

89
2 es.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE ODONTOLOGIA

ESTUDIO DE LAS CARACTERISTICAS
ULTRAESTRUCTURALES Y DE COMPOSICION DEL
TEJIDO OSEO DE MODELOS ANIMALES
EMPLEADOS EN PRUEBAS DE
BIOCOMPATIBILIDAD.

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
CIRUJANO DENTISTA
P R E S E N T A :
AXEL MONTALBAN ASTUDILLO

DIRECTOR DE TESIS: DR. MIGUEL ANGEL ARAIZA TELLEZ
LABORATORIO DE BIOMATERIALES-JURIOQUILLA D.E.P.I.

ASESORES: HUMBERTO ARENAS ALATORRE
I.O. LIDIA ORTIZ VELAZQUEZ

MEXICO, D. F.

FEBRERO DE 1999

TESIS CON
ALLA DE ORIGEN

271378



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.

Agradecimientos.

A la Universidad Nacional Autónoma de México, por abrirme las puertas de sus aulas y bibliotecas para terminar mi enseñanza superior.

Gracias.

A la Facultad de Odontología, por ser el lugar donde mi mente se ocupara de los libros y pasara las mejores horas de mi juventud.

Gracias.

A la División de Estudios de Posgrado de Odontología, por abrirme sus puertas al uso de sus Instalaciones y aprender lo que es La investigación.

Gracias.

Al Instituto de Física, por permitirme desarrollar mi proyecto de investigación en sus instalaciones.

Gracias.

Dra. Margarita García Garduño, por su ayuda en la obtención de muestras que llevó a buen fin mi proyecto.

Gracias.

Mtra. C. Jaqueline Cañetas, por su tiempo, esfuerzo y conocimiento a la obtención de imágenes en el Microscopio Electrónico de Barrido (MEB).

Gracias.

Mtro. Jesús Arenas Alatorre, por su ayuda y colaboración en el estudio de microanálisis, así como su tiempo y disposición brindado para este proyecto.

Gracias.

Dra. María Antonieta Mondragón, por su ayuda y asistencia técnica en la Espectroscopia de FT-IR.

Gracias.

Dr. Miguel A. Araiza Téllez, por su tiempo, paciencia, ayuda y conocimiento que logramos juntos, llegando al fin.

Gracias.

I.Q. Lidia Ortiz Velázquez, por su ayuda, tiempo y dedicación al proyecto.

Mil Gracias.

C.D. Humberto Arenas Alatorre, por su asesoría y conocimientos que me llevaron al final del proyecto.

Gracias.

ÍNDICE GENERAL

Contenido	Página
Resumen	1
Introducción	2
Antecedentes	3
Planteamiento y justificación del problema	15
Hipótesis	16
Objetivo	16
Materiales y Método	
Universo de trabajo	17
Muestra	17
Identificación y definición de variables	17
Material	19
Técnicas de caracterización	20
Resultados	25
Discusión	52
Conclusiones	55
Referencias Bibliográficas	56

ÍNDICE DE FIGURAS

Gráfica	Página
1. Cortes de hueso observado en sentido longitudinal y transversal.	18
2. Esquema de las señales formadas en el microscopio electrónico de barrido cuando el haz de electrones incide en la superficie de la muestra.	21
3. Difractograma de hueso de rata, se observan las intensidades características de la hidroxiapatita.....	39
4. Difractograma de hueso de cobayo, observandose las intensidades características de la hidroxiapatita.....	40
5. Difractograma de hueso de conejo observandose las intensidades características de la hidroxiapatita.	41
6. Difractograma que muestra las intensidades de la composición del hueso de rata, cobayo y conejo, notando la similitud de la composición.	42
7. Difractograma de hueso de perro, se observan las intensidades características de la Hidroxiapatita.	43
8. Difractograma de la cristalinidad y composición de la hidroxiapatita del hueso Humano.	45
9. Espectro de FR-IR comparando las muestras de rata, cobayo y conejo mostrando la gran similitud correspondiente a $(PO_4), CO_3, OH$	46
10.y 11. Espectro de FR-IR comparando las muestras de hueso de perro y humano mostrando la gran	

similitud correspondiente a (PO_4) , CO_3 , OH	47
11. Microanálisis del hueso de rata, cobayo, conejo y perro.	49
12. Microanálisis de Rayos-X del hueso de humano.	50

ÍNDICE DE TABLAS

Cuadro	Página
1. Distribución de la densidad (poros /mm ²) de los poros en los distintos modelos animales.	36
2. Tamaño de los poros de distintos modelos animales (µm).	36
3. Distancia de los poros de distintos modelos animales (µm).	37
4. Composición cualitativa del hueso de los distintos Modelos animales.	51

INDICE DE FOTOGRAFIAS.

Número	Página
1. Fotomicrografía del tejido óseo de rata visto en microscopio electrónico de barrido (JEOL-5200) en diferentes aumentos y zonas.	27
2. Fotomicrografía del tejido óseo de cobayo visto en microscopio electrónico de barrido (JEOL-5200) en diferentes aumentos y zonas.	29
3. Fotomicrografía del tejido óseo de conejo visto en microscopio electrónico de barrido (JEOL-5200) en diferentes aumentos y zonas.	31
4. Fotomicrografía del tejido óseo de perro visto en microscopio electrónico de barrido (JEOL-5200) en diferentes aumentos y zonas.	33
5. Fotomicrografía del tejido óseo de humano visto en microscopio electrónico de barrido (JEOL-5200) en diferentes aumentos y zonas.	35

Estudio de las características ultraestructurales y de composición del tejido óseo de modelos animales empleados en pruebas de biocompatibilidad.

Resúmen: En este trabajo se determinaron las características ultraestructurales de los distintos modelos animales (rata, cobayo, conejo, perro y humano) mediante la aplicación de técnicas instrumentales de caracterización (DRx, FT-IR, MRx y Microanálisis de Rx) que permitió determinar las similitudes y diferencias en textura, tamaño de poro, densidad y la composición química de los especímenes. Los resultados muestran que no existe diferencia en la composición química, ya que la fase inorgánica predominante es la hidroxiapatita. Las principales diferencias se observaron en el tamaño y la densidad del poro en las diferentes especies, siendo el perro la especie que posee mayor similitud con las características del hueso humano.

Paralabras clave: *Hueso, Biocompatibilidad, porosidad, densidad, composición química.*

Ultrastructural and chemical characterization of bone tissue from different animal models used in biocompatibility test.

Abstract: The physicochemical characterization techniques (Drx, FT-IR, MEB and X-Ray microanalysis) were applied in order to determine the ultrastructural characteristics of several animals (rat, guineapig, rabbit, dog and human) used as models in biocompatibility test. Femur of each animal model were selected and specific procedures were made to determine pore diameter density, texture and chemical composition. The results obtained showed that was not possible to identify significant differences upon the chemical composition because the predominant inorganic phase was identify as hidroxiapatite. The most important differences were observed in pore size, and density on all of specimens, because there were present different parameters of distribution and size between animals. The dog was the species that showed characteristics most similar towards the human bone.

Keywords: *Bone, biocompatibility, porosity, density, chemical composition*

INTRODUCCIÓN.

El estudio y validación de materiales que serán utilizados como reemplazo de estructuras o tejidos en el cuerpo humano, no solamente deben de cumplir con cualidades de composición o de estructura, también deben tener un comportamiento biológico aceptable ya que de ello dependerá el éxito o fracaso de su utilización (Black J, 1991).

Como fase de preparación de los biomateriales, es imprescindible la realización de pruebas y ensayos preclínicos en los sitios donde serán colocados. En el caso de los materiales empleados como sustituto y reemplazo de tejido óseo, uno de los ensayos más comunes es la implantación intramedular y cortical en modelos animales de diversa especie, dando por entendido que las características de respuesta pueden ser extrapolados a la que tendrá cuando sea aplicado en humanos (Hench LL, 1998). La información sobre las características de ultraestructura y de composición del tejido óseo de los modelos animales empleados para las pruebas de biocompatibilidad no se encuentra concentrada en alguna fuente que nos permita conocer cuales son las diferencias, si es que las hay, o las similitudes de dichas características.

Debido a las situaciones descritas anteriormente, el objetivo de este estudio es la determinación de las características ultraestructurales y de composición del tejido óseo de distintos modelos animales empleados en las pruebas de biocompatibilidad de materiales de sustitución y reparación ósea.

ANTECEDENTES.

El hueso es un tejido mineralizado, que a pesar de su dureza y fuerza es un material vivo y dinámico, que está siendo renovado continuamente y que experimenta una permanente reconstrucción a lo largo de la vida del individuo. (Fawcett DV, 1988). Desde el punto de vista de la ciencia de materiales se le considera como un material compuesto, o *composite*, esto se relaciona al hecho de que está constituido de una matriz celular variable y un componente mineral. En condiciones normales la materia orgánica y los componentes minerales se encuentran en un equilibrio dinámico donde los procesos de aposición y resorción de material calcificado son determinados por las condiciones de homeostasis o enfermedad presentes en el organismo (Gage, JP *et.al.* 1989).

En conjunto, el tejido óseo es un sistema que provee de soporte al cuerpo, de esta manera el esqueleto está compuesto tejido conjuntivo mineralizado, ligamentos, tendones y un sistema de distribución completo y eficiente de abastecimiento sanguíneo (Kent GC., 1978). El esqueleto sirve como un depósito para el calcio (Ca^{2+}) que es vital para el funcionamiento apropiado de las membranas celulares, y para el fósforo (P^{+5}) que se necesita en el metabolismo intermedio. Además, los huesos largos del sistema esquelético son importantes por la producción de células sanguínea. (Junqueira LC, 1996).

En los huesos que crecen activamente se distinguen cuatro tipos de células óseas: células osteoprogenitoras, osteoblastos, osteocitos y osteoclastos. Los tres primeros se consideran ordinariamente como tipos celulares distintos, es decir, son estadios funcionales diversos de un mismo tipo celular y se les considera también como ejemplos de modulación celular. (Fawcett DV, 1988).

