

Nº 1
2Ej

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ODONTOLOGÍA

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN

TESIS DOCTORAL

CARACTERIZACIÓN ULTRAESTRUCTURAL DE LA *Mellita Eduardobarrosi* sp. nov., Y LA VALORACIÓN *in vivo* DE SU CAPACIDAD COMO BIOMATERIAL

POR:

M. en O. MIGUEL ANGEL ARAIZA TÉLLEZ

TUTOR : Dr. en C. VICTOR M. CASTAÑO MENESES

1994

**TESIS CON
FALLA DE CONTEN**



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ODONTOLOGÍA

Cualquier tesis no publicada que avale el grado de Doctor y depositada en la Biblioteca de la Universidad, Facultad de Odontología, queda abierta para inspección y sólo podrá ser usada con la debida autorización del autor. Las referencias bibliográficas pueden ser tomadas, pero ser copiadas sólo con el permiso del autor, y el crédito se da posteriormente a la escritura y publicación del trabajo.

Esta tesis ha sido utilizada por las siguientes personas que firman y aceptan las restricciones señaladas:

La biblioteca que presta esta tesis debe asegurarse de recoger la firma de cada persona que la utilice.

| Fecha, | Nombre | y | Dirección |
|--------|--------|---|-----------|
|--------|--------|---|-----------|

**CARACTERIZACION DE LA ULTRAESTRUCTURA DE LA
Mellita Eduardobarrosoi sp. nov., Y LA VALORACION *in vivo*
DE SU CAPACIDAD COMO BIOMATERIAL**

Aprobado por:

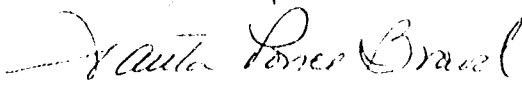
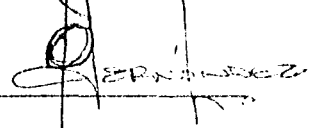
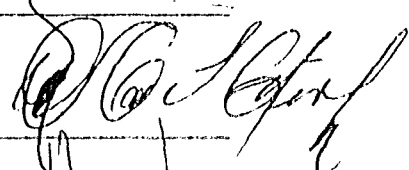
Director de la tesis: Dr. en C. Victor Manuel Castaño Meneses

M. en C. Irene Hiroko Arita Watanabe

D. en C. Margarita Victoria García Garduño

Ph.D. Juan Carlos Hernández Guerrero

Dr. en C. Santa Ponce Bravo.



**CARACTERIZACIÓN ULTRAESTRUCTURAL DE LA *Mellita*
Eduardobarrosoi sp. nov., Y LA VALORACIÓN *in vivo* DE SU
CAPACIDAD COMO BIOMATERIAL**

POR

M.en O. MIGUEL ANGEL ARAIZA TÉLLEZ

TESIS

Presentada como requisito para obtener el Grado de
DOCTOR EN ODONTOLOGÍA

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ODONTOLOGÍA

1994

AGRADECIMIENTOS

En este trabajo se refleja parte de mi vida, su realización estuvo siempre bajo la mirada, cuidado y apoyo de personas e Instituciones que confiaron en mí, a ellos quiero manifestar mi gratitud:

A la Universidad Nacional Autónoma de México, *Alma Mater* que me ha dado la oportunidad de lograr la formación personal y profesional.

De la Facultad de Odontología de la UNAM:

Al Director de la Facultad, el Dr. Javier Portilla Robertson y al Jefe de la División de Estudios de Posgrado e Investigación, Dr. Jose Antonio Vela Capdevila, por su apoyo incondicional para realizar este trabajo.

Al Dr. Juan Carlos Hernández Guerrero, Subjefe de la División de Estudios de Posgrado e Investigación. Por su apoyo incondicional y constante, no sólo para realizar este trabajo, sino también en la consolidación y formación de mi carrera profesional.

A la Dra. Santa Ponce Bravo, jefe del laboratorio de Patología de la División de Estudios de Posgrado e Investigación, por su ayuda en la preparación y consolidación de este proyecto.

Al Sr. Teodomiro Pérez, por su ayuda en el procesamiento histológico de los especímenes animales.

Al M.V.Z. René Olivera, encargado del Bioterio, al técnico Sr. Juan José Ceballos, y los alumnos del Servicio Social de la Carrera de Veterinaria que colaboraron en el cuidado de los animales.

A mis alumnas del Servicio Social, Mónica Romero Méndez y Adriana Carrillo Oliva, por mostrar disposición y anhelo de aprender al mismo tiempo de trabajar.

Del Instituto de Física de la UNAM:

A las autoridades del Instituto, en particular su Director el Dr. Octavio Novaro, por su apoyo al considerarme Estudiante Asociado durante el periodo que duraron mis estudios de doctorado.

Un agradecimiento especial le tengo a la M. en C. Irene H. Arita Watabe, miembro del FATA del IFUNAM, porque con su claridad y gran tenacidad para el trabajo significaron para mí, un buen ejemplo digno de imitarse.

A los integrantes del Departamento de Física Aplicada y Tecnología Avanzada, en especial a la Dra. en C. Margarita García Garduño, por su ayuda en la preparación de las muestras para MEB y su participación en la fase experimental quirúrgica. A la Q.F.B. Elena Oliva, y a la M. en I. Q. Alicia del Real por su orientación y apoyo en todas las etapas del estudio. A la Dra. en C. Antonieta Mondragón por su ayuda en el proceso de las muestras para el estudio de FTIR.

A la Fís. Jaqueline Cañetas, del Departamento de Física Experimental, por su ayuda en los datos obtenidos por MEB.

Al Fís. Roberto Hernández, del Laboratorio de Microscopía Electrónica, por su ayuda en el micronálisis de Rayos X.

Al Fís. Hedilberto Hernández, del Departamento de Estado Sólido por su ayuda en el análisis de difracción de Rayos-X.

A la Señora Martha Romero, por la consideración que tuvo siempre para conmigo.

Finalmente le agradezco a la Dr. en C. Sofía Y. Díaz Miranda, del Centro de Neurobiología de la UNAM, por su importante ayuda en la conclusión de este trabajo.

Gracias mil a todos ellos por su atención.

Por último, en estas líneas quiero hacer patente la influencia que han tenido diferentes personas para lograr hacer de mi un crisol donde se funde la madurez y la superación personal, familiar y profesional.

A Martha Laura, por ser la compañera en el camino de mi vida; por el apoyo, solidez y ternura con que me alimentas día con día.

A la Sra. María del Refugio Téllez, y a mis *Hermanos*, porque ha rendido fruto el sentimiento de responsabilidad inculcado.

Al Dr. Victor Manuel Castaño, porque con su dedicación y profesionalismo me ha demostrado que el límite de nuestros horizontes sólo está en nuestra conciencia.

INDICE GENERAL

| | Página |
|--|--------|
| Resumen. | 1 |
| Introducción. | 2 |
| Cap. I. Conceptos generales. | |
| 1.1 Clasificación de los materiales dentales. | 6 |
| 1.2 Definición de términos sobre la biocompatibilidad. | 12 |
| 1.3 Modelos animales empleados en las pruebas de biocompatibilidad. | 18 |
| 1.4 Materiales de sustitución y reparación ósea. | 22 |
| 1.4.1 Derivados de Hueso | 25 |
| 1.4.2 Obtenidos de Recursos Naturales. | 29 |
| 1.4.3 Sintéticos. | 32 |
| Cap. II. Identificación biológica de la <i>mellita eduardobarrosoi</i> | |
| 2.1 Los equinodermos como modelo de calcificación y remodelado estructural. | 41 |
| 2.2 Utilidad de los Equinodermos. | 44 |
| 2.3 Los Equinodermos como definidores de comunidades biológicas. | 45 |
| 2.4 Descripción de la <i>mellita eduardobarrosoi</i> .sp.nov. | 47 |
| 2.5 Otros miembros de la familia Mellitidae. | 53 |
| Cap. III. Definición metodológica de la caracterización fisicoquímica de la <i>mellita eduardobarrosoi</i> sp.nov. | |
| 3.1 Justificación. | 55 |
| 3.2 Objetivo principal | 57 |
| 3.3 Objetivos particulares | 57 |
| 3.4 Hipótesis. | 58 |
| 3.5 Preparación del material. | 59 |

| | Página |
|--|--------|
| Cap. IV. Caracterización fisicoquímica del esqueleto de la <i>mellita eduardobarrosoi</i> sp.nov. | |
| 4.1 Microscopio Electrónico de Barrido (MEB). | 61 |
| 4.2 Microanálisis de Rayos-X (MRx). | 79 |
| 4.3 Análisis de Difracción de Rayos-X (DRx). | 85 |
| 4.4 Espectroscopia de Infrarrojo (FTIR). | 97 |
| Cap. V. Valoración <i>in vivo</i> del material. | |
| 5.1 Validación del modelo animal. | 102 |
| 5.2 Experimento | |
| 5.2.1 Objetivos generales. | 104 |
| 5.2.2 Objetivos particulares. | 104 |
| 5.2.3 Hipótesis. | 104 |
| 5.2.4 Material y Método. | 105 |
| 5.2.5 Resultados. | 110 |
| Cap. VI. Discusión. | 130 |
| Conclusiones. | 137 |
| Referencias Bibliográficas. | 139 |
| Curriculum vitae. | 149 |

INDICE DE FOTOGRAFÍAS.

| Núm. | Contenido | Pág. |
|------|--|------|
| 1 | Fotografía de una espina o fragmento de erizo de mar | 43 |
| 2 | Apariencia bajo MEB del enrejado mineral <i>sui generis</i> del esqueleto de los equinoideos | 43 |
| 3 | Apariencia dorsal de la <i>mellita eduardobarrosoi</i> sp.nov | 48 |
| 4 | Apariencia lateral de la <i>mellita eduardobarrosoi</i> sp.nov. | 49 |
| 5 | Vista ventral de la <i>mellita eduardobarrosoi</i> sp.nov. | 51 |
| 6 | Vista dorsal de la <i>mellita longifissa</i> . | 52 |
| 7 | Vista dorsal de la <i>Mellita L. Agassi</i> . | 54 |
| 8 | Microfotografía de MEB del aspecto interno de la Meb preparada por método de fractura. | 67 |
| 9 | Vista interna (MEB) del área de los poros de la Me. | 68 |
| 10 | Acercamiento con MEB de los poros de la Me | 69 |
| 11 | Apariencia en MEB de la pared interna de un conducto del esqueleto de la Me. | 70 |
| 12 | Acercamiento con MEB de la pared de un conducto interno de la Me. | 71 |
| 13 | Microfotografía de un gránulo de Me preparado por molienda. | 72 |
| 14 | Microfotografía de un gránulo de Me preparado por molienda. | 74 |
| 15 | Gránulo de Hidroxiapatita coralina (HAc). | 75 |
| 16 | Microfotografía de Gránulos de HAc. | 76 |
| 17 | Apariencia de la Hidroxiapatita sintética (HAs). | 77 |

| Núm. | Contenido | Pág. |
|-------------|---|-------------|
| 18 | Microfotografía de Hueso humano (HH). | 78 |
| 19 | Especimen de 7 días de evolución de implante en sitio "A" | 111 |
| 20 | Formación de cápsula en el espécimen de 7 días de evolución | 112 |
| 21 | Zona de implante de CaCO ₃ en forma de bloque. | 113 |
| 22 | Corte histológico del espécimen de 7 días en forma granular. | 114 |
| 23 | Corte histológico de sitio control. | 115 |
| 24 | Especimen de 15 días de implantación, grupo A. | 117 |
| 25 | Corte histológico de espécimen de 15 días de implantación. | 118 |
| 26 | Corte de espécimen de 15 días de evolución con escaso infiltrado inflamatorio. | 119 |
| 27 | Especimen de 15 días con implante en forma granular. | 120 |
| 28 | Especimen de 30 días de implantación de CaCO ₃ . | 121 |
| 29 | Corte histológico de implante granular de 30 días de evolución. | 122 |
| 30 | Corte de espécimen de implante granular de 30 días. | 123 |
| 31 | Especimen de 45 días de implantación. | 124 |
| 32 | Células gigantes multinucleadas a cuerpo extraño en espécimen de 45 días de evolución. | 125 |
| 33 | Corte histológico de implante en forma granular, a los 45 días. | 126 |
| 34 | Especimen de 60 días de implantación en forma de bloque. | 127 |
| 35 | Proliferación de tejido conectivo hacia el interior del implante en espécimen de 60 días. | 128 |
| 36 | Corte de espécimen de 60 días con implante en forma granular. | 129 |

INDICE DE GRÁFICAS.

| Núm. | Contenido | Pág. |
|-------------|---|-------------|
| 1 | Microanálisis de Rayos-x de la <i>Mellita Eduardobarrosoi</i> sp.nov.(Me) | 81 |
| 2 | Microanálisis de Rayos-x de la Hidroxiapatita coralina (HAc). | 83 |
| 3 | Microanálisis de Rayos-x de la Hidroxiapatita sintética (HAs). | 84 |
| 4 | Difractograma de la Me | 92 |
| 5 | Difractograma de comparación entre la Me y la HAe. | 93 |
| 6 | Difractograma de la HAc. | 94 |
| 7 | Difractograma de Hueso Humano (HH). | 95 |
| 8 | Difractograma de la HAs. | 96 |
| 9 | Espectro de Infrarrojo de la Me. | 99 |
| 10 | Espectro de Infrarrojo de la HAc. | 100 |
| 11 | Espectro de Infrarrojo de la HAs. | 101 |

INDICE DE FIGURAS

| Núm. | Contenido | Pág. |
|-------------|---|-------------|
| 1 | Señales formadas en el microscopio electrónico de barrido. | 62 |
| 2 | Proceso de detección de rayos-x en el detector Si(Li). | 79 |
| 3 | Tipos de interferencia constructiva y destructiva en la difracción de electrones. | 86 |
| 4 | Interferencia constructiva para reflexiones de primero y segundo orden. | 86 |
| 5 | Esquema de un difractómetro de rayos-x. | 89 |
| 6 | Esquema de la implantación del material. | 108 |

INDICE DE TABLAS

| Núm. | Contenido | Pág. |
|-------------|---|-------------|
| 1 | Materiales de Uso Biomédico y sus Aplicaciones. | 4 |
| 2 | Pruebas de Valoración Preclínica de los Materiales de Uso Dental. | 10 |
| 3 | Materiales Dentales Tipo II. Materiales Protésicos. | 11 |
| 4 | Mediadores de la Biocompatibilidad. | 15 |
| 5 | Materiales de Aumento, Reparación y Sustitución Ósea. | 23 |
| 6 | Productos Comerciales de Compuestos de Fosfato de Calcio. | 33 |

CARACTERIZACIÓN ULTRAESTRUCTURAL DE LA *Mellita Eduardobarrosoi* sp.nov. Y LA VALORACIÓN *in vivo* DE SU CAPACIDAD PARA SER CONSIDERADO COMO BIOMATERIAL.

Resumen: Buscando desarrollar alternativas terapéuticas quirúrgicas y ortopédicas, encontramos que el esqueleto de la *mellita eduardobarrosoi* sp.nov. (Me), tiene características requeridas para un material de injerto óseo. El objetivo de esta investigación fue la determinación de las características físico-químicas del invertebrado Me y su potencial para ser desarrollado como un biomaterial. Los estudios de caracterización fisicoquímica realizados (microscopia electrónica de barrido, difracción de rayos-x, microanálisis de rayos-x, y espectroscopia infrarroja) muestran que la composición química del esqueleto es CaCO_3 , con fase cristalina de aragonita. Las imágenes de microscopia de barrido mostraron que el esqueleto tenía conformación porosa entre 40μ y 200μ de diámetro. A partir del esqueleto de la Me se elaboró un material de implante para ser probado experimentalmente en ratas Wistar. Los resultados histológicos muestran que la respuesta del huésped guarda relación inversa con el tiempo, siendo más intensa en los primeros días, y menos a los 60 días, encontrando aún en ese tiempo células gigantes multinucleadas a cuerpo extraño. En conclusión, las características de composición y estructura de la Me, nos hacen sugerir más estudios para comprender su comportamiento *in vivo* e *in vitro*.

Summary: In the attempt for development new therapeutic choices in surgical and orthopedic fields, we found that the skeleton of the invertebrate *mellita eduardobarrosoi* sp.nov. has features required for a graft material. The aim of this research was to determinate the chemical and physical features of such an invertebrate and its potential to be developed as a biomaterial. Several analysis (Scanning electron microscopy, x-ray diffraction, x-ray microanalysis, and infrared spectroscopy), were done. Results of the crystalline phase identification showed that the calcium carbonate is the main component of *mellita*'s skeleton, confirmed by x-ray microanalysis, with crystalline form identified as aragonite. Images from SEM showed the skeleton had a porous conformation with diameter of the porous size between 40μ and 200μ . From *mellita*'s skeleton was made a granular and block implant for experimental test in Wistar rats. Histologic results show that host response has an inverse relationship with time, being more severe at firsts days and weeks, and decrease in severity at 60 days. However, at that time were still found giant cells to forcing-body. Our results, suggest that *mellita*'s skeleton has some qualities in its structure and composition that suggest more studies be made in order to examine the behavior of this material *in vitro* and *in vivo*.

Keywords *calcium carbonate-animal test-physicochemical characterization.*

INTRODUCCION.

La búsqueda de alternativas que permitan proveer de mejores condiciones de vida al hombre actual, ha llevado a la diversificación de las ciencias básicas y aplicadas; en tal intensidad que el estudio de materiales, tanto de origen natural como sintético, ha provocado el surgimiento de la Ciencia de los Biomateriales, con la finalidad de realizar el desarrollo y la evaluación de los diversos materiales o compuestos destinados a reemplazar o sustituir un componente orgánico y/o estructural del cuerpo humano. Esta disciplina, que es aún muy joven y se encuentra en plena fase de establecimiento si se le compara con otras esferas del conocimiento y de la actividad humana, ha revolucionado el mundo de la medicina con materiales y equipos que al ser utilizados, están provocando un considerable salto cualitativo en la cirugía reconstructiva. En la actualidad, la gran variedad que existe de estos materiales permite agruparlos genéricamente dependiendo de su composición química, conformándose una amplia gama de compuestos con características específicas que determinan su utilidad y aplicación, (Helmus, M.N., 1991), tal como se muestra en la tabla 1.

Entre los materiales artificiales destinados a la reconstrucción del tejido óseo, los diversos tipos de fosfatos de calcio ocupan un lugar de primera importancia. En conjunto, estos materiales tienen en común la característica de que son producidos de manera sintética o semi-sintética. De los primeros, los compuestos más representativos son el β -fosfato tricálcico (β -FTC) y el fosfato dibásico (FDB), ambos con la particularidad de que son producidos a partir de recursos existentes en laboratorios de materiales. Por otra parte, la Hidroxiapatita coralina (HAc) representa los productos semi-sintéticos porque se obtiene de recursos naturales y luego su estructura es transformada por métodos de laboratorio (Hench, L.L. 1991).

Aunque existen biomateriales cuya aplicación clínica en humanos es aceptada internacionalmente, ello no garantiza la disponibilidad ni el acceso de éstos para gran parte de la población; esto ha hecho que se busquen alternativas que no sólo sean factibles sino también accesibles.

Son estos antecedentes que reflejan la necesidad de encontrar soluciones a esta problemática, los que han creado la posibilidad de conformar un grupo interdisciplinario de investigadores del Departamento de Física Aplicada y Tecnología Avanzada del Instituto de Física de la UNAM y de la División de Estudios de Posgrado e Investigación de la Facultad de Odontología de la UNAM.

El propósito de este trabajo consiste en reportar las diferentes etapas de investigación, que se realizaron con la finalidad de conocer las características fisicoquímicas del esqueleto de la *Mellita Eduardobarrosoi* sp. nov., y la valoración inicial *in vivo* de su capacidad para ser considerado como biomaterial.

Tabla 1. Materiales de uso biomédicos y sus aplicaciones.

| Material | Aplicación |
|--|---|
| Polímeros Sintéticos no degradables | |
| Poliámidas | Suturas |
| Policarbonatos | Materiales recipientes |
| Poliésteres | Injertos Vasculares |
| Poliformaldehído | Válvulas cardíacas |
| Polioléfinos | Suturas |
| Polivinil cloruro | Bolsas para sangre |
| Fluorocarbonos | Injertos vasculares |
| Hidrogeles | Lentes de contacto, cubiertas de catéter |
| Elastómeros poliolefinos | Cilindros, artificial heart bladders |
| Poliuretanos | Catéteres, artificial heart bleeders |
| Silicones | Reconstrucción de tejido blando |
| Polietilenos de alto peso molecular | Copa aceto Tubular |
| Biodegradables | |
| Albúmina, eslabones cruzados | Cubiertas de injertos vasculares, encapsulación celular |
| Colágena /gelatina, eslabones cruzados | Reconstrucción de tejido blando, cubiertas de injerto vascular |
| Ácidos poliaminos | Liberación controlada, péptidos de adhesión celular |
| Polianhídridos | Liberación controlada |
| Policaprolactones | Liberación controlada, hojas óseas |
| Copolímeros de ácido glicólico/poliláctico | Suturas, hojas óseas |
| Polihidroxibutiratos | Liberación controlada |
| Poliortoésteres | Liberación controlada |
| Materiales derivados biológicamente | |
| Arteria carótida bovina | Injertos vasculares |
| Ligamentos bovinos | Ligamentos |
| Pericardio Bovino | Sustituto pericardial, válvula cardíaca |
| Vena umbilical humano | Injertos vasculares |
| Válvula cardíaca porcina | Válvulas cardíacas |
| Macromoléculas Bioderivadas | |
| Chitosans | Experimental, recubrimiento de heridas liberación controlada |
| Colágena | Inyectables en tejido blando, recubrimientos (coatings), cubiertas de heridas |
| Elastina | Experimental, recubrimientos (coatings) |
| Gelatina, eslabones cruzados | Recubrimiento de corazón artificial |
| Ácido hialurónico | Recubrimientos, apósitos de heridas, no-adhesión quirúrgica |
| Adhesivos tisulares | |
| Cianoacrilatos | Cierre de heridas, microcirugía |
| Pegamento de fibrina | Recubrimiento de injertos vasculares |
| Pegamento de molusco | Aumento de la adhesión celular |

(continua →)

Tabla 1. Materiales de uso biomédicos y sus aplicaciones. Continuación

| Material | Aplicación |
|--|---|
| Metales y Aleaciones Metálicas | |
| Aleaciones de cromo cobalto molibdeno | Implantes dentales y ortopédicos |
| Aleaciones Nitinol (Aleaciones con memoria de forma) | Válvulas cardíacas |
| Acero inoxidable | Alambre ortopédico |
| Titanio y aleaciones de titanio | Alambre ortopédico |
| | Recipientes de corazón artificial, válvulas cardíacas |
| Cerámicas, Inorgánicas, y Vidrios | |
| Óxidos de aluminio, calcio y fósforo | Relleno óseo degradable, aumento del crecimiento óseo |
| Bioglass® | Vidrio calcio fósforo bioactivo, recubierta (coating) ortopédica |
| Cerámicas vítreas | Encapsulación de dispositivos electrónicos médicos implantables |
| Alumina de alta densidad | Esfera o bola de prótesis de cadera |
| Hidroxiapatitas | Cerámicas bioactivas, recubrimiento ortopédico, rellenos óscos |
| Carbonos | |
| Carbonos vítreos | Fibras de composites ortopédicos |
| Carbón pirolítico (isotrópico de baja temperatura) | Válvulas cardíacas, implantes dentales |
| Carbón isotrópico ultrabaja temperatura | Recubrimiento de polímeros sensibles al calor |
| Recubrimientos Pasivos | |
| Albúmina | Tromboresistencia |
| Cadenas álcali | Absorbentes de albúmina para tromboresistencia |
| Fluorocarbonos | Drag reducido para catéteres, tromboresistencia |
| Hidrogeles | Drag reducido para catéteres, tromboresistencia |
| Silicones libres de sílica | Tromboresistencia, cicatrización mejorada de heridas por reconstrucción del tejido blando |
| Recubrimientos Bioactivos | |
| Anticoagulantes, ej., heparina | Tromboresistencia |
| Antimicrobianos | Resistencia a la infección |
| Cerámicas bioactivas y vidrios | Adhesión y formación de hueso, adhesión al tejido blando |
| Péptidos de adhesión celular | Adhesión celular aumentada, epitelio y endotelio |
| Proteínas de adhesión celular | Adhesión celular aumentada, epitelio y endotelio |
| Carga negativa de superficie | Tromboresistencia |
| Trombolíticos | Tromboresistencia |

Helmus N, Michael, Overview of Biomedical Materials, *Materials Research Society Bulletin*, 1991 16: 33-38.

CAPITULO I

CONCEPTOS GENERALES

1.1. CLASIFICACIÓN DE LOS MATERIALES DENTALES.

La manipulación de productos, instrumental y equipos dentales son actividades rutinarias y comunes para la profesión dental, en todos los casos el destinatario final de estos insumos únicamente realiza la ejecución o empleo de los mismos, sin detenerse a cuestionar o pensar en los requerimientos que debió haber cumplido antes de ser comercializado. En México, la Secretaría de Salud es la entidad responsable de vigilar que los productos que se expenden para uso en el consultorio dental no tengan efectos nocivos para la salud y que cumplan con ciertos requerimientos mínimos. Sus dictámenes se apoyan en normas reconocidas internacionalmente y que, en general, han sido establecidas por las tres organizaciones que en el campo de la odontología actúan conjuntamente para evitar duplicación de esfuerzos. Estos organismos son: la Organización Internacional de Normas (**International Organization for Standardization, ISO**), que es una entidad internacional no gubernamental, constituida por organismos nacionales que buscan el establecimiento de normas con reconocimiento internacional (Guzmán-Baez, H.J., 1990).

Otra entidad es la Federación Dental Internacional (**Federation Dentaire Internationale, FDI**), que desde 1958 participa con la ISO en el desarrollo de especificaciones para productos dentales. La FDI es una entidad integrada en forma voluntaria por asociaciones dentales nacionales y con miembros individuales (FDI, 1980). El tercer organismo que participa en la elaboración de normas que rigen el uso de los materiales dentales es el Instituto Nacional Norteamericano de Normas (**American National Institute, ANSI**), que convalida como normas nacionales norteamericanas las propuestas por todos los

organismos sectoriales. La representante en la ANSI del sector dental es la Asociación Dental Americana (**American Dental Association, ADA**).

El establecimiento de una norma para un producto dental es un procedimiento complejo que tiene que atender en primer lugar a la defensa de la salud del paciente, además de tener en cuenta el estado actual de los conocimientos y las realidades de la fabricación (Helmus, N., 1991). Las normas no establecen las características óptimas que pudiera tener un producto, solamente los requisitos mínimos que debe cumplir para el fin propuesto.

Las especificaciones que más se mencionan en México son las mismas de la Asociación Dental Americana (**ADA**), avaladas por la ANSI, muy parecidas aunque no idénticas a las normas ISO. De esta manera puede entenderse que los materiales dentales están clasificados según su finalidad o empleo, por lo que establecer una clasificación de los materiales dentales tomando como base su composición química, se vuelve amplia al considerar las diferentes técnicas y equipos requeridos para su estudio, producción y pruebas empleadas para su desarrollo y evaluación (Mjor, I.A., 1988).

El Manual de Referencia del Dentista para material, instrumentos y equipo, editado por la Asociación Americana de Dentistas, [**Dentist's Desk Reference: Material, Instruments and Equipment, American Dental Association**] también proporciona una subdivisión detallada de la sección de los materiales basada en la composición y parcialmente en el uso, con énfasis en el tipo de material. De este modo, son utilizadas 16 subdivisiones para describir los materiales dentales.

Estos ejemplos ilustran la diversidad en la clasificación de los materiales dentales. Es evidente que ni su composición, uso, o tipo de material parece adecuado para tener un acuerdo general en la presentación de los materiales dentales. También es posible que el enfoque multi-metodológico en la investigación y prueba de los materiales dentales compliquen el establecimiento de una clasificación que parezca lógica a todas las personas involucradas.

CLASIFICACIONES UTILIZADAS EN PRUEBAS BIOLÓGICAS.

Se han publicado varios documentos relacionados con los métodos aceptados para las pruebas biológicas de los materiales dentales (**American National Standard Institute/American Dental Association ANSI/ADA**; **Federation Dentaire Internationale FDI**; y la **International Organization for Standardization ISO**), además de aportar sugerencias para la realización de las pruebas a los diferentes materiales. En esos documentos, se aplica un sistema constituido con varios niveles de subdivisiones que proveen un agrupamiento básico orientado en el uso clínico de los materiales, a su vez es subdividido con particular referencia a diferentes fórmulas químicas.

Las tres clasificaciones están basadas en el uso de los materiales, indistintamente de la composición. Sin embargo, la composición forma parte de una subtipificación detallada. Es evidente que la clasificación varía significativamente en los tres documentos. La **ANSI/ADA (American National Standard Institute/American Dental Association)** y la **Federation Dentaire Internationale (FDI)** utilizan una clasificación similar, pero no idéntica. El documento de la **ISO** define y clasifica los productos dentales así como los materiales dentales. La necesidad de estandarización, basada en la colaboración y el trabajo de equipo, es por lo tanto necesaria en la medida de obtener una clasificación aceptada universalmente.

En el **Dentist's Desk Reference Material, Instruments and Equipment**, editado por la **ADA** de los Estados Unidos de Norteamérica, se refieren las normas o especificaciones para los productos dentales. La norma número 41 trata de las prácticas estándar recomendadas para la evaluación biológica de materiales dentales. En febrero de 1972, el Consejo sobre Materiales, Instrumentos y Equipos Dentales de la **ADA**, publicaron los resultados obtenidos por uno de sus comités, en ese documento (**Standard Practices Recommended for Biologic Evaluation of Dental Materials**) se planteaban ciertas conductas que no eran tan definitivas ni tan exactas que no permitieran la menor

desviación. En ese entonces se reconocieron innumerables variaciones, tanto en los productos como en los métodos de pruebas biológicas, haciéndose hincapié en que las prácticas recomendadas estaban concebidas solamente como guías para la prueba de nuevos productos.

El 28 de Mayo de 1976, durante la Administración Ford se aprobó la Ley de Enmienda sobre Equipos Médicos, el propósito de la enmienda es el aseguramiento de que los aparatos médicos son seguros y efectivos, y propiamente etiquetados para su uso intentado, para cumplir este cometido otorgó a la Administración para Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos (**Federal Drug Administration, US FDA**) la autoridad para examinar y evaluar los efectos biológicos de los materiales y equipos utilizados en seres humanos (Mueller, E., Kamula, R., & Marlowe, D., 1991). En condiciones ideales, los productos deberían cumplir con las especificaciones aprobadas para ellos, pero en la realidad esto es difícil debido a la gran variedad de productos nuevos, las condiciones tan dispares en las cuales se emplean, y las formas de manejo cuando se realizan las pruebas también son variables que pueden involucrar dificultades técnicas para el adecuado desempeño de dichos materiales.

En un intento por normar las pruebas requeridas para los materiales que tienen que ver con el hombre, la ADA/ANSI emitió la norma número 41 la cual se refiere a las prácticas estándar recomendadas para la evaluación biológica de los materiales dentales (Anusav, K.J. & de Rijk, W.G., 1990), en ella se menciona la clasificación de los materiales según su aplicación y se le relaciona con las pruebas específicas para su aprobación (tabla 2).

Los materiales utilizados como implantes (cerámicos, metálicos y de carbón vítreo) son agrupados como de la clase 4, que pertenece a los materiales dentales del Tipo II o también llamado de los materiales protésicos (tabla 3); es importante mencionar que esta clase en particular es la que mayor número de pruebas requiere.

Pruebas de valoración pre-clínica para materiales de uso dental.

| PRUEBAS INICIALES | PRUEBAS SECUNDARIAS | MUESTRAS DE PRUEBAS DE USO-PRECLÍNICO |
|--|--|---|
| Cito toxicidad | Prueba de irritación de la membrana mucosa | Irritación de la pulpa |
| Hemólisis | Toxicidad dérmica a partir de exposiciones repetidas | Recubrimiento de la pulpa (incluyendo pulpotomía) |
| Ames | Implantación subcutánea en guinea pigs | Prueba de uso endodóntico |
| Prueba de Styles para transformaciones celulares | Implantación en hueso de guinea pigs | Implante dental |
| Elemento letal dominante | Sensibilización (en guinea pigs) | |
| Prueba oral LD-50 (prueba para toxicidad sistémica aguda por vía oral) | | |
| IP-LD-50 (prueba sistémica aguda por la vía IP) | | |
| Prueba de inhalación aguda | | |

Tabla 2.- Pruebas de valoración pre-clínica sugeridas para los materiales de uso dental, según el documento: "Recommended Standard-Practices for biological evaluation of Dental Materials" . Stanley, Harold R. *Toxicity Testing of Dental Materials*, 1990.

MATERIALES DENTALES TIPO II: MATERIALES PROTÉSICOS

| CLASE 1 | CLASE 2 | CLASE 3 | CLASE 4. | CLASE 5. |
|------------------------------------|--|---|------------------|----------------------------|
| Materiales para impresiones | Ceras y materiales para bases de placas | Materiales para aparatos protésicos | Implantes | Protectores bucales |
| Hidrocoloides y alginatos | | Aleaciones de metales preciosos | Metálicos | Protectores bucales |
| Bases de hule | | Aleaciones de metales bajos | Cerámicos | |
| Yesos | | Materiales para reparación y confección de bases para dentadura | De carbón vítreo | |
| Ceras y otros compuestos afines | | Dientes artificiales | | |
| Óxido de zinc-eugenol | | Revestimientos para coronas y puentes | | |
| | | Materiales para recubrimientos | | |

Tabla 3.- Materiales dentales clasificados según su empleo y denominados como TIPO II. MATERIALES PROTÉSICOS. (Council of Dental Materials, Instruments and Equipment, ADA/ANSI, 1989)

1.2. DEFINICIÓN DE TERMINOS SOBRE LA BIOCOMPATIBILIDAD.

La palabra biomateriales puede ser definida en dos formas: como materiales biológicos de sitios comunes tales como los tejidos, o como cualquier material que reemplaza la función de los tejidos vivos u órganos (Bu Park, J., 1988). En términos más específicos, "*un biomaterial es una sustancia sistémica y farmacológicamente diseñada para la implantación o incorporación dentro de un sistema viviente*" (Williams, DF, 1987). Esta definición señala claramente a los biomateriales como materiales de implante, mientras que el empleo convencional del prefijo *bio* es algunas veces violado; por ejemplo, la *bioquímica* y la *biofísica* se refieren al estudio de los materiales biológicos más que los materiales manufacturados por el hombre. Para evitar confusión, el término biomateriales se referirá a los implantes que reemplazan o restauran tejidos vivos y sus funciones. A partir de esta definición de biomateriales [implantable] (Bu Park, J. 1988).

Ante la existencia de términos aparentemente bien definidos en la literatura, como los que se relacionan con el comportamiento biológico de los materiales, es posible enfatizar las interacciones existentes de los materiales y los sistemas vivos en un marco conceptual relativo, más que absoluto. Esto sugiere la necesidad de establecer un sistema graduador basado en los resultados de las pruebas que se realizan, haciéndose indispensable definir términos adicionales que expliquen los eventos y los participantes en la colocación de un biomaterial. Estos términos se definen a continuación:

Material de Referencia o Control: Es un material que por pruebas estándar, ha sido determinado para provocar una respuesta reproducible y cuantificable en el material o huésped.

Esta definición no lleva alguna implicación de "buen" o "mal" comportamiento por parte del material. Un material de referencia debe ser un material que cause una respuesta mínima del huésped (una

referencia negativa) o una respuesta extrema del huésped (una referencia positiva). Los materiales de referencia pueden o no ser seleccionados de aquéllos convencionalmente usados para la fabricación de materiales (Black, J. 1992).

El término **biocompatibilidad** surge de un reconocimiento de las diferencias profundas entre los tejidos vivos y los materiales no vivos. En ambas perspectivas la histórica y la práctica, estamos conscientes del amplio rango existente en el comportamiento interactivo entre los tejidos y materiales. En una de estas interacciones también se observan ambos efectos benéficos y dañinos. Así, los materiales que se consideran como alimentos y bebidas, pueden ser nutritivos o no. Desde otro punto de vista, ellos pueden ser considerados también como tóxicos o no tóxicos (ej., el alcohol). Tales juicios son relativos al uso o abuso más que a una escala absoluta.

Como fue mencionado en párrafos anteriores los biomateriales son sustancias de origen natural o hechos por el hombre, y son usados para dirigir, suplir o reemplazar las funciones de los tejidos vivos. Cuando estos materiales provocan una respuesta biológica mínima, ellos vienen a ser llamados **biocompatibles** (Black, J. 1992).

El término **biocompatible** como se usa comúnmente es inapropiado y defectuoso de contenido. Compatibilidad es estrictamente la cualidad de interacción en armonía. Esto es, la etiqueta "biocompatible" sugiere que el material descrito muestra comportamiento armónico o "bueno" universalmente en contacto con tejidos y fluidos tisulares (Black, J. 1992).

Mas aún, las ideas tradicionales de biocompatibilidad se refieren esencialmente al efecto del material en un sistema biológico. Los efectos de procesos biológicos en los materiales son raramente incluidos en el significado, a pesar de que los resultados de los cambios del material causan un cambio en la respuesta biológica. Los efectos del sistema biológico en el material son usualmente colocados en el término **biodegradación**, este término implica "mal" comportamiento.

Podría pensarse que esto es una discusión semántica sin ningún contenido. Por el contrario, la terminología utilizada y la afirmación inherente en esa terminología, tiende a condicionar la aproximación tomada tanto en análisis como experimentalmente. De este modo, la aproximación más común para establecer la biocompatibilidad de un material es determinar la ausencia de efectos deletéreos debidos a su uso en aplicaciones biológicas. Una vez que tales pruebas son completadas, el material es considerado como calificado (**qualified**). Se puede argumentar que la naturaleza absoluta del lenguaje empleado ha llevado al uso de criterios absolutos, lo que hace que en algunas ocasiones no se consideran completamente todos los factores que participan para determinar la biocompatibilidad de un material [Tabla 4] (Castaño, V.M. 1994).

Sin embargo, el uso del término biomaterial en aparatos quirúrgicos y médicos no es absoluto, sino que es más relevante desde el punto de vista del diseño del aparato y la selección del material, que el propósito para lo cual es desarrollado.

El término real de biocompatibilidad no es cuando hay reacciones adversas a un biomaterial, sino cuando ocurre el funcionamiento satisfactorio del material, en el propósito y el medio en que se intenta utilizar. Esto debería llevar directamente a que en el proceso tradicional de diseño en ingeniería biomédica, se consideraran las ventajas y desventajas inherentes en la selección de un material particular para el diseño en una aplicación específica.

Tabla 4.- MEDIADORES DE LA BIOCMPATIBILIDAD

1.- EL MATERIAL

- Composición química global
- Composición química, rugosidad, energía y carga eléctrica de la superficie
- Estabilidad química
- Química de los productos de degradación
- Características físicas de los productos de degradación

2.- EL UTIL

- Tamaño
- Forma
- Módulo elástico y rigidez

3.- EL HUÉSPED

- Especie animal
- Tipo de tejido y localización
- Edad y sexo
- Estado general de salud
- Régimen farmacéutico

4. EL SISTEMA

- Técnica operativa
- Unión implante-tejido
- Infección

DESEMPEÑO BIOLÓGICO (*BIOLOGICAL PERFORMANCE*)

Debe adoptarse el término desempeño biológico como un concepto útil para describir los materiales, con la finalidad de reemplazar la idea presente de biocompatibilidad. Entendiendo el desempeño biológico como la serie de eventos resultantes de la interacción entre los materiales y los sistemas vivientes. A este concepto se relacionan estrechamente los siguientes terminos:

RESPUESTA DEL HUÉSPED: Es la respuesta local o sistémica, que es otra diferente de la respuesta terapéutica intentada.

RESPUESTA DEL MATERIAL: Es la respuesta estructural, de composición o de superficie del material a los sistemas vivientes.

Respuesta del Huésped

Comportamiento Biológico

Respuesta del Material

Es importante tomar en consideración que la biocompatibilidad como se mencionó anteriormente no solamente es la característica que tiene un material para ser utilizado en humanos (Bu Park, J. 1988), sino es la habilidad de un material para cumplir satisfactoriamente una aplicación específica, con una respuesta apropiada, lo que ya se ha definido como comportamiento biológico o *biological performance*. Como éste depende de las características de material y del efecto que el huésped tiene sobre el mismo, debemos considerar que el material debe tener la capacidad de cumplir satisfactoriamente su función, este desempeño que se entiende como *biofunción* del material (Castaño, V. 1994) debe contener las siguientes características:

- Transmisión de cargas y distribución de tensiones
- Articulación (Baja fricción)
- Relleno de espacios
- Generación y aplicación de estímulos eléctricos
- Transmisión de luz
- Transmisión de sonidos
- Transporte y emisión de drogas
- Regeneración guiada de tejidos

En los biomateriales que son diseñados para utilizarse como sustitutos o reparadores de lesiones óseas, el comportamiento en el medio interno del huésped esta encaminado a que además de no desencadenar una respuesta celular inflamatoria exagerada, sea capaz de inducir un comportamiento en el medio interno que permita cumplir su *biofunción*, que en este caso será la biomineralización (McConnell D., 1970), la cual ocurre siempre sobre sustratos macromoleculares que imponen una nucleación orientada, por lo tanto debe existir algún tipo de "*reconocimiento molecular*" entre la química superficial del sustrato y la organización cristalina del depósito (Castaño, V. 1994).

1.3. MODELOS ANIMALES EMPLEADOS EN PRUEBAS DE BIOCOMPATIBILIDAD

Después del análisis de los materiales por técnicas químicas, físicas y biológicas *in vitro*, es la práctica establecida probar los materiales de implante nuevos en modelos animales durante diferentes periodos de tiempo. Aunque se han reconocido muchas de las limitaciones de las especies no humanas (*non-human testing species*), es el juicio común que tales pruebas involucran la exposición de materiales nuevos a procesos sistémicos fisiológicos, y que son un precedente indispensable para llegar a las pruebas clínicas en humanos.

