of Hydroxyapatite Nanocrystals by Hydrothermal Method." *AIP Advances* 8(8). doi: 10.1063/1.5034441.