El hueso se desarrolla a partir del mesénquima embrionario, las células osteoprogenitoras tienen núcleos alargados u ovals, pálidos, y un citoplasma acidófilo poco llamativo o levemente basófilo. Se les encuentra sobre y cerca de las superficies libres del hueso: en el endóstio se les encuentra en la capa más interna del periostio, limitando los canales haversianos y sobre las trabéculas de matriz cartilaginosa de la metafisis de

los huesos en crecimiento. Están activas durante el crecimiento normal de los huesos y pueden ser estimuladas durante toda la vida adulta debida a la reorganización interna del hueso, la curación de las fracturas o en la reparación de otras formas de lesiones. Bajo cualquiera de estas condiciones, se multiplican y se transforman en osteoblastos formadores de huesos, donde un paso preliminar en la formación de tejido esquelético es la síntesis de colágeno por fibroblastos (Paulsen DF, 1981).

Aparte de las células del sistema hematopoyético dentro de la médula ósea, las células específicas del hueso son los osteoblastos, osteoclastos y osteocitos. El osteoblasto es una célula formadora de hueso derivada de una célula precursora. Entre sus funciones importantes están la formación y secreción de sustancias colágenas y no colágenas para formar la matriz ósea orgánica, y la subsecuente mineralización de la matriz. Los osteoblastos producen hueso, son productores de la parte orgánica de la matriz, además de colágena tipo I, proteoglicanos y glucoproteínas. Se disponen siempre en la superficie ósea, de lado a lado en forma similar al epitelio simple. (Junqueira LC, 1996).

Los osteoblastos son responsables de la formación de la matriz ósea y se encuentran invariablemente al frente del avance del hueso que crece o se desarrolla. Durante el depósito activo de nueva matriz, se dispone en una capa epitelioidea de células cuboideas o cilíndricas bajas, conectadas unas con otras mediante expansiones cortas y finas. En las micrografías electrónicas se ve que los osteoblastos tienen la estructura esperada de células encargadas de las síntesis de proteínas. (Copenhaver WM, 1981).

Los osteocitos pueden ser encontrados dentro del hueso mineralizado lacunar. Las lacunas de los osteocitos separados están conectadas por canaliculos, a través de los cuales corren los procesos de los osteocitos que unan un osteocito con otro. El osteocito no es inerte, pero su presencia en el hueso perilacunar es controvertida (Gage, JP.*et.al.* 1989). Las observaciones con microscopía electrónica muestran que las expansiones de los osteocitos vecinos se ponen en contacto por sus extremos, de esta forma parecen estar en comunicación unas con otras y en último término con las situadas más superficialmente a través de una serie de uniones de baja resistencia

eléctrica, que permiten el flujo de iones y quizá también el de moléculas pequeñas. Los osteocitos juegan un papel importante en la liberación del calcio del hueso a la sangre y por ello participan en la regulación homeostática de la concentración de calcio en los líquidos del cuerpo (Borysenko M, 1985).

Los osteoclastos son células gigantes, móviles y polinucleadas, que reabsorben el tejido óseo participando en los procesos de remodelación de los huesos. Secretan ácidos (H^+), colagenasa y otras enzimas que atacan la matriz y liberan calcio (Ca^{2+}), además de participar en la eliminación de los restos del tejido óseo que se forman durante la absorción de hueso (Junqueira LC, 1996).

Los osteoclastos se presentan como células gigantes de 20 a 100 μ m de diámetro y que pueden tener hasta 50 núcleos, se encuentra en áreas de reabsorción ósea, y generalmente en cavidades poco profundas de la superficie del hueso, llamadas lagunas de Howship, las cuales se forman gracias a la acción de los osteoclastos. (Fawcett DV, 1988). Estas células especializadas provienen de otras menos diferenciadas del mesénquima.

La matriz orgánica del hueso es 90% colágena la cual es la principal proteína extracelular en el cuerpo (más del 50% está en el esqueleto) y la resistencia del hueso depende de ella. El 10% remanente de la matriz ósea contiene una variedad de sustancias no-colágenas. Estas incluyen osteocalcin (proteína GIa), proteoglicanos y varias fosfoproteínas de las cuales la osteonectina pueden ser importantes. El hueso puede contener sustancias no colágenas concentradas aparentemente del plasma tal como la α_2 HS-glicoproteína (Gage, JP.*et.al.* 1989).

El componente inorgánico del tejido óseo esta inmerso en una matriz de fibras colágenas, donde la unidad fundamental mineral esta representada por cristales de hidroxiapatita [$Ca_{10} (PO_4)_6 (OH)_2$], este compuesto químico es un mineral altamente estable cuyos componentes son el calcio, iones hidroxilo (OH), y el fosfato (PO_4). El mineral es depositado sobre la matriz colágena de hueso el cual adiciona la rigidez estructural y contribuye cerca del 99%

del calcio corporal. Inicialmente una fracción puede ser amorfo pero rápidamente se vuelve cristalino (LeGeros RZ, 1991).

En el hueso la disposición de la colágena es tal, que existen espacios o zonas huecas dentro de la disposición tri-dimensional de las moléculas en los cuales se deposita el primer cristal de mineral óseo. Los factores que controlan la mineralización son probablemente tanto químicos como celulares. Las concentraciones de calcio y fósforo normalmente presentes en el fluido extracelular podrían ser suficientes para mantener la cristalización (Gage, JP.*et.al.* 1989).

TIPOS DE HUESO.

Existen dos formas de hueso que pueden distinguirse al observarlos a simple vista o con la ayuda de una lupa, estos son: el hueso compacto y el esponjoso. (Fawcett DV, 1988). En los huesos largos típicos, tales como el fémur o el húmero, la diáfisis (tallo) es un cilindro de pared gruesa hecha de hueso compacto, con una cavidad medular central voluminosa ocupada por la médula ósea. Los extremos de los huesos largos están formados fundamentalmente por hueso esponjoso recubierto por una corteza delgada de hueso compacto. (Fawcett DV, 1988).

En el animal en crecimiento, los extremos de los huesos largos, llamados epífisis, nacen de centros de osificación independiente y están separados de la diáfisis por la placa epifisaria cartilaginosa que se une a la diáfisis gracias a una columna de hueso esponjoso de la región intermedia llamada metáfisis. (Murray, 1978). En las superficies articulares de los extremos de los huesos largos, la delgada capa de la cortical de hueso compacto está recubierta por una capa de cartilago hialino, el cartilago articular. (Hayes.*et.al.* 1992).

El hueso compacto es una masa sólida continua, en la cual con la ayuda del microscopio solo se ven espacios. Las dos formas del hueso se continúan una con otra sin un límite nítido que la separe. Está formado fundamentalmente por sustancia intersticial mineralizada, la matriz ósea está depositada en capas o laminillas de 3 a 7 μ m de grosor, también existen cavidades lenticulares llamadas lagunas, cada una de las cuales está ocupada

por una célula de hueso, el osteocito. (Weiss L, 1977). Desde cada laguna irradian en otras direcciones los canalículos, unos conductillos extraordinariamente delgados y ramificados que penetran en la sustancia intersticial de las laminillas y se anastomosan con los canalículos de las lagunas vecinas; se piensa que estos canalículos son esenciales para la nutrición de las células óseas. (Ham AW, 1984).

Las laminillas de hueso compacto se disponen de tres formas diferentes. 1) *Osteonas o sistemas haversianos*: La gran mayoría están dispuestas concéntricamente en torno a un conducto vascular del interior del hueso, para formar unas unidades estructurales cilíndricas. Su tamaño es variable y pueden estar compuestas por un número de laminillas que va de cuatro a veinte. 2) *Sistemas intersticiales*: Entre los sistemas haversianos hay fragmentos angulosos de hueso laminar que tienen forma y tamaño irregular. Los límites entre los sistemas haversianos y los intersticiales están nítidamente marcados por unas líneas refringentes llamadas líneas de cemento. 3) *Laminillas circunferenciales externas e internas*: En la superficie externa del hueso cortical, inmediatamente por debajo del periostio, y sobre su superficie interna, por debajo del endostio, hay varias laminillas que se extienden de modo ininterrumpido en torno a la mayor parte de la circunferencia del tallo. (Borysenko M, 1985).

Los conductos haversianos comunican unos con otros y con la superficie o la cavidad medular por medio de unos canales transversales u oblicuos, llamados canales de Volkmann. (Fawcett DV, 1988).

El hueso compacto consiste de lamelas mineralizadas de colágeno, concentraciones alrededor de los conductos de Havers, como en el eje de huesos largos o en mayor o menor hojas con disminución de canales como en hueso perióstico. Los conductos de Havers contienen una arteriola, una vénula, un vaso linfático y fibras nerviosas. El conducto y su circunvalación lamelar, constituye un osteón o sistema de Havers. Los vasos sanguíneos son responsables de la configuración de los sistemas de Havers. Los vasos en los conductos son continuos en la médula del hueso. En el eje de huesos largos los sistemas de Havers son más o menos paralelos al eje largo del hueso, un aspecto arquitectónico que minimiza la probabilidad de fractura bajo tensión

extrema normal. El plano lamelar de hueso perióstico es formado por osteoblastos sobre la superficie interior del periostio, la membrana fibrosa densa que adjunta a todos los huesos exceptúan a sus superficies articulares. (Kent GC, 1978).

El hueso esponjoso está compuesto también de laminillas, pero sus trabéculas son relativamente delgadas y de ordinario no contiene vasos sanguíneos en su interior, por ello no contiene vasos sanguíneos haversianos, sino que son simplemente un mosaico de piezas angulares de hueso laminar. Las células óseas se nutren por difusión a partir de la superficie endóstica a través de los diminutos canalículos que interconectan las lagunas y que llegan hasta la superficie. Durante el desarrollo embrionario y el crecimiento postnatal, existe una capa interna de células formadoras en contacto directo con el hueso, los osteoblastos. En el adulto, los osteoblastos asumen una forma de reposo (células osteoprogenitoras), y no se distinguen de otras células fusiformes del tejido conjuntivo. Sin embargo, si un hueso es lesionado se reactiva la capacidad formadora de hueso de estas células, toman la apariencia de osteoblastos típicos y participan en la neoformación del hueso. (Michael H, 1992).