En la literatura se menciona que las pruebas de biocompatibilidad pueden ser agrupadas en dos grandes categorías, cada una de ellas llevan implícitas las utilidades y los resultados que se obtienen al realizarlas. A continuación de describen cada una de las categorías.

TIPOS DE PRUEBAS.

Pruebas o Tests No Funcionales.

Las pruebas no funcionales, están caracterizadas porque el implante es de una forma y tamaño arbitrarios, quizá en la forma requerida para pruebas mecánicas posteriores de respuesta del material, y se encontrará "flotando" pasivamente en el sitio del tejido donde se le ha implantado. El prototipo para tales pruebas fue popularizado por Ferguson *et.al.* (1960). Ésta consistía de una implantación supra espinal en el dorso del conejo, seguida por un período de observación de 16 semanas. Esta serie de pruebas formaron las bases para establecer el protocolo de consenso nacional que se utiliza ahora en los Estados Unidos, el método F981 de la Sociedad Americana para Pruebas y Materiales [American Society for Testing and Materials, ASTM, 1990] (Lemons, J. *et.al.* 1986).

El otro tipo de pruebas son llamadas funcionales, en ellas el objetivo fundamental para realizarlas se enfoca a conocer las

interacciones directas entre la sustancia del material y la química y las especies biológicas del medio ambiente del implante. La ausencia de cargas mecánicas y otros elementos de función limitan la utilidad de tales pruebas. De esta manera, ellas tienden a ser de corta duración, usualmente de unos cuantos meses hasta los 24 meses en duración.

Un típico estudio de corta duración (*short-term*) de este tipo es el descrito en el método BS 5736 del Instituto de Estándares Británico [British Standards Institute], parte 2 (1981). Este protocolo de prueba utiliza tiras de material de 1X10 mm. con controles positivos y negativos implantados por incisión y disección roma en músculo para-vertebral (supra-espinal) del conejo, y recuperado por sacrificio después de 7 días. De este modo, aunque siendo un método *in vivo*, evalúa únicamente, la respuesta aguda del tejido blando. En otro estudio, Turner *et.al.* (1973) ha mostrado que tal modelo de 7 días, es capaz de producir falsos negativos, ya que produce falsos no positivos (cuando se compara con la respuesta local del huésped a 12 semanas). De este modo justificando el uso de este modelo para ensayos agudos *in vivo*. Para examinar más completamente los efectos de la fisiología sistémica en el material y la respuesta del huésped, mediante un estudio de larga duración (*long-term*) de estos materiales, es indispensable que inicialmente pasen por un estudio de corta duración.

El F 981 (ASTM, 1990) ilustra el típico curso de un estudio de larga duración (*long-term*). En este protocolo se utilizan implantes fabricados con tamaño estandarizado del material en cuestión, así también como uno o más materiales controles bien caracterizados. Los controles son seleccionados para acercarlos al radio estándar SA/BW de los parámetros de implantación en el hombre, por lo menos para sitios de tejido blando. En el método se utiliza sitios de músculo en la rata, conejo, y perro, así como sitios limitados intramedularmente en los dos últimos animales, si está indicada por el propósito de la investigación. Las ratas son mantenidas y sacrificadas periódicamente hasta las 26 semanas, los conejos y los perros a las 104 semanas. La evaluación consiste primeramente en inspección de los implantes prueba y control, y de los sitios de implantación.

Al momento no existen materiales controles disponibles universalmente para el protocolo F 981. El método especifica el uso de varios metales y un polímero que tienen una larga historia de evaluación experimental y uso clínico humano. Sin embargo, las variaciones individuales en composición, propiedades de superficie, etc., en estos materiales hace difíciles las comparaciones inter-pruebas. Hay un interés considerable en el desarrollo de controles negativos poliméricos y metálicos que puedan estar disponibles a través de un programa tal como el **Standard Reference Material** que es un programa administrado por el Instituto Nacional de Estándares y Pruebas de los Estados Unidos [National Institute of Standards and Testing, NIST].

Existen defectos principales reconocidos en el diseño y práctica de F 981. Sin quitar su fuerte posición como un método que provee de resultados estandarizados que pueden ser comparados con otros (Escalas, *et.al.*, 1975) aún cuando son utilizadas variantes del método; estos logros deben ser reconocidos, ya que como se mencionó en el tipo no funcional, el implante es de una forma arbitraria, quizá en la forma requerida para pruebas mecánicas posteriores de respuesta del material, y "flota" pasivamente en sitio del tejido. A diferencia de las pruebas no funcionales, las cuales se enfocan en las interacciones directas entre la sustancia del material y la química y las especies biológicas del medio ambiente del implante. La ausencia de cargas mecánicas y otros elementos de función limitan la utilidad de tales pruebas, que como se mencionó, tienden a ser de corta duración, usualmente de unos pocos hasta 24 meses de duración.

Con la excepción de los materiales que tendrán aplicación en el sistema cardiovascular, el sitio elegido para las pruebas no funcionales es usualmente el tejido blando. Esta decisión esta basada al asumir que los efectos citotóxicos tienen una generalidad de acción y porque los sitios de tejido blando en animales pueden ser alcanzados con cirugía relativamente menor. Por la misma razón, la cavidad peritoneal ha sido usada para estudios agudos *in vivo* (Wortman *et.al.*, 1983). Para las aplicaciones de reemplazo de articulación o fijación de fractura, la implantación es también realizada en el hueso cortical. Los sitios

especializados como la córnea son usados para materiales no específicos, con aplicaciones limitadas.

Los roedores, aún siguen siendo considerados en las pruebas multi-especies, que aunque son raramente utilizados como único modelo de estudio, se han determinado una variedad de sitios que por su localización y resultados obtenidos han llegado a convertirse en los más populares, y que a continuación se mencionan (Black, J., 1992):

- 1.- Subcutáneo
- 2.- Intramuscular (ej. supraspinatus)
- 3.- Intraperitoneal.
- 4.- Transcortical (ej. fémur)
- 5.- Intramedular (ej. fémur y tibia).

Las pruebas funcionales requieren de un amplio rango de especies debido a los requerimientos del material o configuración del aparato seleccionado. Ninguna especie única presenta un modelo general para la especie humana y algunas funciones estructurales.

1.4.-MATERIALES DE SUSTITUCIÓN Y REPARACIÓN ÓSEA.

Desde tiempos lejanos existen relatos confirmados que señalan una amplia gama de materiales empleados para reemplazar el hueso o los dientes perdidos, la variedad incluye dientes humanos extraídos, productos de madera, rocas ígneas, marfil, hueso seco, oro, alambres de oro, aleaciones de plata y otras sustancias tales como dientes de morsa, y hasta colmillos de elefante (Lemmons, J. & Natiella, J., 1986). En la actualidad los materiales que se utilizan para sustitución y reparación ósea se pueden clasificar dependiendo de su composición química, del espectro de aplicación clínica, y también por sus propiedades mecánicas y fisicoquímicas. En la tabla numero 5, se describen los materiales empleados en la reparación, aumento y sustitución ósea (Le Geros, R.Z., 1988).

El área de utilidad de estos biomateriales se ha ampliado en relación directa a las necesidades surgidas durante la evolución de las ciencias médicas y a la posibilidad de crear mejores condiciones reconstructivas, es decir, actualmente pueden ser aplicados como reemplazos totales de articulaciones como en el caso de la cadera y la rodilla; en los procedimientos de aumento de reborde óseo en la cirugía pre-protética; en la sustitución y reparación en las áreas de cirugía oral, ortopédica, reconstructiva, craneal, mandibular y maxilar; en la reconstrucción ocular y del oído (Kent, J.N., Jarcho, M., 1986; Williams, D.F., 1987; Ferrone, P.J. & Dutton, J.J., 1992).

La utilización de materiales y compuestos para el tratamiento de las lesiones óseas, se fundamenta en el estudio detallado que de ellos se han realizado en modelos *in vivo* de animales de laboratorio, que con el tiempo han permitido su aplicación a sistemas en seres humanos. El interés por el desarrollo de tales materiales no representa una novedad en el área médica, debido principalmente a que es creciente la demanda de alternativas que libren los problemas que hay con los materiales actuales, estas consideraciones son una muestra clara que la ciencia de los biomateriales está en plena etapa de desarrollo.

Tabla 5. Materiales de reparación, aumento y sustitución ósea.

| MATERIALES | APLICACIONES |
|--|---|
| <i>1. Biomateriales Naturales</i> | |
| a) Hueso autógeno y alógeno | Defectos óseos craneales, maxilofaciales; aumento del reborde alveolar, cirugía ortopédica. |
| b) Matriz ósea desmineralizada | Defectos óseos craneales y mandibulares, otras reconstrucciones óseas |
| c) Coral (Biocoral) | Defectos óseos |
| d) HA coralina (Interpore 200 y 500) | Dental, Ortopedia. |
| e) Hueso bovino (Kiel Bone, Surgibone) | Dental, Ortopedia |
| <i>2. Vidrios Bioactivos</i> | |
| Cerámicos (Bioglass, Ceravital) | Implantes óticos, reconstrucción maxilofacial, implantes dentales , cubierta de defectos óseos para implantes metálicos |
| <i>3. Materiales de Fosfato de Calcio (Osteograft)</i> | |
| <i>4. Óxidos Cerámicos (Alumina, Zirconia)</i> | Prótesis ortopédicas, implantes dentales, cubiertas de implantes dentales, cubierta para implantes metálicos |
| <i>5. Polímeros</i> | |
| Reabsorbibles y no reabsorbibles (HTR) | Componente de prótesis ortopédica, reconstrucción maxilofacial, implante ótico, cemento óseo, aplicación dental |
| <i>6. Metales y Aleaciones</i> | |
| a) Co-Cr-Mo-Ni (Vitalium) | Prótesis ortopédica |
| b) Acero inoxidable | Prótesis ortopédica |
| c)Ti y Ti-6Al-4V | Prótesis ortopédica, implantes dentales |

Le Geros, R.Z, *Calcium Phosphate in Oral Biology*, 1991.

Para comprender la función y el comportamiento de cada uno de los materiales utilizados como implante, es indispensable conocer que se establece una relación directa del material con los tejidos del huésped, en la cual el resultado final dependerá de tres cualidades que son inherentes a la composición química, características estructurales, mecánicas y físicas del material. A continuación se definen estas cualidades.

Potencial Osteoconductor: Es la capacidad del material para permitir que a través de su estructura exista proliferación celular y capilar, ocurre con el crecimiento de capilares en un nuevo tejido conectivo. El enrejado o malla provisto por el injerto puede ocurrir con los materiales sintéticos debido a su configuración espacial porosa. Con los injertos de hueso, este proceso es seguido por resorción simultánea de hueso no vital, y la deposición de nuevo hueso lamelar (Genco, R.J., 1990) ; los materiales con esta cualidad no forman hueso en sitios no óseos (Meetsger, D.S., Driskell, T.D., & Paulsrud, J.R., 1982)

Potencial Osteoinductor: Es el efecto que ocurre cuando uno o más tejidos de diferente naturaleza o propiedades, se asocian íntimamente, dando por resultado una alteración en el curso del desarrollo de los tejidos (Genco, R.J., 1990); es decir, el material contiene características de composición mineral o estructural que provocan que las células del huésped formen hueso como respuesta a la presencia del material mismo..

Potencial Osteogénico: Es el efecto que causa que el material de implante forme hueso a partir de sí mismo, esto ocurre cuando las células del injerto sobreviven el traspaso y contribuyen al proceso de reparación. Aunque es la característica ideal que debe poseer cualquier material, existen pocas evidencias de que esto ocurra en los injertos periodontales, ya que la mayoría de las células del injerto aparecen como no viables en estudios histopatológicos subsecuentes (Genco, R.J., 1990).

Los materiales de injerto óseo se pueden agrupar en tres categorías generales:

- **Autoinjertos**, estos son obtenidos de un sitio óseo donador en el mismo sujeto.
- **Alloinjertos**, son obtenidos de un sujeto diferente, dentro de la misma especie.
- **Aloplástico**, estos son de materiales sintéticos, cuyo recurso puede ser de origen natural o completamente sintético.

En cuanto a la superficie de los materiales y la adherencia o interfase que se forma entre el implante y el hueso, los materiales son descritos como **bioactivos** o **bioinertes**, los materiales **bioactivos** permiten la formación de los tejidos normales (hueso nuevo) en sus superficies y forma una unión fuerte y contigua a la interfase material/hueso (Hench, L.L., 1991). Los materiales de compuesto de fosfato de calcio, materiales derivados de hueso bovino y vidrios cerámicos de composición específica son bioactivos, pero no osteoinductivos. Mientras que algunas aleaciones y metales, óxidos de cerámicas y polímeros son descritos como **bioinertes**. A continuación se describen los materiales de injerto de acuerdo a su composición, propiedades fisicoquímicas y su comportamiento *in vivo*.

1.4.1 Derivados de Hueso.

Debido a su arquitectura y composición, tiene propiedades mecánicas únicas. Macroscópicamente, hay dos tipos de hueso: el hueso compacto y el esponjoso. El hueso compacto es microporoso, mientras que el esponjoso o cancelar es macroporoso. El hueso cortical es el material más indicado porque es menos antigénico que el esponjoso (Friedlaender G., & Strong, S. K , 1987), y presenta una concentración mayor de proteínas generadoras de hueso (Urist M, et.al, 1970). El

hueso es un compuesto integrado íntimamente de fases orgánicas e inorgánicas en el radio aproximado de orgánico/inorgánico de 25/75 por peso o 35/65 por volumen. Las fases orgánicas consisten principalmente de colágena tipo I y cantidades más pequeñas de proteínas no colágenas, glicoproteínas ácidas, proteínas séricas y pequeños proteoglicanos, la fase inorgánica ha sido idealizada como Hidroxiapatita [HA], $(Ca_{10}[PO_4]_6[OH]_2)$. Con base en estudios realizados, se ha determinado que el hueso es una apatita-carbonato, asociado con constituyentes menores tales como el sodio, magnesio, cloro, fosfatos y fluoruro, y algunos constituyentes tales como estroncio, plomo, zinc, cobre y hierro, con un radio molar de calcio/fosfato (Ca/P) por abajo o arriba del valor estequiométrico de 1.67 de la HA pura, dependiendo de la edad y especie del sitio donador.

Numerosos reportes en la literatura dan cuenta de la composición mineral de los tejidos duros, existen evidencias que muestran que el principal constituyente es la Hidroxiapatita $(Ca_{10}[PO_4]_6[OH]_2)$, aunque también existe una variedad de sales de fosfato de calcio que están presentes en estadios tempranos o tardíos del desarrollo del tejido duro (Newman, W.F., & Newman, M.W., 1958), los compuestos son: el fosfato octocálcico $(Ca_8H_2[PO_4]_6 \cdot 5H_2O)$, monetita $(CaHPO_4)$, brushita $(CaHPO_4 \cdot 2H_2O)$, y compuesto de fosfato de calcio amorfo (Williams, D.F., 1981).

La caracterización fisicoquímica mineral de los materiales sintéticos de fosfato de calcio y el hueso, muestran que son similares en composición en los términos de tener iones calcio y fósforo como constituyentes principales, sin embargo las diferencias son notables en el radio Ca/P, el tamaño y forma de los cristales, propiedades mecánicas. Mientras que los vidrios cerámicos, los polímeros y los metales tienen propiedades fisicoquímicas totalmente diferentes a las del hueso.

HUESO AUTOGENO.-El hueso es una excelente fuente de recursos para sustituir o regenerar hueso perdido, cuando se obtiene de la misma persona se denomina Hueso Autógeno, su potencial

osteogénico es alto, aunque cuando se utiliza en defectos óseos periodontales se ha demostrado que la respuesta puede ser resorción del injerto, su potencial para formar hueso no es predecible. Su principal desventaja es la de requerir dos intervenciones quirúrgicas, para obtener el hueso de sitios intraorales (sitios de extracción reciente, rebordes desdentados) o extraorales (hueso iliaco, tibia).

HUESO SECO CONGELADO- En algunas ocasiones el hueso que se utiliza para injerto se obtiene de otra persona diferente al que lo va a recibir, en ese caso se le llama heteroinjerto, en la preparación de este biomaterial es necesario contar con donadores que cumplan con un perfil determinado en sus antecedentes médicos y sociales. El material colectado se procesa en dos formas distintas, en una de ellas se fragmenta en partículas de 500μ a 5 mm. y se sumerge en alcohol etílico al 100%, y al final se almacena en congelación durante el tiempo indispensable para analizar los resultados de cultivos bacterianos, pruebas serológicas y ensayos de anticuerpos y antígenos directos. Si hay contaminación se elimina el hueso o se esteriliza mediante sistemas de radiación gama o de gas de óxido etileno. Realizadas las pruebas de esterilización, se muele el hueso para obtener partículas de 250 a 725μ m y se prepara para mantenerlo congelado a una temperatura de -80°C hasta el momento que se le requiera, en tal caso se le denomina como **Hueso Seco Congelado (HSC)**, lo que significa que conserva su estructura y su constituyente mineral (Mellonig, J.T., 1990).

Otra forma de procesar el hueso es que a diferencia del anterior, se le descalcifica en HCl 0.6 N con la finalidad de eliminar el calcio y conservar la estructura ósea y así dejar expuesto lo que se conoce como proteína morfogenética (Urist M.R., Strates B.S., 1971; Glowacki J. et.al., 1981), que será la encargada de inducir la formación de hueso a partir de las células del huésped, además de tener rápida resorción, este material logra la incorporación al nuevo hueso; a este tipo de material se le llama **Hueso Seco Congelado Descalcificado (HSCD)**. El potencial osteoinductor del **HSCD** es mayor que el no descalcificado. Entre las desventajas que se mencionan de estos materiales, existe el riesgo de adquirir enfermedades transmisibles (SIDA, hepatitis) (Friedlan G, Klein

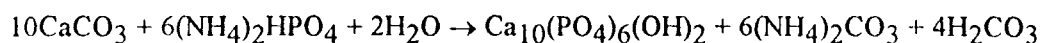
R, 1987), además que los bancos de tejidos que procesan estos materiales son caros, y no siempre están disponibles.

El hueso como biomaterial, también puede ser procesado de especies animales diferentes al hombre, en ese caso se le llama **Xenoinjerto**, la fuente más utilizada es el hueso bovino, desde 1966 los resultados hacen énfasis en que existe nueva formación de hueso debido al potencial osteoinductor de este material, aunque estudios de espectrografía infrarroja demuestran la presencia de fases orgánicas, lo cual pudiera actuar como antígeno, provocando una respuesta adversa a la que se espera. En la actualidad existen varios productos comerciales (Surgibone, Kielbone); algunos otros se encuentran en fase de experimentación, los resultados son buenos, aunque su disponibilidad es limitada sólo a ciertos países (Ueno Y, Hima Y, Akiyama T, 1987).

1.4.2. MATERIALES OBTENIDOS DE RECURSOS NATURALES.

Las dificultades quirúrgicas y las desventajas para obtener cantidades suficientes de hueso humano o animal para ser utilizado como injerto, llevaron a los investigadores a buscar otras fuentes teniendo en mente la estructura tridimensional del hueso, se observó que la estructura esquelética de ciertos corales se podían utilizar como moldes para hacer investimentos de compuestos de fosfato de calcio. White y colaboradores (1975) desarrollaron el proceso replamineforme para duplicar la microestructura de los corales con resultados de un alto grado de uniformidad en el poro; el género de coral más prometedor, la *Porita*, tiene poros con un rango de tamaño de 140 a 160 μ , con todos los poros interconectados. Otro género interesante, *Goniopora*, tiene un tamaño de poro más grande, entre 200 y 1000 μ (White E., Shors E.C., 1986). La composición química básica de los corales es identificada como fases minerales de carbonato de calcio en forma de aragonita (10CaCO₃) asociada con matriz orgánica (Roy, D M., Linnehan, S.A., 1974). La estructura tridimensional de estos organismos muestra tener poros interconectados, lo cual le confiere potencial osteoconductor (Chiroff, R.T., White, E.W., Weber, J.N. & Roy, D.M., 1975; Marquis, P. & Wilson, H.J., 1986).

Con esta idea en mente los investigadores desarrollaron la **Hidroxiapatita coralina [HAc]**, la cual es derivada del coral y se encuentra ampliamente disponible, aunque su precio no sea muy económico. El coral es procesado para remover el componente orgánico y conservar la estructura porosa de su esqueleto. Mediante un proceso hidrotérmico la fase cristalina del carbonato de calcio [aragonita, (10CaCO₃)] es convertida en apatita [OH-apatita] según la reacción química ideal (Roy, D.M., Linnehan, S.K., 1974) que se representa como sigue:



Este método conserva la porosidad original del coral, que es similar a la del hueso (Tencer, A.F., Shorts, E.C., Woodard, P.L., & Holmes, R.E., 1990). La utilidad de éste biomaterial se encuentra bien documentada en cirugía reconstructiva y en varias aplicaciones dentales (Technical Data Interpore 200, 1987; Tencer, A.F., *et.al.*, 1990). En los análisis de difracción de rayos X y de Infrarrojo se encuentra que la HAC no es hidroxiapatita pura, sino que son fases cristalinas de apatita- CO_3 mezcladas con pequeñas cantidades de beta fostato tricálcico con sustitución de Mg (β -FTC), sin embargo el mecanismo de sustitución del Mg en la HA coralina es diferente de la que ocurre en la apatita del hueso (LeGeros R.Z., 1981, Le Geros R.Z., 1991). La HA-coralina difiere de la HA cerámica (sintética) en los parámetros de enrejado (Lattice parameters) debido a la sustitución del grupo OH por el CO_3 , la cristalinidad que es determinada por el método de preparación, y en su composición (CO_3 -AP + β -FTC sustituido con Mg vs HA) (LeGeros, R.Z., 1987), lo cual podría explicar la mayor reactividad observada en la HA-coralina comparada con la HA-cerámica *in vitro* (LeGeros, R.Z.,1988).

Otro producto derivado de los corales es el **Biocoral** (Inoteb Laboratories, Francia), según los fabricantes, su composición química es de más del 97% de carbonato de calcio en la forma de aragonita (10CaCO_3). Al igual que la HA coralina, la fuente natural de obtención del coral es esqueletos de madreporitas con disposición espacial tridimensional, poros interconectados con promedio de diámetro de $150\ \mu$, y ausencia de materia orgánica. La particularidad de este biomaterial es que a diferencia del Interpore, al Biocoral no se le lleva al proceso hidrotermal para lograr el intercambio químico de los grupos funcionales, sino que se le prepara únicamente con la eliminación de la materia orgánica, y esterilización con radiación y para ser utilizado en esa forma en humanos (Irigaray, J.L., *et.al.*,1990). El desarrollo experimental del material se inició en 1977 con el estudio *in vivo*, probándolo en diferentes especies animales. En 1978 se permitió su uso en el área clínica veterinaria, y en 1979 se aplicó en humanos, demostrando a la fecha que la aplicación clínica en Europa está bien fundamentada, ya que se mencionan resultados satisfactorios,

interpretándolos como histocompatibilidad y biofuncionalidad, es más, se dice que al ser implantado en hueso, este biomaterial se resorbe gradualmente y el sitio que ocupaba progresivamente es remplazado por hueso nuevo (Guillemin G, *et.al.*, 1987). Aunque tiene amplia utilidad clínica en países europeos, los resultados clínicos y de laboratorio lo ubican aún como un material cuyo destino biológico no ha sido investigado lo suficiente (Vivek S., Han T.H., 1991).

La búsqueda de recursos naturales que sirvan como medio para desarrollar materiales de sustitución ósea, llevó a un grupo de investigadores europeos a la síntesis de un biomaterial cuyo origen es una variedad de algas marinas. El Algipore [Ronvig A/S, Dagaard, Dinamarca] (Kasperk C., Ewers R., 1986; Kasperk C., Ewers R., Simons B., *et.al.*, 1988), es un producto disponible en países europeos, procesado a partir de algas marinas, aunque la información disponible en la literatura es escasa, su desarrollo ya está en etapa de aplicación clínica.

1.4.3. MATERIALES SINTÉTICOS.

Este grupo de materiales representa el verdadero trabajo que han tenido los investigadores en los últimos tiempos, ya que en su desarrollo han empleado materiales de muy diversa naturaleza, aunque a fin de cuentas los más estudiados son los compuestos de fosfato de calcio. Desde 1920 fue reportado un compuesto descrito como "fosfato de calcio triple" como promotor de formación de hueso nuevo cuando era aplicado en un defecto óseo (Albee, F.D.H., 1920). En el grupo de los materiales sintéticos la naturaleza química de los mismos funciona como parámetro para dividirlos en subgrupos, de esta manera se incluyen vidrios bioactivos, compuestos de fosfato de calcio, óxidos cerámicos, polímeros, metales y aleaciones de los mismos.

COMPUESTOS DE FOSFATO DE CALCIO.- Este grupo contiene materiales que tienen mayor utilidad y aplicación como recursos terapéuticos (Tabla 6). En la mayoría de los casos, un polvo de fosfato de calcio que puede ser obtenido comercialmente o preparado en el laboratorio, es el material inicial del cual puede ser hecho un implante, algunos de los métodos se fundamentan en hacer torundas o bolitas (pellets) del polvo y agua, o mezclarlo con suero o colágena para dar consistencia a la masa; sin embargo, la integridad mecánica de estos compuestos es inútil en la práctica clínica (Williams, D.F., 1981). El método de sinterización marca un límite riguroso en cuanto a los productos obtenidos con esta técnica cuando se les compara con los otros métodos. Este método consiste, brevemente, en preparar una pieza cerámica del material a partir de una mezcla del polvo de fosfato de calcio y el solvente, que generalmente es agua, darle la forma deseada adecuada y llevarlo a una cámara térmica para promover el secado. Cuando se obtiene la pieza con características que se denominan de "green body" o de cuerpo verde, se incrementa la temperatura para que se fusionen las partículas, y de esta manera se obtiene un material de consistencia firme que es lo que conocemos como el Biomaterial (De Groot, K., 1981; Hench, L.L. 1991). Existen variantes de esta técnica en

las que utilizan peróxido de hidrógeno como solvente (Rejda, B.V., et al., 1977); otros embeben una microestructura esquelética con cera, eliminan la estructura con ácido y así obtienen una réplica en cera; otros en lugar de cera utilizan esferas de naftalina. La finalidad de estas modificaciones es la creación de espacios entre las partículas de la masa, dándole una estructura porosa de al menos 100μ . (Dunn, E.J. & White, E.W., 1976; Jarcho M., 1986; Arita I., Wilkinson D., Mondragón & Castaño V., 1994).

Tabla 6.- Productos comerciales de fosfato de calcio en uso actual.

Cerámicas de fosfato de calcio

1. Hidroxiapatita de calcio, $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, HA:
(productos comerciales: Calcitite (Calcitek, Inc); Periograf, Alveograf (Cook-Waite), Durapatite (Cook-Waite), Osteograf/N (CeraMed, Corp.); Orthomatrix (Orthomatrix, Inc.), Allopat (Hcyl, FRG); Bioapatite (Francia))
2. β -fosfato tricalcico, $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$:
(productos comerciales: Synthograf, Augmen (Milter, Inc.)
3. Fosfatos de calcio bifásicos (Mezcla de HA y β -FTC)
(producto comercial: Triosit (Zimmer))

Fosfato de calcio, no cerámico:

(producto comercial: Osteogen (GBD, Implants))

Fosfatos de calcio obtenidos de recursos naturales:

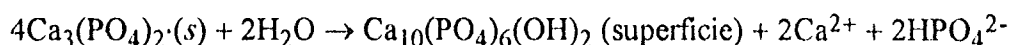
1. HA coralina: Coral (*Porites*) convertidas hidrotérmicamente en HA.
(Producto comercial: Interpore 200 (Interpore Inc))
2. Bio-oss (Sintetizado de hueso bovino)

Es por la importancia y los resultados obtenidos de la técnica de preparación, que los materiales a base de fosfato de calcio se dividen en los sinterizados y los no sinterizados. Los compuestos de fosfato de

calcio disponibles para su aplicación clínica, en la mayoría de los casos son productos etiquetados como "Fosfato Tricálcico", "Hidroxiapatita", "aproximadamente $\text{Ca}_{10}(\text{OH})_2(\text{PO}_4)_6$ ", o "aproximadamente $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ " son actualmente fosfatos de calcio con estructura apatítica y baja cristalinidad, algunas veces mezclada con otras fases de fosfato de calcio como la monetita (CaHPO_4). Otros materiales que actualmente se comercializan como "Hidroxiapatita" son formas de beta-fosfato tricálcico $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ (β -FTC) (LeGeros, R.Z., 1991).

Un ejemplo de fosfato de calcio no sinterizado es un material comercial llamado OsteoGen, el cual es descrito como una "HA resorbible". En análisis de difracción de rayos X de varios lotes de OsteoGen se encontró que no era una HA, sino una apatita de baja cristalinidad o apatita mezclada con monetita (LeGeros R.Z., Daculsi, G., Orly I, Le Geros J.P., 1990).

Las fases estables de las cerámicas de fosfato de calcio dependen considerablemente de la temperatura y la presencia de agua, también durante su procesamiento o el medio ambiente en que se usa. A la temperatura corporal, únicamente 2 fosfatos de calcio son estables en contacto con un medio acuoso, tal como los fluidos corporales; a un pH < 4.2 la fase estable es $[\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}]$ (Fosfato dicálcico, también llamado monofosfato de calcio o brushita, C_2P), mientras que a pH ≥ 4.2 la fase estable es $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ (Hidroxiapatita) [Van Raemdonck, P. *et.al.*, 1984]. Las fases no hidratadas de fosfato de calcio de alta temperatura interactúan con el agua, o fluidos corporales, a 37°C para formar HA (Hench, L.L., 1991a). La HA se forma en superficies expuestas de β -FTC por la siguiente reacción:



De este modo, la solubilidad de una superficie de FTC alcanza la solubilidad de la HA y decrece el pH de la solución la cual posteriormente incrementa la solubilidad del FTC y aumenta la

reabsorción en el cuerpo. La presencia de microporos en el material sinterizado puede incrementar la solubilidad de estas fases (Tencer, A.F., Shors, E.C., Woodard, P.L., & Holmes, R.E., 1990).

El β -fosfato tricálcico tiene una fórmula química ideal de $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ y un radio fosfato a calcio de 1.5, pertenece a la clase de cristales triangulares y exhibe simetría monoclinica en su estructura cerámica a alta temperatura. Mineralógicamente es la Whitlockita (de Groot K., 1981).

La hidroxiapatita es una cerámica con la fórmula química ideal de $[\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2]$ y con un radio fosfato/calcio de 1.67, pertenece a la clase de cristales hexagonales y exhibe el espectro de hidroxiapatita bajo el análisis de rayos-X (Osborn, J.F., Neweseley, H., 1980).

Los compuestos de fosfato de calcio de mayor utilidad clínica son la Hidroxiapatita HA, el fosfato tricálcico FTC, y el fosfato de calcio bifásico. Los productos comerciales anunciados como hidroxiapatita, supuestamente tienen la composición ideal, entre éstos se mencionan al Osteograf, Orthomatrix, y Calcita (Calcitek, USA) [Tabla 6].

Aunque la HA, el FTC y el FCB son los más empleados para los productos comerciales, existen compuestos cerámicos que contienen además otros elementos, además del calcio y fósforo; como fluoruro (fluorapatita), aluminio (aluminato de calcio), azufre (sulfato de calcio), o bien sólo calcio (carbonato de calcio) (Erra, R. 1991).

El Sulfato de calcio (CaSO_4) o *gypsum*, fue el primer material cerámico evaluado como reemplazo de tejido óseo por Dreesman en 1894, en revisiones posteriores se ha concluido que el yeso de París puede ser utilizado segura y convenientemente en una amplia variedad de defectos óseos. La absorción del material ocurre rápido y en un lapso de pocas semanas es resorbido y por lo general se sustituye por hueso. La degradación probablemente no es por vía celular, sino por una simple dilución fisicoquímica de las sales de sulfato de calcio (Williams, D.F.,

1981). De la experimentación clínica se ha observado que es bien tolerado y no causa reacción a cuerpo extraño.

Los carbonatos de calcio (CaCO_3) han sido estudiados esporádicamente; los estudios realizados con este material mostraron que se resorbía y era sustituido por hueso; la Aragonita (10CaCO_3) implantada en tejido óseo de perros, fue degradada después de unos pocos meses y sustituida por hueso (Chiroff, R.T., White, E.W., Weber, J.N. & Roy, D.M., 1975), también otros reportes indican que puede existir comportamiento similar con formas menos definidas de carbonatos de calcio [Calcita (6CaCO_3)]. Como los iones de calcio participan en la composición mineral del hueso, es de esperarse que el carbonato de calcio sea un biomaterial. Chifoff (1975) en sus trabajos experimentales encontró encapsulación, además de aposición de nuevo hueso en la superficie de la aragonita. Su preparación relativamente fácil, además de ser un mineral que se encuentra abundantemente en la naturaleza, puede ser una razón para proponer estudios a futuro. Algunos de ellos ya se han llevado a cabo, como es el caso del Biocoral, biomaterial que fue descrito en la sección anterior.

VIDRIOS CERÁMICOS Y VIDRIOS BIOACTIVOS.- Ciertas composiciones de vidrios, vidrios cerámicos y composites han demostrado que se unen al hueso, se ha denominado como "cerámicas bioactivas". Algunos que tienen composición más especial se unirán a tejidos blandos así como al hueso. Una característica común de las cerámicas bioactivas y los vidrios bioactivos es una dependencia-tiempo, la modificaciones cinéticas de la superficie que ocurre posterior a la implantación. La superficie forma una capa de apatita hidroxicarbonato (HAC) activa biológicamente que es la que provee la interfase de unión con los tejidos. La fase HAC que forma en los implantes bioactivos es equivalente química y estructuralmente a la fase mineral en el hueso (Kokubo, T., 1990; Christel, P, *et. al.*, 1988).

La unión (*bonding*) al hueso fue demostrada primero para un cierto rango de composición de vidrios bioactivos los cuales contenían

SiO_2 , Na_2O , CaO , y P_2O_5 en proporciones específicas. En la actualidad muchos vidrios bioactivos de sílica están basados en la fórmula llamada

"45S5" (significando 45% del peso de SiO_2 , y un radio molar de 5 a 1 de Ca y P).

Gross y colaboradores han demostrado que vidrios de sílica-cerámicas bioactivas (Ceravital) con rango bajo de álcali (0-5% de peso) también se une al hueso, pero que pequeñas proporciones de Al_2O_3 , Ta_2O_5 , TiO_2 , Sb_2O_3 , u ZrO_2 inhiben la unión al hueso (Gross., U.M., Müller-Mai C.M., & Voigt C., 1990). Sin embargo una vitro-cerámica de dos fases sílica fosfato compuesta de apatita [$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH}_1\text{F}_2)$] y cristales wollastonite [$\text{CaO}\cdot\text{SiO}_2$] y una matriz de sílica residual, desarrollada en Kyoto, Japón, es denominada vitro-cerámica bioactiva A/W (A/W glass-ceramic bioactive). Una vitro-cerámica de A/W se une con el hueso y tiene muy alta fuerza de unión interfacial (Kokubo, T., 1990). Adicionando Al_2O_3 u TiO_2 a la vitro cerámica A/W también inhibe la unión ósea, pero incorporando una segunda fase de fosfato, β -whitlockita ($3\text{CaO}\cdot\text{P}_2\text{O}_5$) eso no ocurre (Hench, L.L., Wilson, J. 1991b).

ÓXIDOS CERÁMICOS (Cerámicas inertes).- La alumina de alta densidad y alta pureza (>99.5%) Al_2O_3 , (α -alumina) fue el primer biocerámico ampliamente utilizado para prótesis de cadera, implantes dentales y ortopédicos (Jahnke, K., Plester, D., & Heimke, G., 1982). Combina la excelente resistencia a la corrosión, buena biocompatibilidad, alta resistencia al uso y alta dureza. Mientras que algunos implantes dentales son cristal zafiro sencillos, la mayoría de los aparatos de Al_2O_3 , son granos policristalinos muy finos de α - Al_2O_3 . Una pequeña cantidad de MgO (0.5%) es usado como ayuda para sinterizar y limitar el crecimiento del grano durante el sinterizado (Hench, L.L., 1991b).

La resistencia a la fatiga, y la dureza a la fractura de la α - Al_2O_3 , policristalina son una función del tamaño del grano y lo que llaman

edad-porcentual de ayuda de sinterización, por ejemplo, la pureza del compuesto base. El éxito a largo plazo en las aplicaciones ortopédicas depende de su micro estructura (tamaño de grano con distribución uniforme, mínima porosidad, y ausencia de inclusiones), geometría del implante, y estado de salud del huésped (Christel, P. *et.al.*, 1988). Otras aplicaciones clínicas de la alumina incluyen prótesis de rodilla, tornillos óseos, proceso alveolar (hueso mandibular) y reconstrucción maxilar, sustituto óseo ótico (oído medio), queratoprótesis (reemplazo de córneas), reemplazo de segmentos óseos, y tornillos, hojas e implantes dentales del tipo poste (Hench, L.L., 1991a).

La zirconia (Zr_2O_3), en su forma estable o parcialmente estable también ha sido recomendada para aplicaciones dentales y médicas (principalmente ortopédicas).

Los óxidos cerámicos, a pesar de ser biocompatibles, no se adhieren directamente al hueso (no son bioactivos).

POLÍMEROS.- La vasta mayoría de los polímeros biomédicos que actualmente son utilizados como cementos, prótesis, aparatos u órganos artificiales son considerados bioestables y se espera resistan la influencia del medio ambiente *in vivo* por el tiempo de vida del aparato o el paciente reteniendo las propiedades necesarias que cumplen las funciones requeridas (Navarro, A. *et.al.*, 1994) En contraste, polímeros biomédicos biodegradable o bioresorbible son diseñados para ser degradados y eliminados del cuerpo por metabolismo normal y procesos fisiológicos sin afectar negativamente los fluidos corporales, tejidos y órganos (Hu, H., Saniger, J., & Castaño, V., 1993). El término "bioestabilidad" comúnmente se refiere a la estabilidad relativa de polímeros biomédicos en el medio ambiente fisiológico como una función de tiempo. Existen tres factores principales que afectan la bioestabilidad/biodegradación de los polímeros biomédicos: (1) la vida de servicio *in vivo* del polímero biomédico o aparato; (2) la pérdida de la función del aparato o prótesis durante la vida de servicio *in vivo*; y (3) la presencia o ausencia de efectos adversos en los sistemas fisiológicos,

por ejemplo, fluidos corporales, tejidos y órganos (Anderson, J.M. 1991).

POLÍMEROS NO RESORBIBLES.- El polietileno de ultra alto peso molecular (por ejemplo, Medpor) es utilizado en reconstrucción maxilofacial, y ha sido ampliamente utilizado como un componente de prótesis de cadera. La Silicona (Silastic), fibras de poliamida (Nylamid), y politetrafluoretileno (Proplast) son usados como cemento óseo. El polimetilmetacrilato (PMMA) es utilizado en la elaboración de cemento óseo (Hailin, H.,1992). En los procedimientos de relleno óseo se encuentra disponible un producto llamado HTR® [Hard Tissue Replacement, HTR Sciences, U.S.] (Leake, D. 1988), éste biomaterial desarrollado por Arthur Ashman (1975, 1988) tiene una base de PMMA cubierto con hidroximetilmetacrilato (HMMA) e impregnado con hidróxido de calcio que cuando es implantado en sistemas vivos tiene un comportamiento adecuado, según Nathanson *et.al.* (1978), y Ashman & Moss (1977); ya que aparentemente no hay rechazo ni evidencia de inflamación crónica causada por el implante, aunque si hay encapsulación y en algunos casos neoformación ósea alrededor del material (Salman, L., Kinney, L.A., 1992).

POLIMEROS REASORBIBLES.- Este grupo de biomateriales incluye compuestos a base de ácidos poliláctico/glicol, ácidos poliamino, polihidroxibutiato, óxido polietileno, eslabones cruzados de colágena/gelatina, poliortoésteres. Las aplicaciones de estos materiales son desde suturas a injertos vasculares, férulas artificiales de ligamento y sistemas para llevar medicamentos en polímeros degradables ambientalmente (Barenberg, S.A., 1991).

METALES Y ALEACIONES.- Es importante hacer notar que este grupo de biomateriales se consideran implantes porque son utilizados para sustituir en algunos casos órganos dentarios, o bien servir de anclaje en soluciones de fracturas, o fijación de prótesis o aparatos biomédicos. Los metales y aleaciones usadas para implantes ortopédicos pueden ser clasificados como (a) cromo-cobalto, (b) acero inoxidable, y (c) titanio. El primer grupo consiste de cobalto (Co),

cromo (Cr), molibdeno (Mo), y níquel (Ni). Un ejemplo de una aleación disponible comercialmente, es el Vitallium, está elaborado de 62% de Co, 27% de Cr, 5% de Mo, y 3% de Ni. El grupo de acero inoxidable contiene 11 a 30% Cr, 11 a 14% Ni, 2 a 6% Mn, 2 a 3% Mo, y menos del 1% de otros elementos. El grupo de titanio consiste de titanio puro (Ti), o Ti-6Al-4V, una aleación compuesta de un máximo de 6% de aluminio (Al), 4% de Vanadio (V), con el balance hecho por el Ti. El grupo de titanio, especialmente el de aleación de Ti, es usado para implantes dentales (De Groot K., 1987; Branemark P.I., Zarb G.A., & Albrektsson T., 1985).

CAPITULO II

CARACTERÍSTICAS BIOLÓGICAS DE LA

Mellita Eduardobarrosoi sp. nov.

El estudio de cualquier material que se desea desarrollar, debe fundamentarse primeramente en la identificación precisa del origen, características propias, composición biológica y el comportamiento que tiene dentro de la naturaleza. Las características de la composición química y la distribución porosa que tiene el esqueleto de algunos corales marinos (*Madreporitas*), así como las observaciones preliminares que realizamos de algunos equinodermos, nos hizo notar ciertas similitudes que hacen pensar en la posibilidad de desarrollar un material similar a la Hidroxiapatita coralina (HAc) o al Biocoral, tomando como la base de este desarrollo a la *Mellita Eduardobarrosoi* sp. nov., considerando que existen similitudes importantes en estructura y composición, además de que hay la factibilidad de obtener los especímenes. A continuación se analiza en detalle la información existente en torno a la *Mellita Eduardobarrosoi* sp. nov., sus características biológicas, así como el papel que desempeña dentro de los sistemas ecológicos.

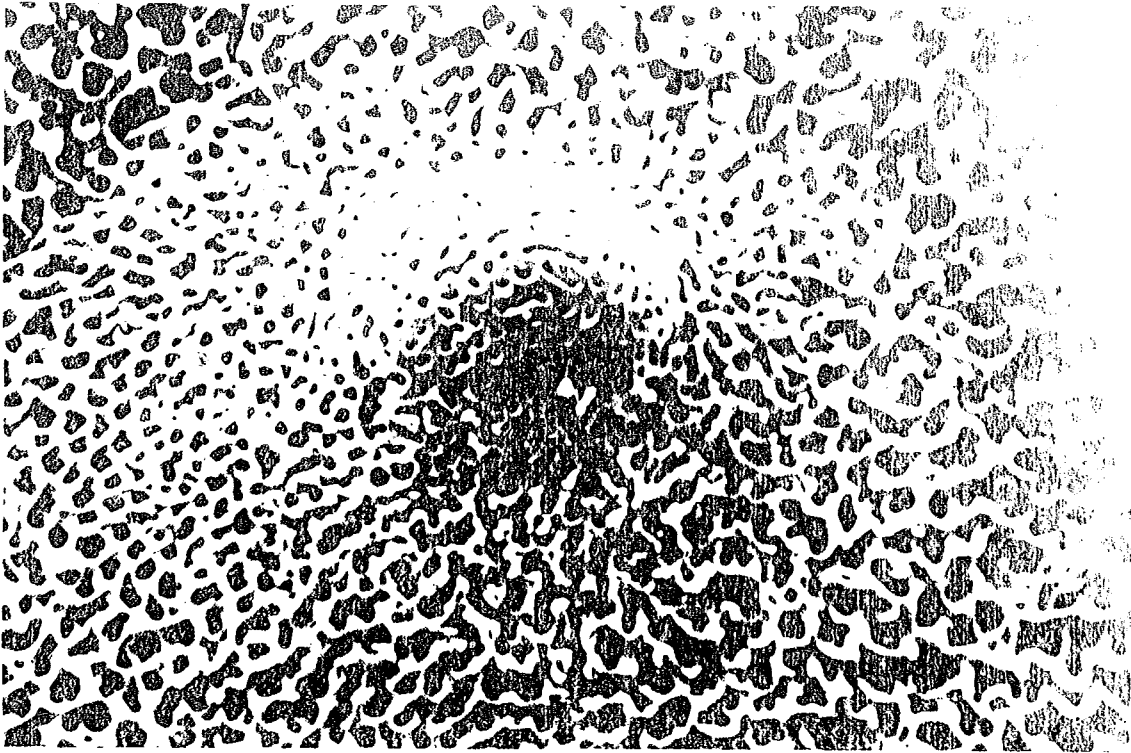
2.1 LOS EQUINODERMOS COMO MODELOS DE CALCIFICACIÓN Y REMODELADO ESTRUCTURAL.

La deposición de sales de calcio en estructuras esqueléticas es una actividad fisiológica entre los invertebrados, el esqueleto puede ser una cubierta externa como en ciertos protozoos y moluscos, con una formidable estructura interna de grandes dimensiones, embebiendo fragmentos calcificados, como en otros equinodermos y esponjas, o bien como una fundación masiva de partes vivientes del animal como en algunos corales. Comúnmente el mineral es carbonato de calcio. Menos frecuentemente, sílica, fosfato de calcio u otras formas minerales del esqueleto.

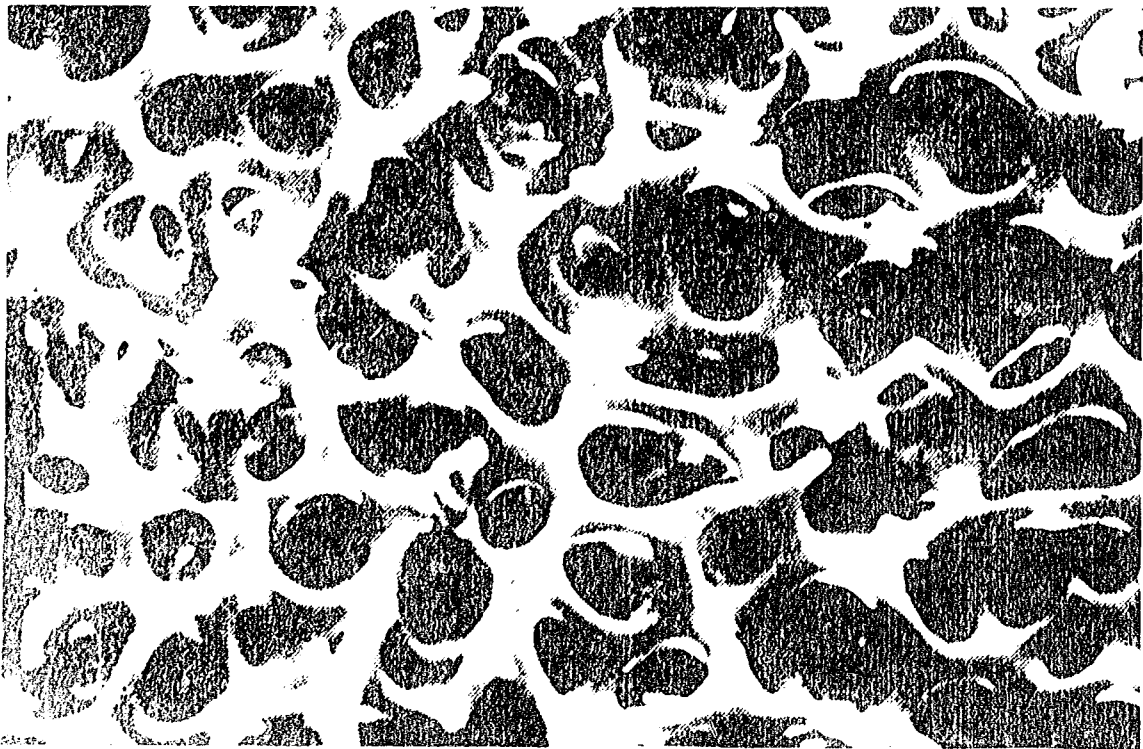
El esqueleto de los equinoideos (por ejemplo, los erizos de mar y algunos moluscos) al igual que los corales marinos está constituido por depósitos de cristales de carbonato de calcio (CaCO_3). Algunas circunstancias de la vida demandan que los invertebrados, al igual que los mamíferos (incluidos los hombres), deban reparar sus esqueletos en una muestra de adaptación o respuesta a la agresión; el resultado consecuente es que la parte reparada puede ser aproximada al original o diferente tanto química como cristalográficamente. El estudio del proceso de la remineralización en los invertebrados se ha limitado y confinado a tres grupos principalmente: los Artrópodos, los Equinoideos y los Moluscos. Un proceso importante observado en los equinoideos y los moluscos es la regeneración de la estructura, que es vista después de la remoción experimental o accidental de una porción del esqueleto.

El esqueleto del equinodermo es distinto en su estructura básica, la apariencia en microfotografías de MEB de una de sus unidades esqueléticas (una espina o fragmento de un erizo de mar), por ejemplo, muestra una apariencia de enrejado (meshwork) calcáreo compuesto de calcita magnésica (fotografía 1). La forma de este enrejado mineral *sui generis* comúnmente parece una construcción en la cual una superficie divide el espacio en dos regiones interpenetrantes, cada una continua y cruzada con la que no tiene conexiones (fotografía 2). Los espacios interconectados dentro de la unidad esquelética están llenos con una dermis consistente de una variedad de tipos celulares y fibras colágenas. Mientras una epidermis cubre la superficie externa del esqueleto. Células específicas de la dermis elaboran el enrejado calcificado. Las áreas llenas de dermis constituyen del 10 % al 50 % del volumen esquelético, dependiendo de la región y las especies (Wilbur, K.M., 1973).

La calcita del equinodermo es un material de propiedades inusuales. Debido a que su estructura fenestrada tiene baja densidad, su dureza es comparable a la de la piedra caliza de alta densidad.



Fotografía 1 - Microfotografía de unidad esquelética de un equinoideo, corresponde a una espina o fragmento de erizo de mar (Wilbur, K.M., 1973)



Fotografía 2 - Apariencia bajo microscopio electrónico de barrido [MEB] del enrejado mineral *su generis* del esqueleto de los equinoideos (Wilbur, K.M., 1973).

La dureza es debida a dos características: (1) Las unidades estructurales son cristales sencillos y (2) debido a su estructura fenestrada, los impactos de fractura no son propagados.

2.2 UTILIDAD DE LOS EQUINODERMOS

Los equinodermos en general y muy especialmente los erizos de mar han tenido y tienen actualmente, una gran importancia en las investigaciones biológicas. Son clásicos los estudios realizados en erizos de mar del género *Arbacia*, la *Arbacia punctulata* que vive a lo largo de Norteamérica, y que ha servido como medio de experimentación en distintos laboratorios de biología marina como los de Woods Hole, Mass.. En la costa pacífica de México, vive *Arbacia inicsa*, especie muy común en la costa Oeste de Baja California y en general en toda la región panámica. A los erizos del género *Arbacia*, se les captura con facilidad durante el verano, época en que las distintas especies de este género producen huevos en cantidades considerables. En Francia, Inglaterra, Japón e Italia se han utilizado otros géneros del erizo de mar. Los estudios experimentales realizados en los huevos de erizos de mar, han servido para relacionar a la citología, fisiología y bioquímica y han servido al hombre a su vez, para encontrar o hallar solución a muchos problemas de biología experimental (Caso, M.E., 1978, Caso, M.E. 1979).

Es importante hacer notar que los equinodermos en general, además de ser útiles como modelos para estudiar los procesos de regeneración y calcificación, también tienen valor económico para el hombre ya que de ciertas especies de equinoideos, holoturoideos y asteroideos son empleadas algunas de sus gónadas para la alimentación humana; como complemento proteínico para el crecimiento de ratas, aves de corral y producción de huevo en aves. De igual manera de algunas especies de equinoideos se utilizan los caparazones para producir fertilizantes (Caso, M.E., 1978).

2.3 LOS EQUINOIDEOS COMO DEFINIDORES DE COMUNIDADES BIOLÓGICAS Y FACIES BIONÓMICAS.

Los Equinodermos son organismos muy valiosos para definir comunidades biológicas marinas como lo han demostrado los estudios clásicos de principio de siglo realizados por Petersen (1913) en las costas escandinavas y danesas, y los estudios posteriores hechos por Le Danois (1925) en las costas del Occidente y sureste de Europa y Norte de África. Para poder establecer "facies bionómicas", se sabe que es indispensable la presencia de una o dos especies típicas, las cuales, bien sea por el número de ellas o bien por su peso, representan preeminencia muy definida en el conjunto de la fauna que se encuentra en un sustrato o fondo característico (Caso, M.E., 1978) .

Por muchos años se ha tratado de buscar cuáles son los animales que son susceptibles de caracterizar una determinada facie, entre los innumerables organismos que salen como productos de un dragado. Es sabido que los "*animales mesenciales*" o definidores de facie, son aquellos que llevan una vida total o relativamente sedentaria; dentro de ellos, los grupos característicos son: los Moluscos, y los Equinodermos, además de otros que tienen una importancia secundaria. Los Equinodermos son los animales que más se utilizan en la actualidad, para definir facies, ya que ellos presentan:

- Vida sedentaria.
- Viven agrupados en bancos compactos homogéneos.
- Son organismos que tienen una euritermia relativa, propiedad que les permite que no les afecte la acción de las estaciones.
- Presentan una distribución batimétrica bien definida, lo que hace que desempeñen un papel fundamental en la clasificación de los fondos submarinos.

- Animales muy abundantes, variables. Se les localiza fácilmente, por lo que ellos, proporcionan al hombre un medio faunístico de primer orden.

Al ser dragados, los Equinodermos pueden registrarse con facilidad por su propia talla y porque en la mayoría de los casos, la epifauna que vive sobre ellos es escasa. A continuación se hace una somera enumeración del grado en que las distintas especies de Equinodermos pueden facilitar la determinación de facies bionómicas.

Asteroideos.- Casi todas las especies de estrellas de mar pueden considerarse como formas predominantes; el "*habitat*" de estos equinodermos es por lo general muy especializado y muchos de ellos presentan *estenobatia*. Existe una fauna constante de estrellas costeras, casi repartidas sobre toda la extensión de la plataforma continental. Se sabe que los mismo en las grandes profundidades, se desarrollan verdaderos cortejos de estrellas de mar características, tales como los *Pentagonastéridos* y las estrellas del género *Brisinga*.

Ofiuroideos.- Estos equinodermos entrelazan sus brazos flexuosos o rígidos de una manera tan íntima que ellos acaban por formar gruesas masas compactas, las cuales cubren grandes extensiones de suelo marino. Se les encuentra desde las zonas subcosteras, hasta los fondos abisales y su composición varía según la profundidad.

Equinoideos.- Los erizos han servido para determinar facies, los *Cidaroideos* entre los 200 a 800 m y los *Echinoturoideos* a más de 1000 mts. de profundidad.

Holoturoideos. Abundan en los fondos limosos. Las especies del género *Stichopus* pueden ser consideradas como las detectoras del limo. A mayor profundidad se encuentran los *Sinallactideos*, *Molpadideos* y principalmente los *Elasipodeos*.

2.4 DESCRIPCIÓN DE LA ESPECIE *mellita eduardobarrosoi* sp. nov.

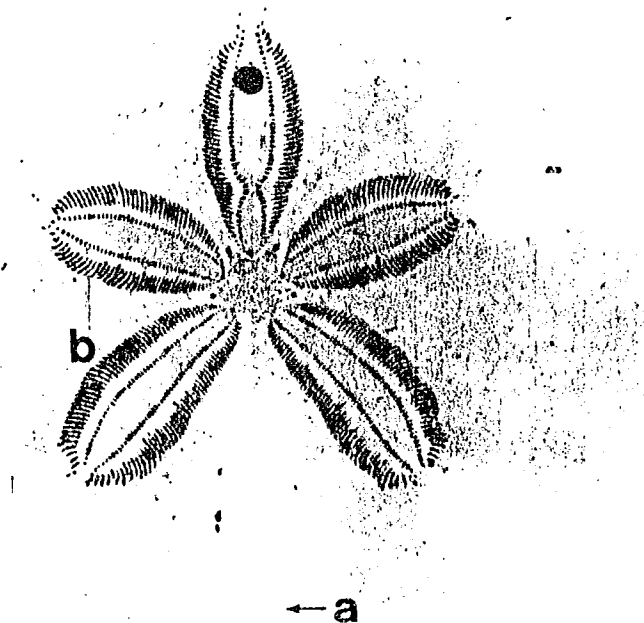
Entre el género de invertebrados marinos existen también otros organismos que como parte fundamental de desarrollo realizan la síntesis de carbonato cálcico para constituir su esqueleto. En la clase equinoidea, los erizos y las estrellas de mar son organismos representativos de estas cualidades [Gosner, 1982]. Los miembros de esta clase en la etapa adulta tienen un tamaño entre 10 y 150 mm., pueden tener una forma regular, radial, simétrica y en general son subsféricos, la superficie ventral es plana y la dorsal más o menos engrosada (Fotografía 3) [Hyman, 1965, Sherman & Sherman 1979].

La comúnmente llamada estrella de mar o dólar de mar (*sand dollar*), taxonómicamente es la especie de *mellita eduardobarrosoi* sp. nov.. Pertenece al género *mellita*, de la familia *mellitidae*, del orden *Clypeasteroidea*, clase equinoidea, del phylum Echinodermata [Gosner, 1982, Hyman 1955].

Crece en un ambiente poco profundo y cercano a la playa. Tiene forma de disco con 5 perforaciones largas (lúnulas), de coloración amarillo-café a oro ocre con verde (fotografía 3), puede tener un diámetro de 115 mm. [Gosner, 1982]. Las características de composición química del esqueleto de los equinoideos los hace ser uno de los modelos representativos de los procesos de calcificación (Wilbur, K.M., 1973).

Mellita Eduardobarrosoi, sp. nov.

Diagnosis.-Forma casi circular. La anchura mayor que la longitud. Cara posterior, no truncada. La altura máxima del caparazón, es anterior al aparato apical. Lúnulas anteriores pares, más de las tres partes de la longitud de las lúnulas posteriores pares (fotografía 3).



Fotografía 3. Vista dorsal de la Me. a) lúnulas, b) pétalos

Periprocto en el extremo anterior de la lúnula impar. Los 4 ambulacros laterales marcan ventralmente, superficies conspicuas irregulares las que rodean a las lúnulas pares. Los márgenes de las lúnulas pares son gruesos y festonados de una manera peculiar que recuerda a *M. notabilis* H.L. Clark.

DESCRIPCIÓN:

Forma. Casi circular. La anchura de los especímenes es siempre superior a la longitud. Cara posterior no truncada, ligeramente ondulada (fotografía 4).

Altura. La altura máxima o ápice es anterior al aparato apical (fotografía 5). El declive hacia el margen posterior no es abrupto.



Fotografía 4.- Vista lateral de la *mellita eduardobarrosoi* sp. nov.

Lúnulas anteriores pares. Más cortas que las lúnulas posteriores pares. Dispuestas en ángulo obtuso respecto al eje antero-posterior del caparazón (fotografía 3).

Lúnulas posteriores pares. No alineadas a lo largo del eje longitudinal de los pétalos; no están arqueadas hacia el eje del caparazón.

Pétalo anterior impar. Ligeramente más largo que los pétalos anteriores pares.

Pétalos anteriores pares. Miden aproximadamente $2/3$ partes de la longitud de los pétalos posteriores pares.

Sistema apical. Desplazado hacia el extremo anterior.

Peristoma. Desplazado hacia el extremo anterior.

Periprocto. Situado en el extremo anterior de la lúnula posterior impar (fotografía 6).

Características únicas de la *Mellita Eduardobarrosoi*.

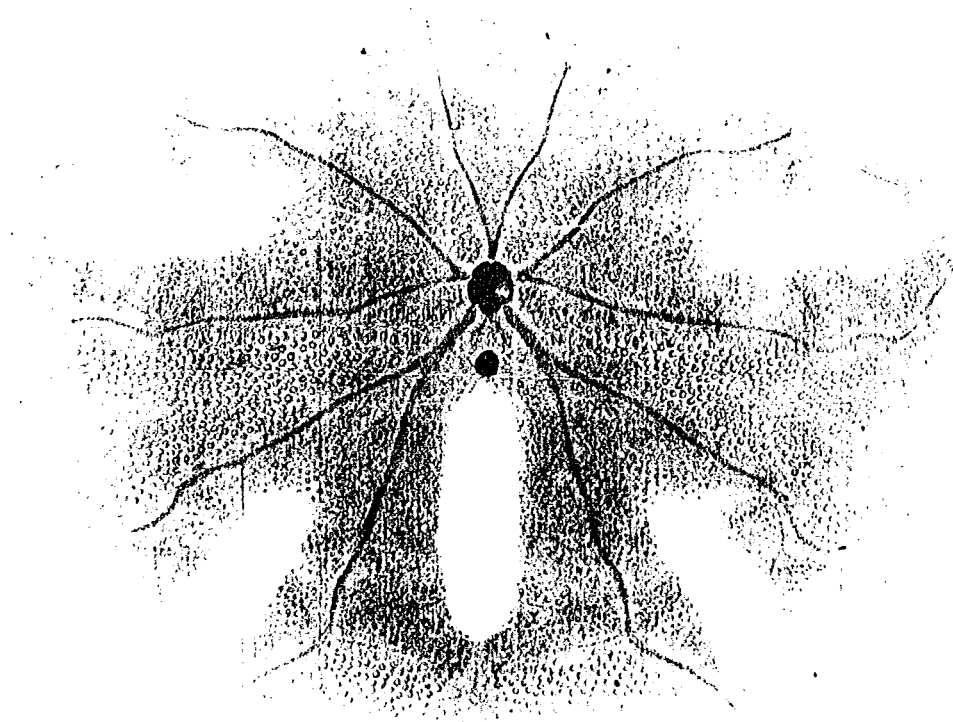
a) El contorno es redondo pero no truncado en su cara posterior y ligeramente ondulado.

b) La altura máxima del caparazón (o sea el ápice) se localiza anteriormente respecto al aparato apical.

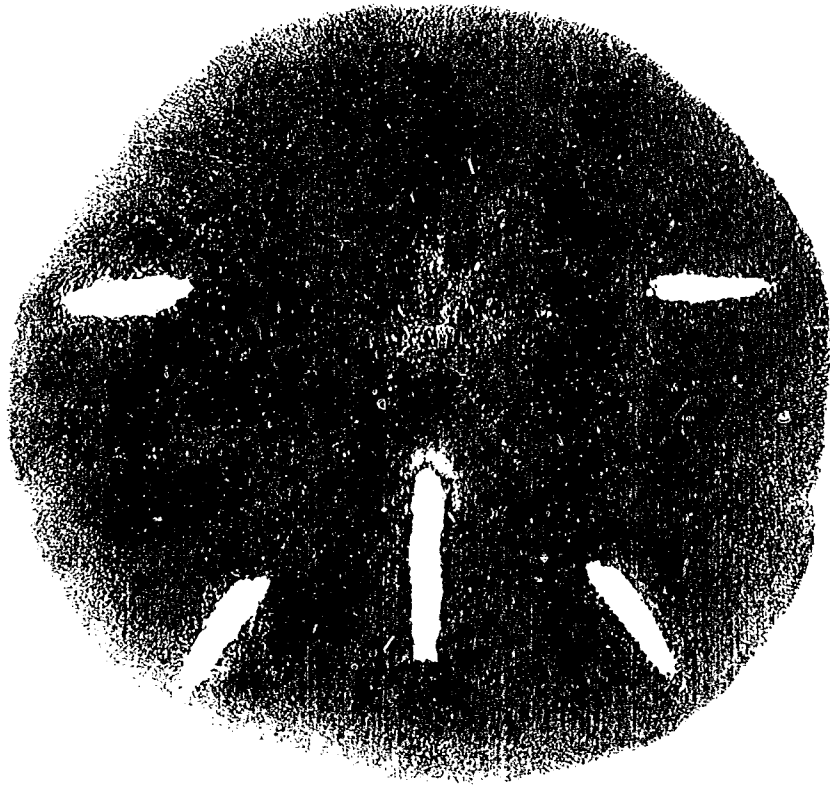
c) Lúnulas anteriores pares, más de las 3/4 partes de la longitud de las lúnulas posteriores pares.

d) Periprocto en el extremo anterior de la lúnula posterior impar.

e) Distribuido en la costa pacífico sur de México. Playa Encantada, Guerrero, Gro. Playa del Revolcadero, Acapulco, Gro. Playa San Benito, Tapachula, Chiapas, Chis. (en el límite con Guatemala) y en la costa chica del Estado de Veracruz.



Fotografía 5.- Vista ventral de la *mellita eduardobarrosoi*, Me,



Fotografía 6.- Apariencia dorsal de la *mellita Longifissa*.

2.6 OTROS MIEMBROS DE LA FAMILIA MELLITIDEA

FAMILIA MELLITIDAE STEFANINI

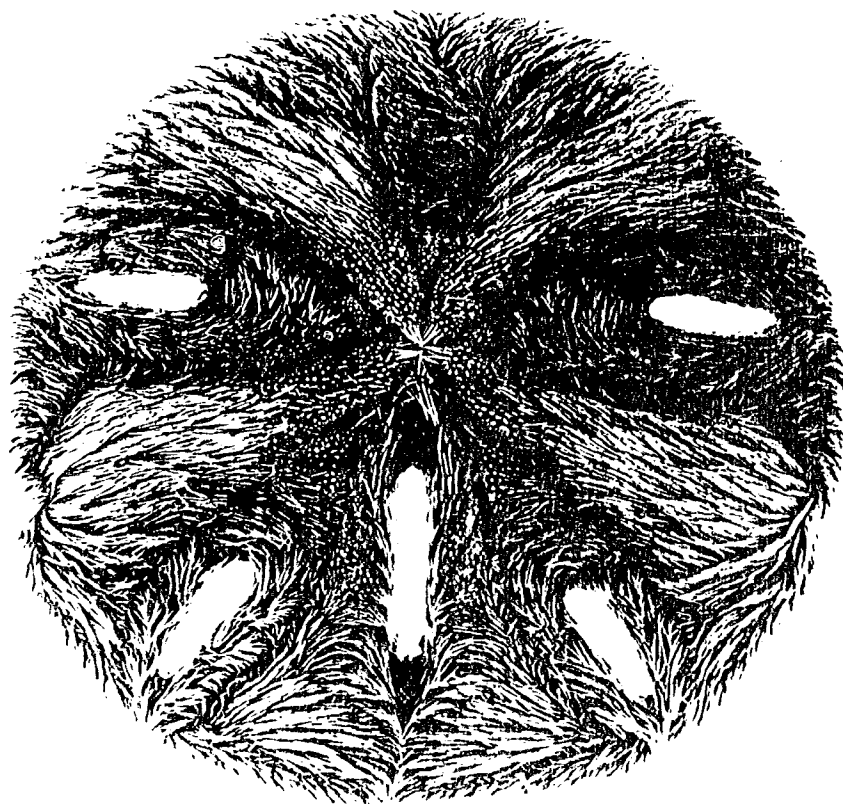
Tamaño mediano o grande, formas aplanadas. Soportes internos bien desarrollados. Lúnulas pares ambulacrales y lúnula interambulacral posterior o una simple muesca. Pétalos bien definidos, cerrados moderadamente; poros conjugados, el poro externo de cada par, alargado, escasos pares de poros primarios por fuera de los pétalos. Interambulacros pares no están en contacto con las placas basicoronales de la superficie oral. Interambulacros sobre la superficie oral, se ensanchan hacia el ambitus, tan anchos como los ambulacros en el ambitus. Placas basicoronales francamente pequeñas, placas interambulacrales ligeramente más grandes que las placas ambulacrales. Periprocto sobre la superficie oral entre la lúnula interambulacral posterior y el peristoma. Surcos alimenticios ambulacrales se bifurcan justamente por fuera de las placas basicoronales.

MELLITA L. AGASSIZ

Caparazón mediano o grande, delgado y aplanado. Márgenes delgados, contorno redondo a subpentagonal. La altura máxima del caparazón, anterior al aparato apical. Lúnulas ambulacrales pares e interambulacral impar. Lúnulas angostas y alargadas, en el adulto normalmente cerradas. Aparato apical ligeramente anterior. Pétalos bien definidos, cerrados moderadamente. Pétalo anterior ligeramente más abiertos que los otros. Pétalo anterior impar y posteriores pares aproximadamente de la misma longitud, pétalos pares anteriores más cortos (fotografía 8). Poros externos de cada par ambulacral, alargados, no subdivididos. Peristoma francamente anterior. Surcos ambulacrales alimenticios se bifurcan exactamente por fuera de las placas basicoronales. Lúnula interambulacral posterior se extiende cerca del peristoma sobre la superficie oral.

Periprocto dentro de la parte anterior de la lúnula posterior sobre la superficie oral. Placas basicoronales pequeñas. Interambulacros pares no están en contacto con la hilera basicoronal, con 3 placas basicoronales por columna sobre la superficie oral. Interambulacro posterior en contacto con las placas basicoronales. Periprocto parcialmente dentro de la placa basicoronal interambulacral. Las primeras placas basicoronales posteriores del interambulacro posterior se extienden hasta cerca de la mitad de la lúnula.

Ambulacros con 4 a 6 placas posteriores basicoronales por columna. 4 poros genitales. Viven desde el Mioceno al Reciente. Las especies de este género viven en playas templadas y cálidas de América del Norte América del Sur.



Fotografía 7.- Vista ventral de la *Mellita L. Agassi*.

CAPITULO III

DEFINICIÓN METODOLÓGICA DE LA CARACTERIZACION FISICOQUIMICA DE LA *Mellita Eduardobarrosoi* sp.nov..

3.1 JUSTIFICACIÓN

La necesidad terapéutica y profesional de contar con materiales de injerto que puedan ser utilizados en cirugía reconstructiva, maxilofacial y dental, es cotidiana en nuestro país debido a los altos costos que implica la obtención de estos productos, y esto en el caso de que puedan ser conseguidos. La escasa disponibilidad en el mercado nacional es determinada no sólo por los factores económicos, sino también por algunos de orden de legislación sanitaria, en este aspecto la ley mexicana marca lineamientos estrictos que establecen determinadas pruebas que deben ser aprobadas para que un producto que venga del exterior pueda ser utilizado en la población mexicana como recurso terapéutico, ninguno de los materiales que actualmente están disponibles en el mercado internacional se ha sometido a los estudios de certificación de la Secretaría de Salud. Otro factor que afecta la disponibilidad de los materiales de injerto es que en México no existe la producción de estos biomateriales, y el costo de la transferencia tecnológica es alto el caso de existir algún grupo interesado en la producción de los mismos.

Inmersos en la problemática descrita, se determinó seleccionar la especie de *mellita eduardobarrosoi* sp. nov., en particular, porque en observaciones preliminares y pequeños ensayos hemos observado que poseen características parecidas al coral, en cuanto a su disposición espacial, su estructura porosa y su composición de carbonato de calcio bien documentada en la literatura. Un punto importante es que su utilidad biológica se circunscribe, en gran medida, a su empleo como definidor de comunidades en el medio marino, así como su posible uso como material alimenticio para algunos animales. Las muestras que se

colectaron para realizar este proyecto fueron suficientes en cantidad, es necesario enfatizar que los especímenes colectados se encontraban fuera de su hábitat natural, esto es, que se encontraban en la playa, expuestos a los rayos solares, sin ninguna muestra de vitalidad. Este tipo de especímenes se podrían considerar no útiles para el entorno marino, ya que al colectarlos fuera del agua no se rompe el equilibrio ecológico, el cual sí se ve afectado cuando se corta el coral.

Para la realización de este trabajo, la experiencia no es nueva en el grupo interdisciplinario que se conjuntó con investigadores del Departamento de Física Aplicada y Tecnología Avanzada (FATA) del IFUNAM y de la Facultad de Odontología de la UNAM. Desde hace tiempo en el FATA se trabaja en el área de biomateriales, con un grupo de investigadores que además de trabajar con líneas específicas de materiales derivados de ácidos poliacrílicos, han incursionado en el estudio de cerámicas biológicas con buenos resultados. La escasa disponibilidad de biomateriales en el país, hace imperante la necesidad de buscar soluciones alternativas, excluyendo el alto costo de la transferencia tecnológica, un camino que recientemente se ha trazado es la de innovación tecnológica, es por ello que la Subjefatura de Investigación de la Facultad de Odontología y el Departamento de Física Aplicada y Tecnología Avanzada del Instituto de Física, han considerado la posibilidad de desarrollar un material de injerto similar a la HAc obtenida de los corales, pero siendo la *mellita eduardobarrosoi* sp. nov. la base para la producción de este nuevo material.

3.2. OBJETIVO PRINCIPAL.

Conocer las características estructurales y de composición del esqueleto de la *Mellita eduardobarrosoi* sp. nov. por medios fisicoquímicos, que permitan determinar las posibilidades para su desarrollo como un biomaterial.

3.3. OBJETIVOS PARTICULARES

1. - Determinar la composición mineral de la *Mellita eduardobarrosoi* sp. nov. mediante en análisis cualitativo de difracción de rayos-X.
2. - Determinar las características de superficie y estructurales de la *Mellita eduardobarrosoi* sp. nov. por medio del microscopio electrónico de barrido.
3. - Calcular las medidas relativas y absolutas del poro de la *Mellita eduardobarrosoi* sp. nov.
4. - Realización de estudios de microanálisis de rayos-x y por infrarrojo de la *Mellita eduardobarrosoi* sp. nov. para determinar su composición química.
5. - Comparar la composición mineral y las características de superficie entre los diferentes compuestos de fosfato de calcio disponible en el mercado y las obtenidas con la *Mellita eduardobarrosoi* sp. nov..
6. - Desarrollar la metodología de preparación de la *Mellita eduardobarrosoi* sp. nov. con la finalidad de eliminar cualquier material diferente al esqueleto.
7. - Realizar pruebas de esterilización del material mediante diferentes métodos que permitan su posterior evaluación de biocompatibilidad en modelos animales inferiores.

3.4. HIPÓTESIS

- H₁ Las características ultraestructurales y de composición fisicoquímicas del esqueleto de la *mellita eduardobarrosoi* sp. nov. le confieren posibilidades para ser utilizada como biomaterial.
- H₀ Las características ultraestructurales y de composición fisicoquímicas del esqueleto de la *mellita eduardobarrosoi* sp. nov. no le confieren posibilidades para ser utilizada como biomaterial.

DEFINICIÓN DE VARIABLES.

- Variable Independiente. Características ultraestructurales y de composición fisicoquímicas
- Variable Dependiente: posibilidad para ser utilizada como biomaterial.

OPERACIONALIZACIÓN DE VARIABLES

Por características ultraestructurales, se entienden aquellas condiciones referentes a tipo de superficie y constitución de masa, de tal manera que se midió el tamaño aproximado del poro, la distribución del mismo. Por composición fisicoquímicas, se entienden la composición química obtenida por las pruebas de análisis de difracción de rayos-X y de microanálisis de rayos-X.

TIPO DE ESTUDIO.

Para realizar la caracterización fisicoquímica del esqueleto de la *mellita eduardobarrosoi* sp.nov. se diseñó un estudio que básicamente era comparativo, pero que en sus diversas etapas, se definió de

diferentes maneras, así pues fue de tipo descriptivo y observacional cuando se utilizó el microscopio electrónico de barrido y el análisis de difracción de rayos X; y analítico cuando se utilizaron el análisis de infrarrojo, el microanálisis de rayos X.

3.5. PREFARACIÓN DEL MATERIAL.

Los materiales que fueron colectados en la costa norte del Estado de Veracruz se encontraban fuera del mar y expuestos a los rayos del sol, y sin indicio alguno de vitalidad. Se depositaron en un recipiente plástico que contenía hipoclorito de sodio al 15% durante un período de 15 días, con cambios de solución cada 5 días; después de este periodo se lavaron con agua destilada con la finalidad de retirar el excedente de hipoclorito. Se dejó que escurrieran el agua y se secaran al medio ambiente. El siguiente paso consistió en fracturar los esqueletos en trozos grandes para iniciar la molienda de los especímenes; la que se realizó en un molino de bolas (**Fritsch Pulverisette, Germany**), a una velocidad de 3 durante 10', con pasos sucesivos de molienda hasta completar 10 ciclos, entre cada uno de los ciclos se llevaron a cabo pasos de tamizado en gradillas de 500 μ , 250 μ , 125 μ y 50 μ .

Con la finalidad de obtener un tamaño y dimensión de muestra uniforme al tamiz de 125 μ ; el último ciclo de la molienda se realizó sin bolas a una velocidad de 6 durante 5' minutos. Por último se volvió a tamizar para retirar el polvillo. Las partículas obtenidas nuevamente se lavaron en un aparato de ultrasonido que contenía una solución de alcohol absoluto por 5 minutos. Se hizo otro lavado en ultrasonido con agua destilada por 5 minutos, se coló y repitió hasta obtener agua clara. Secar en mufla (horno en ambiente normal a 100 grados centígrados por 5 horas y luego bajar a 80 grados centígrados y dejar por doce horas.

El tamaño de la partícula de la molienda preparada primero fue determinada mediante tamices de 125 a 250 μ y luego corroborado mediante un Microscopio de Medición (**Leitz Wetzlar, Germany.**), en el que se encontró que las partículas además de presentar forma irregular,

tenían un tamaño variable, midiendo en ancho de 100 a 130 μ y de largo de 100 a 200 μ .

Los gránulos obtenidos se colocaron en frascos ámbar previamente lavados con acetona, y se determinó colocar 2 cc. de gránulos por frasco. El modo en que se hizo esto fue el siguiente: se llenó la botella con 2 cc. de agua, se marcó el nivel en el que llegaba, posteriormente se pesó en una balanza analítica, se tiró el agua, se volvió a pesar (se obtuvieron 1.592 gr.); y se secó el frasco para que se llenaran los frascos con gránulos hasta la marca, en base al peso diferencial determinado.

Los frascos ya con los gránulos se empacaron en bolsas con reactivo testigo de esterilización y se procedió a la esterilización con gas de óxido de etileno, durante 24 horas.

CAPITULO IV

CARACTERIZACIÓN FÍSICO-QUÍMICA DEL ESQUELETO DE LA *mellita eduardobarrosoi* sp. nov..

En el desarrollo de los diversos materiales con aplicaciones biomédicas se hace imperativo el conocimiento acertado de sus características de composición química y de sus propiedades físicas, con la finalidad de mejorar el comportamiento que tendrá en relación a los tejidos del huésped. A continuación se describen los diversos métodos de caracterización físico-química empleados para determinar la composición química y las características de superficie del material obtenido a partir de la *mellita eduardobarrosoi* sp. nov. (Me). La finalidad de realizar este tipo de pruebas es la identificación de los elementos y características constituyentes de los materiales, los cuales son comparados con estándares previamente elaborados. En nuestro trabajo además de cotejar algunas pruebas con las referencias almacenadas en el *software* de los aparatos empleados, hicimos pruebas similares para productos comerciales disponibles en el mercado.

4.1 MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO

El microscopio electrónico de barrido (MEB) [Scanning electron microscope, SEM] es un elemento poderoso que permite la observación y caracterización de materiales orgánicos e inorgánicos heterogéneos; se emplea eficazmente para analizar y explicar correctamente los fenómenos que ocurren en escala de micras (μm) o submicrónica ($0.1 \mu\text{m}$). (Goldstein, J.I., 1981).

El mecanismo fundamental de funcionamiento del MEB es que el área que se va a examinar es irradiada con un haz de electrones finamente enfocados, el cual es arrastrado sobre la superficie del espécimen. En la figura 1, se esquematizan los tipos de señales producidos cuando el haz de electrones se encuentra con la superficie

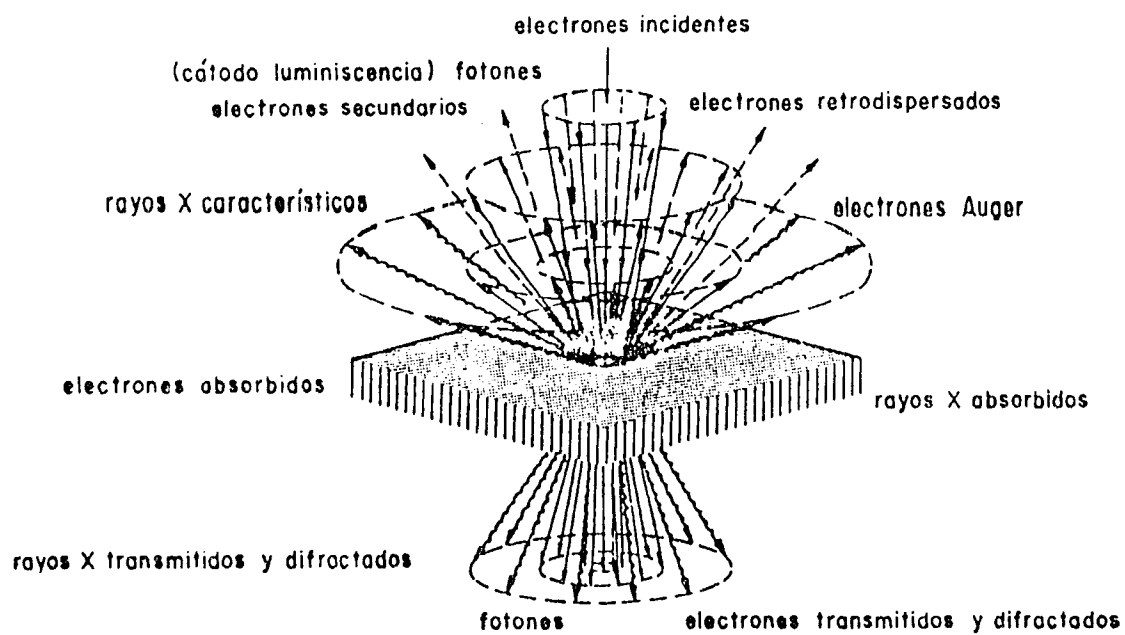


Figura 1.- Esquema de las señales formadas en el microscopio electrónico de barrido cuando el haz de electrones incide en la superficie de la muestra. *Formación de Imágenes en el Microscopio Electrónico*. Barrio-Paredes, Rafael A. (1982):

del espécimen incluyen electrones restrodispersados y secundarios, rayos-X característicos y fotones de varias energías. Estas señales son obtenidas de volúmenes de emisión específicos dentro de las muestras y pueden ser utilizados para examinar muchas características de las mismas [composición, topografía superficial, etc.] (Barrios-Paredes, R.A. 1982.; Jenkins, R. 1976).

En el microscopio electrónico de barrido (MEB), las señales de mayor interés son las emisiones secundarias, porque varían como un resultado de diferencias en la topografía superficial y composicional. Como el haz de electrones es barrido a través del espécimen, la emisión secundaria es confinada a un volumen cercano al área de impacto del haz, permitiendo que las imágenes sean obtenidas en resolución relativamente alta. La apariencia tridimensional de las imágenes es debida a la gran profundidad de campo del microscopio electrónico de barrido así como al efecto de sombra del contraste secundario de electrones (Goldstein, J. 1981; Oatley, C.W. 1972).

PREPARACIÓN DE LA MUESTRA.

El esqueleto de la *Mellita Eduardobarrosoi* sp.nov. (Me), fue preparada de manera que se obtuvieron dos formas. Una se hizo según el método descrito en el capítulo anterior, es decir en forma granular, y la otra se logró de fragmentos grandes obtenidos por la fractura del esqueleto de la Me. Independientemente de la forma de las muestras, ambas se prepararon de la misma manera para el MEB. Una vez determinado el tamaño de los especímenes que se observaron, se lavaron y desengrasaron con un solvente contenido en limpiador ultrasónico, en nuestro método el solvente utilizado fue acetona de 99.5% de pureza (J.T. Baker S.A., de C.V., México), aunque también podría ser utilizado el alcohol o el tolueno porque éstos poseen las mismas características.