Los huesos esponjosos, son semejantes en sus elementos esenciales pero diferentes en su aspecto cuando se observa detenidamente. El hueso esponjoso consiste de hueso trabecular y médula de hueso. Las trabéculas son un ensamblaje que emite, y excluye varillas, que como atados arquitectónicos forman una estructura rígida que provee una fortaleza máxima en áreas de tensión. Ellos se componen de arreglos irregulares de lamelas sin sistemas de Havers. La médula ocupa las cavidades entre trabéculas. Esto consiste de un retículo de fibras conjuntivas de tejido que apoyan vasos sanguíneos, fibras nerviosas y tejido adiposo (médula amarilla) y, en algunos huesos tejido hematopoyético que es la fuente de hematies de sangre y algunos tipos de células blancas. (Borysenko M, 1985).

La cavidad medular está compuesta con una membrana delgada de tejido conjuntivo formando el endostio. Estos tienen algunos aspectos de periostio y la capacidad para depositar hueso, o remodelarlo bajo condiciones seguras. (Kent GC, 1978).

Matriz ósea

La sustancia intersticial del hueso está constituida por dos componentes principales: uno es la matriz orgánica; y el otro las sales inorgánicas, cada uno constituye el 50% del peso seco de la matriz. La matriz orgánica está formada por fibras colágenas embebidas en la sustancia fundamental. En los mamíferos adultos, alrededor del 90% de la matriz orgánica corresponde al colágeno. (Gage, JP.*et.al.* 1989).

Hueso membranoso.

El hueso depositado directamente dentro de un blastema membranoso sin tener que haber sido precedido por un modelo cartilaginoso es el hueso membranoso. Entre los procesos fisiológicos que ocurren en el hueso, la neoformación de tejido mineralizado depende de la existencia de células mesenquimatosas diferenciadas que respondan a una estimulación humoral y celular para que ocurra el proceso de reparación o neoformación. (Michael H, 1992).

Componente mineral.

En cuanto al componente mineral del hueso, esta conformado principalmente por fósforo y calcio integrados en cristales de hidroxiapatita $[(Ca)_{10} (PO_4)_6 (OH)_2]$. Este fosfato de calcio constituye cerca del 95% del componente mineral del hueso, el resto lo constituyen otras sales de calcio, principalmente en forma de carbonato ($CaCO_3$), además de contener elementos en cantidad variable de Na^{+1} , K^{+1} , Mg^{+2} , Zn^{+2} , Mn^{+4} y Cu^{+2} (LeGeros RZ, 1991).

El análisis químico del hueso determina que está constituido por los siguientes elementos :

<u>Ca</u>	<u>Mg</u>	<u>Na</u>	<u>K</u>	<u>Sr</u>	<u>P</u>	<u>F</u>	<u>Cl</u>	<u>CO₂</u>	<u>Summ</u>
26.70	0.44	0.73	0.06	0.04	12.47	0.07	0.08	3.48	44.06

Cuando se le agrega el ácido cítrico y el nitrógeno, la suma de los elementos es ligeramente menor al 50%. Estos porcentajes son para los elementos (excepto el CO_2 y el ácido cítrico), y pueden ser convertidos a porcentajes de peso de óxido (Mc Connel, 1970), tal como sigue:

<u>CaO</u>	<u>MgO</u>	<u>Na₂O</u>	<u>K₂O</u>	<u>SrO</u>	<u>P₂O₅</u>	<u>CO₂</u>	<u>F</u>	<u>Cl</u>	<u>Sum*</u>
37.56	0.72	0.99	0.07	0.04	28.58	3.48	0.07	0.08	71.54

La estequiometría de la hidroxiapatita en el hueso humano se ha determinado en un cociente (Ca/P) de 1.67, encontrando situaciones donde se podría determinar una relación de 1.3:1 a 2.0:1 donde la condición nutricional participa de manera directa en la constitución y disposición del contenido mineral de los tejidos (LeGeros RZ, 1991).

La significancia de la proporción Ca/P de la dieta, ha sido discutida por muchos años. En el pasado se ha enfatizado que la proporción ideal de calcio-fósforo para los seres humanos se encuentra entre los rangos de 2:3 y 1:1 y que cualquier valor fuera de rango es peligroso. (Machlin, 1970).

Por sus características químicas y cristalográficas, la hidroxiapatita es un compuesto de alta estabilidad, insoluble en medio fisiológico y de gran dureza, es por ello que su presencia en los tejidos les confiere gran resistencia y dureza (esmalte, dentina y hueso), pero se ve afectada por la presencia de medios ácidos (Williams, Rad, Elliot JC, 1982). En el ámbito biológico, la hidroxiapatita juega un papel determinante para el diseño y elaboración de materiales que serán utilizados como sustituto o relleno de hueso (Holmes RE, 1988).

Los tejidos calcificados en el cuerpo pueden ser divididos en dos, conocidos como mesodermo y ectodermo. El hueso dentina y cemento se encuentra en el primer grupo, mientras que en el esmalte es parte del segundo.

El hueso es el tejido del cuerpo muy importante, su signo biológico y estructura es muy amplio. Biológicamente actúa como un reservorio del calcio, además de servir en la producción de células óseas. Estructuralmente el hueso provee la arquitectural del hueso humano. (Narasaratu, TSB; 1996).

Hasta el momento se ha llevado a cabo pocos estudios involucrando la forma y constitución del hueso en los distintos modelos animales empleados en pruebas de biocompatibilidad, de hecho uno de ellos ha abordado el estudio

desde el punto de ciencia de materiales, ya que trata de determinar la influencia del tamaño del cristal de la hidroxiapatita y la respuesta que desencadena en el tejido óseo, determinándose una influencia directa cuando los cristales están en un rango microscópico (Frank RM, *et.al.*, 1991).

La aproximación del estudio del hueso desde el punto de vista de Ciencia de Materiales se ha dirigido al estudio de las interfases formadas entre los implantes y el tejido óseo (Martin M, *et.al.*, 1990; Hayes A, *et.al.*, 1992), o bien para demostrar algunas de las cualidades físicas del hueso que deberá recibir prótesis que descansaran sobre él. (Doherty MJ, 1994).

Las referencias anteriores dan perspectiva de la aproximación que se ha hecho del estudio del hueso. Sin embargo, no hay una fuente donde se mencione si el tejido óseo de los modelos animales tienen características ultraestructurales y de composición similares o diferentes, estos últimos conceptos adquieren importancia ya que es conocido que para que ocurra un adecuado desempeño biológico, es necesario que ocurra un buen funcionamiento entre el material, el huésped y la respuesta (Black, 1991). Por lo antes revisado no hay un estudio que muestre cuales son las características de los diferentes modelos animales. A continuación se mencionaran algunas cualidades que deben considerarse para el uso y selección de los animales para un modelo experimental.

Modelos animales empleados en pruebas de biocompatibilidad

Los animales han servido para realizar test o pruebas de materiales que luego serán empleados en el cuerpo humano, la conveniencia y seguridad de estas pruebas dependen del modelo animal empleado (Stanley, HR, 1990). De esta manera, es importante distinguir las ventajas, desventajas y condiciones en las cuales se utilizan los distintos modelos animales. Entre las ventajas que se pueden citar con respecto a los modelos animales se encuentran:

1. Periodos de vida cortos. Reaccionan y envejecen rápidamente
2. Pueden ser sacrificados y se puede estudiar un proceso completo de cualquier enfermedad
3. Disponible en número suficiente (estadísticas)
4. Se pueden usar agentes infecciosos sin restricciones de moral

5. Interacción de varios factores

Los modelos animales pueden ser utilizados tan específicamente como sea necesario, sin embargo, es conveniente tomar en cuenta que básicamente los modelos animales se pueden clasificar en base al fenómeno que se les piensa observar. (Melby EC, 1974)

1. *Experimental*, este tipo es inducido quirúrgicamente, debe imitar la enfermedad que esta siendo estudiada, y ser fácilmente manipulable y fácilmente reproducible. Si este modelo no reproduce la enfermedad exactamente, la correlación entre animal y humano debe ser significativa, verificable y predecible.

2. *Negativo*, este tipo de modelo no desarrolla la enfermedad y usualmente es evitado. Puede ser útil para determinar por que algunas especies son resistentes, por ejemplo el Herpes saimirii no afecta al mono ardilla, la rata de campo es resistente a la mordida de la serpiente y la zarigüeya es resistente a la rabia.

3. *Huérfano*, este tipo de modelo incluye enfermedades de animales, las cuales no se encuentran en su contraparte humano, o enfermedades similares a estas en el hombre con etiologías o patogénesis diferentes. Por ejemplo el Sarcoma de Rous en el pollo fue descubierto en 1910 y ha sido usado de manera extensa desde la inmunología hasta investigaciones del cáncer, pero este no tiene una contraparte humana conocida.

4. *Espontáneo*, en estos casos la enfermedad ocurre naturalmente.

FACTORES QUE DEBEN SER CONSIDERADOS CUANDO SE SELECCIONA UN ANIMAL PARA INVESTIGACIÓN.

A continuación se mencionan las características que deben cumplir los animales que participaran en ensayos que pretendan llevarse a cabo. (Mitruka BM, 1976)

1. *Disponibilidad de especies*, se selecciona una especie la cual debe ser fácilmente disponible o pueda ser fácil de suministrar los animales al mismo investigador para que el trabajo pueda ser confirmado y/o sobre ampliado.
2. *Patogénesis*, comprender el proceso que se pretende estudiar.
3. *Periodo de vida de las especies y el mejor segmento del proceso* cada una de las fases de vida puede responder de manera diferente que las otras.
4. *Características anatómicas*, las características anatómicas propias, tamaño del animal, conformación, especialmente donde la restricción en el largo plazo esta comprometida.
5. *Requerimientos y hábitos nutricionales*, pueden variar con la edad, sexo, gestación, lactancia, embarazo, enfermedad, estación del año, temperatura, humedad relativa, ventilación algunos mecanismos psicológicos internos o la experimentación del estrés, por esta razón en el presente estudio se prefieren especímenes machos con la finalidad de evitar alteraciones hormonales.
6. *Genéticas*, tamaño de los genes comparados con los humanos.
7. *Polimorfismo*, cada una de las especies tienen características únicas que los separa de otros.
8. *Reproducción*, las características reproductivas incluidas como son el estatus endocrino según el sexo, periodo de gestación, tipo de placentación, tamaño de la camada y velocidad de desarrollo en el útero.
9. *Factores indígenas*, peculiares de una especie, cepa o repuesto.

10. *Tipo de agente* debe ser definido con su posible acción metabólica y productos su efecto en un órgano final y su modo de excreción, este deberá llevar especial cuidado y manejo.