Debido a que el objetivo principal de utilizar el MEB fue el de determinar las características de superficie del esqueleto de la *Mellita*

eduardobarrosoi sp. nov., fue necesaria la remoción de contaminantes orgánicos e inorgánicos que pudieran tener un efecto adverso en la emisión secundaria de electrones; la materia orgánica se eliminó desde la primera etapa, cuando se les sumergió en hipoclorito de sodio.

La parte inorgánica se eliminó de la superficie mediante métodos mecánicos, que se hicieron antes del montaje en el porta muestra. Hubo algunas ocasiones cuando se calibraba el método de preparación, en que la poca limpieza del esqueleto provocó artefactos visibles al utilizar el MEB. Esta contaminación se explica porque el haz de electrones causa rompimiento de carbohidratos, lo que resulta en la deposición de carbón y otros productos en el espécimen durante la examinación (Goldstein Jr., 1981).

Como el esqueleto de la *mellita eduardobarrosoi sp. nov.* es un espécimen que por sus características físicas y químicas es no-conductivo, durante la observación en el MEB pueden presentarse efectos de carga en su superficie; para compensar ese efecto se cubrió la superficie de la muestra con una película delgada de oro, mediante la técnica de evaporación al alto vacío. Entre el lapso transcurrido desde que las muestras que ya estaban preparadas y su observación en el MEB, se evitó la hidratación de los especímenes mediante el almacenamiento de los mismos en una campana de cristal que contenía geles de sílice.

De igual manera se realizó la preparación de muestras para el MEB en los siguientes productos comerciales: la Hidroxiapatita coralina (HAc) [INTERPORE 200™, Interpore International, USA]; hueso humano calcinado, (proporcionado por la Facultad de Medicina de la UNAM; también se prepararon muestras de Hidroxiapatita sintética proporcionada en el Departamento de Física Aplicada y Tecnología Avanzada del IFUNAM.

Las muestras ya montadas se observaron en un microscopio electrónico de barrido (JEOL, modelo JSM-5200) del Departamento de Física Experimental del IFUNAM; calibrando las condiciones de trabajo

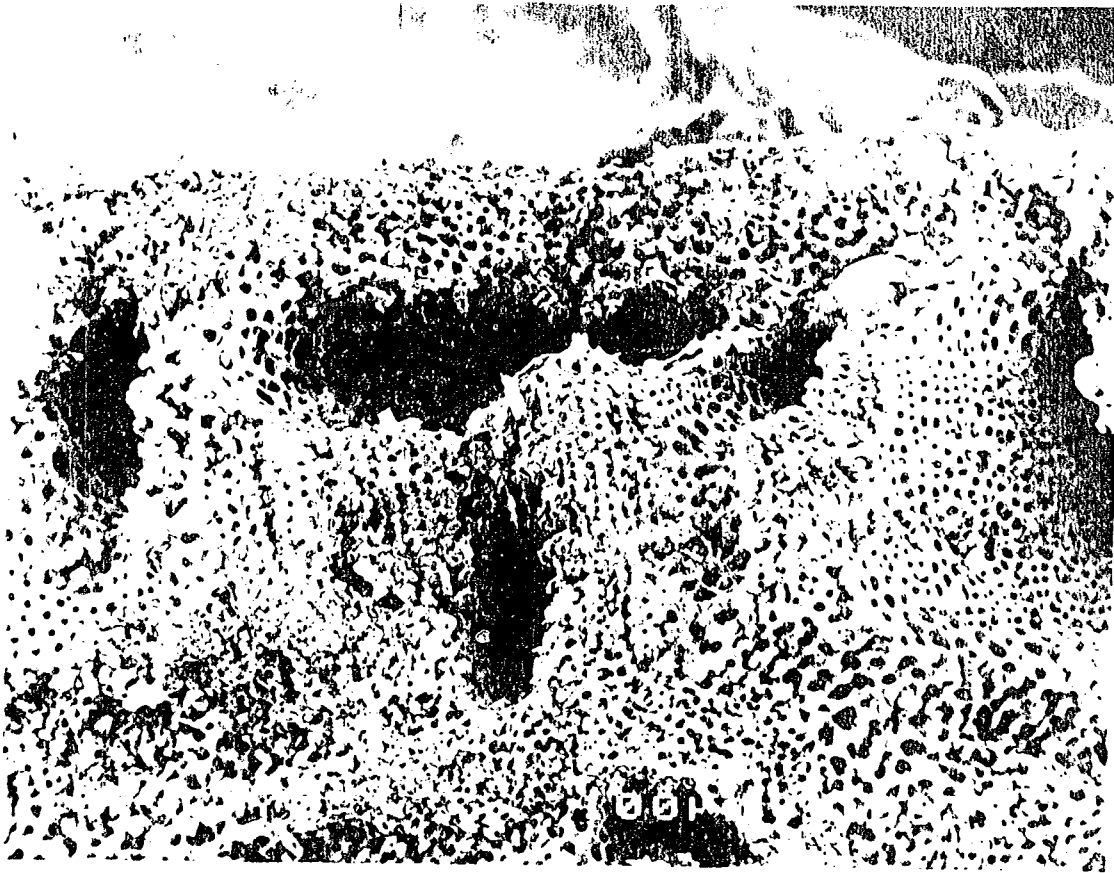
según las necesidades técnicas, en un rango de 10 y 25 kV y con aumentos de trabajo que variaron entre X35 y X1000.

RESULTADOS:

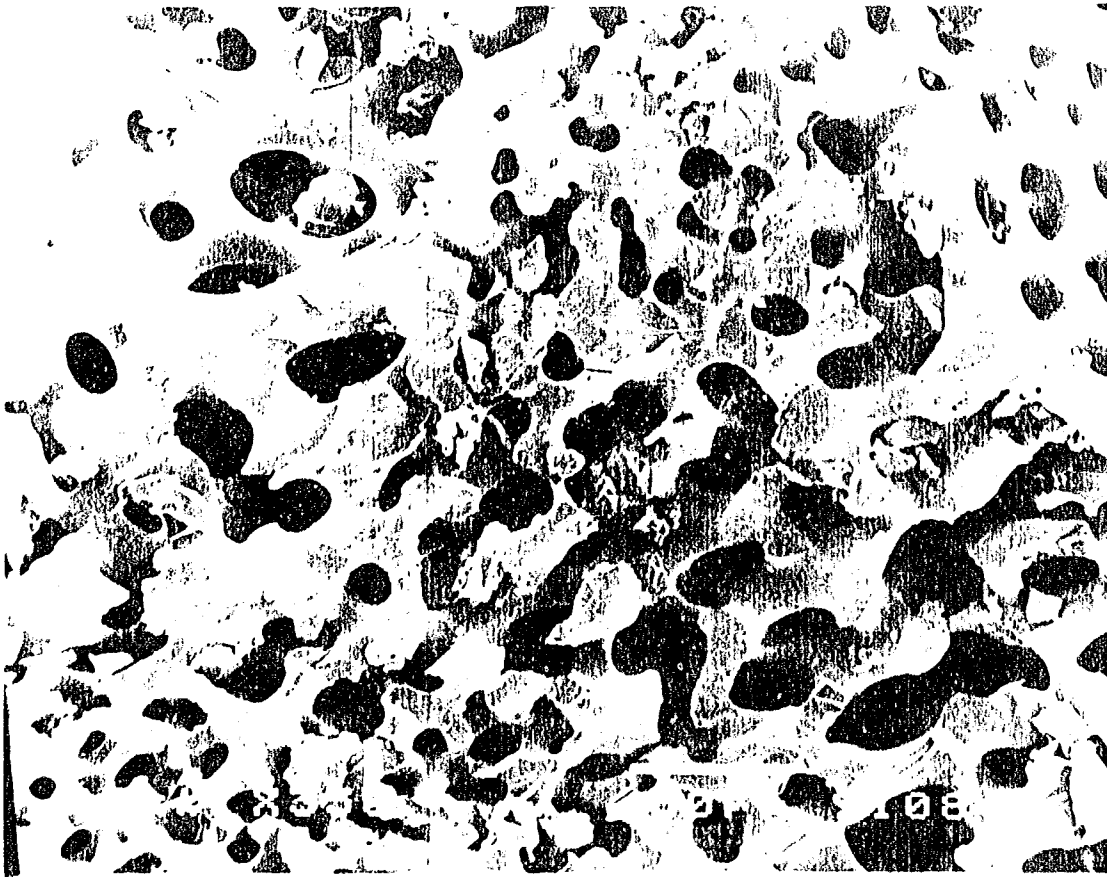
Las imágenes obtenidas muestran que el esqueleto de la *mellita eduardobarrosoi sp. nov.* tiene una estructura morfológica porosa. A continuación se describen las observaciones en MEB; la microfotografía 8 corresponde a un espécimen obtenido por fractura del esqueleto de la (Me). En esa imagen se aprecia que la superficie externa es irregular y que en la parte interna existen poros grandes que tienen forma irregular (ovalada), que miden en el sentido más largo entre 200 y 500 μ y en el ancho de 100 a 200 μ . Las paredes del esqueleto propiamente dicho, también presentan porosidad, en la misma microfotografía se observa que la disposición de los poros esta determinada por el espacio que ocupaba la materia orgánica. Esto significa que la superficie de las paredes de los poros grandes están fenestradas por orificios con diámetro más o menos igual y aparentemente de forma circular. Sin embargo, orientando la muestra hacia la región interna, se observa que estos poros en realidad son conductos que atraviesan el esqueleto. El trayecto que siguen es sinuoso, lo que da la idea de intercomunicación de los conductos. Estas observaciones se confirman al realizar mayores acercamientos, en la microfotografía 9 se aprecia la forma elongada de los poros internos del esqueleto de la (Me) con 20 a 25 μ de ancho y 75 μ de largo. En la microfotografía 10 se muestra la forma y tamaño que tienen los conductos que atraviesan el esqueleto de la Me.

La interconectividad que se mencionó anteriormente, se corrobora con la microfotografía 11 que corresponde a la pared de un conducto grande, los poros pequeños que ahí se encuentran tienen forma regular con diámetro de 20 a 40 μ , y al observar a un mayor acercamiento (microfotografía 12), la imagen asemeja un sistema de cavernas en el cual todos los conductos están comunicados hacia todas las direcciones.

La muestra de (Me) que se preparó con el método de molienda y se le dio forma de gránulo, también se observó en MEB (microfotografía 13), encontrando que la forma es irregular; la superficie del gránulo está fenestrada con poros de tamaño de 20 a 40 μ aproximadamente.



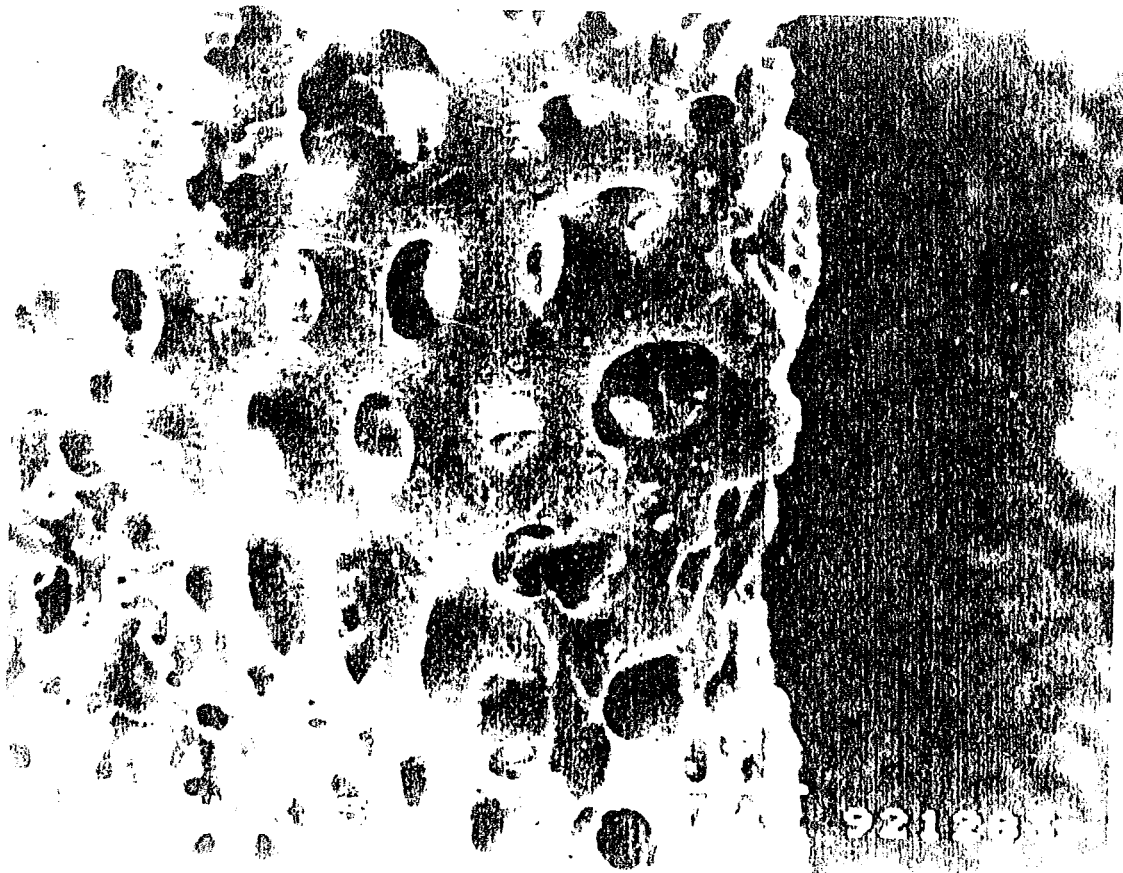
Microfotografía 8. Aspecto interno de la *Mellita Eduardobarrosoi* sp. nov. (Me) preparada por método de fractura, nótese la presencia de dos tipos de poros, los grandes irregulares de 100 a 200 μ de ancho y de 200 a 500 μ de largo. (10kV X75, JEOL JSM-5200).



Microfotografía 9. Vista interna de la Me donde se aprecian los poros del esqueleto, la forma es irregular, casi elongada; midiendo de 20 a 25 μ de ancho y 75 μ de largo. (X350 10 kV, JEOL JSM-5200).



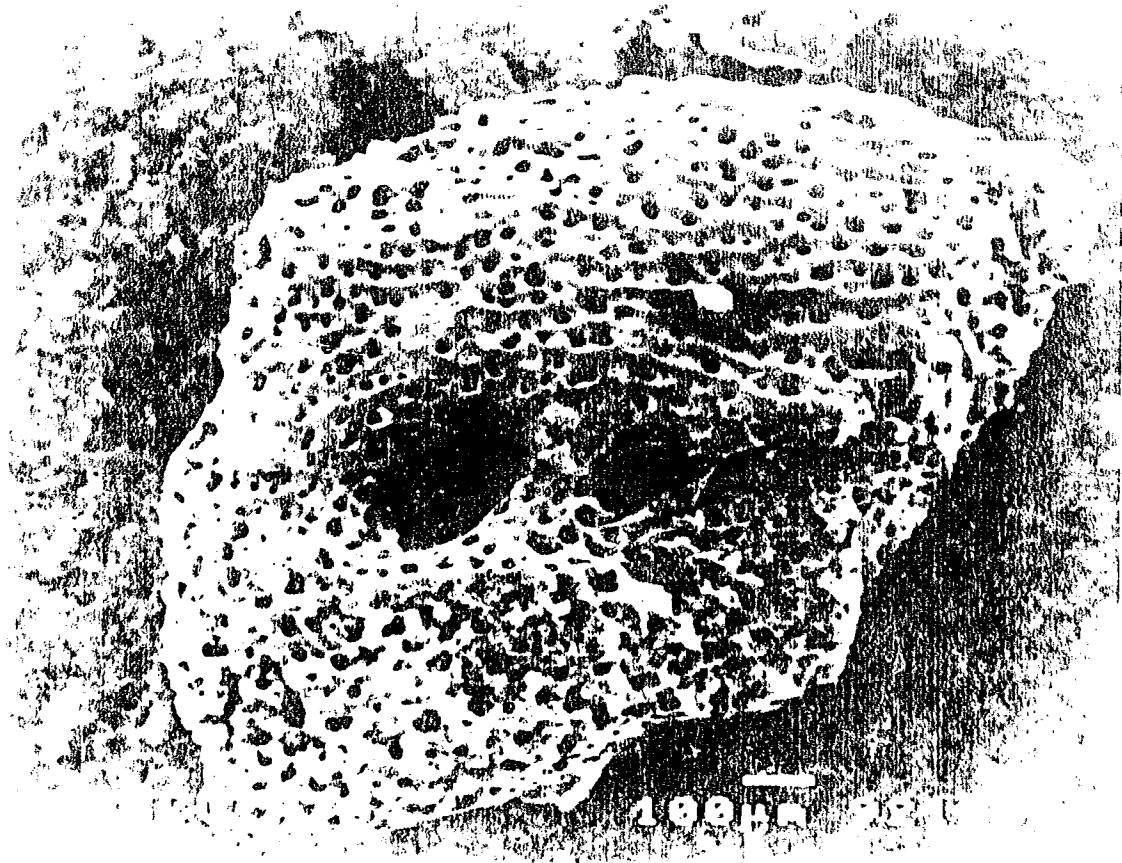
Microfotografía 10. Vista de la forma irregular de los poros de la Me, la forma y tamaño de los mismos es irregular, así como el trayecto que siguen. (X750 25 kV, JEOL JSM-5200).



Microfotografía 11. Pared interna de un conducto del esqueleto de la Me, los poros que forman parte de esa pared miden de 20 a 40 μ y aparentan estar intercomunicados. (X350 25 kV, JEOL JSM-5200).



Microfotografía 12. Acercamiento de la pared de un conducto interno, en la cual se observa la intercomunicación de los poros, aparentando un área similar a cavernas. (X1,000 25kV, JEOL JSM-5200).



Microfotografía 13. Gránulo preparado por método de molienda, la forma es irregular, los poros pequeños tienen diámetro de 20 a 40 μ , y los grandes que se observan son de 100 y 200 μ . (X75 25kV, JEOL JSM-2500).

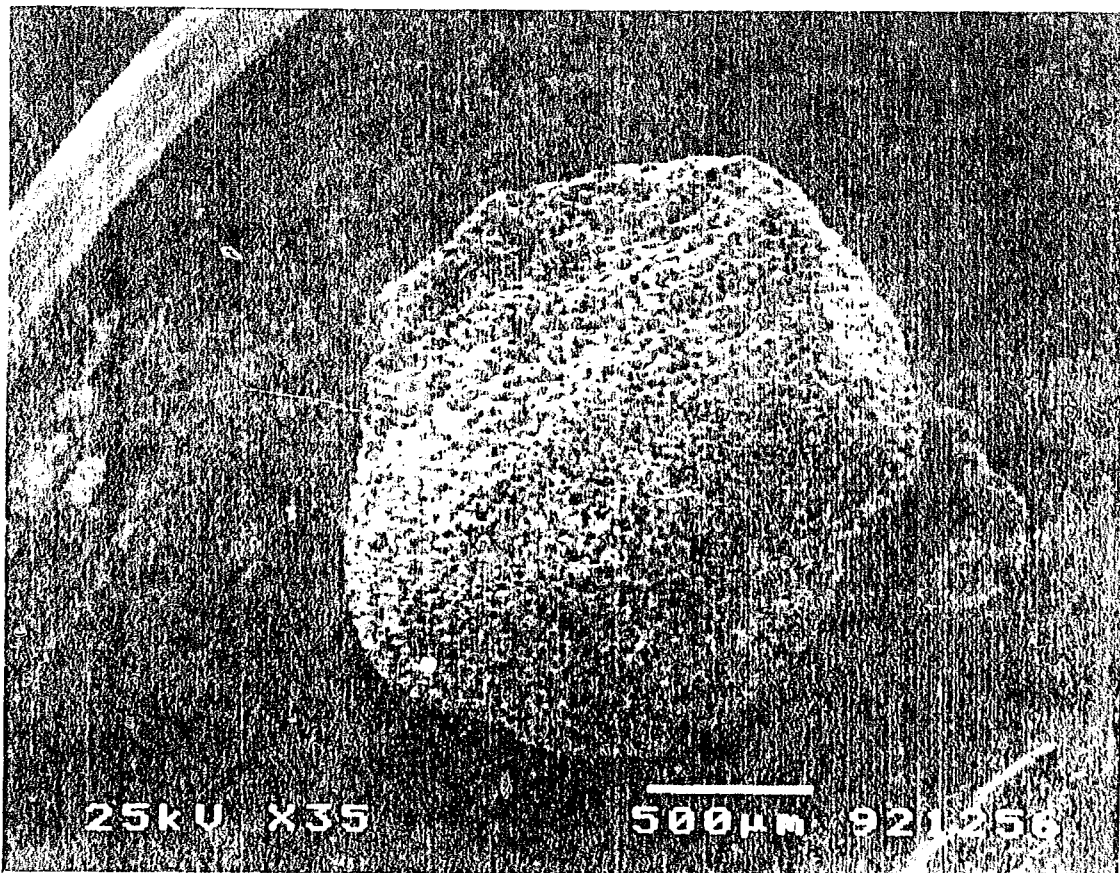
También se observan dos poros grandes, uno con diámetro de $100\ \mu$ y el otro de $200\ \mu$ aproximadamente. Los bordes de la muestra son irregulares, aunque sin formar ángulos.

En la microfotografía 14 se muestra un gránulo de Me, que tiene los bordes redondeados, el diámetro de los poros es uniforme entre 20 y $40\ \mu$, a diferencia del descrito anteriormente, en éste gránulo no se aprecian los grandes conductos. Esto parece indicar que la muestra tal como se preparó no es homogénea en la distribución y presencia de conductos o poros grandes, no así en cuanto al diámetro de los poros pequeños, el cual es constante en las dos muestras.

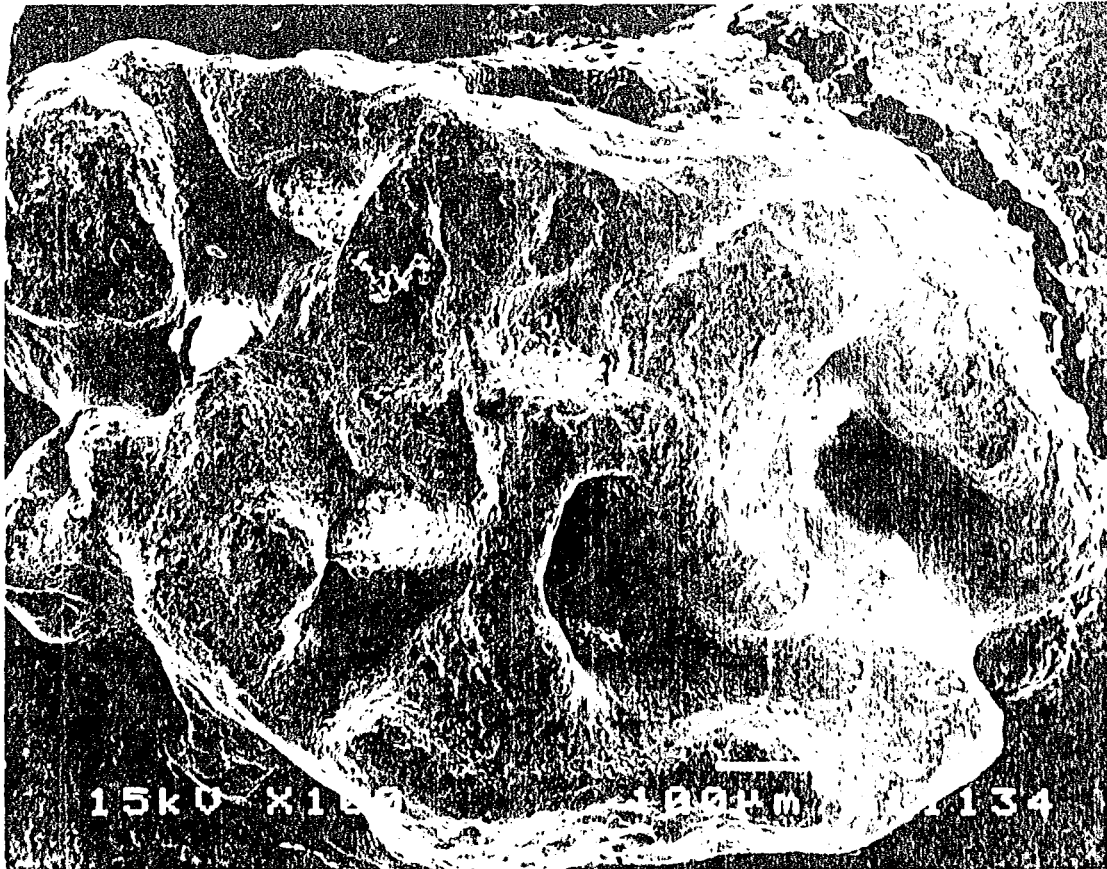
De los productos comerciales que fue posible conseguir, la Hidroxiapatita coralina [HAc]; en la microfotografía 15, tiene poros grandes de forma irregular, con diámetro aproximado de $100\ \mu$ en el lado más corto y de $250\ \mu$ en el más largo; la forma del gránulo es irregular, con bordes redondeados y sin ángulos; la masa del gránulo se aprecia compacta y se observa que los poros se comunican entre sí. La irregularidad en la forma de los gránulos es evidente cuando se comparan entre sí [microfotografía 16], el tamaño del poro aparentemente es uniforme, con un diámetro aproximado de $100\ \mu$ en todos los gránulos.

La microfotografía 17 corresponde a una muestra de Hidroxiapatita densa, tiene apariencia amorfa, con la presencia de cristales característicos (hexagonales), de tamaño variable (aproximadamente $10\ \mu$), y que se encuentran rodeados de cristales más pequeños de $1\ \mu$.

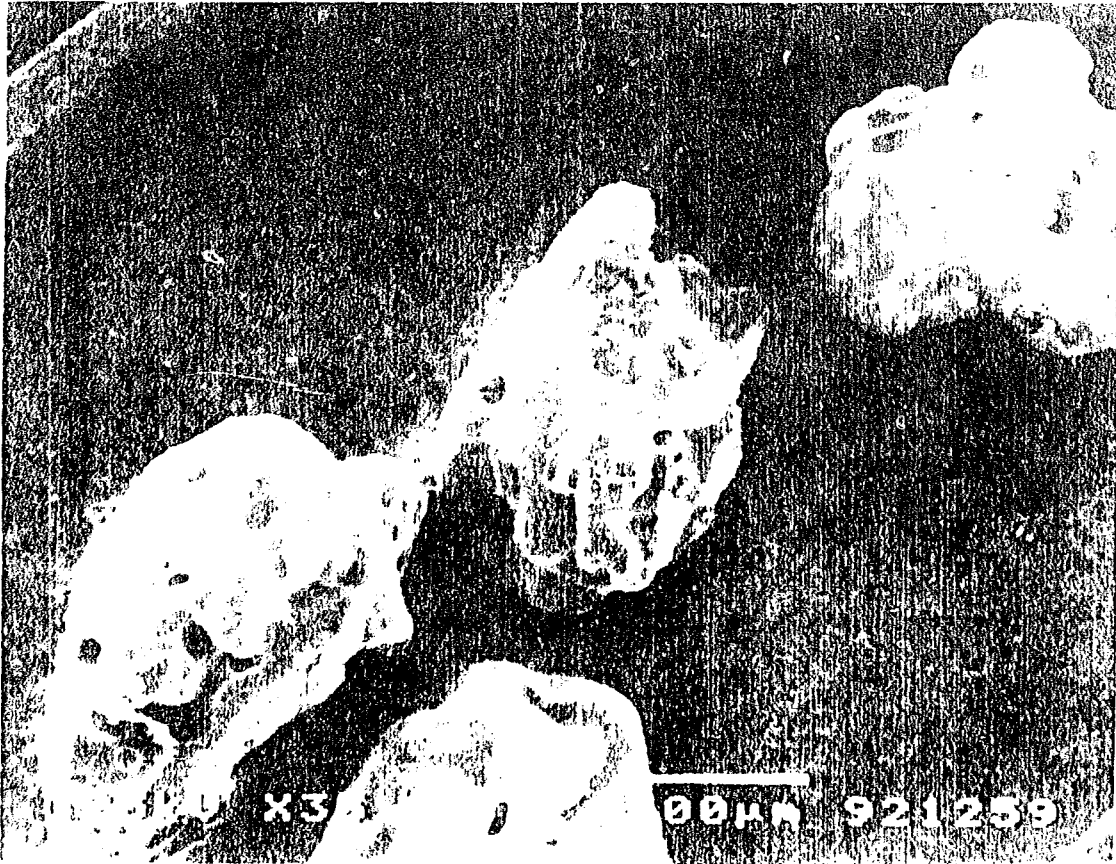
La variabilidad que se encontró en el tamaño y distribución de los poros en los gránulos observados, también fue evidente cuando se examinó un fragmento de hueso humano; en éste, los poros encontrados varían en su tamaño entre 50 y $300\ \mu$, con forma y distribución irregular (microfotografía 18).



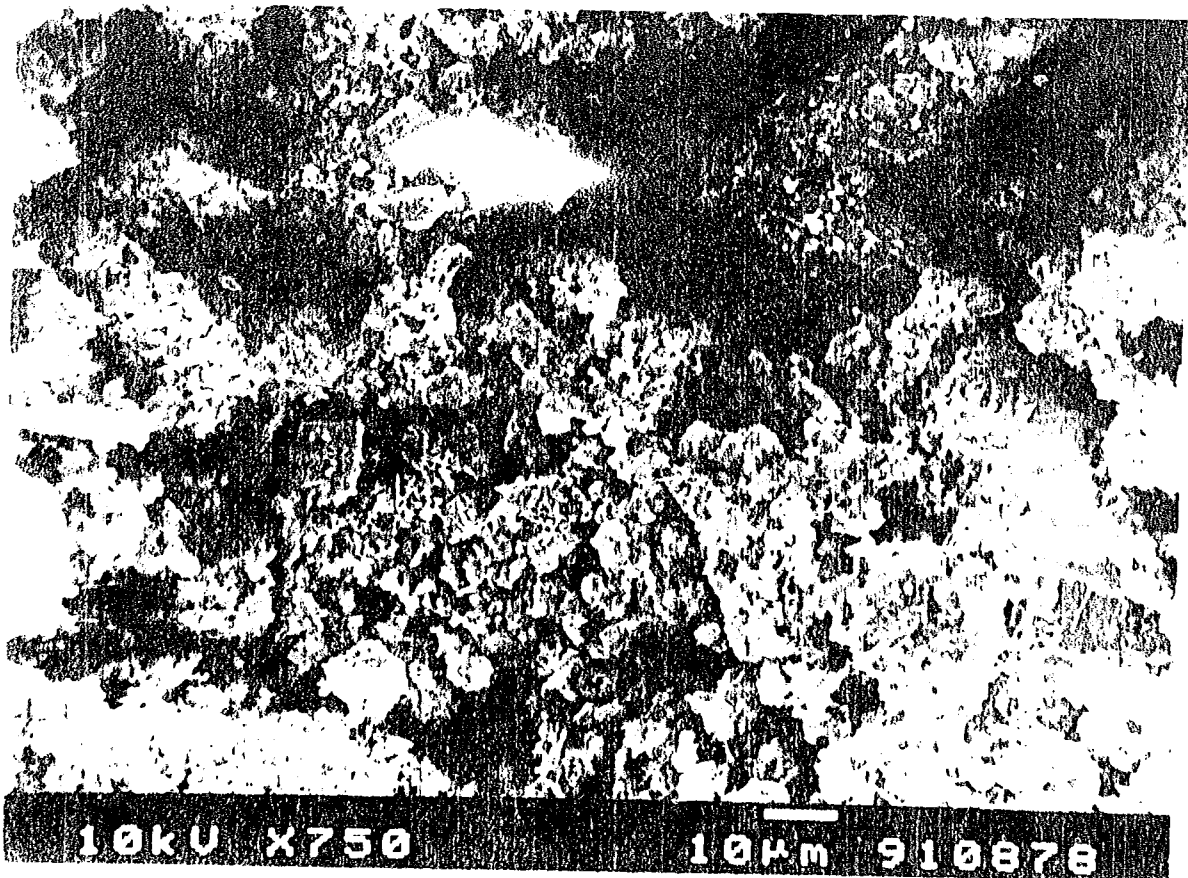
Microfotografía 14. Gránulo de Me preparado por molienda, tiene forma redondeada, en la superficie se observa que está fenestrada por poros pequeños de 20 a 40 μ de diámetro. (X35 25kV, JEOL JSM-5200).



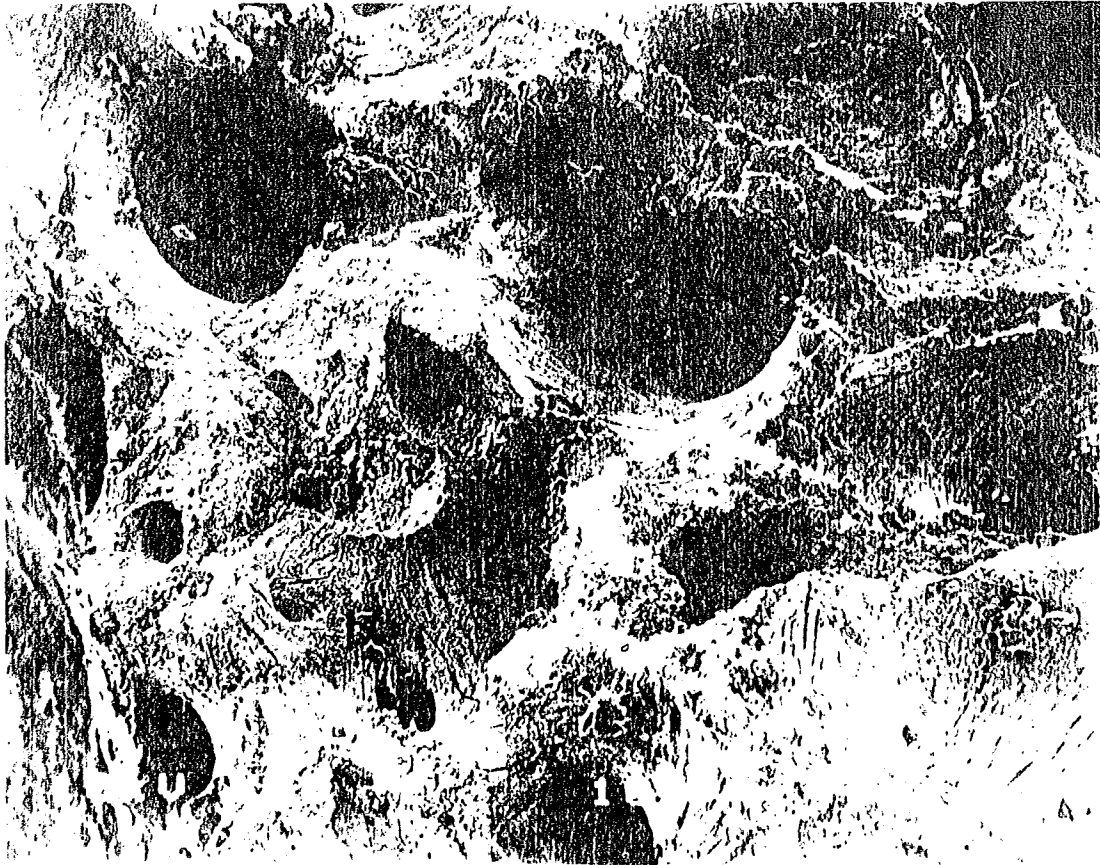
Microfotografía 15. Gránulo de Hidroxiapatita coralina HAc [Interpore 200™, Interpore International Inc], los poros son de forma irregular y con diámetro entre 100 y 200 μ . (X100 15kV, JEOL JSM-5200).



Microfotografía 16. Gránulos de Hidroxiapatita coralina (HAc), la forma de los poros, así como de los gránulos es irregular, el diámetro de los poros es entre 100 y 200µ. (X35 25 kV, JEOL JSM-5200).



Microfotografía 17. Muestra de hidroxiapatita densa, con cristales de forma hexagonal característica, y tamaño de 10μ aproximadamente. (X750 10kV, JEOL JSM-5200).



Microfotografía 18. Hueso humano, se observa variabilidad en el tamaño y distribución de los poros, los cuales miden entre 50 y 300 μ . (X75 10kV, JEOL JSM-5200).

4.2. MICROANÁLISIS DE RAYOS X (MRx).

Este procedimiento utiliza un detector de rayos-X de estado sólido en un microanalizador de haz de electrones. Los principios operativos son que la señal de la muestra pasa a través de una ventana delgada de berilio en un detector. La clave para comprender como trabaja un espectrómetro de energía-dispersiva (**Energy-Dispersive Spectrometer, EDS**) es reconocer que los pulsos del voltaje producidos por el detector son un promedio proporcional en tamaño para atraer la energía del fotón de rayos-x. El proceso básico de detección por el cual esta conversión proporcional de energía de fotón dentro de una señal eléctrica es conseguida es ilustrada en el siguiente diagrama:

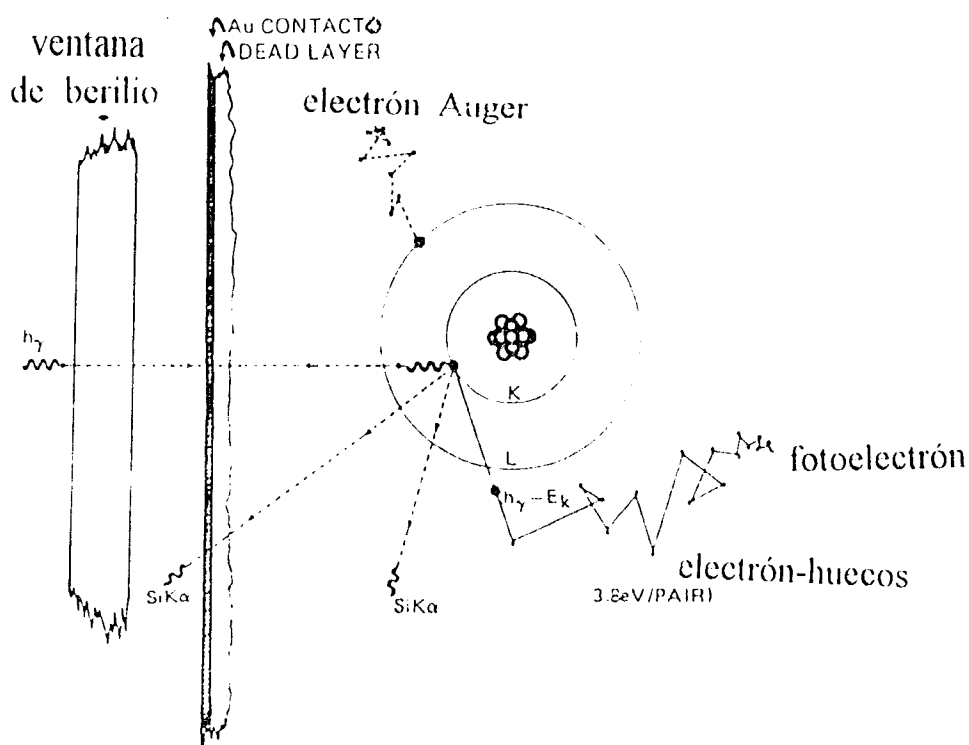


Figura 2.- Proceso de detección de rayos-x en el detector Si(Li). Golstein, J.I. *et al.*, 1981.

El cristal tranquilo de Si(Li) tiene una estructura de banda en la cual los estados de conducción de la banda están vacíos mientras que las valencias de la banda están llenas. Cuando un fotón de energético es

capturado, los electrones son promovidos dentro de la banda de conducción, dejando huecos en la valencia de la banda, bajo las *bias* (inclinaciones) aplicadas, estos electrones y los huecos son arrastrados aparte y colectados en unos electrodos en las caras del cristal. Los procesos de captura del fotón es absorción fotoeléctrica. El fotón de rayos-x incidente es primero absorbido por un átomo de silicón y entonces es emitido un electrón energético. Este fotoelectrón entonces crea pares de electrón-huecos como si viajara en el detector de silicón y se dispersara inelásticamente. El átomo de silicón es dejado entonces en una condición energética debido a la energía requerida para expulsar el fotoelectrón. Esta energía es subsecuentemente liberada en la forma de un electrón Auger o un rayos-x silicón. El rayos-x silicón puede ser reabsorbido, lo cual inicia el proceso otra vez, o puede ser dispersado inelásticamente. De este modo, una secuencia de eventos toma lugar llevando a la deposición de toda la energía original del fotón en el detector, a no ser que la radiación generada durante la secuencia, tal como un fotón de silicón K_{α} , escape del detector (Goldstein, J.I., *et.al.*, 1981). El detector es también sensitivo a los electrones energéticos con los cuales entran, tales electrones pueden formar directamente llevadores de carga.

De esta manera puede ser concluído que el microanálisis de rayos-x esta basado en la determinación del flujo de rayos-x por un desconocido relativo a otro de un estándar adecuado, para determinar la composición química presente en regiones tan pequeñas como unas micras de diámetro. Los estándares más facilmente obtenibles son aquellos de los elementos puros.