11. *Cédula de administración*, frecuencia , cantidad y ruta tomada de dicho medicamento.

12 *Estado de salud de los animales* deben estar tan saludables como el experimento designado se llame, dentro de las restricciones monetarias.

13. *Requerimientos ambientales*, temperatura, humedad, luz, limpieza, ruido, así bien como otros numerosos factores deben ser considerados.

En este contexto, la prueba y validación de materiales de injerto óseo se lleva a cabo en animales de laboratorio tomados como ideales, sin embargo es probable que existan diferencias anatómicas y estructurales que puedan influir para que se manifieste una respuesta diferente a la esperada, es por ello que el propósito del presente estudio es la determinación de las características ultraestructurales de los diferentes modelos animales empleados para pruebas de biocompatibilidad. (Murray FE, 1978).

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACION.

El estudio y desarrollo de materiales que serán considerados como biomateriales debe seguir los lineamientos de las organizaciones reguladoras del uso y validación de este tipo de recursos. La International Standard Organization (ISO), la American Standard for Testing Materials (ASTM) y la British Standard Institute (BSI) son las entidades encargadas de dar los parámetros de prueba para los nuevos materiales, esto último es importante porque una de las etapas fundamentales para la validación, la constituye su prueba en tejido óseo vivo, ya sea humano o de animales, siendo hasta la fecha que no existe un estudio comparativo de las características de ultraestructura entre las diferentes especies empleadas para las pruebas de regeneración y neoformación ósea. La cuestión más importante radica en que los resultados que se obtienen en un estudio se tienden a extrapolar a modelos humanos, sin tomar en cuenta que pueden existir diferencias morfométricas en los componentes celulares de las distintas especies, lo cual se reflejará en la respuesta que se presente ante materiales porosos y no porosos, y aún puede influir la relación del tamaño y componente celular, y el tamaño y forma de partícula del material.

La elaboración de pruebas de materiales que serán sustitutos de tejidos mineralizados, se ha desarrollado en modelos en los cuales no existe una evidencia de similitudes o diferencias entre las distintas especies empleadas, a esto debe agregarse que las características propias del material juegan un papel importante en la respuesta expresada en las pruebas *in vivo*. Para comprender mejor la diversidad de los mecanismos y de la respuesta biológica presente en las pruebas de biocompatibilidad, es necesario llevar a cabo la caracterización de los materiales para conocer las similitudes y las diferencias que puedan existir entre los distintos modelos, esto permitiría hacer una discriminación entre la eficacia y la utilidad de los diferentes modelos cuando se pretenda valorar materiales con características específicas.

HIPÓTESIS:

H1: Existen diferencias ultraestructurales y de composición química en el tejido óseo de distintas especies animales empleadas como modelos in vivo de prueba de biocompatibilidad de materiales.

H0: No existen diferencias ultraestructurales y de composición química en el tejido óseo de distintas especies animales empleadas como modelos in vivo de prueba de biocompatibilidad de materiales.

OBJETIVO GENERAL: Determinar las características ultraestructurales de distintos modelos animales (cobayo, conejo, rata, perro, humano) empleados para evaluar la respuesta de tejido óseo ante materiales de relleno y reconstrucción de tejido duro.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

1. - Conocer las características de la superficie y textura del tejido óseo en el fémur de las especies seleccionadas (MEB)
2. - Establecer las similitudes y diferencias de estructura de los componentes esponjoso y compacto del tejido óseo de las distintas especies animales (MEB).
3. - Analizar la composición química del mineral constituyente del tejido óseo de las distintas especies. (MRx)
4. - Determinar la existencia de las fases minerales presentes en el tejido óseo de las distintas especies (DRx).
5. - Conocer el contenido de CaCO_3 y de HA en la composición del hueso de las distintas especies (FT-IR).

MATERIAL Y MÉTODO.

Universo de Trabajo: En este estudio se utilizaron las muestras obtenidas de animales sanos, que no tenían antecedentes de enfermedades crónicas ni adquiridas del tejido conectivo, y que su sacrificio haya sido determinado con fines experimentales o que hayan sufrido algún traumatismo que les cause la muerte, pero sin involucrar el fémur derecho o izquierdo.

Muestra: Se utilizaron tres especímenes de cada modelo animal, haciendo un total de 15 muestras. Por consideraciones éticas, los especímenes humanos se obtuvieron de un anfiteatro (Facultad de Medicina UNAM) que contaba con material disponible, teniendo cuidado de obtener información referente a las características propias del espécimen.

Identificación y definición de variables: En este estudio se consideró como variable independiente al tejido óseo de modelos animales. Esta variable es de tipo nominal y con fines de operatividad se le consideró como aquel tejido obtenido del fémur de rata, cobayo, conejo, perro y humano.

La variable dependiente fue considerada como las características ultraestructurales y de composición química, esta es una variable de tipo cuantitativo que debido a las diferentes etapas y pruebas tendrá valores y significados diferentes. Con fines de operatividad, a continuación se describe cada una de las variables.

Textura: Es la característica de superficie que se determina por la continuidad de la misma, observándose la existencia de porosidad.

Composición Química: Es la constitución mineral expresada por la existencia de elementos químicos, esta se determinará por el microanálisis de Rx.

Grupos funcionales.- Es la organización de los elementos expresada por los enlaces químicos identificados por las intensidades de absorbancia en el espectro infrarrojo en el rango de 400 a 4000 cm^{-1} .

Preparación de las muestras:

Todos los especímenes fueron almacenados en solución de formaldehído al 10%, después se cortaron con un disco de diamante y refrigeración con agua desionizada, el sentido del corte fue longitudinal y trasversal para obtener las observaciones según la cara que deseaba analizarse. La orientación de los cortes se encuentran esquematizados en la figura 1.

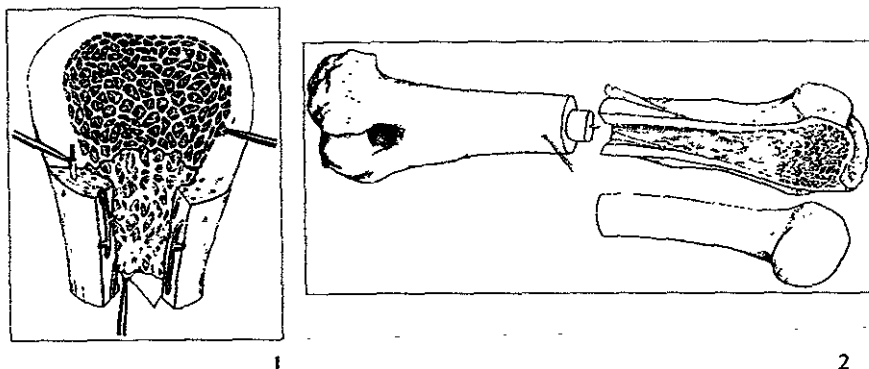


Fig.1. Corte de hueso observado en sentido transversal (1) y longitudinal (2). (Barks WJ, 1986)

En la realización de este trabajo se tomaron en cuenta las distintas técnicas instrumentales (Willard H, *et.al*, 1991). A continuación se describe cual es la característica estudiada y el medio empleado.

Textura: Para el estudio de esta característica se empleó un microscopio electrónico de barrido (MEB) marca JEOL-5200. Los materiales en su forma original se colocaron en portamuestras y adheridos mediante cinta recubierta de carbón, después se llevaron a evaporar y fueron recubiertos de oro para ser observados posteriormente en un microscopio electrónico de barrido, los datos que se obtuvieron son: tamaño y forma de los poros.

Porosidad: Los materiales en su forma granular original se colocaron en el recipiente portamuestras del MEB se tomaron fotografías en aumentos variables, y posteriormente se calculó la distribución, densidad y tamaño de los macroporos, tomando como medida individual la escala de cada fotografía.

Presencia de grupos funcionales CO_3 y PO_4 .- Los materiales se trituraron mediante un molino de bolas y luego en un mortero de ágata. Después 1 mg de este material se mezcló con 300 mg de KBr y en un pastillador se sometieron a una presión de 10 a 12 mil kg/cm². Las pastillas que se obtuvieron se corrieron en un espectroscopio infrarrojo de Transformada de Fourier, observando las bandas de absorción con modo de absorbancia en 605 cm⁻¹ que corresponden a las bandas del PO_4 , y al de 1410 cm⁻¹ que corresponde a la del CO_3 .

Composición elemental.- Esta determinación se llevó a cabo mediante el microanálisis de rayos-X, el cual esta incorporado en el microscopio electrónico de transmisión, donde se hizo el análisis mediante el EDAX.

Determinación de fases.- Esta se llevó a cabo mediante la observación por técnica de polvos en un difractómetro. De la muestra triturada se tomó una cantidad suficiente para ser colocada en el portamuestras, y se hizo un barrido de 0° a 70° del 2θ para observar la los picos de difracción en los $hkl_{(100)}$ correspondientes a la hidroxiapatita y al carbonato de calcio.

MATERIAL:

Recursos Materiales: Portamuestras para MEB, mortero de ágata, espátulas de acero inoxidable no magnéticas, portamuestras para difracción de polvos, cajas de petri, frascos de 100 ml. y 500 ml. con boca ancha.

Recursos químicos: Bromuro de potasio (KBr) grado infrarrojo, acetona, hipoclorito de sodio al 15%, pintura de plata.

Equipo: Espectroscopio Infrarrojo Nicolet, Microscopio Electrónico de Barrido JEOL.5200, Difractómetro Siemens D-5000, Microscopio Electrónico de Transmisión, Computadora personal e impresora.

Biológicos: Tejido óseo de animales que cumplan con los criterios de participación ya establecidos y obtenido en condiciones donde se conozca su procedencia.

Infraestructura: Para el desarrollo de este proyecto se contó con el Laboratorio de Biomateriales de la División de Estudios de Posgrado e Investigación, de la Facultad de Odontología, y de los Laboratorio de Microscopía Electrónica, Materia Condensada y Física Aplicada y Tecnología Avanzada, todos ellos del Instituto de Física de la UNAM.

TÉCNICAS DE CARACTERIZACIÓN.

Microscopio electrónico de barrido (MEB): El microscopio electrónico de barrido, 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 microscópica y submicroscópica (Goldstein, J.L., 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. Los tipos de señales producidos cuando el haz de electrones se encuentra con la superficie 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 muestras y pueden ser utilizados para examinar muchas características de las mismas. (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 del 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:

Los especímenes se prepararon en forma granular y otros en fragmentos grandes obtenidos por la fractura de los huesos, una vez determinados los tamaños de los especímenes que se observaron, se lavaron y desengrasaron con un solvente contenido en un limpiador ultrasónico, en nuestro método el solvente utilizado fue la acetona de 99.5% de pureza, aunque también podría haberse utilizado el alcohol o el tuleno por poseer las mismas características. 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 le sumergió en hipoclorito de sodio.

Se cubrió la superficie de la muestra con una película delgada de oro, mediante la técnica de evaporación al alto vacío. Las muestras se observaron en el microscopio electrónico de barrido (JEOL, JSM-5200) del Departamento de Física Experimental del IFUNAM.

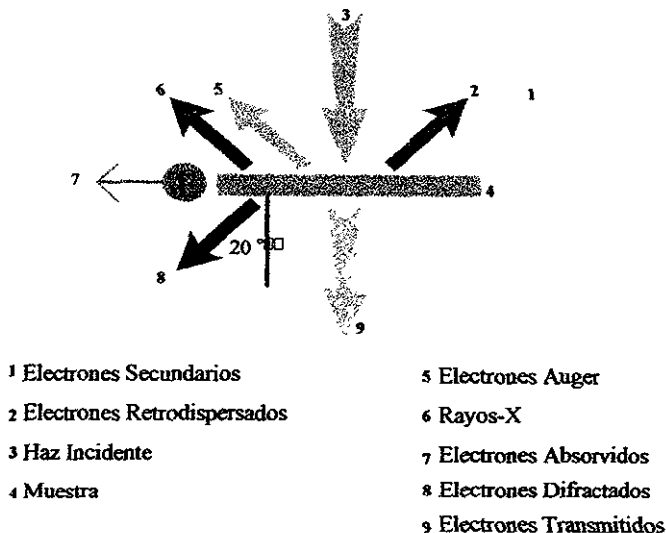


Fig. 2. Esquema de las señales formadas en el microscopio electrónico de Barrido cuando el haz de electrones incide en la superficie de la muestra.

Microanálisis de Rx (MRx): Este aparato utiliza un detector de rayos-X de estado sólido en un microanalizador de haz de electrones. Está 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 fácilmente obtenibles son aquellos de los elementos puros.

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 foton de rayos-X.

Preparación de las muestras:

Se prepararon especímenes de rata, cobayo, conejo, perro y humano para ser llevados a un microanalizador contenido en un microscopio electrónico de Transmisión (TEM, JEOL-100CX) con aditamento EDS (Energy-Dispersive Spectrometer) Kever, del Laboratorio de Microscopía Electrónica del IFUNAM, se obtuvieron las graficas en las cuales se cotejaron los resultados con los datos del *software* de la microsonda.

Análisis de difracción de Rayos-X (DRx): Los análisis de rayos X, se considera como un procedimiento espectroscópico, porque en términos generales, fundamentan su estudio en la correlación de la composición elemental como las variaciones de la 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 (Davison, 1980):

$$2d_{hkl}\sin\theta = n\lambda$$

Esta ecuación 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. 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 mayor orden. La d_{hkl} más pequeña que se puede detectar se puede inferir a partir de la densidad de $n \leq 2d_{hkl} / \lambda$ haciendo $n=1$; obteniendo una mínima del orden de $\lambda/2$

Preparación de las muestras:

El análisis del material por medio de los rayos X se realizó en muestras preparadas en forma de polvo, las muestras se molieron en un mortero y se trituraron con un pistilo de ágata hasta lograr polvo fino. Los polvos así preparados se colocaron en un portamuestras de vidrio.

Para el análisis de las muestras en este estudio se empleó un Difractómetro Siemens D 5000 con ánodo de cobre del Departamento de Estado Sólido del IFUNAM.

Espectroscopía infrarroja (FT-IR): 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 más alta debido a la absorción de la radiación (Parker, FS., 1983). Las posiciones de las bandas, 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 (LeGeros R.Z., 1991).

Todos los espectrómetros de IR tienen una fuente de radiación infrarroja, la que es comúnmente utilizada para algunos materiales sólidos calentados a la incandescencia por una corriente eléctrica (Colthup N.B., Daly L.H & Wilberley, 1990).

Preparación de las muestras:

Para el análisis de espectroscopia infrarroja, se utilizó el FT-IR del laboratorio de Caracterización Óptica del departamento de Física Aplicada y Tecnología Avanzada del INFUNAM. Las muestras fueron trituradas y molidas con un mortero de ágata para obtener moliendas muy finas de los huesos. Las muestras fueron suspendidas en bromuro de potasio (KBr) para ser llevadas al aparato y ser analizadas con técnica de reflectancia difusa.

RESULTADOS.

En esta investigación se analizaron 15 especímenes, 3 de cada modelo animal. En todos los casos el análisis por las distintas técnicas instrumentales fué realizada cada muestra, es decir no se hizo la mezcla entre los distintos especímenes.

- Los modelos animales utilizados fueron el fémur de la rata, el cobayo, el conejo, el perro y el humano. La selección y obtención de cada uno de los especímenes implicó dificultades debido a que deberían tomarse en cuenta las consideraciones éticas y biológicas para obtenerlos, de esta manera, los especímenes de rata, cobayo, conejo y perro no fué difícil obtenerlo de bioterios que aseguraban la calidad de la muestra. En el caso del hueso humano, éste fué obtenido del anfiteatro de la Facultad de Medicina de la UNAM.

Microscopia de Barrido (MEB):

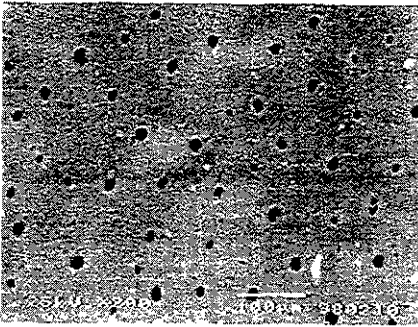
➤ RATA

En su parte interna, el tejido óseo de la rata presenta una textura lisa a bajos aumentos (X200). El tejido es compacto tomando en cuenta que el fémur de este espécimen es el más pequeño de todos los estudiados. En la fotomicrografía 1a. se observa que los poros están muy delimitados (circulares) y en abundancia, la densidad en estas muestras fué de 52 poros/mm², (tabla 1), esto fué constante en estas muestras. La distribución es uniforme y la distancia entre los poros se encuentra en un rango de 50 a 190µm, interpretándose la primera como la distancia mínima y la segunda como la máxima entre la separación entre los poros. El diámetro de los poros es variable (foto 1b), ya que observan poros pequeños de 8µm de diámetro, unos medianos de 10µm y unos más grandes de 15µm. En todas las muestras observadas la forma está bien definida.

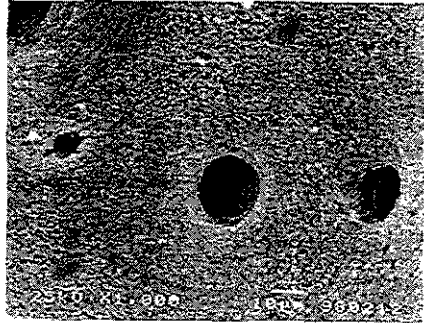
En la parte externa se aprecia una variabilidad en el tamaño y forma de los poros (foto 1c) la densidad de la misma fué determinada en 56 poros/mm², y la distribución no se observa dentro de un patrón, es más, la distancia entre los poros, se encuentra en un rango desde 25µm hasta 250µm (tabla 2). El tamaño de los poros varió al igual que en la parte interna, observándose en

este caso diámetro de hasta $5\mu\text{m}$ de los más pequeños; los medianos de $15\mu\text{m}$ y los más grandes de $40\mu\text{m}$.

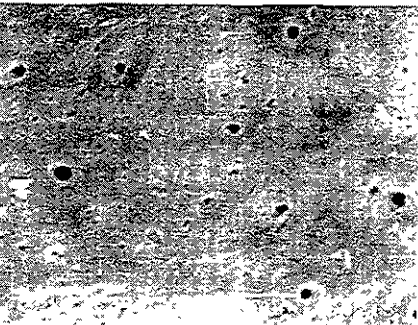
El análisis de la superficie porosa reveló una apariencia irregular (foto 1d) característica del hueso medular; en la distancia de los poros no se determina mientras que el diámetro variaba desde unos muy pequeños de menos de $10\mu\text{m}$ hasta unos muy grandes de más de $100\mu\text{m}$. Los poros pequeños se encontraban sobre las paredes del hueso.



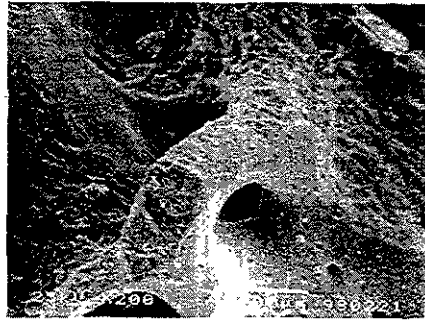
1a



1b



1c



1d

I. Fotomicrografía del tejido óseo de rata visto en microscopio electrónico de barrido (JEOL-5200) en diferentes aumentos y zonas.

1a. Parte interna del fémur de rata visto a un aumento de X200 donde se observa poros circulares bien delimitados.

1b. Parte interna vista a un aumento de X1000 donde se observa sus poros pequeños y variables con forma delimitada.

1c. Parte externa vista un aumento de X200 donde se observa variabilidad en el tamaño de sus poros.

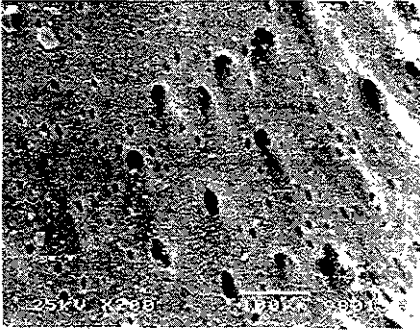
1d. Parte porosa vista a un aumento de X200 donde se observa con apariencia irregular y de diametro variable.