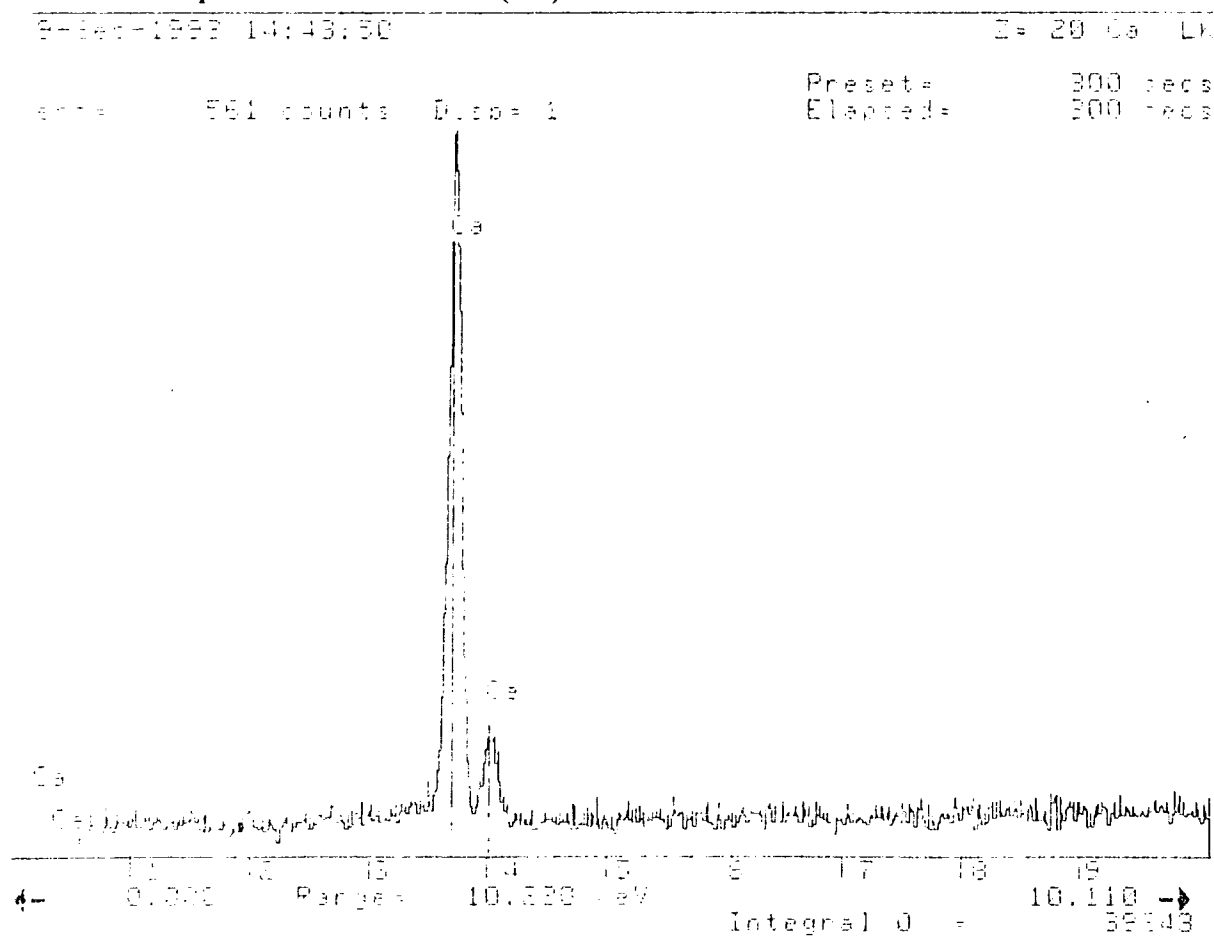
PREPARACIÓN DE LA MUESTRA.

Se prepararon especimenes de la *mellita eduardobarrosi* sp. nov., Hidroxiapatita coralina (HAc), y de Hidroxiapatita sintética (HAs) para ser llevados en un microanalizador contenido en un microscopio electrónico de Transmisión (TEM, JEOL 100CX) con aditamento EDS [Energy-Dispersive Spectrometer] Kevex, del Laboratorio de

Microscopía Electrónica del IFUNAM. Se obtuvieron las gráficas en las cuales se cotejaron los resultados con los datos del *software* de la microsonda. Es importante mencionar que con este tipo de análisis no se pueden detectar elementos ligeros como el oxígeno o el carbono, debido a que las energías asociadas son muy bajas (Bucio-Galindo, L., 1990).

RESULTADOS.

En la gráfica 1, se encuentran los elementos encontrados en la muestra de estrella de mar (EM), en donde la relación entre la intensidad vs energía concentra los picos característicos de los elementos que componen el espécimen, encontrando en este caso únicamente los correspondientes al calcio (Ca).



Gráfica 1. Microanálisis de Rayos-X de la *Mellita eduardobarrosi* sp.nov. (TEM, Jeol 100CX, EDS Kevex)

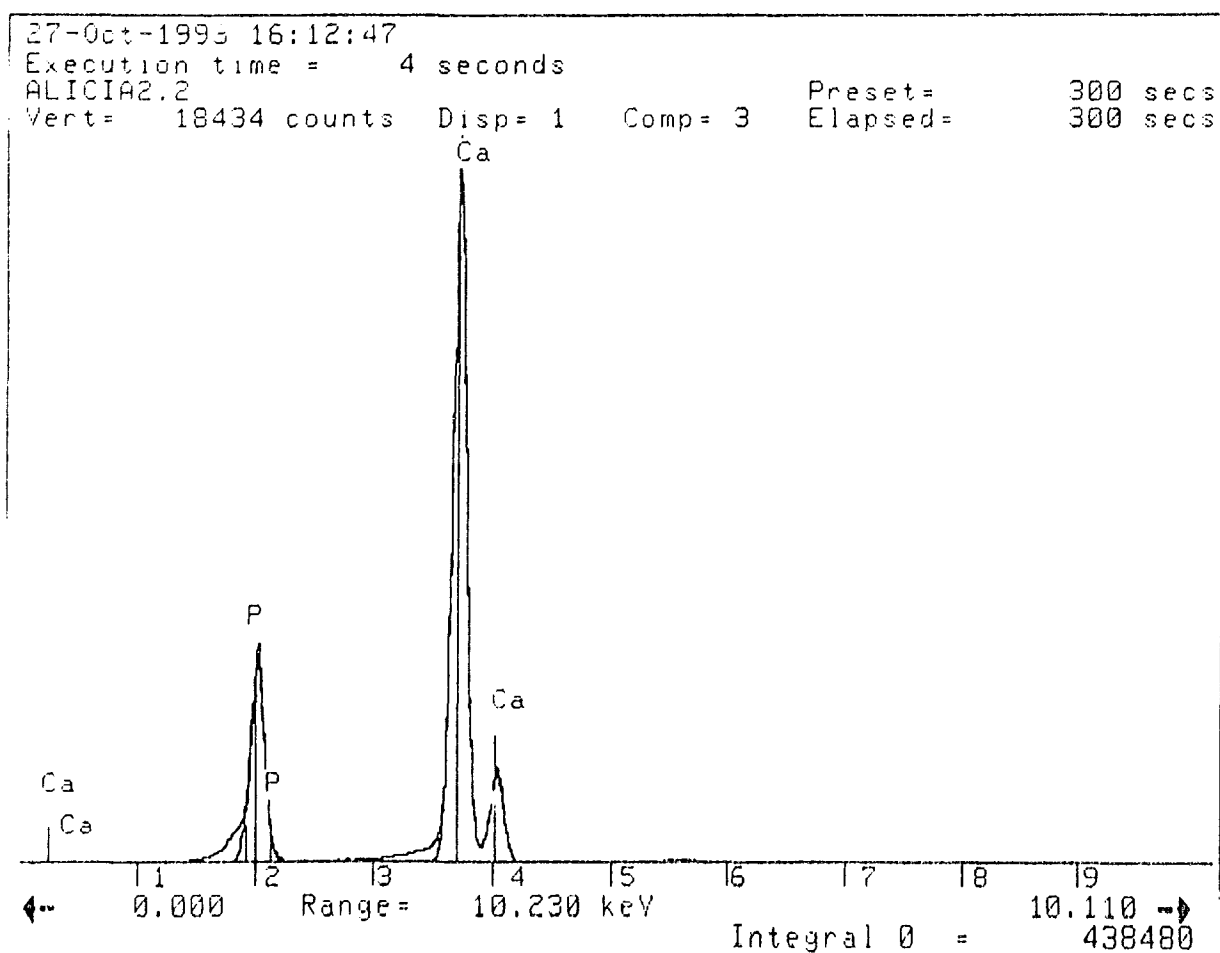
Las condiciones técnicas para realizar el análisis EDS [**Energy-Dispersive Spectrometer**], consistieron en: voltaje de aceleración de 100.0 KeV, ángulo de incidencia muestra-haz de rayo de 45 grados, ángulo de emergencia de rayos-x de 90 grados, y ángulo de incidencia ventana-rayos-x de 14.8 grados.

Con respecto a los resultados obtenidos en la muestra de Me, es importante mencionar que en el espectro solo se muestran los picos que son característicos de la composición de la muestra, de tal manera que aunque sólo se vean los correspondientes al calcio, es probable que existan elementos ligeros, tales como el C, N, y O, los cuales no pueden ser detectados por esta técnica.

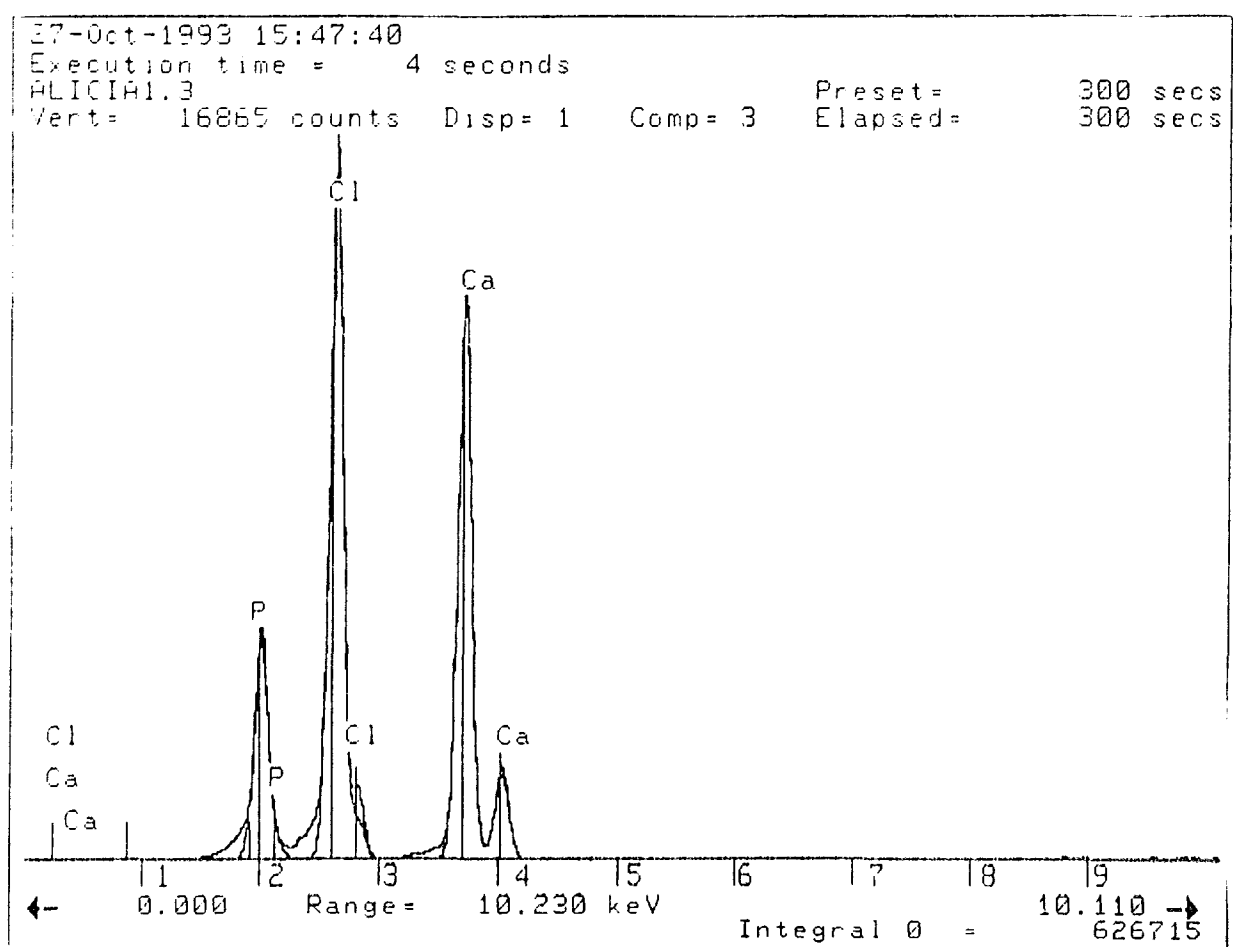
Las muestras de Hidroxiapatita coralina (HAc) [**Interpore 200, Interpore Inc.**] también fueron analizadas, a un voltaje de aceleración de 40 KeV, un ángulo de incidencia muestra-haz de rayos de 45 grados, ángulo de emergencia de 90 grados y un ángulo de incidencia ventana-rayos-x de 14.8 grados. (Gráfica 2)

En la gráfica 2, se observa que los picos obtenidos corresponden a los elementos calcio (Ca) y fósforo (P), lo cual es obtenido al solicitar la información al *software* del aparato.

En la gráfica 3 se encuentran los resultados obtenidos del microanálisis de las muestras de Hidroxiapatita sintética, trabajadas en las mismas condiciones de trabajo que las establecidas para la HAc y la Me. Los elementos encontrados en estas muestras son el Ca, P, y en forma importante el Cl.



Gráfica 2.- Microanálisis de Rayos-X de la Hidroxiapatita coralina (HAc). [TEM, Jeol 100CX, EDS Kevex)



Gráfica 3. Microanálisis de Rayos-X de Hidroxiapatita sintética (HAS). [TEM, JEOL 100CX, EDS KeveX)

4.3 ANÁLISIS DE DIFRACCIÓN DE RAYOS-X.

Para el análisis químico de materiales, actualmente se cuenta con métodos que logran la determinación cuantitativa y cualitativa de la composición elemental de los materiales; los análisis de rayos X [Diffraction X-Ray Analysis] se consideran como procedimientos espectroscópicos, porque en términos generales, fundamentan su estudio en la correlación de la composición elemental con las variaciones de intensidad específicas en el espectro de emisión o absorción del espécimen excitado (Jenkins, R. 1976); esto significa que, el principio básico de este análisis es que los materiales están constituidos de diversos compuestos que se organizan en cristales, los cuales tienen un comportamiento característico cuando son expuestos a un haz de rayos-x, por lo que se establece que una muestra cristalina difractará los rayos-x obedeciendo a la ecuación de Bragg (Davidson, 1980):

$$2d_{hkl}\text{sen } \theta = n \lambda$$

Esta ley expresa que para una cierta *distancia interplanar* d_{hkl} correspondiente a una familia de planos $\{hkl\}$, sobre la cual se incide un haz de longitud de onda (λ); existe un *conjunto discreto* $\{\theta_1, \theta_2, \theta_3\}$ de ángulos de incidencia θ (también denominado como ángulo de difracción de Bragg), para el cual ocurrirán las reflexiones R_1, R_2, R_3, \dots (con $n= 1, 2, 3$) respectivamente, se les llama *reflexiones* debido a la analogía que existe entre este fenómeno y la ley de la reflexión en óptica [donde el ángulo de reflexión es igual al de incidencia] (Bucio Galindo, L. 1990).

Estas reflexiones se entienden como señales de máxima intensidad causada por la *interferencia constructiva* entre los rayos X que previamente han sido dispersados luego de incidir a un ángulo θ sobre los planos de la familia $\{hkl\}$ (figura 2).

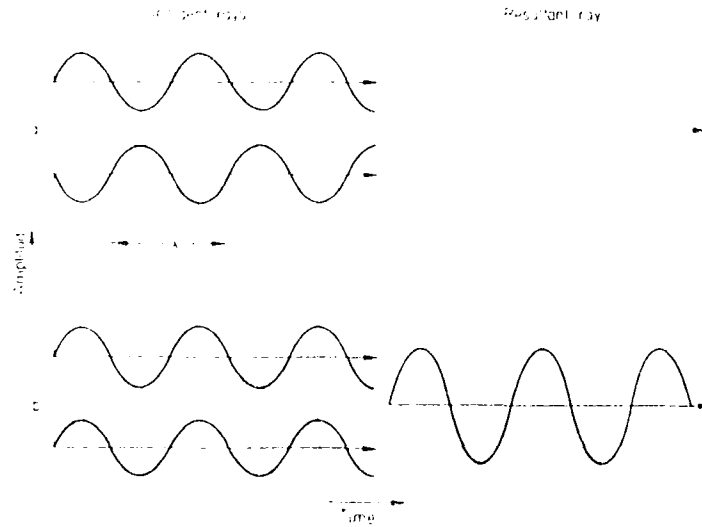


FIGURA 3. Interferencias (a) constructiva y (b) destructiva.

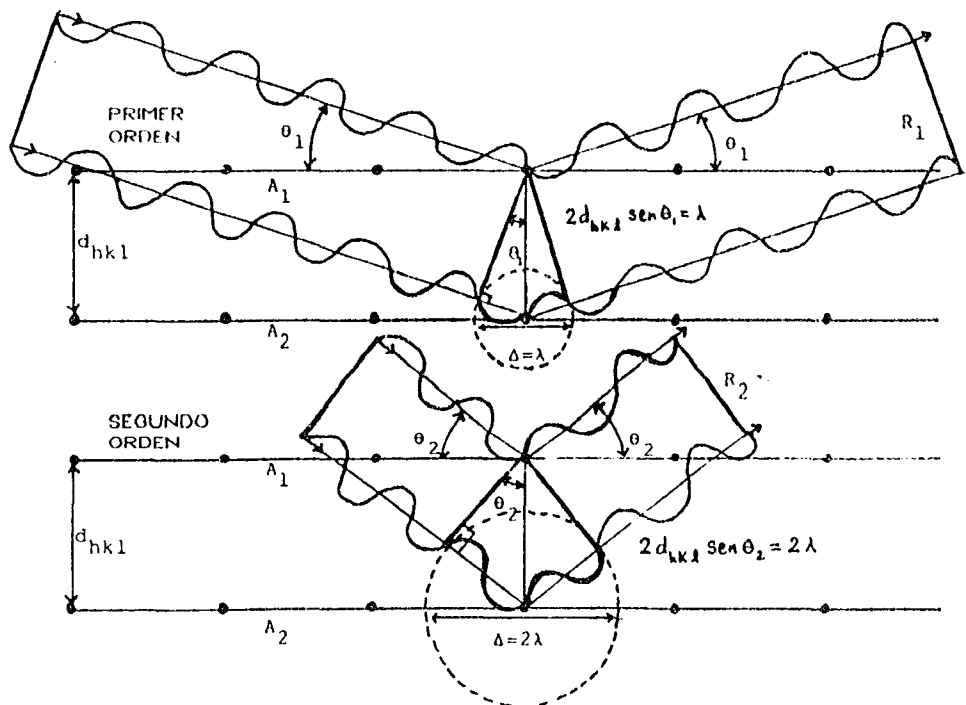


Figura 4. Interferencia constructiva para reflexiones de primero y segundo orden ($n=1$ y 2).

La condición matemática para que en el ángulo θ_i ocurra la reflexión R_i se ilustra en la figura 3; los rayos X que inciden sobre los planos A_1, A_2, A_3 , etc. (de una misma familia), son dispersados por los átomos de esos planos ocurriendo el fenómeno de difracción, luego entonces, *interfieren constructivamente* cuando su *diferencia de camino óptico* Δ es un múltiplo entero n de la longitud de onda λ de la radiación X incidente. En la figura 3 se han representado las reflexiones de primer orden R_1 ($n=1$) y de segundo orden, R_2 ($n=2$).

La ecuación de Bragg involucra cuatro variables: la distancia interplanar d_{hkl} -que normalmente se desea determinar-; el ángulo θ , la longitud de onda λ y n , que en un experimento es un número natural que puede tomar cualquier valor (Bertin, E.P. 1970). Las reflexiones de orden superior pueden ser detectadas siempre y cuando se mantenga la relación:

$$n \leq 2d_{hkl} / \lambda.$$

Para ángulos muy pequeños los valores de d_{hkl} se vuelven muy grandes; las reflexiones de mayor orden están en ángulos más grandes que los correspondientes a reflexiones de menor orden. La d_{hkl} más pequeña que se puede detectar se puede inferir a partir de la desigualdad de $n \leq 2d_{hkl} / \lambda$ haciendo $n=1$; obteniendo una $d_{mínima}$ del orden de $\lambda/2$.

Utilizando la ley de Bragg para radiación X característica $K_{\alpha 1}$ de un ánodo de Cu ($\lambda = 1.54051$). Los análisis consistieron en hacer un barrido continuo del ángulo 2θ desde 6° hasta 65° . De esta manera se determinaron indirectamente los valores d_{hkl} .

PREPARACIÓN DE LA MUESTRA:

El análisis del material por medio de los rayos X se realizó en muestras preparadas en forma de polvo, esto se logró porque los gránulos del esqueleto de la *mellita eduardobarrosoi sp. nov.*, se molieron en un mortero y se trituraron con un pistilo de ágata hasta

lograr polvo fino. Lo mismo se hizo con los materiales comerciales que sirvieron como control. Uno de ellos fue la Hidroxiapatita coralina (HAc) comercial y el otro la Hidroxiapatita densa (HAd) proporcionada por el FATA. del IFUNAM.

El *Método de polvos* tiene como finalidad dar la oportunidad de que todas las familias de planos existentes en la muestra, tengan aproximadamente la misma probabilidad de reflejar los rayos X (Davison W. 1980), teniendo la gran ventaja de no alterar la muestra, y de revelar las estructuras químicas presentes. El utilizar esta técnica trae consigo la posibilidad de caracterizar una muestra cristalina, sabiendo de antemano que cada fase en la muestra posee un conjunto de distancias interplanares que los distingue (Plug, H.P., & Alexander, L.E., 1954). Los polvos así preparados se colocaron en un porta muestras de vidrio.

En el procesamiento de las muestras se utilizó la ecuación de Bragg usando la radiación X característica $K_{\alpha 1}$ de un ánodo de Cu ($\lambda = 1.54051$), haciendo un barrido continuo del ángulo de difracción 2θ de 2 a 70 en un primer análisis, y luego de 8 a 60 en una segunda corrida, la que sirvió para confirmar la veracidad de los resultados iniciales.

Para el análisis de los materiales en este estudio se empleó un **Difractómetro Siemens D 5000** con ánodo de cobre del Departamento de Estado Sólido del IFUNAM. En este instrumento, la intensidad del haz difractado se mide a través de un contador, en donde el número de pulsos de corriente producidos por unidad de tiempo es directamente proporcional a la intensidad del haz de rayos X que entró en él.

Los componentes fundamentales del difractómetro se muestran en la figura 5; el porta muestras **P** se sujeta por un dispositivo **D** que se adhiere, por medio de un imán, a la placa giratoria **G**. Este conjunto está rígidamente unido al disco **H** por medio de la placa **G**.

El disco **H** puede girarse alrededor del eje **O** (perpendicular al plano de la figura 5. Los rayos X divergen de **S**, donde está la mancha focal, sobre la línea focal que viene del tubo de rayos-x. Al llegar a

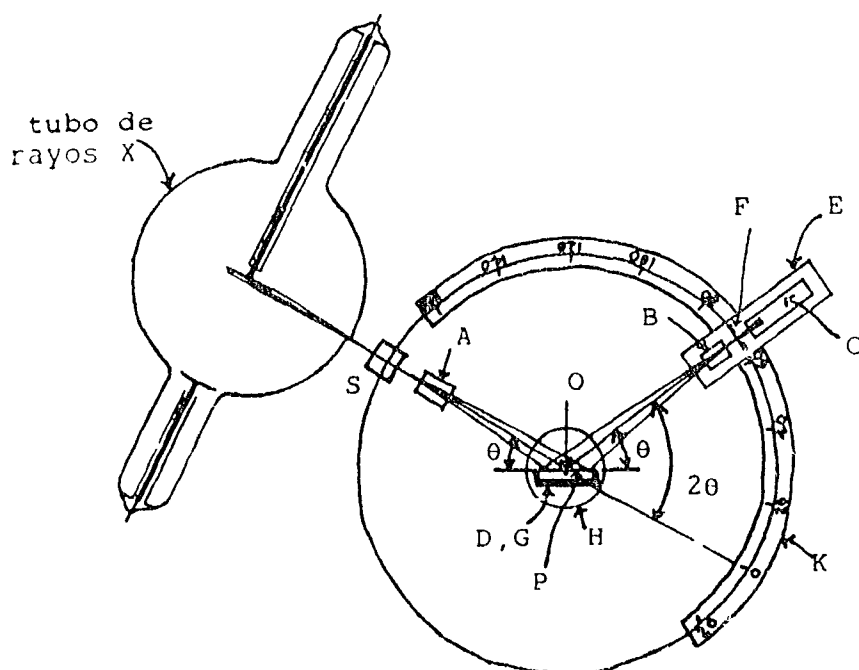


Figura 5.- Esquema de un difractómetro de rayos-X.

muestra son difractados por ésta, y forman un haz difractado que converge enfocándose en la apertura **F**, para introducirse enseguida al contador **C**. **A** y **B** son aperturas que definen y coliman los haces incidente y difractado respectivamente.

El contador y las aperturas receptoras van montados en un brazo goniométrico **E** que gira alrededor del eje **O**, y cuya posición angular 2θ está dada según la escala graduada **K**. El brazo **E** y el disco **H** están acoplados mecánicamente de modo que una rotación de 2θ grados en el contador (montado en el brazo **E**), va acompañada *automáticamente* de una rotación de θ grados de la muestra (en el disco **H**). Este acoplamiento asegura que los ángulos de incidencia y de reflexión en el plano de la muestra sean iguales entre sí e iguales a la mitad del ángulo 2θ durante todo el tiempo que dura el barrido del ángulo 2θ . Este es un arreglo que resulta muy conveniente y necesario para preservar las condiciones de enfoque.

arreglo que resulta muy conveniente y necesario para preservar las condiciones de enfoque.

Las muestras sometidas al análisis en el difractómetro arrojan las cuentas resultantes de la difracción de los rayos X. Dichas cuentas se manifiestan en el difractograma (Dgr) como picos que son característicos de composiciones cristalográficas específicas; a este procedimiento se le denomina como identificación de fases cristalinas, cuando una muestra tiene diferentes fases, las gráficas obtenidas de la muestra se comparan con las que se encuentran almacenadas en el software del difractómetro, es decir, difractogramas estándar.

Con la finalidad de acelerar el procedimiento de comparación, se proporciona a la computadora del difractómetro una lista de elementos que se piensa constituyen al material que se está analizando. De esta manera el software muestra diferentes alternativas al comparar los resultados de las cuentas de la muestra con las que tiene almacenadas, determinándose al final cuáles son los difractogramas que son similares entre sí, concluyendo de esta manera cuál es la fase que está presente. En los análisis de rutina la DRx se puede obtener la siguiente información acerca de un compuesto: (i) *Identidad* : cada composición cristalina y estructural tienen sus propios picos de difracción en ángulos de difracción específicos, únicos para esa composición y estructura, aún en casos donde ellos pueden tener fórmula química similar o idéntica (ejemplo calcita, aragonita y varias formas de carbonato de calcio). (ii) *Pureza*: Se puede determinar si el compuesto consiste de una fase únicamente o de fases mixtas. (iii) *Cristalinidad*: Refleja el tamaño del cristal y/o perfección (debido a la presencia o ausencia de colonias o defectos.) en el cristal como derivado de la diseminación de los picos de difracción, $\beta_{1/2}$ (iv) *Tamaño aproximado y forma*.

En los patrones de difracción es importante mencionar que la diferencia en la resolución de los picos de difracción refleja el tamaño del cristal, cuando los picos son anchos y la intensidad es débil, la cristalinidad del material es pobre (Weinlander, M.,1992; Zhou, J., *et.al.*, 1993).

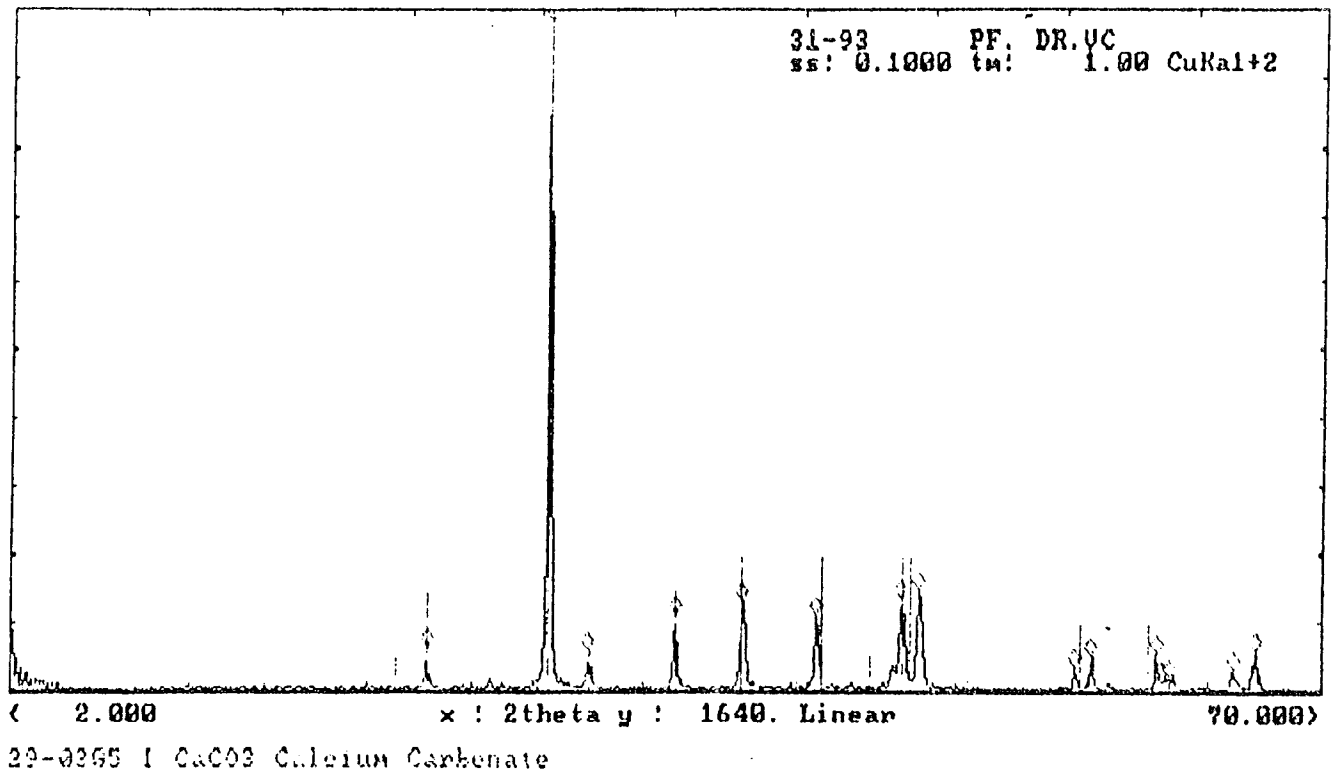
RESULTADOS:

Se obtuvieron difractogramas de las muestras de *mellita eduardobarrosoi* sp.nov. (Me), de hidroxiapatita sintética (HAs), Hidroxiapatita coralina (HAc) y de hueso humano (HH), los cuales se compararon con el difractograma estándar de Hidroxiapatita (HAe) contenido en el programa del aparato.

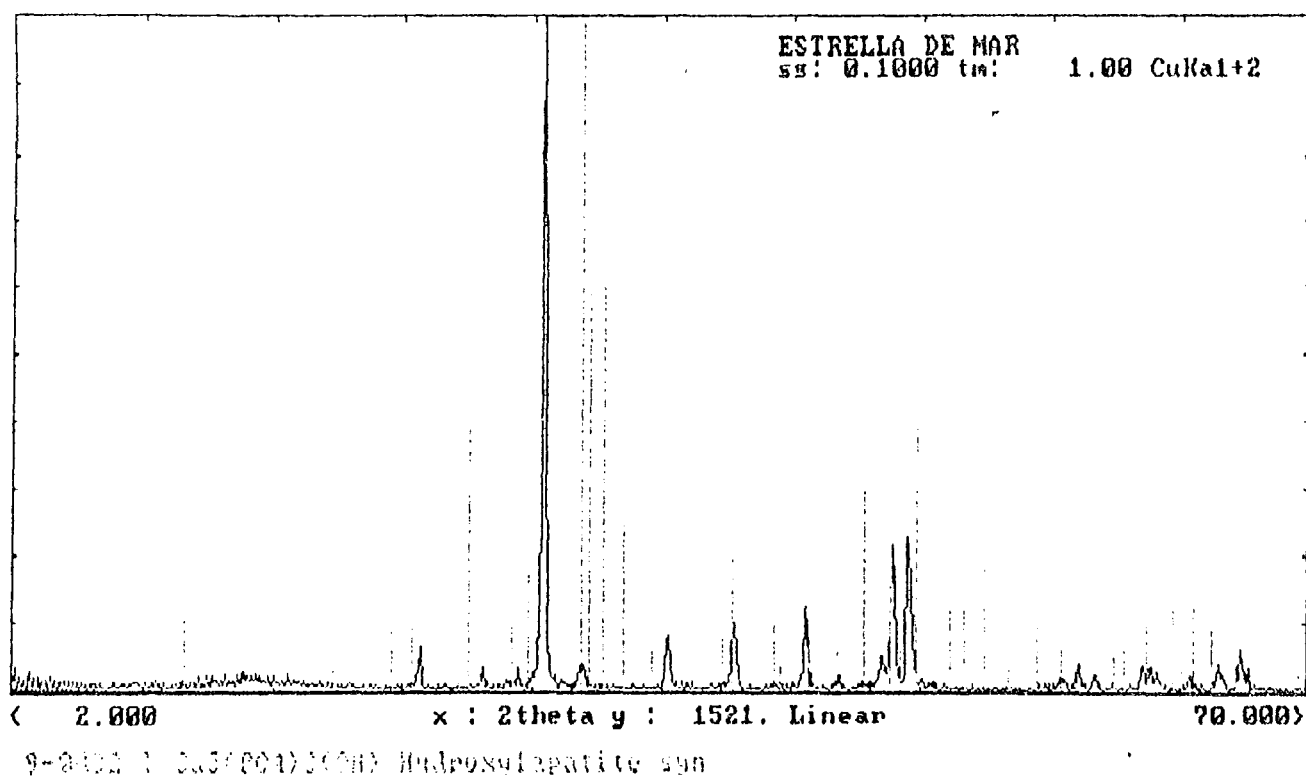
La muestra de *Mellita Eduardobarrosoi*, sp.nov. (Me), también denominada como estrella de mar, fue examinada en el aparato mediante un barrido continuo del ángulo 2θ de 2° hasta 70° , en la gráfica 4 se encuentran los picos obtenidos en el difractómetro, los trazos representan las cuentas producidas por la incidencia de los rayos en la superficie de la muestra, estos datos se cotejaron con la información contenida en el *software* del difractómetro, indicando en el resultado que en el material estudiado se identifica el CaCO_3 como el principal constituyente de la muestra, y que tiene una fase cristalina que coincide con la *calcita* [6CaCO_3].

Se barrió nuevamente la muestra pero no se encontró ningún otro constituyente. Las cuentas obtenidas en el análisis de la muestra de Me, se cotejaron con la información que el sistema tiene de la hidroxiapatita estándar. En la gráfica 5 se muestra el difractograma donde existe una diferencia en los trazos de las cuentas de la Me y las que se consideran estándar de la HA.

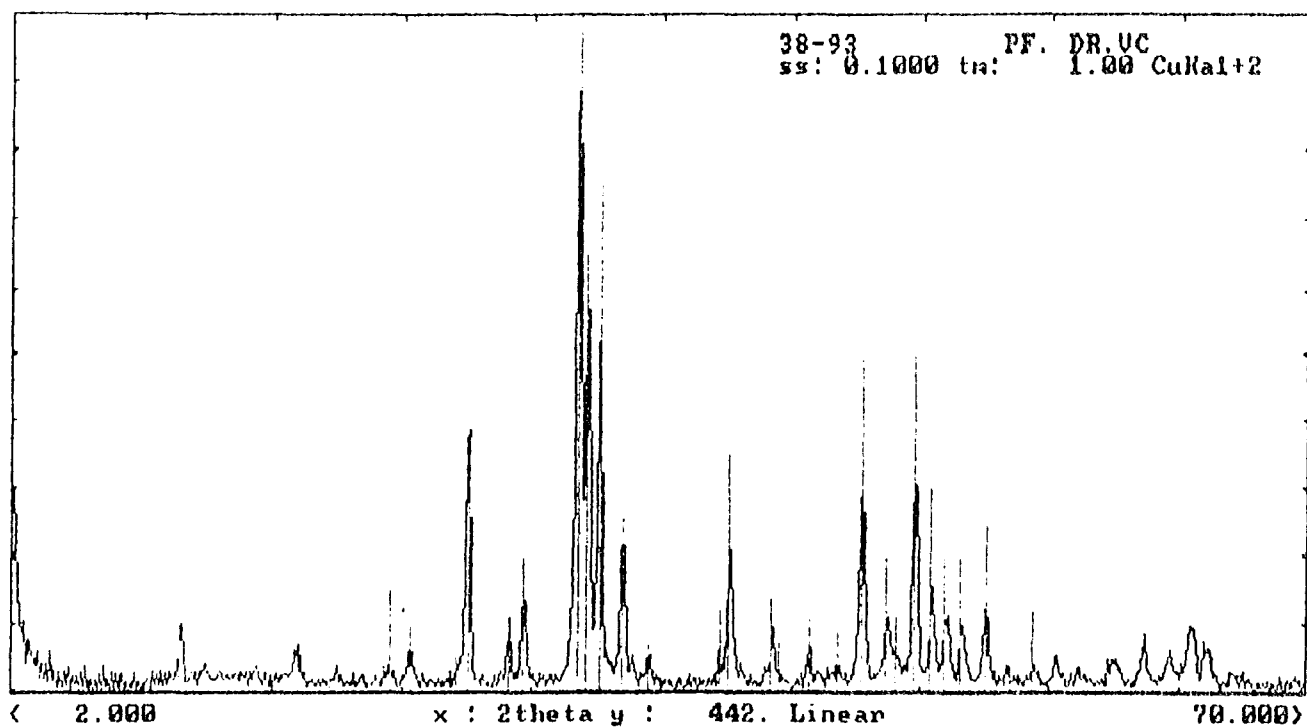
Otro material que también se estudio fue la Hidroxiapatita coralina (HAc). El análisis se hizo por un barrido continuo de la muestra de 2θ de angulación entre 2° y 70° , obteniendo la mayor cantidad de cuentas entre 30 y 35; al ser comparados los picos con la información del difractómetro se encontró que el material estudiado fue identificado como fosfato de calcio [$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6$], en la grafica 6 se presenta el difractograma de la HAc.



Grafica 4.- Gráfica de las cuentas obtenidas por el barrido de la muestra a una angulación de 2θ entre 2° y 70° , los picos corresponden al Carbonato de Calcio $[\text{CaCO}_3]$, cuya fase cristalina es *calcita* $[\text{6CaCO}_3]$. En rojo se marcan las cuentas del análisis de la Me, y en verde los picos de referencia que proporciona el difractómetro.

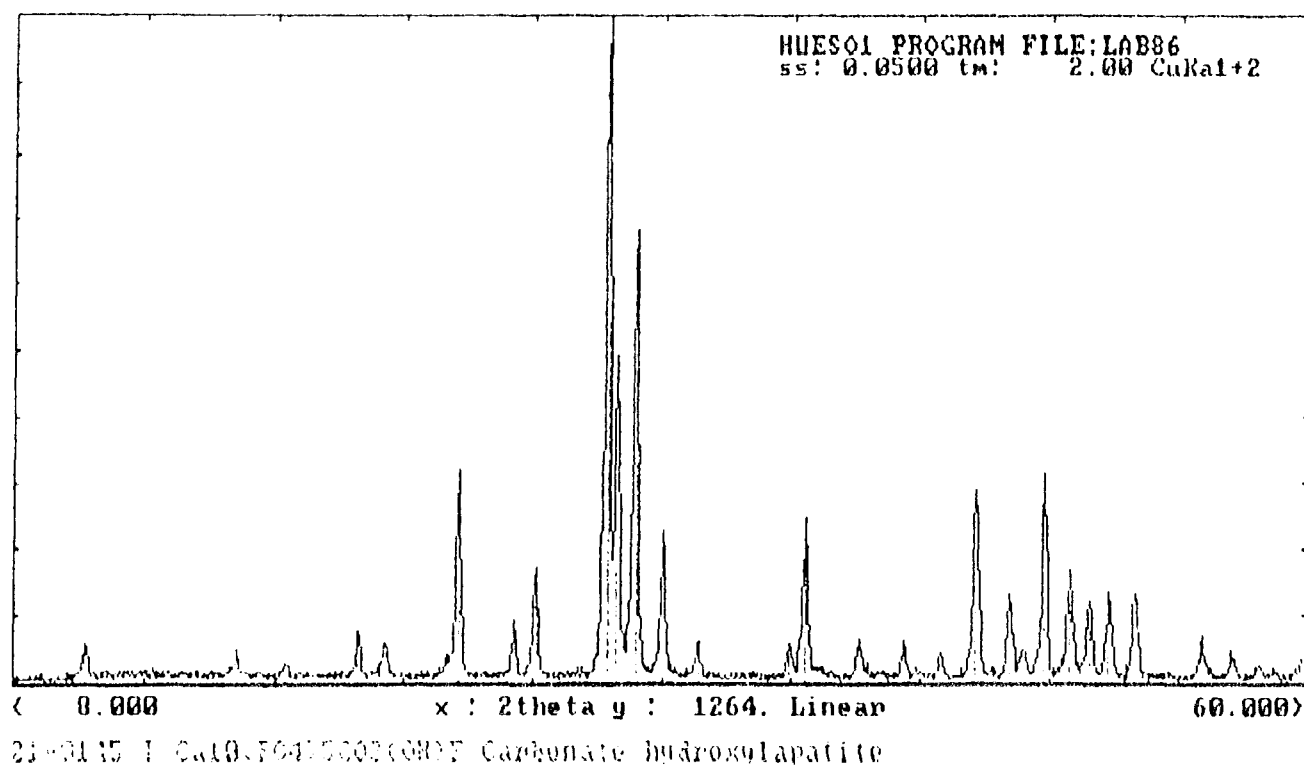


Gráfica 5.- Gráfica obtenida por el difractómetro al comparar las cuentas del análisis de la (Me) con la información que el aparato tiene de las cuentas de la hidroxiapatita. Nótese la incongruencia entre los diferentes valores. En rojo los valores de la (Me) y en azul la hidroxiapatita.(HA)



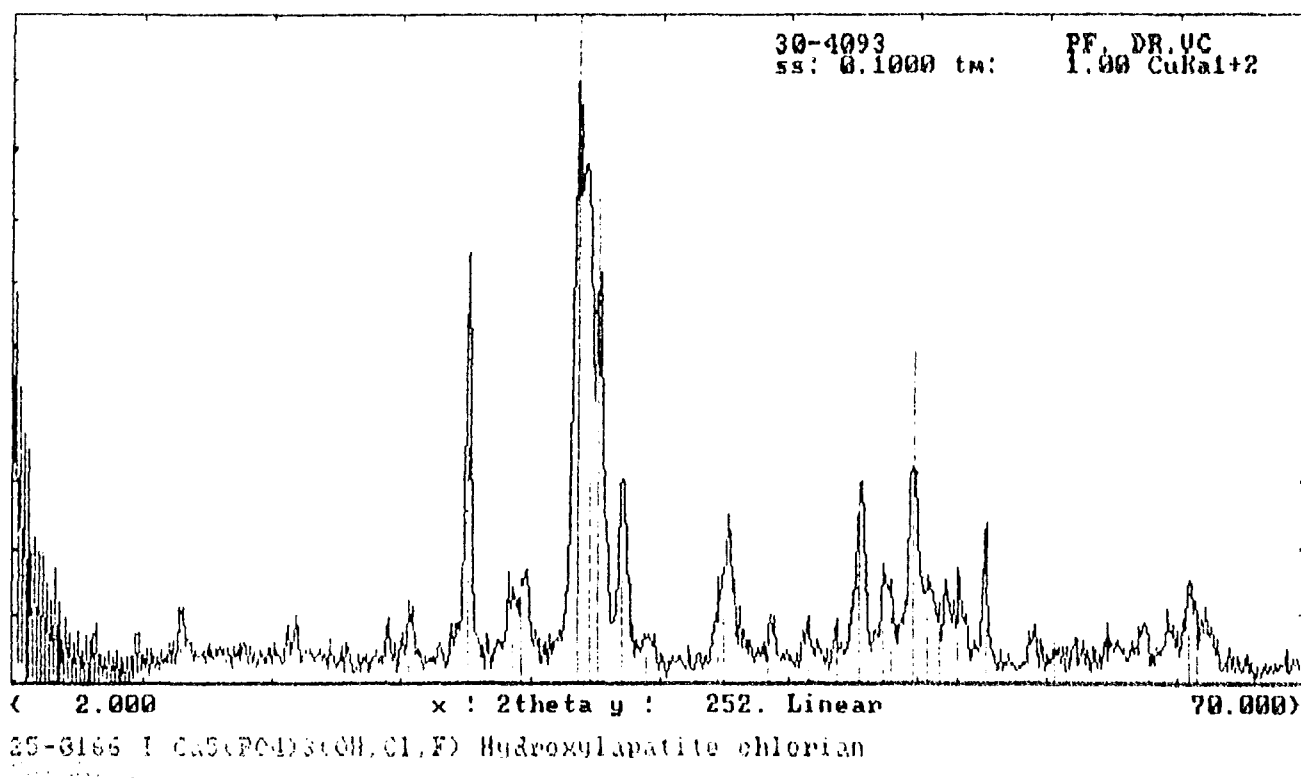
Gráfica 6.- Difractograma del de la Hidroxiapatita coralina (HAc), la comparación con los datos contenidos en el aparato señalan que se trata de un fosfato de calcio, con la fórmula $[Ca_{10}(PO_4)_6]$. En rojo las cuentas del análisis de la HAc, y en verde los picos de referencia contenidos en el aparato para el fosfato de calcio

En la gráfica 7 se presenta el resultado del análisis de las muestras de hueso humano, el resultado de las cuentas obtenidas después de barrido el espécimen se compararon los picos y se encontró que correspondían a la composición de la hidroxiapatita.



Gráfica 7.- Difractograma obtenido de la muestra de hueso humano (HH), las cuentas del difractograma coinciden con la composición de la hidroxiapatita. En rojo las cuentas del análisis de la HH, y en verde los picos de referencia contenidos en el aparato para la hidroxiapatita.

En la gráfica 8 se muestran los resultados obtenidos del barrido de las muestras de Hidroxiapatita sintética (HAs), fue barrida en un rango de 2° a 70° , encontrando que al cotejar los picos de las cuentas, la composición resultante es de hidroxiapatita con algunos elementos extraños (Cl, F, y OH).



Gráfica 8.- Difractograma de la muestra de Hidroxiapatita sintética (HAs), el resultado muestra que su composición corresponde a la Hidroxiapatita, con algunos elementos extraños (Cl, F, y OH). En rojo el trazo de las cuentas de la HAs y en verde las referencias del difractómetro.

4.4. ESPECTROSCOPIA INFRARROJA.

El espectro infrarrojo (IR) es causado por los diferentes modos de vibraciones y rotación de grupos funcionales de un compuesto. La banda de absorción en el espectro IR se origina cuando una molécula es elevada de un nivel de energía a otro de energía mas alta debido a la absorción de la radiación (Parker, FS., 1983). Las posiciones de las bandas ν , están expresadas en centímetros recíprocos (cm^{-1}) y son proporcionales a la fuerza constante, f , entre los átomos o grupos de átomos habiendo reducido la masa, μ (Le Geros R.Z., 1991).

Los factores determinando la frecuencia de absorción son: elasticidad de unión (fuerza constante, f); masas relativas de los átomos unidos. Otros factores que pueden causar desplazamientos en la frecuencia de las bandas de absorción son efectos eléctricos, naturaleza, tamaño y cargas de átomos vecinos, cambios de fase y nitrógeno uniente.

Los principios generales útiles en la correlación del espectro con la estructura molecular son: (a) cada frecuencia vibracional o banda espectral está relacionada a un movimiento definido (por ejemplo elongaciones o flexiones) de los átomos vibrantes. (b) cada configuración específica de los átomos formando el radical producirán un espectro vibracional característico, (c) la frecuencia vibracional es dependiente tanto de las masas de los átomos como de las fuerzas internas que mantienen la configuración de la molécula (tal como las distancias interatómicas), y los cambios en el ambiente de los grupos moleculares alterarán el parámetro de equilibrio del grupo molecular (simetría). (Le Geros, R.Z. 1991; Colthup N.B., 1990).

En el caso de los compuestos fosfatados. el análisis de IR da la siguiente información: (a) identificación de fases y (b) pureza; por la presencia de grupos funcionales (ej. HPO , CO , PO componentes orgánicos), (c) medio ambiente de los grupos funcionales.

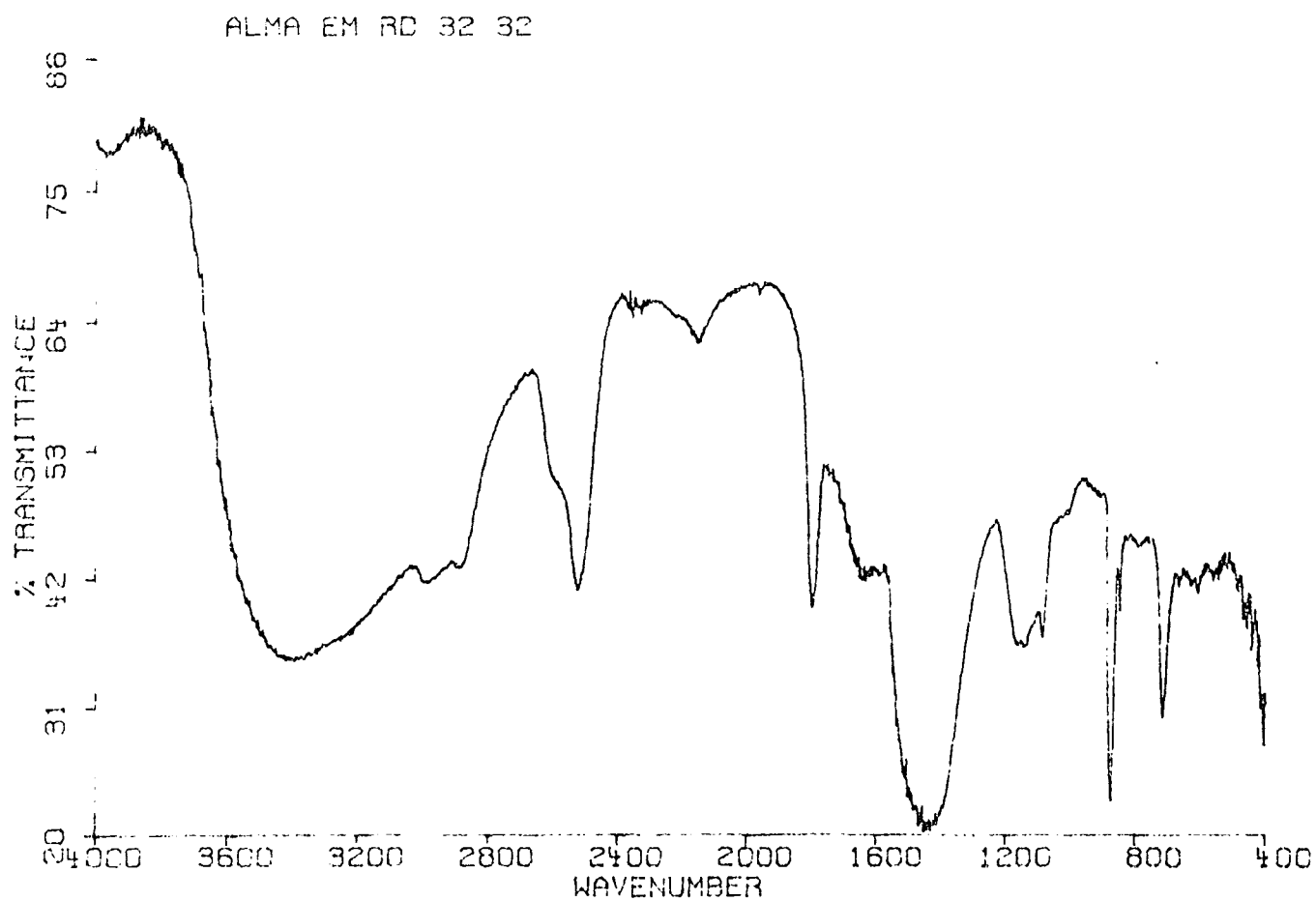
Todos los espectrómetros de IR tienen una fuente de radiación infrarroja, la que es comunmente utilizada para algunos materiales sólidos calentados a la incandescencia por una corriente eléctrica. El Nerst Glower es un recurso compuesto principalmente de óxidos de tierras raras tales como zirconio, itrio y torio; y el Globar es un bastón de silicón carburo. Otros material también han sido usados. Todas estas fuentes son emisores eficientes de radiación infrarroja y alcanzan la distribución de energía de un cuerpo negro teórico (Colthup N.B., Daly L.H. & Wiberley, 1990).

PREPARACIÓN DE LA MUESTRA.

Las técnicas para obtener el espectro infrarrojo de los sólidos son más diversificadas que para los líquidos y los gases. Si se cuenta con un solvente adecuado, el sólido puede ser disuelto y medido; los solventes utilizados pueden ser cloroformo y sulfuro de carbono ya que dan transparencia a las preparaciones. Para el análisis de espectroscopia infrarroja, se utilizó el FTIR [Fourier transform infrared, Nicolet 510] del laboratorio de Caracterización Óptica del departamento de FATA del IFUNAM. Las muestras fueron trituradas y molidas en un mortero de ágata hasta obtener moliendas muy finas del esqueleto de la *Mellita Eduardobarrosoi* sp.nov. (Me), hidroxiapatita coralina (HAc) y de hidroxiapatita sintética (HAs). Las muestras fueron suspendidas en bromuro de potasio (BrK) para ser llevadas al aparato y ser analizadas con técnica de reflectancia difusa.

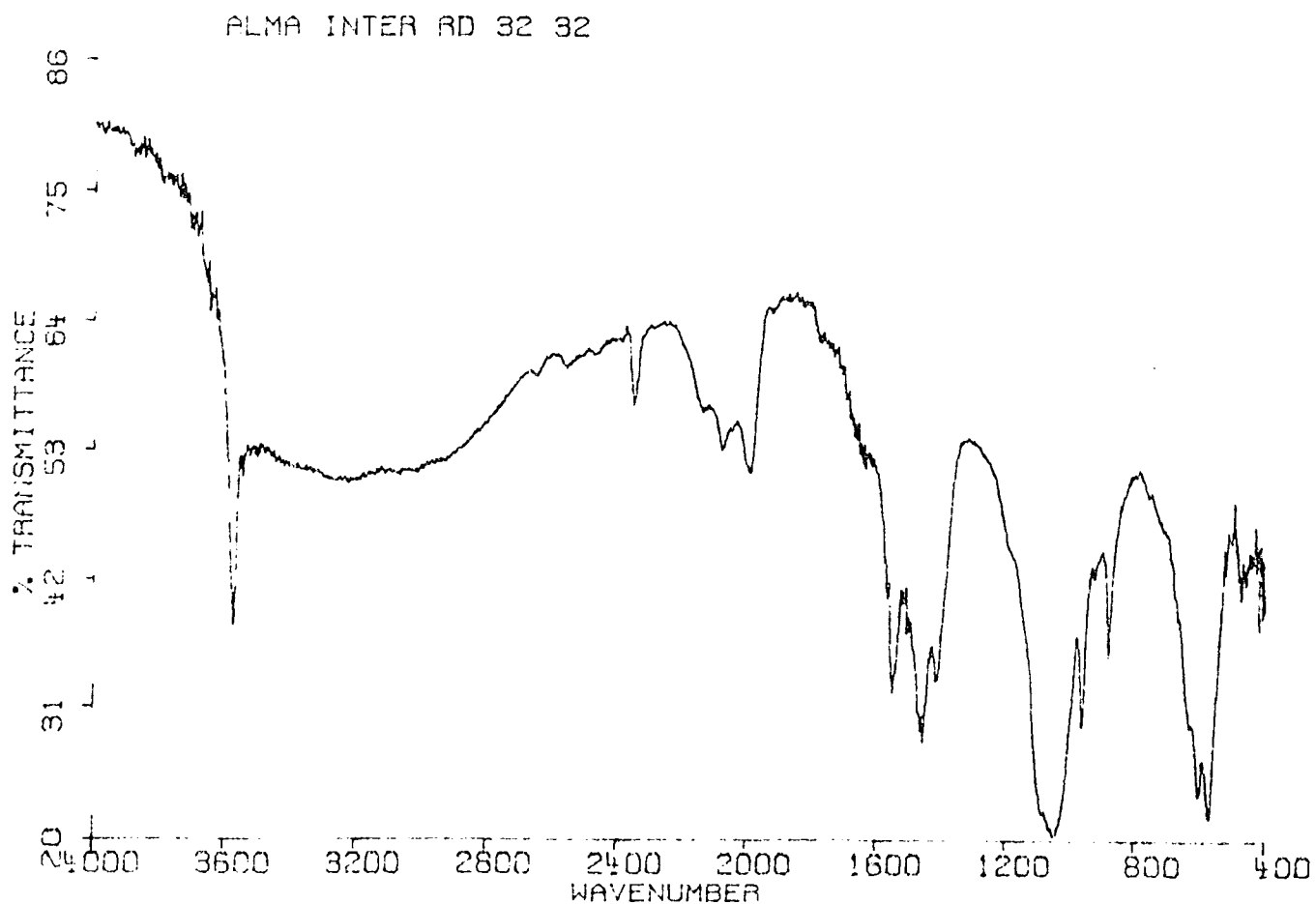
RESULTADOS

El espectro de infrarrojo (IR) indica que la *mellita eduardobarrosoi*, sp.nov. (gráfica 9), tiene bandas de absorción entre 700 cm^{-1} y $3,500\text{ cm}^{-1}$ aproximadamente, el diagrama revela picos muy intensos en 715 , 975 , $1,450$, $1,800$, $2,500$ y 3400 cm^{-1} , los cuales corresponden al carbonato de calcio [CaCO_3] (Pouchet, Ch.J., 1985). Es probable que el contenido mineral de la muestra de la Me, sea exclusivamente el CaCO_3 .



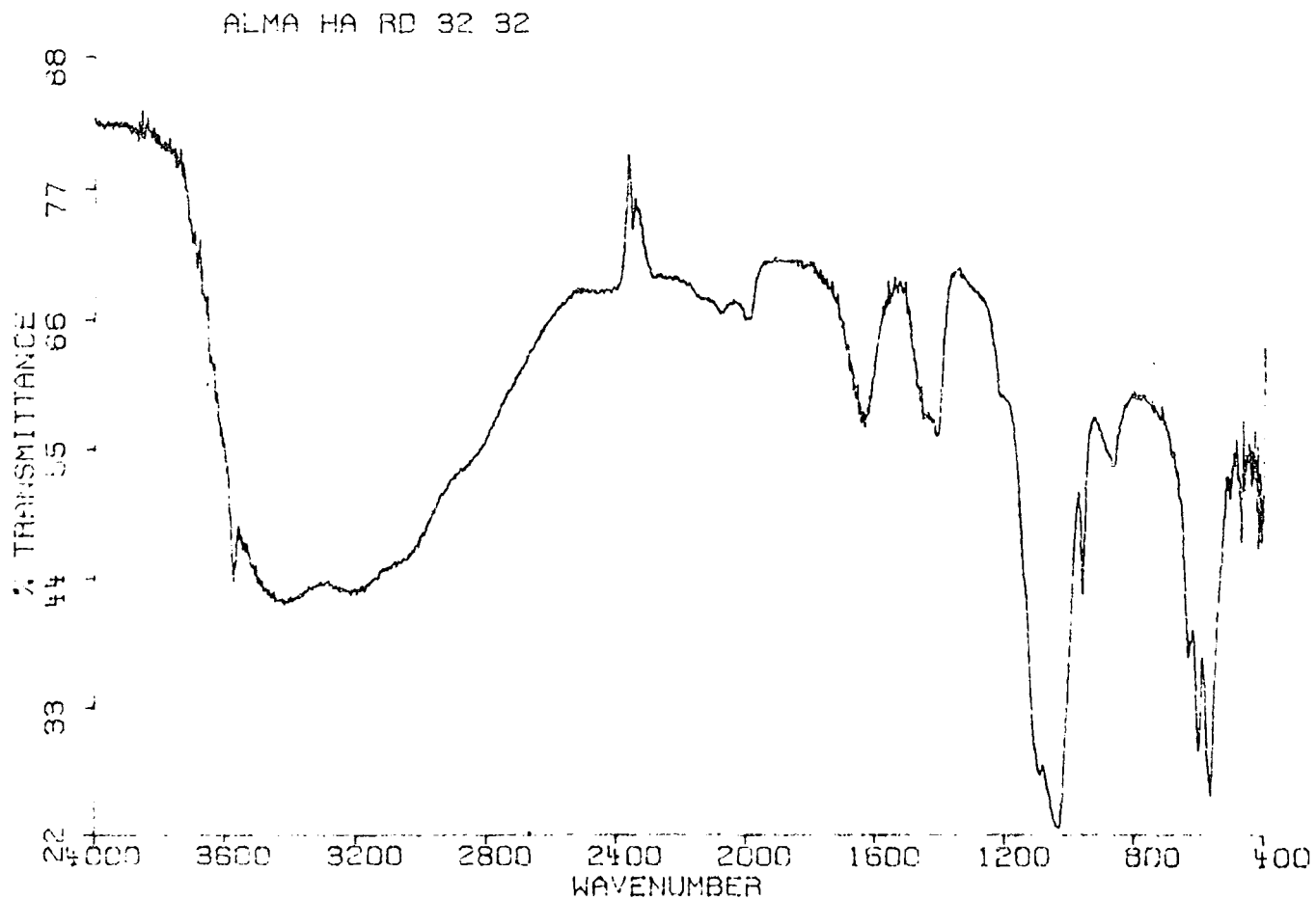
Gráfica 9.- Espectro IR de la *melita Eduardobarrosi* sp.nov., las bandas de absorción entre 700 cm^{-1} y $3,500\text{ cm}^{-1}$ son características del carbonato de calcio.

El espectro de absorción de la HAC se encuentra entre los 630 cm^{-1} y $3,573\text{ cm}^{-1}$, muestra la presencia de bandas de absorción C-O (grupos CO_3) que la determina como una apatita (Pinholt, E.M., *et.al.*, 1992). El pico de absorción representando los grupos monoméricos de OH^- de la HA en los 3573 cm^{-1} y 630 cm^{-1} , además de las bandas de absorción de los grupos CO_3 entre 872 cm^{-1} y 1548 cm^{-1} están bien definidas en la gráfica.



Gráfica 10.- Espectro de IR de la Hidroxiapatita coralina (HAC), las bandas de absorción entre 630 cm^{-1} y $3,573\text{ cm}^{-1}$ determinan los grupos OH^- de la HA, y las que se encuentran entre 872 cm^{-1} y $1,548\text{ cm}^{-1}$ a los grupos CO_3

El espectro obtenido de la Hidroxiapatita sintética (HAs), muestra bandas de absorción características de la HA, a excepción de los picos en $2,400\text{ cm}^{-1}$, lo cual puede ser debido a algún artefacto durante el análisis de la muestra.



Gráfica 11.- Espectro de IR de la Hidroxiapatita sintética, las bandas de absorción son las representativas de la HA, sin embargo es importante notar la banda localizada en los $2,400\text{ cm}^{-1}$.

CAPITULO V

VALORACION *IN VIVO* DEL MATERIAL

5.1 VALIDACIÓN DEL MODELO ANIMAL (ROEDOR)

En el proceso que se sigue para el desarrollo de materiales nuevos, es indispensable que después de establecer los resultados de las pruebas de caracterización fisicoquímicas, realizadas para conocer la composición química, la estructura básica y su configuración espacial; se elabore la planeación de una estrategia que permita llevar el conocimiento básico obtenido a una aplicación clínica, lo cual consiste en determinar la posibilidad de que llegue a ser considerado como un biomaterial. El paso siguiente en el orden metodológico establece una serie de pruebas *in vitro* e *in vivo* antes de que se llegue a la aplicación en los humanos. La práctica más común consiste en probar los materiales nuevos de implante en modelos animales durante diferentes períodos de tiempo. Aunque se han reconocido muchas de las limitaciones de las especies no humanas (non-human testing species), es un juicio común que tales pruebas involucran la exposición de materiales nuevos a procesos sistémicos fisiológicos, y que son un precedente necesario e indispensable para llegar a las pruebas clínicas humanas.

Un modelo animal que proporciona información valiosa aunque con ciertas limitaciones, es el ratón. Este modelo que por sus características será tomado como un modelo de pruebas no funcionales, porque el implante es de una forma y tamaño arbitrarios, no tiene la forma requerida para pruebas mecánicas posteriores de respuesta del material, y se encontrará "flotando" pasivamente en el sitio del tejido donde se le ha implantado (Black, 1992), según el prototipo que para tales pruebas fue propuesto por Ferguson et.al. (1960); el cual consistía de una implantación supra espinal en el dorso del conejo, seguida por un período de observación de 16 semanas, muy similar al método F 981 de

la Sociedad Americana de Pruebas y Materiales (**American Society for Testing and Materials, ASTM, 1990**).

Los periodos de observación serán variables dentro de un periodo mínimo de 7 días hasta 60 días.

Con la excepción de los materiales que tendrán aplicación en el sistema cardiovascular, el sitio elegido para las pruebas no funcionales es usualmente el tejido blando. Esta decisión se basa en asumir que los efectos citotóxicos tienen una generalidad de acción y porque los sitios de tejido blando en animales pueden ser alcanzados con cirugía relativamente menor. Por la misma razón, la cavidad peritoneal ha sido usada para estudiar respuestas agudas *in vivo* (Wortman et. al., 1983).

Los roedores, aún siguen siendo considerados en las pruebas multi-especies, que aunque son raramente utilizados como único modelo de estudio, desde la experiencia de Opperheimers, se han determinado una variedad de sitios que por su localización y resultados obtenidos representan el modelo animal más popular; los cuales son:

1. Subcutáneo
2. Intramuscular (e.g., supraspinatus)
3. Intraperitoneal.
4. Transcortical (e.g., fémur)
5. Intramedular (e.g., fémur y tibia).

5.2 EXPERIMENTO: VALORACIÓN *in vivo* DEL COMPORTAMIENTO BIOLÓGICO DE IMPLANTES DE CaCO_3 EN RATAS WISTAR.

5.2.1 OBJETIVO GENERAL:

El objetivo principal de esta investigación fue la valoración del comportamiento biológico del material de injerto constituido de $[\text{CaCO}_3]$, por medio del estudio de la respuesta histopatológica producida por la implantación subcutánea en ratas Wistar.

5.2.2 OBJETIVOS PARTICULARES

- ♦ Determinar el tipo y contenido de la respuesta del huésped en los sitios de implante granular y de bloque.
- ♦ Conocer la influencia de la forma del CaCO_3 en el tipo e intensidad de células inflamatorias en los sitios de implante.
- ♦ Determinar la respuesta histopatológica posterior a la implantación subcutánea de CaCO_3 en el tejido subcutáneo de ratas Wistar.
- ♦ Registrar el seguimiento clínico de los sitios donde se implantó el CaCO_3 .

5.2.3 HIPÓTESIS.

- ♦ H_1 : La implantación subcutánea de carbonato de calcio (CaCO_3) en ratas Wistar es bien tolerado por los tejidos del huésped.
- ♦ H_0 : La implantación subcutánea de carbonato de calcio (CaCO_3) en ratas Wistar no es bien tolerado por los tejidos del huésped.

5.2.4 MATERIAL Y MÉTODO.

Los recursos para esta investigación fueron aportados por la Facultad de Odontología a través de la Subjefatura de la División de Estudios de Posgrado e Investigación. Los recursos cubrieron el cuidado, manutención y manejo de los animales del laboratorio en el Bioterio de la División; así como lo necesario para el procesamiento de los especímenes y su posterior valoración histopatológica en el laboratorio de Patología.

RECURSOS BIOLÓGICOS:

- 30 Ratas de Cepa Wistar, machos, con peso de 250 a 300 grs., determinadas clínicamente como sanas, proporcionadas por el Bioterio de la Facultad de Medicina de la UNAM.

RECURSOS MATERIALES:

- **SOLUCIONES Y REACTIVOS:** Glutaraldehído al 2% (Banicide, Pascal, USA), solución isotónica de NaCl al .95% .
- **QUIRÚRGICOS:** Mango para bisturí #3, hoja para bisturí # 15, legra tipo Hopkins, pinzas de curación, tijeras de Iris, pinzas de mosquito, porta-agujas Mathew, pinzas de Corn, charola de instrumental, fresas de carburo # 6.
- **EQUIPO:** Agitador magnético Nuova II (Thermolyne, USA), balanza analítica (Chyo Balance Corp, Japan), mosca para cristizador, microscopio quirúrgico (Carl Zeiss, Germany), mini-taladro (Mini-tool, Dremel Inc, USA), Jung Histokinette 2000 (Leica Inc. USA).
- **CRISTALERÍA:** Vasos de precipitado de 100, 200 y 500 ml., 120 frascos de 30 ml. color ámbar, matraces de 500, 1000 y 2000 ml., pipeta de 250 ml., termómetro.

- **DE LABORATORIO HISTOPATOLÓGICO:** Solución de formaldehído al 10 % (J.T. Baker Analysed Inc, USA), Xileno (J.T. Baker Analysed Inc, USA), Hematoxilina (Carlo Erba,), Eosina (Carlo Erba,), Alcohol absoluto.
- **MEDICAMENTOS:** Pentobarbital sódico (Anestosal, Smithkline. Beecham Farmacéutica, México), Clorhidrato de propiomacina (Combelen, Bayer de México), Ketamina (Ketavet, Laboratorio Revetmex, México).
- **VARIOS:** Seda para sutura 4-0, jeringas desechables de 1 ml., algodón, gasas de algodón, cinta adhesiva, cubrebocas, guantes de látex, radiografías DF-58 (Kodak, Inc), líquido revelador y fijador para radiografías (Kodak, Co.).

MATERIAL DE PRUEBA

El material por implantarse fue preparado en el laboratorio del Departamento de Física Aplicada y Tecnología Avanzada del IFUNAM. Se caracterizó por medio de análisis de difracción de rayos X (DFRx), microscopia electrónica de barrido (MEB), de transmisión (MET), espectroscopía de infrarrojo (IR). El material ya limpio y preparado en forma granular, se esterilizó con gas de oxido etileno y se colocó en viales estériles para conservarse hasta el momento de ser implantado en los animales.

MÉTODO DE IMPLANTACIÓN DEL MATERIAL.

El material experimental se implantó en ratas Wistar con la finalidad de realizar las pruebas de biocompatibilidad subcutánea, y la interacción del material de implante en el medio interno del huésped. Se escogió este tipo de animales porque representan un buen modelo de prueba debido a su fácil manejo y a la información valiosa que puede ser obtenida de ellos.

Se formó un lote de 30 ratas de cepa Wistar, adultas y sanas, con peso de 250 a 300 grs., dividiendo el lote en 5 grupos de seis cada uno, los cuales se identificaron de acuerdo con el número de días que se dejaría el implante (8, 15, 30, 45 y 60); y dentro del mismo los animales se codificaron como 1 al 6. Los sitios de elección para colocar el material fue la zona subcutánea ventral.

Los animales se anestesiaron mediante sedación inducida por inyección intramuscular de Ketamina (100 mg/Kg de peso) y de Combelen (0.44 ml/Kg de peso); el área por intervenir se lavó con solución antiséptica de poca concentración (Isodine) y después se rasuró, primero con máquina y después con navaja.

En la región abdominal del animal se dibujó un cuadrado, en el cual los vértices se utilizaron como referencia para ubicar el sitio donde se realizarían las cuatro incisiones para acceder al espacio subcutáneo, tal como se muestra en la figura 6. De esta manera se crearon unas bolsas o sacos peritoneales donde se colocó cada uno de los materiales, quedando un sitio como control positivo. Por cuestiones metodológicas los sitios elegidos se designaron como letra (A) al lado superior derecho, al superior izquierdo la letra (B), el inferior izquierdo la letra (C), y al inferior derecho la letra (D). Posterior a la incisión se realizó disección roma, y en cada una de las zonas se colocó una cantidad igual de cada material; en el sitio (A) y (B) se implantó el material en forma de bloque, en el sitio (D) fue en forma granular, y el sitio C fue determinado como sitio control positivo. La base de la bolsa creada se encontraba aproximadamente a 1 cm. de la línea de incisión. Los labios de la incisión se afrontaron y se fijaron con seda de 4-0; concluida la intervención se regresaron los animales a su jaula y se mantuvieron en observación. En algunos casos durante el período transquirúrgico hubo animales que no toleraron la concentración del agente anestésico y sobrevino la muerte por sobredosis, para completar el grupo se decidió reemplazarlo por otro, y si el deceso fue durante el período posoperatorio también fueron reemplazados en el número necesario, guardando siempre la relación del tiempo de observación requerido en cada grupo.

El sacrificio de los animales se realizó a los 8, 15, 30, 45 y 60 días según se había planeado.

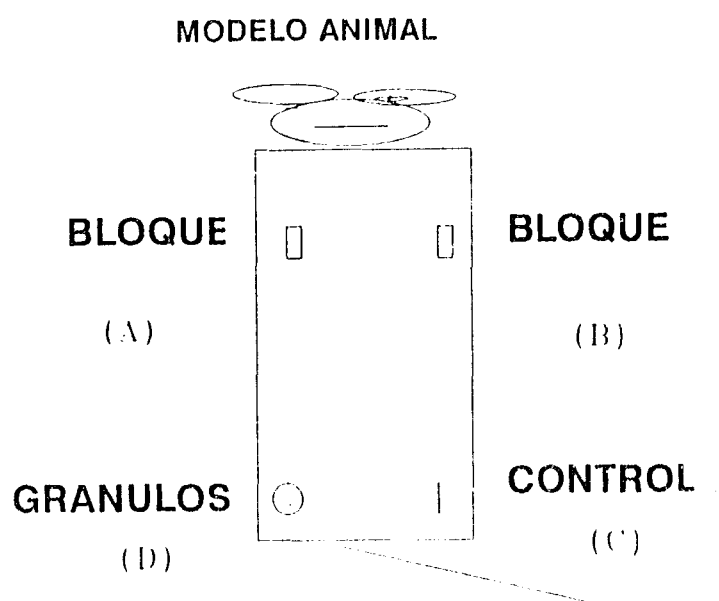


Figura 6.-Esquema de los sitios de implante subcutáneo en las ratas Wistar.

RECUPERACIÓN DEL MATERIAL Y TÉCNICA HISTOLÓGICA:

Después de terminado el período de observación en cada uno de los grupos de animales, el sacrificio fue llevado a cabo mediante sobredosis de cloroformo, teniendo cuidado que desde el momento que sufría la inconsciencia hasta la muerte por paro cardio-respiratorio se obtuvieran los especímenes. El modo en que fueron obtenidos fue mediante una incisión vertical primaria en la parte media abdominal y luego con tijeras se cortó la piel y músculo, para obtener una sección de tejido constituida por piel, tejido subcutáneo y músculo, durante el proceso se tuvo especial cuidado de no alterar o desplazar la zona del implante.

Obtenidos los especímenes se lavaron con solución salina estéril y se depositaron en frascos que contenían por lo menos 30 ml. de formalina al 10%, se enviaron al Laboratorio de Patología de la División de Estudios de Posgrado e Investigación de la Facultad de Odontología para que fueran procesados de manera rutinaria, y que se realizaran cortes seriados con 6μ de grosor, orientados en dirección perpendicular al tejido peritoneal y permitir la observación de la interfase entre el material de prueba y el tejido.

Como parte del método histológico, el carbonato de calcio se desmineralizó después de haber fijado y lavado en agua corriente los especímenes. La descalcificación se logró con la inmersión de las muestras en solución de ácido nítrico al 5% por un periodo de 2 horas en un Jung Histokinette 2000 (Leica Inc. USA). Los especímenes ya descalcificados, se deshidrataron con alcohol en concentraciones ascendentes, se aclararon en soluciones de xilol e incluyeron en parafina, para ser cortados y teñidos con hematoxilina y eosina. Los cortes se observaron en un microscopio de luz en aumentos de trabajo a 10X, 20X y 40X; y las fotografías fueron tomadas en un fotomicroscopio AxioPhot (Carl Zeiss, Germany).

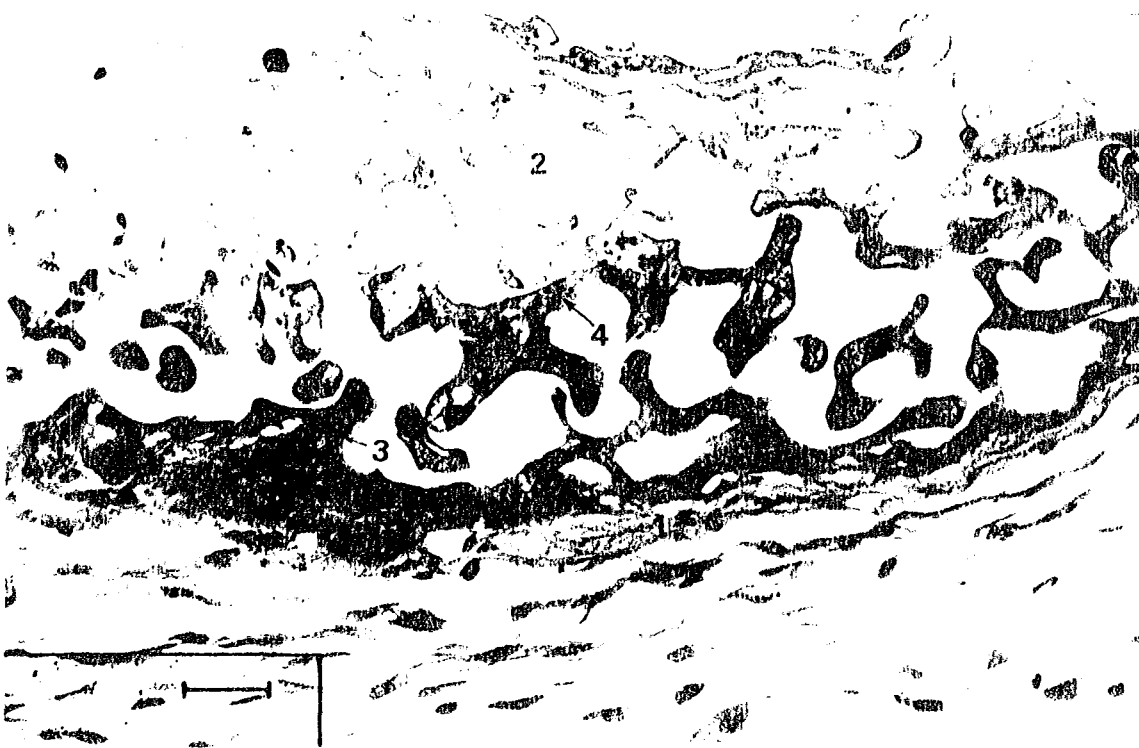
5.2.5 RESULTADOS.

La evolución de los animales durante la fase transquirúrgica fue satisfactoria; en dos casos hubo muerte por intolerancia farmacológica durante el transcurso posquirúrgico, para mantener el mismo número de integrantes en los grupos se reemplazó el animal en ese momento. La recuperación inmediata y la cicatrización se encontraron dentro de los límites normales. Los animales eran revisados día con día teniendo especial cuidado en observar las condiciones de la herida y la alimentación; en ningún caso hubo muerte debida a complicaciones en éste periodo, tampoco se presentó infección de la herida, sino por el contrario, al término de los 6 días en que se programó el retiro de los puntos de sutura, no hubo necesidad de realizarlo porque éstos se habían caído antes de ese tiempo, además, en todos los casos, los animales ganaron peso. Los sacrificios se realizaron según lo planeado y los especímenes se enviaron al Laboratorio de Patología de la DEPI de la Facultad de Odontología para que fueran procesados de manera rutinaria.

El área de interfase entre el material de prueba y el tejido conectivo se evaluó para determinar la presencia de necrosis o de inflamación. En cuanto a la respuesta del huésped, se valoró la intensidad y extensión de la respuesta, y otros cambios pertinentes tales como la resorción del material. La inflamación se registró como ausente o presente, así también como cualquier diferencia en toda la interfase del material y tejido conectivo. La severidad de la respuesta inflamatoria está basada en el tipo y localización de las células inflamatorias. Como punto de comparación, en cada uno de los animales existió un control positivo, en el cual no fue implantado ningún material, las características que se encontraron en este sitio fueron comparadas con las encontradas en los sitios de implante. Como parte de la evaluación histopatológica se realizó la descripción de cada una de las laminillas observadas.

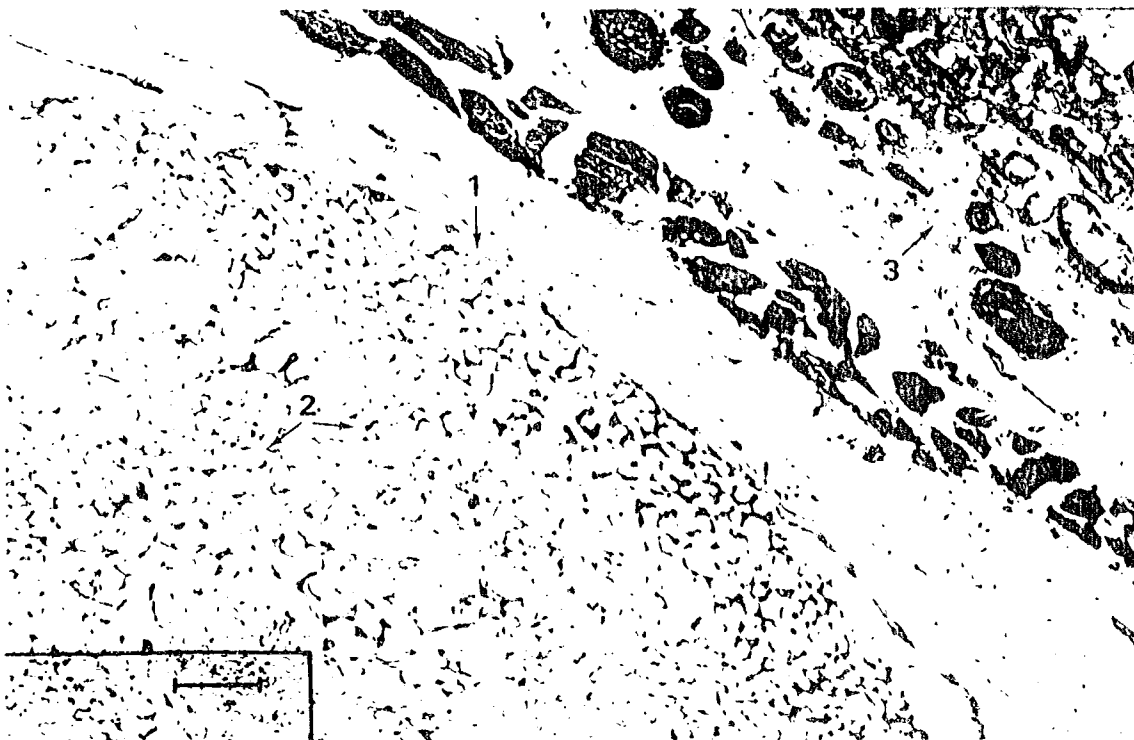
7 días.- La condiciones histopatológicas en este periodo muestran que el material de implante se encuentra rodeado por una cápsula constituida de haces de fibras colágenas densas. la presencia de

fibroblastos jóvenes en la zona adyacente a la cápsula hace suponer una gran actividad fibroblástica, acompañándose de una aparente buena organización del tejido conectivo. En la zona de interfase del implante y el huésped, se observan células de infiltrado inflamatorio, con presencia predominante de linfocitos, plasmocitos, además de células gigantes multinucleadas a cuerpo extraño y leucocitos polimorfonucleares del tipo neutrófilos, lo que significa la existencia de respuesta intensa del huésped ante un material extraño. La proliferación de tejido conectivo (fibras colágenas) se aprecia en la interfase del implante/huésped mostrándose como una delgada capa de tejido conectivo denso que se extiende hacia el interior del implante, siguiendo el curso o trayecto de la interconectividad de los poros (microfotografía 19), el tejido conectivo hacia el interior del implante no alcanza el centro, sino que se limita exclusivamente a la periferia.