► COBAYO

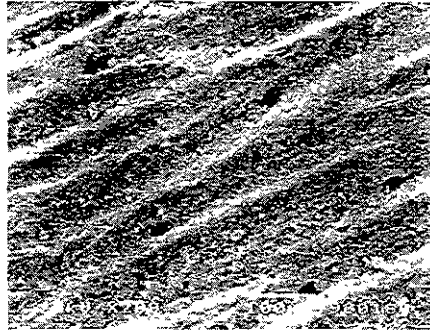
En su parte interna presentó una textura menos lisa, se observa entre esponjoso y compacto el material óseo. A bajo aumento el tamaño del hueso es un poco más grande comparado con el de la rata, sus conductos están delimitados y el hueso se observa distinto al descrito con anterioridad. En la fotomicrografía (foto 2a) sus poros presentan una forma muy irregular, y son ovalados, la densidad que presentó en esta muestra fué de 120 poros/mm². En su superficie se observa muy irregular. La distancia de los poros se encuentra entre un rango de 50 a 90µm. El diámetro de los poros varía ya que observamos que los más pequeños miden 10µm y los más grandes 25µm, en estos poros no se aprecia una forma muy bien definida.

En la parte externa se observa una superficie rugosa y el hueso se ve menos compacto que el de la rata y más esponjoso que el de conejo, el cual se describirá posteriormente. La densidad de la muestra es de 32 poros/mm² (foto 2b). Sus poros son menos delimitados y no se observa una circunferencia muy notable. La distancia de los poros presenta un rango entre 220 a 350µm. Su tamaño de poro tiene una medición de 30µm de diámetro los más grandes, y de 10µm los más pequeños. En su forma son muy irregulares, y ovalados con superficie irregular.

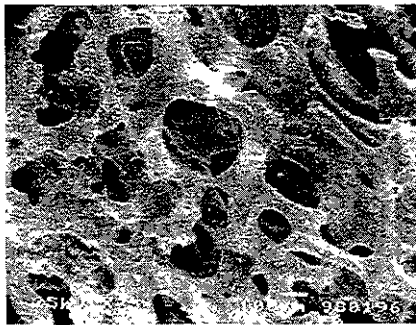
En su parte porosa, el hueso es muy esponjoso, el tamaño del poro varía, ya que presenta distintos tamaños de longitud midiendo los más grandes de 300µm (foto 2c), los poros medianos miden 150µm, y los poros más pequeños que miden 30µm. Se observa que los poros son muy delimitados, tienen una forma circular que en comparación con el hueso de rata cambia en la delimitación de los conductos y el tamaño; presenta una superficie muy irregular al igual que en su parte externa, y la distancia entre los poros se encuentra entre 250µm.



2a



2b



2c

2. Fotomicrografía del tejido óseo de cobayo visto en microscopio electrónico de barrido (JEOL -5200) en diferentes aumentos y zonas.

2a. Parte interna del fémur de cobayo visto a un aumento de X200 donde se observa con poros de forma irregular y ovalados.

2b. Parte externa vista a un aumento de X200 donde se observa una superficie rugosa y poros bien delimitados.

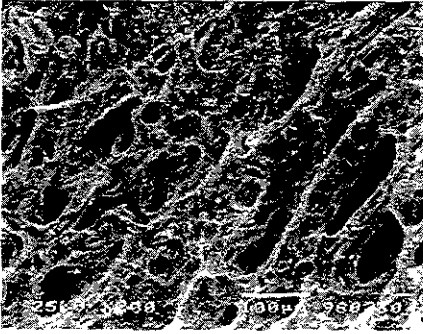
2c. Parte porosa vista un aumento de X75 donde se observa hueso muy esponjoso y variación del tamaño del poro.

➤ CONEJO.

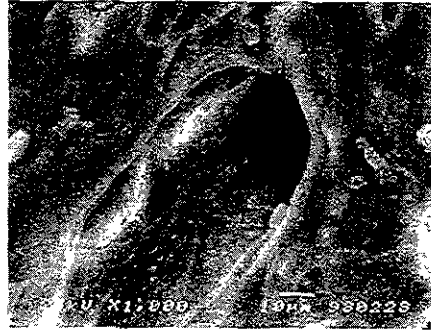
La parte interna de este espécimen presenta una superficie irregular y rugosa (foto 3a) en comparación de los huesos de rata y cobayo, y en su tamaño es más grande que los anteriores. Tiene una densidad de 80 poros/mm² observándose tres diferentes tamaños de poros. La distancia entre los poros se encuentra en un rango de 80 a 100µm. Los más grandes midieron 50µm, los poros medianos tuvieron una medición de 25µm, y los poros más pequeños presentaron un diámetro de 12µm con una forma irregular. En cuanto al tejido óseo es muy esponjoso, sus poros no presentan una delimitación, ya que como describimos anteriormente el hueso es demasiado esponjoso.

En la parte externa, se observa un tejido óseo muy compacto, se le ve poco trabeculado óseo y sus conductos son más difusos en comparación de las muestras anteriores (foto 3c). En los poros se observa una densidad de 72 poros/mm². La distancia entre los poros se encuentra en un rango de 50 a 100µm con una longitud de 40µm de diámetro en sus poros más grandes, y de 3µm de diámetro en sus poros más pequeños, en algunas zonas la superficie se ve mas lisa (foto 3b).

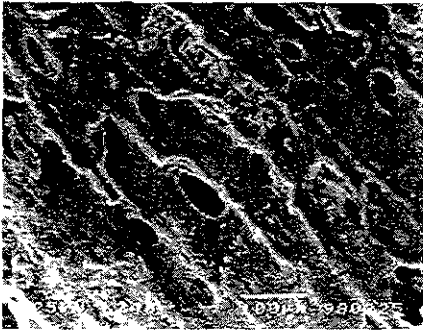
En su parte porosa es muy semejante al hueso del cobayo, sin deferencias muy notables en cuanto a sus poros y tamaño de los mismos (foto 3d). Presenta una distancia entre los poros de 50 a 100µm aproximadamente.



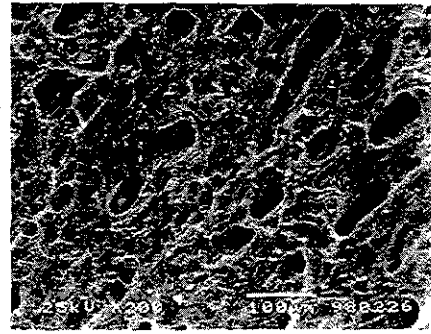
3a



3b



3c



3d

3. Fotomicrografía del tejido óseo de conejo visto en microscopio electrónico de barrido (JEOL-5200) en diferentes aumentos y zonas

3a. Parte interna del fémur de conejo visto a un aumento de X200 observándose los tres tamaños diferentes de poros.

3b. Parte externa vista a un aumento de X1000 observándose con algunas zonas de superficie lisa.

3c. Parte externa vista a un aumento de X200 donde se observa conductos muy difusos.

3d. Parte porosa vista a un aumento de X200 donde se observa una semejanza al hueso de cobayo.

➤ PERRO.

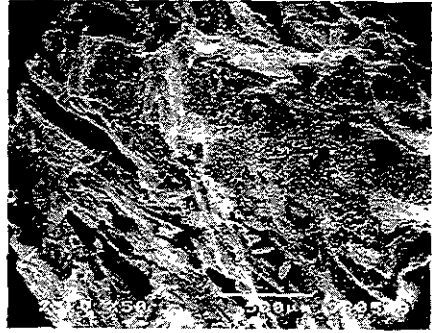
La parte interna de este espécimen presenta mucha semejanza al hueso de humano debido a que tienen la misma textura y forma del tejido óseo. Su superficie es más esponjosa en comparación con los otros especímenes, presenta muchas trabéculas al igual que el hueso de humano, y aunque tiene poros menos simétricos, presenta una densidad de 72 poros/mm² (foto 4a), y una distancia de los poros de 80µm con un tamaño de 100µm de diámetro en los poros más grandes, de 25µm de diámetro en los poros medianos y de 10µm en los poros más pequeños (foto 4b).

En la parte externa se observa bastante trabeculado óseo, con algunas zonas de hueso compacto en la mayor parte de la muestra y pocas zonas de esponjoso. Sus poros se ven menos delimitados que en el de humano; presenta una densidad de 30 poros/mm² con una distancia de los poros en un rango de 30 a 60µm; se observan dos tamaños de poros en donde los más grandes tienen una medición de 150µm de diámetro y comparándolos con los más pequeños se observa una diferencia muy notable ya que los pequeños tienen una medición de 40µm de diámetro (foto 4c).

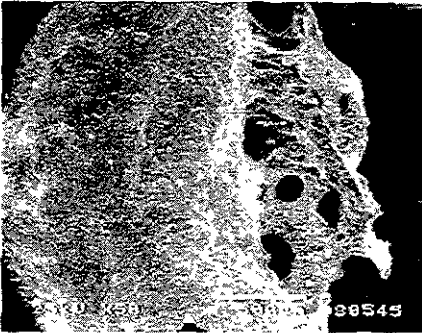
En la parte porosa presenta semejanza al hueso de humano, ya que tiene una apariencia esponjosa y los poros no son simétricos, en esta parte es muy diferente al de los demás especímenes. La distancia de los poros se encuentra entre 15 y 40µm, el tamaño del poro es muy variable ya que presenta poros grandes y ovalados con un diámetro menor de 250µm y diámetro mayor de 500µm, en los poros medianos miden 150µm de diámetro o mayor de 200µm, en los poros pequeños miden 70µm de diámetro (foto 4d) y son más difusos comparado con el humano.



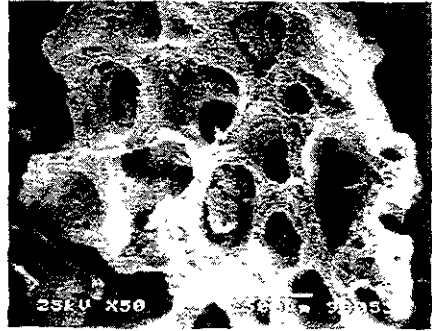
4a



4b



4c



4d

4. Fotomicrografía del tejido óseo de perro visto en microscopio electrónico de barrido (JEOL-5200) en diferentes aumentos y zonas

4a. Parte interna del fémur de perro visto a un aumento de X200 donde se observa una superficie esponjosa y poros asimétricos.

4b. Parte interna vista a un aumento de X50 donde se observa poros más pequeños.

4c. Parte externa vista a un aumento de X50 donde se observa algunas zonas de hueso compacto y detrás hueso esponjoso.

4d. Parte porosa vista a un aumento de X50 donde se observa tamaño del poro variable.

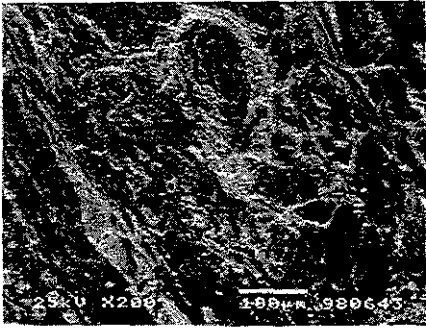
➤ HUMANO.

En la parte interna como se mencionó en la descripción anterior, el hueso del humano tiene semejanza con el del perro, de acuerdo a su textura y forma. Presenta una superficie muy plana. En cuanto a sus poros guarda cierta similitud al del perro, sólo que en este espécimen son más simétricos y presentan mayor delimitación, tienen una densidad de 96 poros/mm². (foto 5a). La distancia de los poros se encuentra en un rango de 20 a 30µm, presenta distintos tamaños de poros en donde los poros chicos miden 10µm de diámetro, y los poros grandes tienen una diferencia muy notable de diámetro en la que mide hasta 100µm de diámetro. Su superficie es muy irregular como se presenta en la foto 5b.

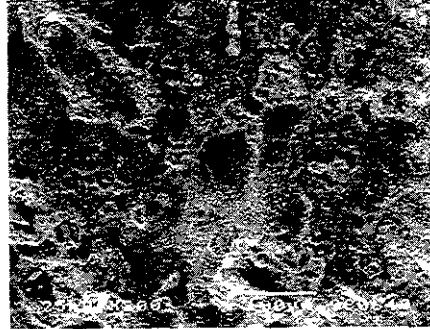
En la parte externa el hueso presenta una densidad de 108 poros/mm² (foto 5c), presenta diámetros variables mayor de 200µm y menor de 50µm en sus poros más grandes, mientras que en sus poros más pequeños miden 10µm de diámetro. La distancia de los poros es de 100µm. El hueso es muy compacto con mucho trabeculado óseo, se observa una superficie muy lisa y forma irregular.

En la parte porosa al igual que la muestra anterior (perro), presenta una apariencia muy esponjosa y los poros son mucho más amplios y definidos (que en cualquiera de las otras especies analizadas) y sus delimitaciones son más notables, presentan un diámetro de 500µm, con una forma irregular, llegando a medir inclusive cerca de 1mm, la pared de los conductos es compacta, y la distancia entre los poros llega a ser de 30 a 120µm.

En la tabla 1 se encuentran concentrados los datos relativos a la densidad de los poros en cada especie animal, encontrándose su distribución tanto en la parte interna como en la externa de cada una de las especies. La tabla 2 contiene los datos relativos al tamaño del poro, se encuentran descritos en base a los parámetros de: poros chicos, medianos y grandes. En la tabla 3 se observan los datos relacionados a la distancia entre los poros. Es importante mencionar que estos parámetros son arbitrarios, ya que desde el punto de



5a



5b



5c



5d

5. Fotomicrografía del tejido óseo de humano visto en microscopio electrónico de barrido (JEOL-5200) en diferentes aumentos y zonas

5a. Parte interna del fémur de humano visto a un aumento de X200 observándose poros simétricos y delimitación de distintos tamaños.

5b. Parte externa vista a un aumento de X200 donde se observa una superficie irregular.

5c. Parte externa compacta vista a un aumento de X200, donde se observa hueso muy compacto, de superficie lisa e irregular.

5d. Parte porosa vista a un aumento de X50 donde se observa poros amplios y definidos.

Modelo Animal	Densidad (n/mm ²)	
	Parte interna	Parte externa
Rata	52	56
Cobayo	120	32
Conejo	80	72
Perro	72	30
Humano	96	108

Tabla 1. Distribucion de la densidad de los poros en los distintos modelos animales.

Modelo Animal	Tamaño del Poro (µm)		
	Chico	Mediano	Grande
Rata	I-8	I-10	15
	E-5	15	40
	P-10	n.d	100
Cobayo	I-10	n.d	25
	E-10	n.d	30
	P-30	150	300
Conejo	I-12	25	50
	E-3	n.d	40
	P- n.d	n.d	n.d
Perro	I-10	25	100
	E-40	n.d	150
	P-70	150	200
Humano	I-10	n.d	100
	E-10	50	200
	P- n.d	n.d	n.d

Tabla 2. Tamaño de los poros de distintos modelos de animales.

I : Parte Interna

E : Parte Externa

P : Parte Porosa

n.d : no determinada

Modelo Animal	Distancia de los Poros (µm)		
	P.interna	P.Externa	P.Porosa
Rata	50-190	25-250	nd
Cobayo	50-90	220-350	250
Conejo	80-100	50-100	50-120
Perro	80	30-60	15-40
Humano	20-30	100	30-120

Tabla 3. Distancia de los poros de distintos modelos animales

Difracción:

El análisis de estos especímenes, se llevó a cabo en corridas de 0 a 70°. En cada uno de ellos se determinó la relación de cuentas por segundo (cps) y la distancia con respecto al ángulo 2θ , independientemente de los resultados que se obtuvieron, éstos fueron comparados con los parámetros establecidos para la hidroxiapatita (JCPDS 9-0432), revisándose el *hkl* y el ángulo 2θ y las cuatro principales intensidades características, es decir 100 (31.774), 60 (32.197), 60 (32.902), 40 (25.879) y 30 (46.713) así como también la correspondiente al 10CaCO_3 (JCPDS 5-586), 6CaCO_3 (JCPDS 41-1475), $\text{CaCO}_3\text{-Mg}$ (JCPDS 43-697) y el $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_6\text{OH}$ (JCPDS 9-77).

Los difractogramas obtenidos en un difractor Siemens D5000 con ánodo de Cu y λ de 1.54056, mostraron poca diferencia entre las distintas especies, encontrando las intensidades características para la hidroxiapatita según el JCPDS de referencia. En el caso del espécimen de rata, la ligera desviación de las distancias no representa una desviación arriba de una décima con respecto a la referencia (figura 3).

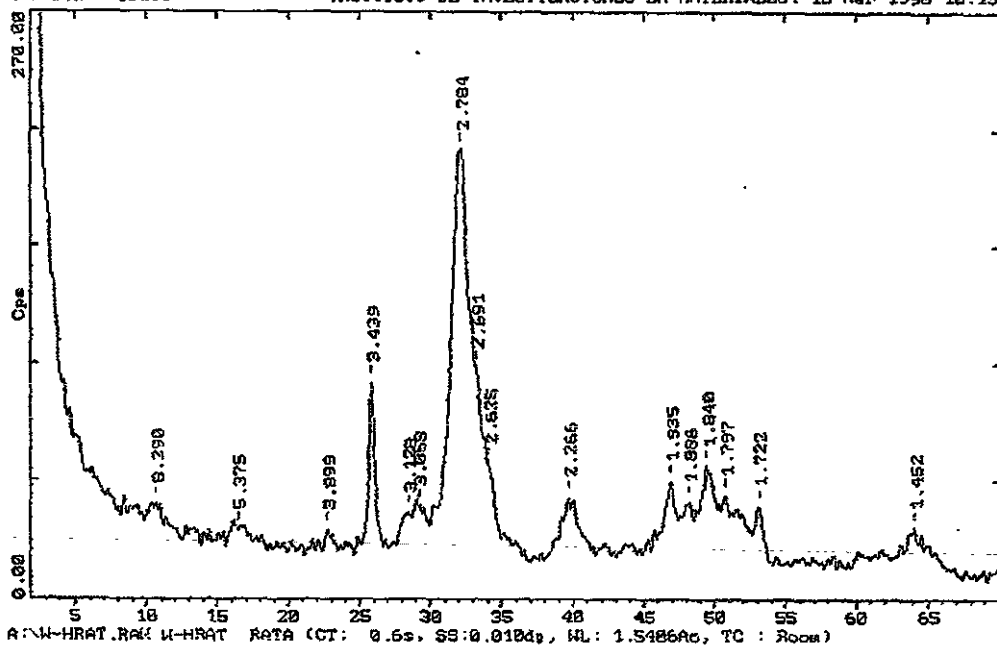
Tanto en el cobayo (figura 4) como el conejo, los difractogramas obtenidos muestran los picos característicos de la hidroxiapatita, aunque también hay una variación de menos de una décima con respecto a los valores de referencia.

En los especímenes de conejo así como en el de la rata no se observa la presencia de intensidades diferentes a la hidroxiapatita (figura 5), aunque la intensidad de los principales picos en estos especímenes no es tan manifiesta, lo que puede ser debido a una diferencia a la cristalinidad como en el caso del conejo y la rata (figura 6).

Los difractogramas del perro muestran que la composición es hidroxiapatita sin la presencia de alguna otra fase cristalina. En la figura 7 correspondiente, se muestran las distancias con respecto a 2θ en las que hay una correspondencia idéntica con los picos de referencia.