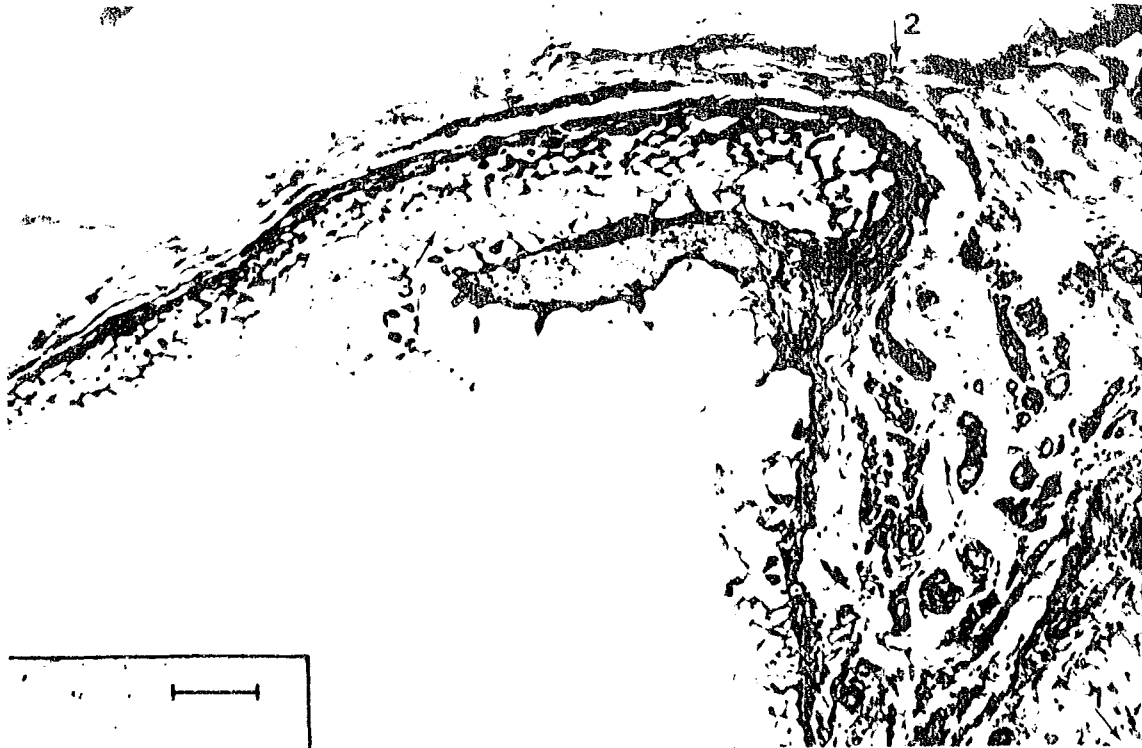


Microfotografía 19.- Espécimen FOI-029-94, de 7 días de evolución correspondiente al sitio de implante A. Se observa la cápsula de tejido conectivo fibroso laxo (1) rodeando al implante (2), en la periferia del implante se observan células gigantes multinucleadas a cuerpo extraño (3) y la proliferación fibroblástica de tejido conectivo laxo (4) a través de los poros del implante (H&E, 40X).

La respuesta celular fue diferente entre los sitios A, B y D; Como se recordará, el sitio A y D recibieron implantes en forma de bloque, el sitio B en forma de gránulos y el sitio C sirvió como control. En el A y D la intensidad del infiltrado inflamatorio era casi similar, en cuanto el tipo y cantidad aproximada de células inflamatorias en la zona de interfase implante/huésped. Una de las observaciones primarias que se realizó era la búsqueda de zonas de necrosis, lo cual no fue encontrado en estos especímenes (microfotografía 20). Alrededor de los implantes se encontraba una cápsula bien organizada de tejido conectivo denso, con gran actividad fibroblástica adyacente a esta zona, encontrándose en la interfase del implante/huésped células gigantes multinucleadas a cuerpo extraño (microfotografía 21).



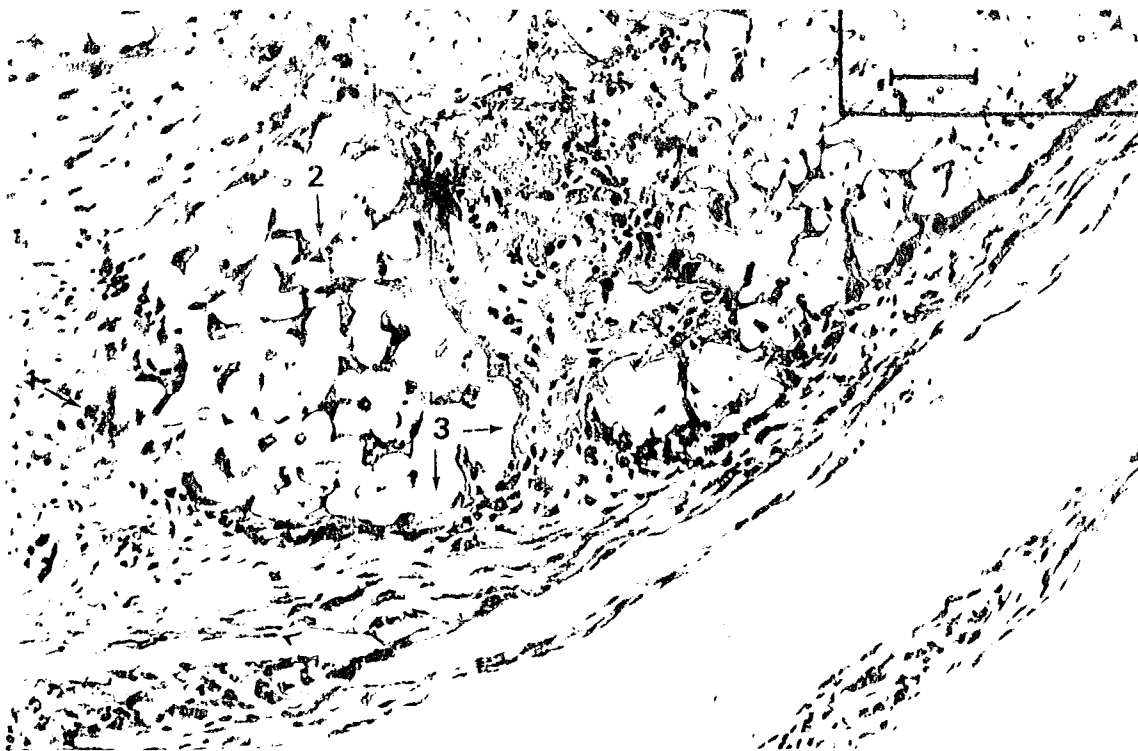
Microfotografía 20.- Especimen FOI-032-94, de 7 días de evolución, se observa formación de cápsula de tejido conectivo en la periferia del implante (1) con escaso infiltrado inflamatorio, y proliferación de tejido conectivo laxo en el interior del implante (2). No se observan zonas de necrosis tisular. (3) superficie externa del espécimen (Tinción de H&E, X40).



Microfotografía 21.- Microfotografía a menor aumento de la zona de implante (CaCO_3) en forma de bloque (especimen FOI-021-94). En la periferia se observa el Tejido celular subcutáneo (1), y la formación de una cápsula de tejido conectivo fibroso bien organizado (2) y la actividad fibroblástica hacia el centro del implante, el cual aparentemente está vacío (3), porque era el espacio ocupado por el (CaCO_3) y que se hace evidente por el proceso de descalcificación (H&E, 10X).

En el sitio B (microfotografía 22) el infiltrado inflamatorio fue más evidente, porque se apreciaba una cápsula de tejido conectivo que rodeaba los gránulos del implante, adyacente a ésta se observó la presencia de fibroblastos jóvenes. Los gránulos del implante se encontraban rodeados de células de infiltrado inflamatorio; predominando entre ellas los linfocitos, células plasmáticas, y células gigantes multinucleadas a cuerpo extraño.

En el sitio C las condiciones histológicas mostraban organización fibroblástica, con poco infiltrado celular inflamatorio (microfotografía 23).



Microfotografía 22.- Espécimen FOI-022-94, que muestra el aspecto granular del implante, alrededor se presenta una gran actividad fibroblástica con la presencia de células gigantes multinucleadas a cuerpo extraño (1) y moderado infiltrado inflamatorio crónico, nótese el aspecto intercomunicado (2) que adquiere la proliferación debido a que el tejido se extiende a través de los poros y en el momento de la desmineralización quedan los espacios que eran ocupados por el implante [3] (Tinción con H&E, 20X).



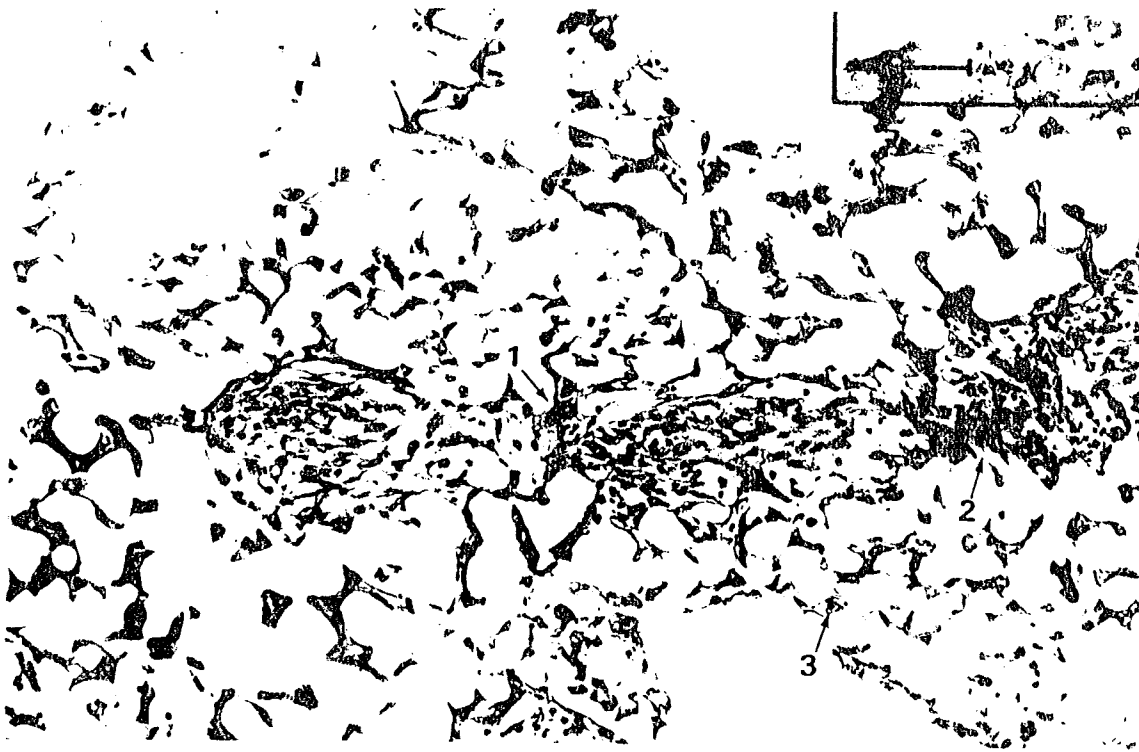
Microfotografía 23.- Corte histológico de un espécimen representativo del sitio control (FOI-091-94), se observan abundantes folículos pilosos (1) entremezclados con tejido conjuntivo fibroso denso y laxo, con buena vascularización. Hacia la parte interna se observan haces de tejido muscular estriado (2) (Tinción con H&E, 10X).

15 días.- Los especímenes de este periodo, mostraron infiltrado inflamatorio con predominio de células linfoplasmocitarias y células gigantes multinucleadas a cuerpo extraño. En todos los casos la zona peri-implante presentaba una cápsula de tejido conectivo bien organizado, y además el tejido conectivo proliferante presentó áreas que se observaban como lagunas o islotes en la parte interna del implante, lo cual puede ser debido a la irregularidad del tamaño de los poros y a que el comportamiento del huésped intenta cubrir los espacios del implante con tejido de reparación. Como característica de esta etapa, existen células gigantes multinucleadas a cuerpo extraño que se encuentran cubriendo la periferia del implante, aunque en número menor que en el periodo de los 7 días. En las áreas correspondientes a poros grandes (más de 100 μ) el tejido conectivo está bien organizado, observándose también la proliferación y neoformación vascular. En los sitios A y D la cápsula de tejido conectivo denso está bien definida y con infiltrado inflamatorio concentrado en algunas áreas, lo cual se observa con áreas densas de tejido conectivo inmersas en el centro del implante (microfotografía 24 y 25, especímenes registrados como FOI-045-94 y FOI-056-94).

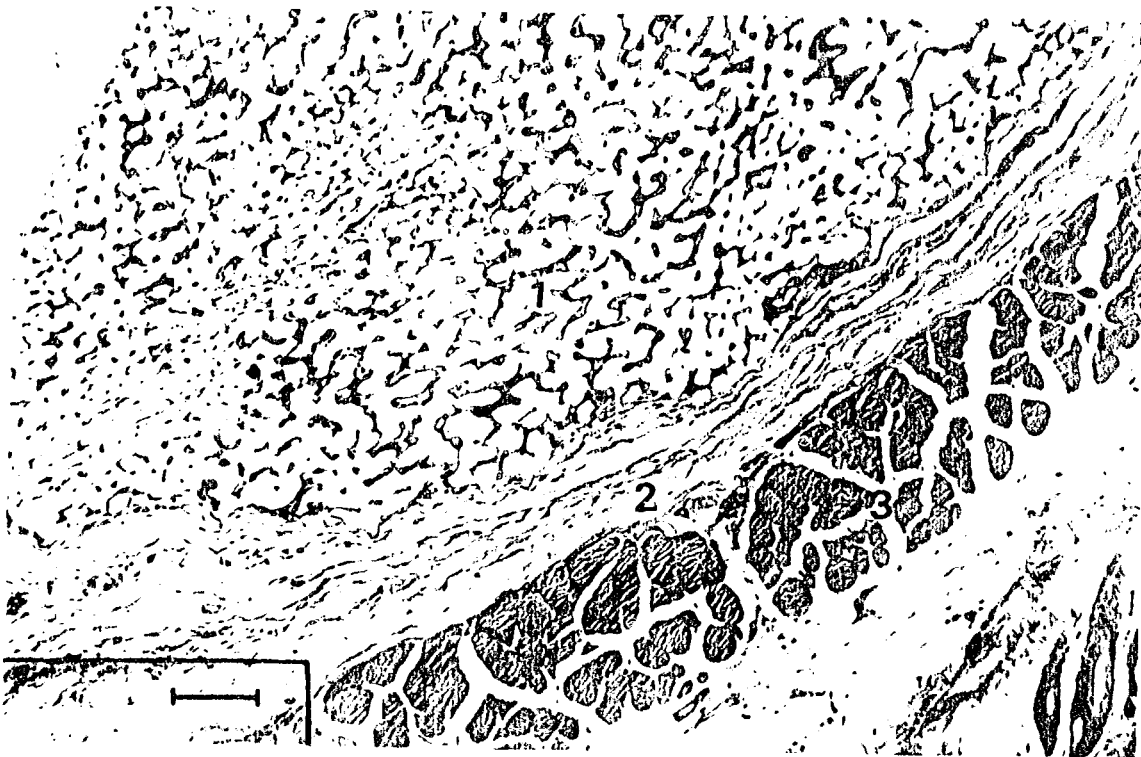
En este grupo experimental también se encontró variabilidad en la respuesta del huésped, ya que en algunas áreas la presencia de células inflamatorias es escasa, como en el caso del espécimen registrado como FOI-053-94 (microfotografía 26); a diferencia del sitio B, en que el espacio entre los gránulos del implante se encuentra ocupado por fibras de tejido conectivo y células de infiltrado inflamatorio crónico (microfotografía 27). En el sitio control no hay presencia de células inflamatorias y el tejido conectivo está bien organizado.



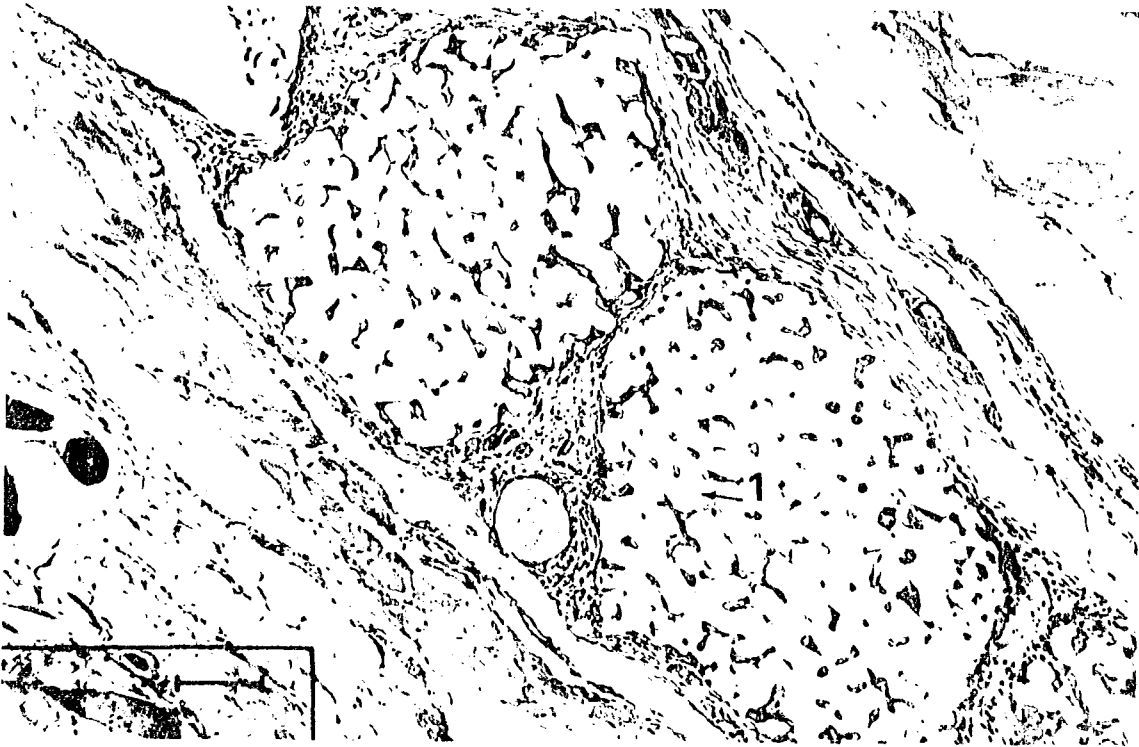
Microfotografía 24.- Corte de un espécimen de 15 días de implantación en el grupo A (FOI-045-94). La proliferación del tejido conectivo en los poros del implante se observan como islotes hacia el interior del implante (1), con incremento en la vascularidad; el tejido conectivo es fibroso denso y laxo (2). También se observa la presencia de células gigantes multinucleadas a cuerpo extraño (3) e infiltrado inflamatorio crónico (Tinción con H&E, 10X)



Microfotografía 25.- Corte histológico del espécimen FOI-056-94 de 15 días de implantación. En el centro del implante se encuentran islotos de tejido conectivo, con presencia de células gigantes multinucleadas (1), fibroblastos activos, infiltrado linfoplasmocitario (2), vasos sanguíneos y eritrocitos extravasados (3). La organización de las bandas de tejido conectivo depende en gran medida tanto por la disposición como por el diámetro de los poros del implante (H&E, 20X)

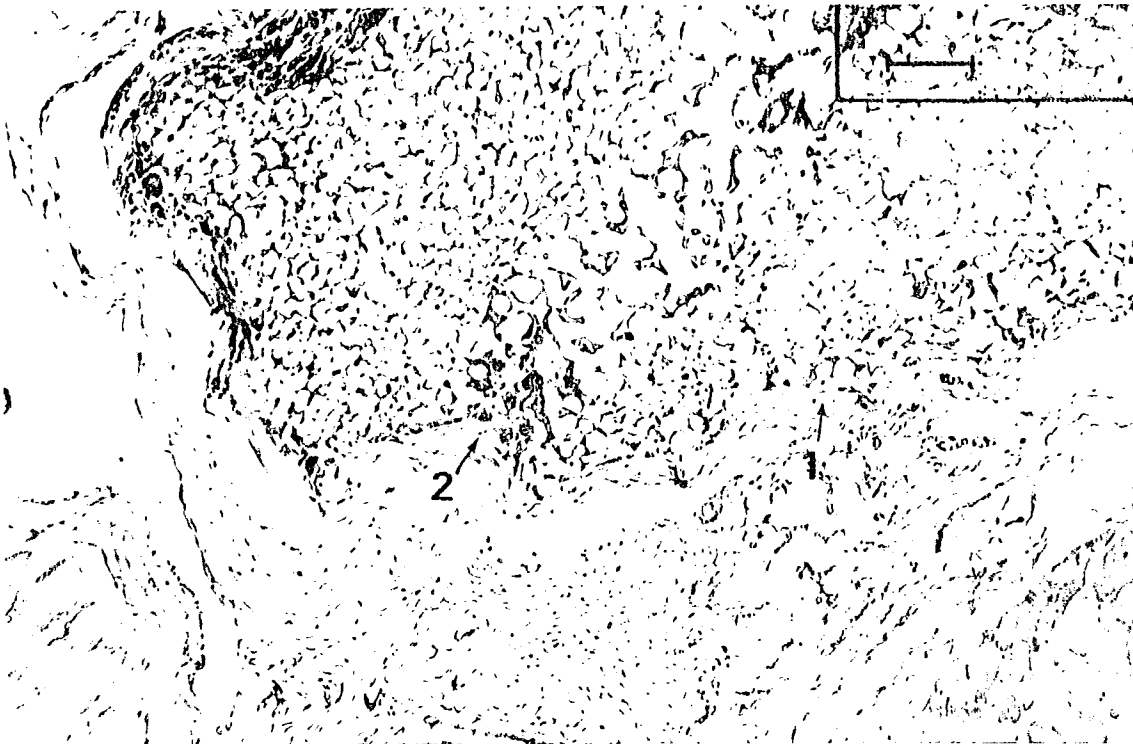


Microfotografía 26.- Corte del espécimen (FOI-053-94) de 15 días de implantación, con escaso infiltrado inflamatorio y proliferación de tejido conectivo hacia el interior del implante a través de los poros (1), lo que da el aspecto de malla; el implante se encuentra delimitado por una banda bien organizada de tejido conectivo fibroso denso (2) y tejido muscular estriado hacia la periferia [3] (H&E, 10X)



Microfotografía 27.- Corte histológico del espécimen FOI-054-94 con 15 días de implantación (granular), se observa infiltrado inflamatorio linfoplasmocitario y células gigantes a cuerpo extraño alrededor del implante, nótese la poca vascularidad de la zona de implantación (1) (H&E, 10X).

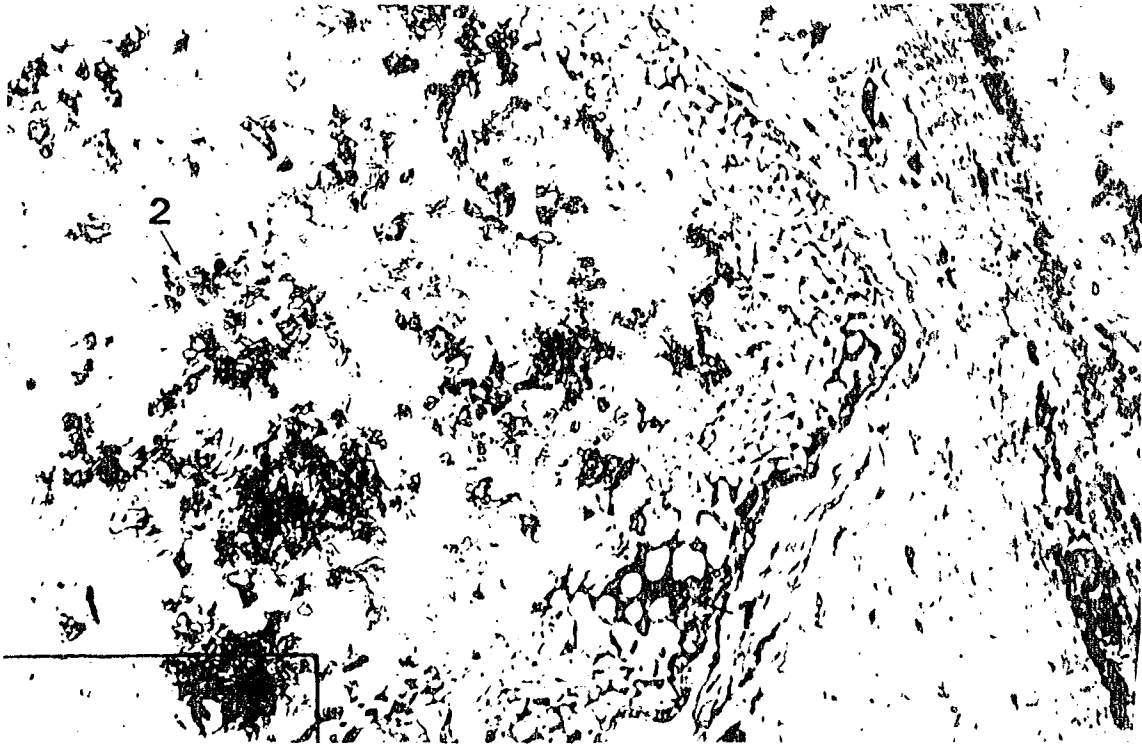
30 días.- Los especímenes de más de cuatro semanas muestran encapsulamiento por tejido conectivo denso bien organizado, hacia el interior hay proliferación de tejido conectivo siguiendo el trayecto de los poros interconectados del implante. En este grupo de especímenes también existe diferencia entre el tipo y cantidad de células inflamatorias en la interfase huésped/tejido, ya que aunque se localizaron células gigantes a cuerpo extraño, éstas se localizaron en algunas áreas (microfotografía 28), siendo más evidentes en los especímenes B que corresponde al implante en forma granular (microfotografía 29), donde además de haber tejido conectivo bien organizado (cápsula) la presencia de células de inflamación crónica y de células gigantes multinucleadas a cuerpo extraño es más evidente que en las zonas A y D, en estos sitios las áreas son más localizadas (microfotografía 30). Hacia el interior del implante se aprecia proliferación celular replicando la interconectividad de la estructura del material de implante.



Microfotografía 28.- Especimen FOI-009-94 de 30 días de implantación del CaCO_3 , se observa la bien formada cápsula de tejido conectivo (1), y la presencia de células gigantes multinucleadas en forma focal (2), con moderado infiltrado inflamatorio. (H&E, 10X).

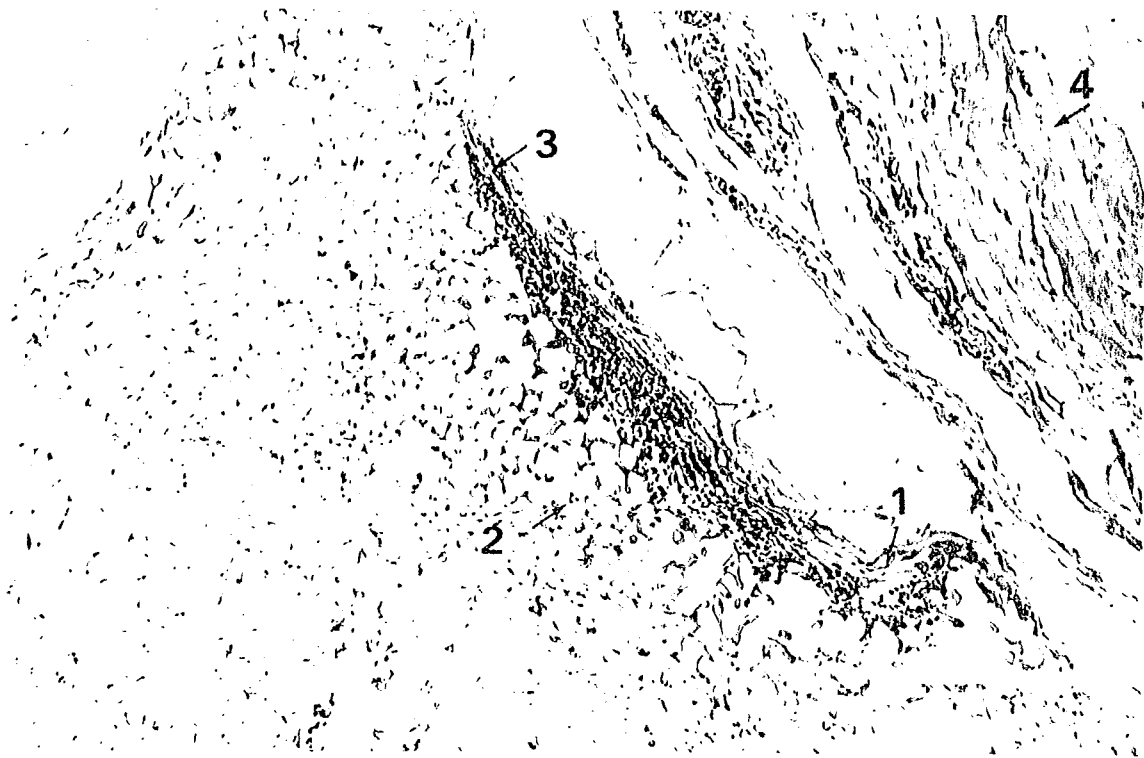


Microfotografía 29.- Corte histológico del espécimen FOI-014-94 con implante granular de 30 días de evolución, Los implantes se encuentran cubiertos por una cápsula de tejido conectivo fibroso denso (1), y es evidente la presencia de abundante infiltrado inflamatorio crónico tanto en la periferia (2) como en el centro del implante (3). También se observa escasa vascularidad hacia el centro del implante (H&E, 10X).

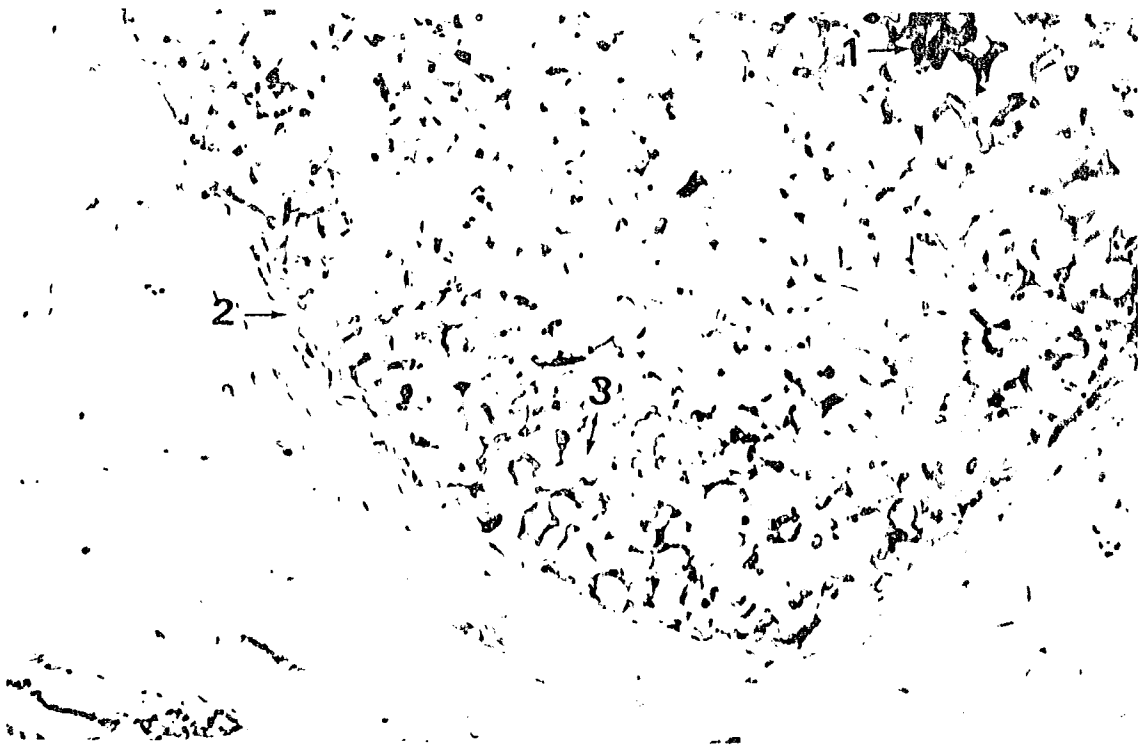


Microfotografía 30.- Corte del espécimen FOI-008-94 de 30 días de evolución con implantación en forma de bloque, se observa encapsulamiento por tejido conectivo; proliferación al interior del implante y células gigantes multinucleadas localizadas en el extremo inferior derecho (1). Este espécimen fue parcialmente desmineralizado y por eso se observan los cristales de CaCO_3 en el centro (2), así como el desarrollo de trayectos vasculares (H&E, 10X).

45 Días.- Después de más de 6 semanas de haber implantado el material, los cortes histológicos de este grupo muestran que la organización del tejido conectivo es buena, de tal manera que se formó una cápsula de grosor variable (microfotografía 31), y las células de inflamación crónica que se encuentran en la interfase implante/huésped son más escasas, aunque las células gigantes multinucleadas a cuerpo extraño están presentes, su número es menor que en los grupos anteriores. La proliferación del tejido conectivo dentro del implante también fue observada en este grupo, observándose que se sigue la arquitectura de los poros originales del implante (microfotografía 31). Los hallazgos entre los sitios A y D son similares, mientras que en el B, hay más células gigantes a cuerpo extraño cuando se compara con el sitio A o D, pero menos si se compara con las encontradas en grupos de menos días (Microfotografía 33).



Microfotografía 31.- Corte del espécimen FOI-073-94 de 45 días de implantación, se observa formación de la cápsula (1) y proliferación del tejido conectivo hacia el interior del implante (2), así como la formación de trayectos vasculares, áreas de hemorragia quirúrgica (3) y tejido muscular (4) (H&E, 10X).

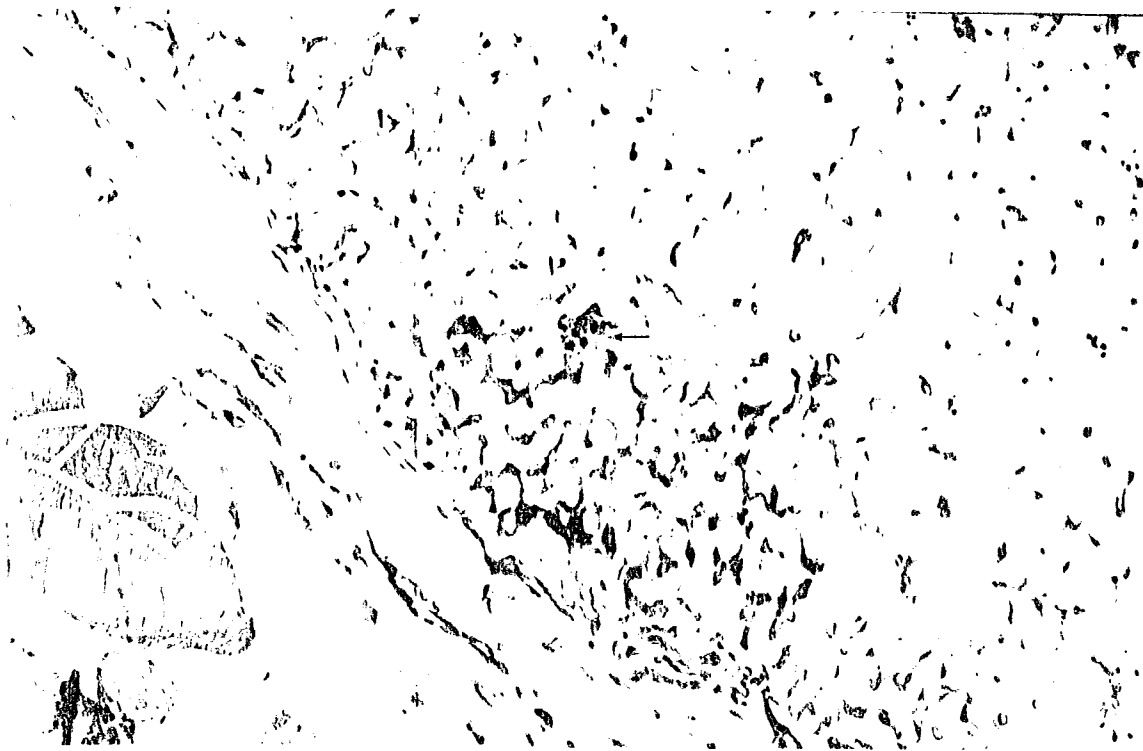


Microfotografía 32.- Corte histológico del espécimen FOI-084-94 de 45 días de implantación, la presencia de células gigantes multinucleadas a cuerpo extraño (1) es escasa y localizada, y el implante está rodeado de una cápsula de tejido conectivo (2). El tejido conectivo proliferante hacia el interior del implante (3) es menos denso y la respuesta inflamatoria es menor (H&E, 20X).

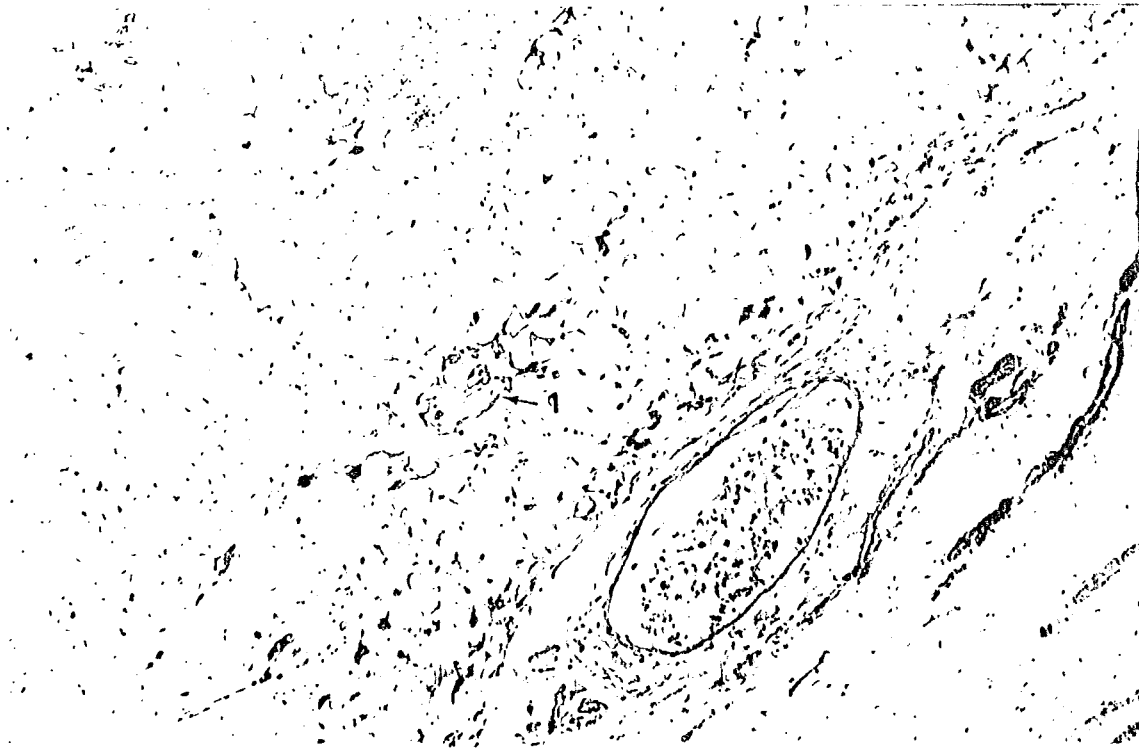


Microfotografía 33.- Corte histológico del espécimen FOI-082-94 de 45 días de implantación en forma granular, se observa una cápsula más gruesa (1) y la cantidad de células gigantes multinucleadas a cuerpo extraño son más escasas que en especímenes con menos días de evolución. También se observa infiltrado linfoplasmocitario y menor formación de vasos sanguíneos (H&E, 10X).

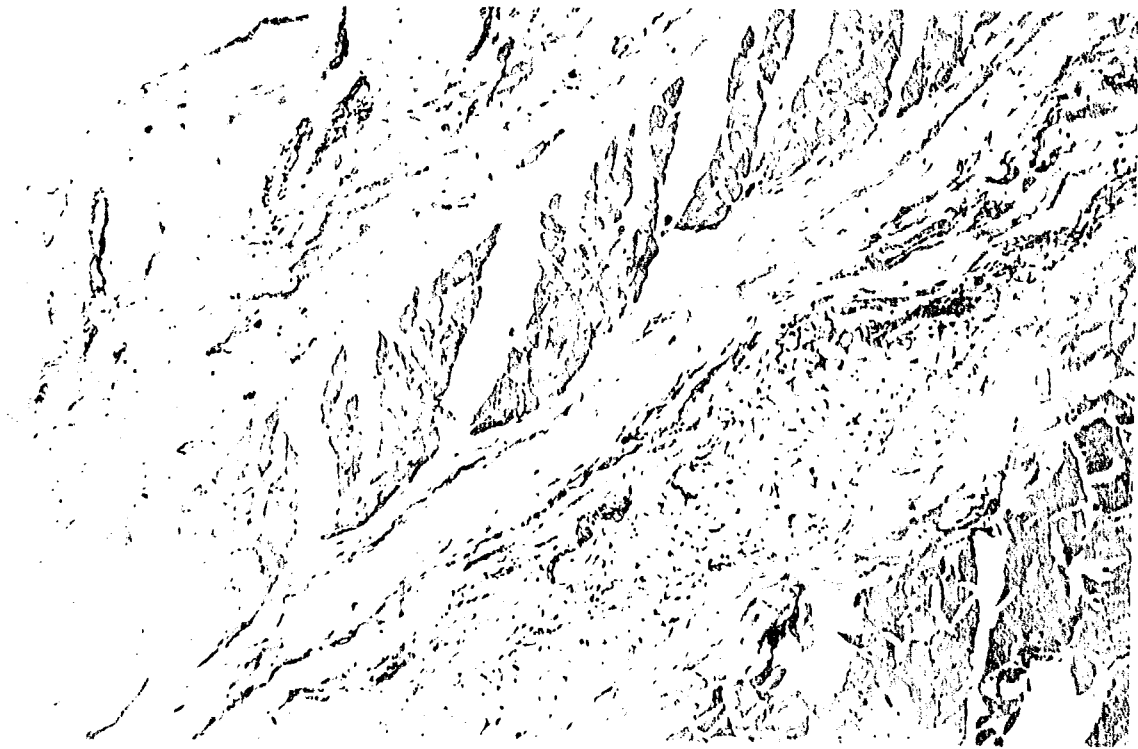
60 días.- En el último grupo de animales el material de implante fue recuperado después de 8 semanas, la observación de los cortes (A y D) de este grupo muestra que el material de implante está encapsulado por tejido conectivo denso, con escasas células de infiltrado inflamatorio crónico, así como algunas células gigantes multinucleadas a cuerpo extraño (microfotografía 34), hacia el interior del implante hay proliferación celular y de tejido conectivo, la cápsula que rodea el implante varía de grosor dependiendo del área que se revisa (Microfotografía 35). En el sitio B, también ocurre encapsulamiento de los gránulos del material con presencia de células gigantes multinucleadas a cuerpo extraño en áreas focales (microfotografía 36); esto es, que sólo se aprecian en algunas zonas de los gránulos y no como en especímenes de menos días, en los cuales su presencia era en un área mayor.



Microfotografía 34.- Especimen de 60 días de implantación en forma de bloque, la presencia de células gigantes multinucleadas a cuerpo extraño son escasas, y el implante está encapsulado por tejido conectivo fibroso-denso y poco infiltrado inflamatorio crónico (H&E, 10X)



Microfotografía 35.- Corte histológico del espécimen FOI-092-94 de 60 días de implantación en forma de bloque, la proliferación de tejido conectivo al interior del implante sigue el trayecto original de los poros, y se observan islotos (1), los cuales corresponden a los poros de diámetro mayor, aproximadamente de 100 μ , existe escaso infiltrado inflamatorio crónico. (H&E, 10X).



Microfotografía 36.- Corte histológico del espécimen FOI-106-94 de 60 días de evolución en forma granular, el implante se observa encapsulado por tejido conectivo, la presencia de células gigantes multinucleadas a cuerpo extraño y células de infiltrado inflamatorio crónico son escasas (H&E, 10X).

CAPITULO VI

DISCUSIÓN.

La determinación de iniciar el desarrollo de un material que tendrá uso biomédico, implica el conocimiento no sólo de la composición química y estructural, sino también de los fenómenos que ocurren cuando se encuentran en un medio biológico. La conceptualización global de estas ideas nos llevó a realizar los estudios iniciales de caracterización de un material, con la finalidad de establecer el potencial que por su composición química y espacial pudiera ser desarrollado como un recurso para su aplicación en seres humanos, dicho de manera técnica, en un biomaterial.

Para establecer las características del material también se realizaron las pruebas fisicoquímicas en productos comerciales con la finalidad de tener parámetros de comparación; de esta manera al estudiar las características de la Hidroxiapatita coralina (HAc), encontramos que bajo el MEB, el diámetro de poro es menor en algunas zonas en relación al reportado en la literatura que menciona un diámetro aproximado de 200μ . En nuestros resultados encontramos que los gránulos observados tenían un diámetro de hasta 100μ y 150μ . Es importante mencionar que el tamizado de los gránulos de HAc era uniforme. La composición química determinada mediante IR y MRx coincide con la reportada en la literatura, en cuanto a la presencia de Ca y P. Con respecto a este material otros investigadores han encontrado que en análisis de infrarrojo y de difracción de rayos-x no es 100% hidroxiapatita, sino que en un porcentaje importante mantiene formas cristalinas de β -fosfato tricálcico o bien de Whitlockita (Le Geros, R.Z. 1991).

De los resultados obtenidos de los análisis de difracción de rayos-x y del microanálisis de rayos-x que fueron aplicados a las muestras preparadas del esqueleto de la *mellita eduardobarrosoi* sp.nov. (Me), encontramos que la composición química de la Me, es principalmente carbonato de calcio (CaCO_3), con fases cristalinas identificadas como

calcita (6CaCO_3), según los resultados obtenidos en el software del difractografo. La composición de la Me es igual a la reportada para ciertos grupos de corales, aunque diferente en las fases cristalinas con respecto a los productos comerciales que son obtenidos de recursos naturales [**Interpore 200™** y **Biocoral™**], que tiene fases de *aragonita* (10CaCO_3), según la información reportada en la literatura (Roy, D.M., Linnehan, S.A., 1974; White, E., Shors, E.C., 1986; Guillemín, G. *et.al.*, 1987). La implantación de carbonato de calcio en modelos animales puede ser bien tolerada, no importando sea aragonita o calcita, como se ha documentado en la literatura, según los experimentos citados por Williams en 1982.

Las fases cristalinas que posee un compuesto de calcio, en particular el que constituye el esqueleto de la Me, es relevante en el sentido que aunque ambos pueden ser bien tolerados en el organismo (Williams en 1982), la respuesta es diferente cuando se intenta algún procedimiento de transformación estructural química. Este hecho fue bien establecido por Chiroff y Roy en 1974, porque lograron la transformación de la aragonita de carbonato de calcio (10CaCO_3) en hidroxiapatita [$\text{Ca}_{10}(\text{OH})_2(\text{PO}_4)_6$] mediante un procedimiento de conversión hidrotermal; en el mismo experimento estos autores aplicaron el método de conversión a materiales con fase de calcita (6CaCO_3), el producto obtenido se identificó como Whitlockita (Roy, D.M. & Linnehan, S.K., 1974; White, W., *et.al.*, 1975), este compuesto ha sido implantado en modelos animales como tal, obteniendo resultados satisfactorios (Driessen, A.A., *et.al.*, 1982).

Con el desarrollo tecnológico surgido a partir de los procesos de transformación química, el avance en la ciencia de materiales ha sido vertiginoso y productivo. White y colaboradores (1975), hicieron uso de dichos procesos con la finalidad de para transformar el esqueleto de ciertos corales, *goniopora* y *madreporita* en HA, el producto obtenido fue identificado como hidroxiapatita; y al ser comercializado se le dio el nombre de Hidroxiapatita Coralina, HAc (**Interpore 200**). Es importante mencionar que en la actualidad existen reportes que establecen que la composición de este compuesto no es exclusivamente Hidroxiapatita,

sino que en su composición se encuentran otras formas de compuestos de calcio (Le Geros, R.Z., 1991). La HAc prácticamente es aplicada de manera amplia en varias áreas de la medicina y odontología quirúrgica y ortopédica (Frame, J.W., Browne, R.M. & Brady, C.L., 1981; Diesen, H., *et.al.*, 1985; White, E., & Shors, E.C., 1986, Tencer, *et.al.*, 1990, Oonish, H., 1991).

Un grupo de investigadores franceses, encabezados por Guillemin, trabajaron también con corales marinos, sin especificar la especie a la cual pertenecen, aunque mencionando que la fase cristalina del carbonato de calcio era la aragonita. En su metodología únicamente realizaban la eliminación de la materia orgánica que se encontraba en el coral, con la finalidad de conservar exclusivamente el esqueleto del invertebrado (Guillemin, G., *et.al.*, 1987). Posteriormente hacían la esterilización del material mediante radiación γ , para ser llevado al uso clínico en humanos (Irigaray, J.L., *et.al.*, 1990), este producto es el **Biocoral**. En América Latina, el antecedente más cercano es la llamada Hidroxiapatita coralina, elaborado por un grupo de investigadores cubanos, el fundamento y características de este producto es idéntico a las del **Interpore 200** (González, R. 1989; Socarrás, E. *et.al.*, 1990).

La composición química de la Me, no tendría importancia desde el punto de vista de ciencia de materiales, si no fuera por la disposición espacial de los poros que se encuentran contenidos en su estructura esquelética. La apariencia de los gránulos y fragmentos de la Me bajo el microscopio electrónico de barrido, muestran que el diámetro de los poros de la Me se encuentran en el orden de 10μ a 50μ los más pequeños y de 100μ a 200μ los más grandes. La configuración completamente porosa de este organismo le confiere cualidades que son importantes desde el punto de vista de la biofunción del material, y son inherentes tanto a la composición química de los materiales [fases cristalinas, purezas, radio Ca/P] (Le Geros R.Z., 1991; Frank, R., M., *et.al.*, 1991; Osborn, J.F., & Newesely, H., 1980; Heughebaert, M. *et.al.*, 1988; Doi, T. KS *et.al.*, 1993), así como a las características estructurales del mismo [tamaño, presencia de poros. bordes] (Lehtinen, R. *et.al.*, 1990; Pearsal, A.D., *et.al.*, 1992; Gatti, A.M., Zaffi, D., &

Poli, G.P., 1990). Estas cualidades, que se interpretan como potencial osteogénico, osteoconductor y osteoinductor (Genco, R.J., *et.al.*, 1990), se relacionan íntimamente con los tejidos del huésped para actuar conjuntamente y determinar el comportamiento y resultado de los mecanismos de reparación y regeneración de un sitio que recibe un implante o sustituto óseo.

En el sentido estructural, la disposición espacial y el diámetro de los poros del esqueleto de la Me tiende más a promover el encapsulamiento del implante y no la neoformación tisular dentro del mismo (Hulbert, *et.al.*, 1971). La presencia de tejido conectivo en la periferia del implante, formó una cápsula bien definida desde los primeros días, y con el paso del tiempo proliferó hacia el interior del los implantes a través de los poros del material, indicando que en este modelo experimental el material posee potencial "osteoconductor", aunque este término se aplique únicamente para describir la proliferación de tejido hacia el interior del material y no la formación de hueso, ya que se ha comprobado que ningún material implantado en sitios no-óseos es capaz de formar hueso (Heughebaert, M. *et.al.*, 1988).

Un aspecto complementario a la caracterización fisicoquímica del material, era su prueba en modelos animales, en vista de que existían reportes en la literatura que informaban de la implantación, prueba y aún el uso en humanos de materiales compuestos exclusivamente de carbonato de Calcio (Guillemin, G., *et.al.*, 1987; Chiroff, R.T., 1975), se decidió implantarlo en ratas Wistar.

Cuando un biomaterial es llevado hacia el medio interno del huésped, el comportamiento del implante puede considerarse agresivo al mismo, tomando en cuenta que la respuesta ante un agresor es variable en cada individuo y especie animal (Black, J., 1992; Bagnall, R.D., 1980). La relación entre el tiempo y la presencia de células de infiltrado inflamatorio crónico, y en especial las células gigantes multinucleadas a cuerpo extraño fue evidente en los especímenes de los grupos que recibieron implantes de material a base del esqueleto de la Me. En los

primeros días (7 y 15) el rechazo al material fue evidente ya que el infiltrado celular estaba constituido de neutrófilos, macrófagos, linfocitos y células plasmáticas. Con el paso del tiempo se observó que la población celular cambio, ya que entre los 15 y 30 días el predominio de células de defensa era de infiltrado linfoplasmocitario y células gigantes multinucleadas a cuerpo extraño. Hacia el final del periodo experimental, en los especímenes de los grupos de 45 días y particularmente en los de 60 días, se encontró que las células predominantes eran las células gigantes multinucleadas a cuerpo extraño. Demostrando así que existía una relación inversa entre el tiempo y el predominio y cantidad de células características de rechazo al material.

La presencia de células gigantes multinucleadas a cuerpo extraño es un indicador de la existencia de rechazo del huésped ante un agente agresor, por lo tanto es de esperarse que al implantar o colocar cualquier material, sustancia o agente extraño en el medio interno estas células estén presentes. En estudios realizados por Pinholt y colaboradores, encuentran células gigantes a cuerpo extraño en los especímenes de cuatro apatitas comerciales que fueron implantadas en ratas, la respuesta del huésped después de 8 semanas de evolución aparentemente fue buena, aunque los cortes histológicos revelaban la nula formación de hueso y la presencia de células gigantes multinucleadas a cuerpo extraño (Pinholt, E.M., *et.al* 1992). Ahora bien, el papel que desempeñan estas células no debe considerarse estrictamente invariable, porque así como pueden ser indicadores de rechazo, también pueden serlo de tolerancia a los materiales, dicho de otra manera, la presencia de este tipo de células puede ser indicador de adaptación funcional del huésped ante el agente agresor (Black. J., 1992). Obviamente esta adaptación dependerá tanto del tipo y cantidad de células de rechazo, como del tejido que se forme hacia el interior como alrededor del material de implante.

En los especímenes de los grupos experimentales la formación de fibras de tejido conectivo alrededor de los implantes permitió la organización de una cápsula de tejido conectivo denso, que delimitaba perfectamente el material de implante y el tejido del huésped. Con

respecto a la forma del implante se observó que si era en bloque la cápsula era uniforme y seguía el trayecto de la superficie del material, a diferencia de cuando era en forma granular, ya que además de envolver el total de los gránulos, también los cubría individualmente. La formación de una cápsula alrededor de materiales de implante ha sido documentada en la literatura en estudios animales y humanos para materiales como β -fosfato tricálcico, Hidroxiapatita densa e Hidroxiapatita porosa (Lehtinen, R. *et.al.*, 1990; Pinholt, *et.al.*, 1992).

En los especímenes que recibieron el implante, indistintamente de la forma del mismo, hubo formación de tejido hacia el interior del material. El tejido que proliferó hacia el interior del implante siguió el trayecto de los poros que originalmente constituían el esqueleto de la Me. Esta neoformación tisular era antecedida por una proliferación y formación vascular hacia el interior del material, este comportamiento puede interpretarse como osteoconducción, aunque no se haya implantado en hueso. Es importante destacar esta característica, porque el comportamiento en hueso tal vez sea similar al reportado para el fosfato tricálcico, donde además de la encapsulación se formó tejido osteoide en el interior del implante (Chiroff, R.T., *et.al.*, 1975; Osborn, J.F., 1980; Frank, R.M., *et.al.*, 1991).

La degradación del material es un aspecto importante para determinar el comportamiento biológico del material, en el modelo experimental animal, el huésped respondió formando una cápsula de tejido conectivo al rededor del material y manifestando el rechazo con células gigantes multinucleadas a cuerpo extraño, aún en un periodo relativamente largo (60 días), sin embargo las células del huésped fueron incapaces de fagocitar en este periodo el material de implante, debido a la cantidad del mismo o bien a una cierta tolerancia que le produce la composición química del implante. Para conocer más de la degradación del material es necesario realizar estudios de solubilidad *in vitro*.

La respuesta del huésped ante la presencia del material de implante en los sitios experimentales puede ser considerada de leve en

algunos casos y moderada en otros. Por reacción tisular leve, se entiende que a las doce semanas de implantado el material, el tejido esta bien organizado. Por reacción tisular moderada, que a las 2 semanas hay algunas células inflamatorias a lo largo del material de implante, el tejido adyacente ha retenido su estructura pero contiene leucocitos (no en cantidad considerable), linfocitos, células plasmáticas, macrófagos y células de cuerpo extraño ocasionalmente. A las doce semanas hay algunas células inflamatorias crónicas, linfocitos, células plasmáticas, macrófagos, y ocasionalmente células de cuerpo extraño.

Los resultados de la caracterización del material y de la valoración *in vivo* hacen surgir cuestionamientos no sólo del comportamiento biológico en un animal, sino de la posibilidad de ser transformado químicamente en un compuesto más tolerado como la Hidroxiapatita o el β -Fosfato Tricálcico. La última consideración que se debe tomar en esta discusión, pero la más importante, es la posibilidad de contar con la cantidad suficiente de especímenes de *mellita eduardobarrosoi* sp.nov., para lograr elaborarla y ofrecerla como un recurso de sustitución y reparación ósea en ortopedia y cirugía médica y dental. Estas consideraciones son importantes ya que por el tipo de recolección del material, y no de captura o corte como los hacen en el coral, la posibilidad de obtener cantidad suficiente de la muestra es grande, sin alterar el equilibrio ecológico de las facies bionómicas de nuestros litorales. De tal manera que los estudios realizados para elaborar este informe permiten pensar en la posibilidad de desarrollar un material de sustitución y reparación ósea, con la realización de estudios complementarios de pruebas biológicas *in vivo* e *in vitro*.

CONCLUSIONES

De los resultados de este trabajo se pueden concluir que:

La composición mineral del esqueleto de la *mellita eduardobarrosoi* sp.nov. es principalmente carbonato de calcio [CaCO₃].

La fase cristalina del esqueleto de la *mellita eduardobarrosoi* sp. nov. es la aragonita [6CaCO₃].

El esqueleto de la *mellita eduardobarrosoi* sp. nov. tiene estructura porosa, que esta distribuida en dos categorias, los de diámetro menor entre 10μ y 40μ, y los de diámetro mayor entre 100μ y 200μ.

La estructura porosa del esqueleto de la *mellita eduardobarrosoi* sp. nov. tiene una apariencia de interconectividad.

La respuesta del huésped ante implantes de [CaCO₃] de la *mellita eduardobarrosoi* sp. nov. esta caracterizada por la presencia de células de infiltrado inflamatorio crónico.

La presencia de células de infiltrado inflamatorio crónico en sitios de implante de [CaCO₃] tiene una relación inversa con el tiempo de evolución de la implantación.

La forma y tamaño del implante determina la severidad de la respuesta del huésped.

El implante provoca encapsulamiento e induce la proliferación del tejido conectivo a través de los poros.

La estructura porosa del implante, así como la masa misma del material permite la neoformación de trayectos vasculares.

La presencia de células gigantes multinucleadas a cuerpo extraño en forma abundante en los periodos iniciales indica un rechazo al material de implante.

La disminución de las células gigantes multinucleadas a cuerpo extraño es indicativo de la aceptación del material de implante en un periodo a largo plazo

PERSPECTIVA PARA INVESTIGACIONES FUTURAS.

Es importante que los resultados obtenidos en esta investigación se continúen en ensayos y proyectos dirigidos a proporcionar información con respecto a:

Posibilidad de transformar la composición química del esqueleto de la Me, de carbonato de Calcio en un compuesto mejor tolerado por el huésped (Hidroxiapatita o β -Whitlockita, según la literatura).

Realizar pruebas de comportamiento biológico del material de Me, en sitios óseos (intraóseos y perióseos) de modelos animales.

Realizar pruebas *in vitro* complementarias del material de Me.

Determinar el potencial de solubilidad *in vitro e in vivo* del esqueleto de la Me.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.

Addison, W.H.F. (1990): Histologic Methods Adapted for Rat Tissues, in *The Rat in Laboratory Investigation*, edited by Ferris & Griffith 453-482..

Albee, F.H. (1920): Studies in bone Growth. Triple Calcium Phosphate as a Stimulus to Osteogenesis. *Ann Surg* 71:32-36.

Anderson, J.M., Zhao, Q.H. (1991): Bioestability of Biomedical Polymers. *Materials Research Society, MRS Bulletin* 16:75-77.

Anusav, K J., & de Rijk, W.G. (1990): Performance of Dental Biomaterials: Conference Report. *Dental Materials*, January, 69-72.

Arita I., Wilkinson, D., Mondragón, M., Castaño, V. (1994): Chemistry and Sintering behavior of thin hydroxyapatite ceramics with controlled porosity *Biomaterials*, in Press.

Ashman, A., Moss, M.L. (1977). Implantation of Porous Ploymethylnmethacrylate Resin for Tooth and Bone Replacement. *J. Journal of Prosthetic Dentistry* 37:657-665.

Ashman, A., Bruins P. (1985): Prevention of alveolar Bone Loss Postextraction with grafting materials. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 6:146-153.

Ashman, A (1988): The Introduction and History of HTR Polymer. *Compendium of Continuing Education*, Suppl 10, 318-321.

Barenberg, S.A. (1991): Report of the Committee to Survey Needs and Opportunities for the Biomaterials Industry. *MRS Bulletin* 16:26-32.

Barrio-Paredes, Rafael A. (1982): *Formación de Imágenes en el Microscopio Electrónico*. Universidad Autónoma de México, 94 pp.

Bertin, E.P. (1970): *Principles and Practice of X-Ray Spectrometric Analysis*. Plenum Press, New York, 679 pp.

Black, J., (1992): *Biological performance of materials. Fundamentals of biocompatibility*, 2nd ed., Marcel Dekker, Inc., New York.

British Standards Institution (1981): *Evaluation of Medical Devices for Biological Hazards*, BS 5736, Part 2: *Method of Testing by Tissue Implantation*. BSI, London.

Bowen D.K. & Hall C.R. (1975): *Scanning Electron Microscopy*, The MacMillan Press LTD, Great Britain. 298 pp.

Bucio-Galindo, Lauro (1990): Modelo de compatibilidad de estructuras para óxidos tetracomponentes y su aplicación al sistema In-Sr-Cu-O. *Tesis de Licenciatura*, Universidad Iberoamericana, México. 195 pp.

Bu Park, Joon. (1988): *Biomaterials Science and Engineering*, Plenum Press, New York. 450 pp.

Caso, María Elena (1961): Los Equinodermos de México. *Tesis Doctoral*. Fac. Ciencias, Univ. Nal. Autón. México. 388 pp.

Caso, María Elena (1978): Ciencia y Técnica de los Equinodermos en relación con el hombre. Primera Parte, Aspecto Científico. *Anales del Centro de Ciencias del Mar y Limnología*, Univ. Nac. Autón. México. 5 (1); 255-267.

Caso, María Elena (1979): Los Equinoideos del Pacífico de México. Tercera Parte-Orden *Clypeasteroidea*. *Anales del Centro de Ciencias del Mar y Limnología*, Univ. Nac. Autón. México, 1-68.

Caso, María Elena (1980): Contribución al estudio de los *Echinozoa* de México. La familia *Mellitidae* stefanini. Descripción de una nueva especie del género *Mellita*. *Mellita eduardobarrosoi* sp.nov. *Anales del Centro de Cienc. del Mar y Limnol.* Univ. Nal. Autón. México. 7(2):141-180.

Castaño, V. (1994): *Comunicación personal*.

Chiroff, R.T., White, E.W., Weber, J.N., Roy, D.M. (1975): Tissue Ingrowth of Replamineform in implants. *J Biomed Mat Res*, 6;29-45.

Christel P., Meunier, A., Dorlot, J.M., Crolet, J.M, Witvoet, J., Sedel, M., & Boutin, P. (1988): Biomechanical Compatibility and Design of Ceramic Implants for Orthopedic Surgery. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 523:234-256.

Colthup, N.B., Daly, L.H., Wiberley, S.E. (1990): *Introduction to Infrared and Raman Spectroscopy*, 3rd. Edition, Academic Press, Inc, San Diego CA. . 547pp.

Davison, W.L., (1980): X-Ray Diffraction Methods to Powders and Metals. in *Physical Methods in Modern Chemical Analysis*. By Kuwana, Theodore. Academic Press, Volume 2, New York, 411 pp.

De Groot K. (1987a): Hydroxyapatite Coatings for implants in Surgery, in *High Tech Ceramics*,(ed)Vincenzini P. (ed) Elsevier Science Publishers, Amsterdam, 381-386.

De Groot K. (1987b); Branemark P.I., Zarb G.A., & Albrektsson T. (1985): Tissue-Integrated Protheses, Osseo-Integration in *Clinical Dentistry*. Quintessence, Chicago.

De Groot K. (1981): Degradable Ceramics, in *Biocompatibility of Clinical Implant Materials*. Williams D.F. (ed) CRC, Boca Raton

Denisen, H, Mangano C., & Venini G. (1985): *Hydroxiapatite Implants*. -iccin Nuova Libreria, Italy. 167 pp.

Doi, Y., Koda, T., Wakamatsu, N., Goto, T., Kamemizu, H., Moriwaki, Y., Adachi, M., & Suwa, Y. (1993): Influence of Carbonate on Sintering of Apatites.

Driessen A.A., Klein C.P.A.T., de Groot K (1982): Preparation and some properties of sintered β -Withlockita. *Biomaterials* 3:113-116.

Dunn E.J., White, E.W., (1976): Bone ingrowth in replamineform porous implants, in *Biocompatibility of implant Materials*, Williams, D. Ed. Sector Publishing, London.

Erra R. (1991): Conception et Elaboration D'un Materiau Composite "Hydroxiapatite-Peptides D'Elastine-Coallagene I + III". *Doctoral Thesis*, Universite de Bordeaux..

Escalas, F., Galante, J., Rostoker, W., & Coogan, P.S. (1975): *J. Biomed Mater Res*, 9:303.

Federation Dentaire Internationale, FDI. (1980): Recommended Standard Practices for Biological Assessment of Dental Materials; *International Dental Journal*, 30.

Ferguson, A.B., Jr., Laing, P.G., & Hodge,E.S. (1960): The Ionization of Metal Implants in Living Tissues, *J. Bone Joint Surg*. 42A:77.

- Ferrone, P.J., Dutton, J.J. (1992): Rate of Vascularization of Coralline Hydroxyapatite Ocular Implants. *Ophthalmology*, 99:376-379.
- Frank, R.M., Klewansky, P., Hemmerle, J., & Tenenbaum, H. (1991): Ultrastructural Demonstration of the Importance of Crystal Size of Bioceramic Powders Implanted into Human Periodontal Lesions. *J. Clin Periodontol*, 18: 669-680.
- Friedlaender G., Strong S.K. (1976): Studies on the Antigenicity of Bone. I. Freeze-Dried and Deep Frozen Bone Allografts in Rabbits. *J Bone Joint Sug* 58A854.
- Friedlan G, Klein R. (1987): Transmission of Human Immunodeficiency Virus. *N Engl. J. Med* 317:1125.
- Frame, J.W., Brown, R.M., & Brady, C.L. (1981): Hydroxyapatite as a bone substitute in the jaws, *Biomaterials*, 2:19-22.
- Gatti, A.M., Zaffe, D., & Poli, G.P. (1990): Behavior of Tricalcium Phosphate and Hydroxyapatite Granules in Sheep Bone Defects. *Biomaterials*, 11:513-517.
- Genco, Robert J., Goldman, Henry M., Cohen, D.Walter. (1990): *Contemporary Periodontics*, The C.V. Mosby Company, St. Louis Missouri, USA.
- Glowacki J., Murray J.E., Kaban L., Folkman J., Mulliken J.B. (1981): Application of the Biological Principle of Induced Osteogenesis for Craniofacial Defects, *Lancet* 11:959-963.
- Goldstein J.I., Newbury D.E., Echlin P., Joy D.C, Fiori C., Lifshin E. (1981): *Scanning Electron Microscopy and X Ray Microanalysis*. Plenum Press, New York, 663 pp.
- González, R. (1989): Método de Obtención de Hidroxiapatita a Partir de Corales Marinos Cubanos. *RPI No. 135/89 ONIITEM*. Cuba.
- Gosner, K.L. (1988): *Guide to Identification of Marine and Estuarine Invertebrates*, Wiley-Interscience, New York, 570-574.
- Gross U.M., Müller-Mai C.M., Voigt C. (1990): The Interface of Calcium-Phosphate and Glass-Ceramic in Bone, A Structural Analysis. *Biomaterials* 11:83-85.

Guzmán Baez H.J. (1990): *Biomateriales Odontológicos de Uso Clínico*. Cat Editores, 180 pp.

Guillemin G, Patat J.L., Fournie J., Chetail M. (1987): The Use of Coral as a Bone Graft Substitute. *J Biomed Mater Res* 21:557-567.

Hailin H. (1992): Estructura y comportamiento mecánico de los compuestos del ácido poliacrílico con óxidos metálicos. *Tesis de Doctor en Ciencias*, Fac. de Ciencias U.N.A.M., México.

Helmus M.N. (1991): Overview of Biomedical Materials. *MRS Bulletin* 16:33-38.

Hench L.L. (1991a): Bioceramics: From Concept to Clinic. *Journal of the American Ceramic Society* 74:1485-1510.

Hench L.L., Wilson J. (1991b): Bioceramics. *MRS Bulletin* 14:62-74.

Heughebaert, M., LeGeros, R.Z., Gineste, M., Guilhem, A., & Bonel, G. (1988): Physicochemical characterization of deposits associated with HA ceramics implanted in nonosseous sites. *J. Biomed. Mater. Res.: Applied Biomaterials*, 22: 257-268.

Hu H., Saniger J., Castaño V. (1993): Deformation behavior of PolyAcrylic-Metal Oxide Composites in Water. *Materials Letters* 16:200.

Holmes R.E. (1979): Bone Regeneration within a Coralline Hydroxyapatite Implant. *Plast Reconstr Surg* 63:626-636.

Hulbert, S., Klawiter, J., & Leonard, R., in *Medical Engineering Textbook*. Ray, C., Year Book Med. Pub., Chicago.

Hyman L.H. (1955): *The invertebrates: Echinodermata. The coelomate bilateria*. Vol. IV, Mc. Graw-Hill Book Co. New York. 750 pp.

Interpore 200, Porous Hydroxyapatite (1987): *Technical Data*, Interpore International.

Irigaray J.L., Oudadesse H. Bloundiaux G. (1990): Quantitative study of the coral transformations "in vivo" by several physical analytical methods. *Biomaterials* 11:73-74.

Jahnke K., Plester D., Heimke G. (1982): Experiences with Al₂O₃-ceramic Middle Ear Implants. *Biomaterials* 3:137-138.

Jarcho M. (1986): Calcium Phosphate as Biomaterials. Properties and Applications. *Dent Clin North Am.* 1:25-48

Jarcho M. (1981); Calcium Phosphate Ceramics as Hard Tissue Prosthetics. *Clin Orthop* 157:259-278.

Jenkins R. (1976): *An introduction to X-Ray Spectrometry*. Ed. Heyden, London, Great Britain, 123 pp.

Kasperk C, Ewers R, Simons B. (1988): Algae-derived (phycogene) hydroxylapatite. A Comparative Histological Study. *Int J Oral Maxillofac Surg* 17:319.

Kasperk C, Ewers R. (1986): Tierexperimentelle untersuchungen zur synthetischer, koralaliner und ans Algen gewonnener (phycogener) Hydroxylapatitmaterialien. *Z Zahnaerzt Implantol* 2:242.

Kent, Jonh N., Jarcho, Michael (1986): Reconstruction of the Alveolar Ridge with Hydroxylapatite. in Fonseca, R.J., *Reconstructive Preprosthetic Oral and Maxillofacial Surgery*. W.B. Saunders.

Kokubo T. (1990): Bioactive glass ceramics properties and applications. *Biomaterials* 12:155-163.

Leake D. (1988): HTR® Polymer: Present and Future Application. *Compendium of Continuing Education in Dentistry*. Suppl 10, 328-330.

LeGeros R.Z. (1991): *Calcium Phosphates in Oral Biology*. Monographs in Oral Science, vol 15. Karger, New York.

LeGeros R,Z (1981): Apatites in Biological Systems. *Prog Crystal Growth Charact* 4:1-45.

LeGeros R.Z., Daculsi G., Orly I., LeGeros J.P. (1990) Bone augmentation Implant Coating Materials. In: *Proc. First International Conference on Implant Dentistry*, Tokio, February.

LeGeros, Racquel Z, Orly I, Gregoire M, Abergas T, Kazimiroff J, Tarpley T. (1987): Physicochemical Properties of Calcium Phosphate Biomaterials Used as Bone Substitutes. *The 13th Ann Meeting Soc of Biomaterials*, Abs. No. 84.

LeGeros, Racquel Z (1988) Calcium Phosphate Materials in Restorative Dentistry: A Review. *Adv Dent Res* 2:164-183.

Lemons, Jack & Natiella Joseph. (1986): Biomaterials, biocompatibility and peri-implant. in *Dent Clin of North Am*, 1:4-7.

Lehtinen, R., Kuusilehto, A., & Nikkanen, U. (1990): Bone Response to Hydroxyapatite Particles of Different Shapes in Rabbit Tibia. *J. Oral Maxillofac. Surg*, 48:1075-1078.

McConnell, Duncan (1970): Biomineralogy of Phosphates and Physiological Mineralization. in *Environmental Phosphorous Handbook*. 425-442.

Marquis, P.M., Wilson H.J., (1986): A Tooth for a tooth-Ceramics in Dentistry. *Chemistry and Industry*, Oct., 657-661.

Metsger DS, Driskell TD, Paulsrud JR. (1982): Tricalcium Phosphate -A Resorbable Bone Implant: Review and Current Status. *J. of American Dental Association*, 105: 1035-1038.

Mellonig, James T.(1991): Freeze-Dried Bone Allografts in reconstructive periodontal surgery. *Dental Clinics of North America*. 3:497-512.

Mjör, Ivar A. (1985): *Dental Materials: Biological Properties and Clinical Evaluations*. CRC Press, Inc, Florida USA. 70 pp.

Muller, E., Kammula, R., & Marlowe, D. (1991): Regulation of "Biomaterials" and Medical Devices. *MRS Bulletin* 16:39-41.

Navarro A., García M, Martínez E, Vazquez G & Castaño V. (1994): Studies on the Stability of a Styrene-butadiene copolymer in biomedical applications. *Materials Letters*, in Press.

Newman, W.F. & Newman, M.W. (1958): *The Chemical Dynamics of Bone Mineral*. The U. of Chicago Press. 39-54.

Nathanson, D., Gettleman, L., Schnitman, P. & Shklar, G. (1978): Histologic Response to Porous PMMA Implant Materials *Journal of Biomedical Research* 12:13-33.

Oatley, C.W. (1972): *The Scanning Electron Microscope. Part I, The Instrument.* Cambridge University Press, Great Britain. 205. pp.

Oonishi, H. (1991): Orthopedic Application of Hydroxyapatite. *Biomaterials*, 12:171-178.

Osborn, J.F. & Newesely, H. (1980): The Material Science of Calcium Phosphate Ceramics. *Biomaterials* 1: 108-111.

Parker, Frank S. (1983): *Applications of Infrared, Raman and Resonance Raman Spectroscopy in Biochemistry*, Plenum Press, New York, 550. pp.

Pinholt, E.M., Ruyter, I.E., Haanaes, H.R., & Bang, G. (1992): Chemical, Physical, and Histologic Studies on Four Commercial Apatites Used for Alveolar Ridge Augmentation. *J. Oral Maxillofacial Surgery*. 50: 859-867.

Pearsal, A.D., Spears, R., & Chokshi, M. (1992): The ultrastructural Architecture of the Tissue/Hard-Tissue Replacement Interface. *J. Oral Maxillofac Surg*, 50:375-384.

Petersen, G.G. (1913): Valuation of the Sea. II The Animal Communities of the Sea Bottom and their Importance for Marine Zoogeography. *Rep Danish biol Sta.*, 21:1-44.

Piecuch, J.F. (1986): Augmentation of the Atrophic Edentulous Ridge with Porous Replamineform Hydroxyapatite (Interpore 200). *Dent Clin North Am* 30:291-305.

Plug, H.P., Alexander, L.E. (1954): *X-Ray Diffraction Procedures.- For Polycrystalline and Amorphous Materials.* John Wiley and Sons, New York. 111-125.

Pouchet, Charles J. (1985): *The Aldrich Library of FTIR Spectra.* Aldrich Chemical Company.

Rejda, B.V., Peelen J.G.J. & de Groot, K. K. (1977): Tricalcium phosphate as a bone substitute. *J Bioeng.*, 1,93

Roy DM, Linnehan SA (1974): Hydroxyapatite Formed from Coral Skeleton Carbonate by Hydrothermic Exchange. *Nature* 274:220-227.

Salman, L., & Kinney L.A. (1992): Clinical Response of Hard Tissue Replacement (HTR) Polymer as an implant Material in Oral Surgery Patients. *J. Oral Implatology* 18:24-28

Socarrás, E. (1990): Evaluación de la hidroxiapatita obtenida de corales marios cubanos. *Tesis de candidatura a Dr. en Ciencias Médicas*. Instituto Superior de Ciencias Médicas de la Habana Cuba. Octubre.

Sherman, Irving W. & Sherman, Vilia G. (1976): *The invertebrates: Function and Form*. Mc. Millan Publishing Co., Inc. New York., 333 pp.

Stanley, Harold R. (1990): *Toxicity Testing of Dental Materials*. CRC Press, Boca Raton, Florida. 166 pp.

Straughan, BP. & Walker S. (1983): *Spectroscopy, Volume Two*, John Wiley & Sons Inc., New York.

Tencer, A.F., Shors, E.C., Woodard, P.L., & Holmes, R.E., 1990): Mechanical and biological Properties of a Porous Polymer-Coated Coralline Ceramic. in *Handbook of Bioactive Ceramics*. Yamamuro, T., Hench, L.L., Wilson, J. ed., CRC Press, Boca Raton. 209-221.

Turner, J.E., Lawrence, W.H., & Autian, J., Subacute Toxicity Testing of Biomaterials using Histopathologic Evaluation of Rabbit Muscle Tissue, *J Biomed Mat Res* 7:39.

Ueno Y, Shima Y, Akiyama T (1987): Development of a New Biomaterial as a Bona Substitute, Tre Bone Ceramoics. *High Tech Ceramics*, 369-378.

Urist MR, Strates BS (1971) Bone Morphogenetic Protein. *J. Dental Research* 50:45-49

Urist M, Jurist, Dubuc D. (1970): Quantitation of new bone formation in intramuscular implants of bone matrix in rabbits. *Clin Orthop* 68:279.

Van Raemdonck, W., Ducheyne, P., & De Meester, P. (1984): Calcium Phosphate Ceramics. in Ducheyne, P., & Hastings, G.W., *Metal and Ceramic Biomaterials*. CRC Press, Boca Ratón, 144-166.

- Vivek Shetty & Thomas J. Han (1991): Alloplast Materials in Reconstructive Periodontal Surgery. *Dent Clin North Am* 3:513-521.
- Weinlander, M., Beumer III, J., Kenney, E.B., & Moy, P.K. (1992): Raman microprobe investigation of the calcium phosphate of three commercially available plasma-flame-sprayed hydroxyapatite-coated dental implants. *J. of Materials Science: Materials in Medicine*. 3: 397-401.
- White E., & Shors E.C. (1986): Use of Porous Hydroxyapatite "Interpore-200" as Biomaterial. *Dent Clin North Am*. 1:49-67.
- White, EW, Weber JN, Roy DM, Owen EL, Chiroff RT, & White RA (1975): Replamineform Porous Biomaterials for Hard Tissue Implant Applications. *J Biomed. Mat. Res. Symp*, 6:23-27.
- Wilbur, Karl M., (1973): Mineral Regeneration in echinoderms and molluscs. in *Hard Tissue Growth, Repair and Remineralization. Ciba Foundation Symposium 11*, Ed. Elsevier , Excerpta Medica, p. 7-34.
- Williams, DF (1987): Tissue-biomaterial interactions. *J Materials Science* 22:3421-3445.
- Williams, DF (1981): *Biocompatibility of Clinical Implant Materials*. Vol. I., CRC, Boca Raton Fl.
- Winograd, N., & Gaarenstroom, S.W. (1980): *X-Ray Photoelectron Spectroscopy. in Physical Methods in Modern Chemical Analysis*, Vol. 2. by. Kuwana, Theodore. Academic Press, New York.
- Wortman, R.S., Merrit, K., & Brown, S.A. (1983): *Biomat. Med. Artif. Org.* 11:103.
- Zhou, J., Zhang, X., Chen, J., Zeng, S., & de Groot, K. (1993): High Temperature Characteristic Hydroxyapatite. *J. of Materials Science: Materials in Medicine*. 4: 83-85.

CURRICULUM VITAE

Nombre: MIGUEL ANGEL ARAIZA TÉLLEZ

Fecha de Nacimiento 29 de Septiembre de 1961.

Lugar de Nacimiento Distrito Federal, México.

Nombre de los Padres Sra. María del Refugio Téllez Santana.
Sr. Prisciliano Araiza García.

ESTUDIOS PROFESIONALES:

Licenciatura: Cirujano Dentista, Escuela Nacional de Estudios Profesionales Iztacala. U.N.A.M., 1981-1984.

Especialización Endoperiodontología, Escuela Nacional de Estudios Profesionales Iztacala, U.N.A.M.. 1987-1988.

Maestría Maestría en Odontología, Facultad de Odontología, U.N.A.M., 1988-1989.

Doctorado Doctorado en Odontología, Facultad de Odontología, U.N.A.M., 1992-1994.

DISTINCIONES ACADÉMICAS:

Medalla Gabino Barreda Otorgada por el Consejo Universitario como reconocimiento a los estudios de Maestría

Otorgada por el Consejo Universitario como reconocimiento a los estudios de Especialización.

Mención Honorífica Otorgada por el examen realizado para obtener el grado de Maestro en Odontología.

Otorgada por el examen realizado para obtener el diploma de especialización en Endoperiodontología.

Otorgada por el examen realizado para obtener el título de Cirujano Dentista.

DISTINCIONES PROFESIONALES:

Miembro del Sistema Nacional de Investigadores con categoría de Candidato a Investigador Nacional, mediante convenio de Junio de 1993 a Junio de 1996.

EXPERIENCIA ACADÉMICA:

Profesor de Asignatura "A" en el Curso de Especialización en Endoperiodontología de la Escuela Nacional de Estudios Profesionales, U.N.A.M., de Septiembre 16 de 1990 hasta Marzo de 1993.

Profesor Asociado "A" Tiempo Completo en el Curso de Especialización en Endoperiodontología de la Escuela Nacional de Estudios Profesionales, U.N.A.M., de Marzo de 1993 al 15 de Noviembre de 1993.

Profesor de Asignatura "A" adscrito a la División de Estudios de Posgrado e Investigación de la Facultad de Odontología de la U.N.A.M., del 16 de Noviembre de 1993 a la fecha.

DIRECCIÓN PERMANENTE:

Paseo de las Alamedas 242, Las Alamedas, Atizapán de Zaragoza, Estado de México, C.P. 52970.