2-Theta - Scale

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES EN MATERIALES. 18-Mar-1998 10:15



2-Theta - Scale

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES EN MATERIALES. 18-Mar-1998 10:18

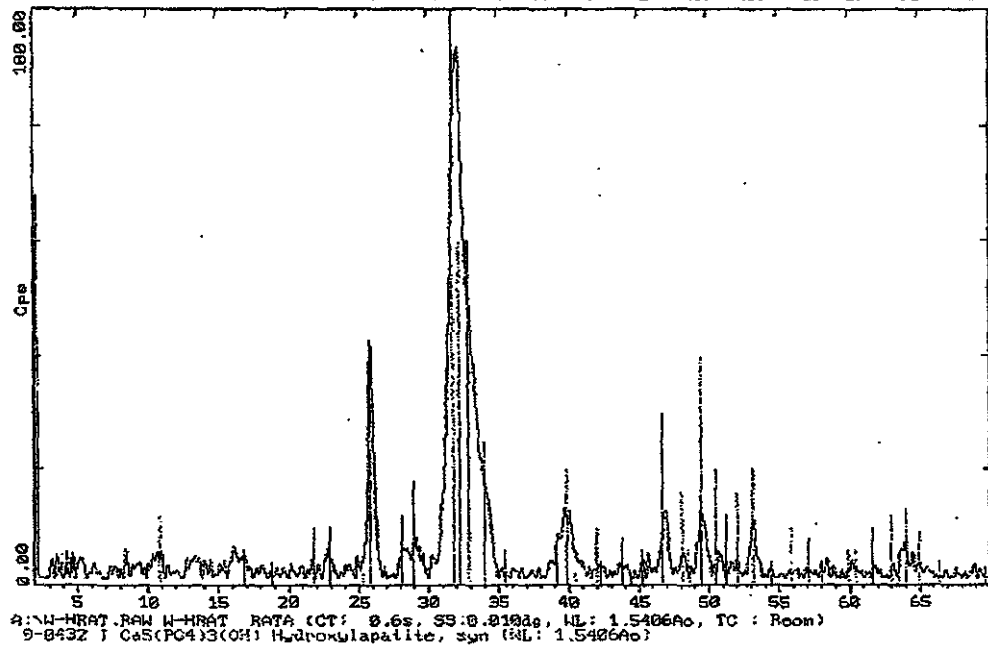
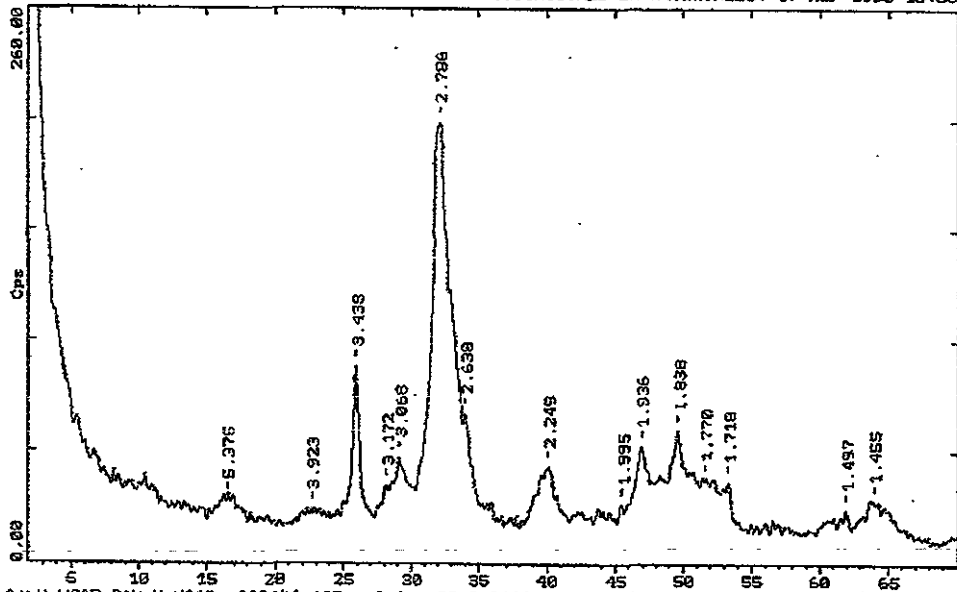


Fig.3. Difractograma de hueso de rata observandose las intensidades características de la hidroxiapatita.

2-Theta - Scale

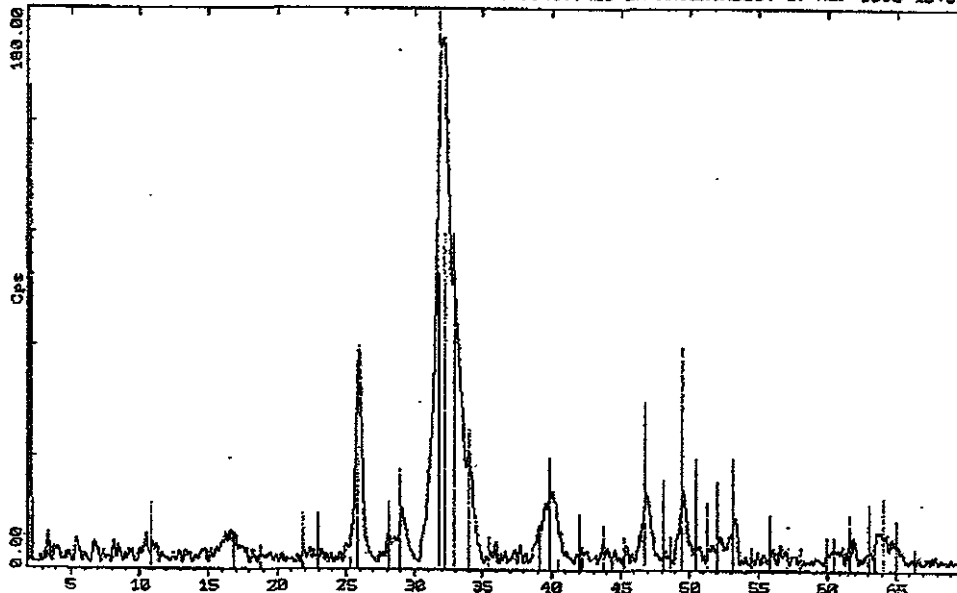
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES EN MATERIALES. 17-Mar-1998 13:36



A: N-HCOB.RAW N-HCOB COBAYO (CT: 0.6s, SS:0.010d, WL: 1.5406Ao, TC: Room)

2-Theta - Scale

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES EN MATERIALES. 17-Mar-1998 13:39



A: N-HCOB.RAW N-HCOB COBAYO (CT: 0.6s, SS:0.010d, WL: 1.5406Ao, TC: Room)
5-3422 | Ca5(PO4)3(OH) Hydroxylapatite, syn (WL: 1.5426Ao)

Fig. 4. Difractograma de hueso de cobayo observandose las intensidades caracteristicas de la hidroxiapatita.

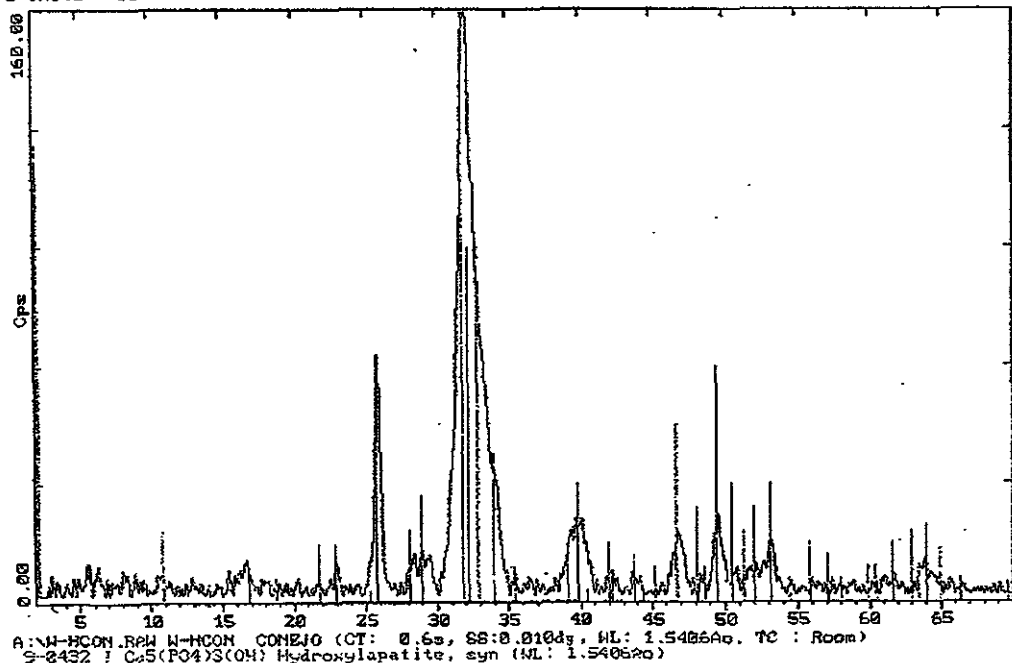
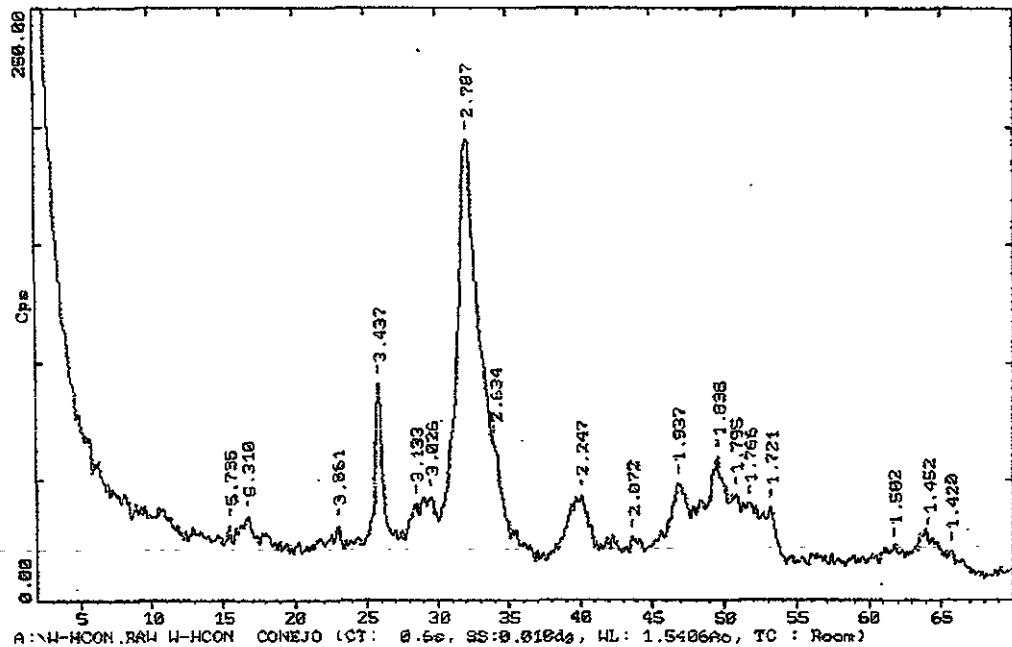


Fig. 5. Difractograma de hueso de conejo observandose las intensidades características de la hidroxiapatita.

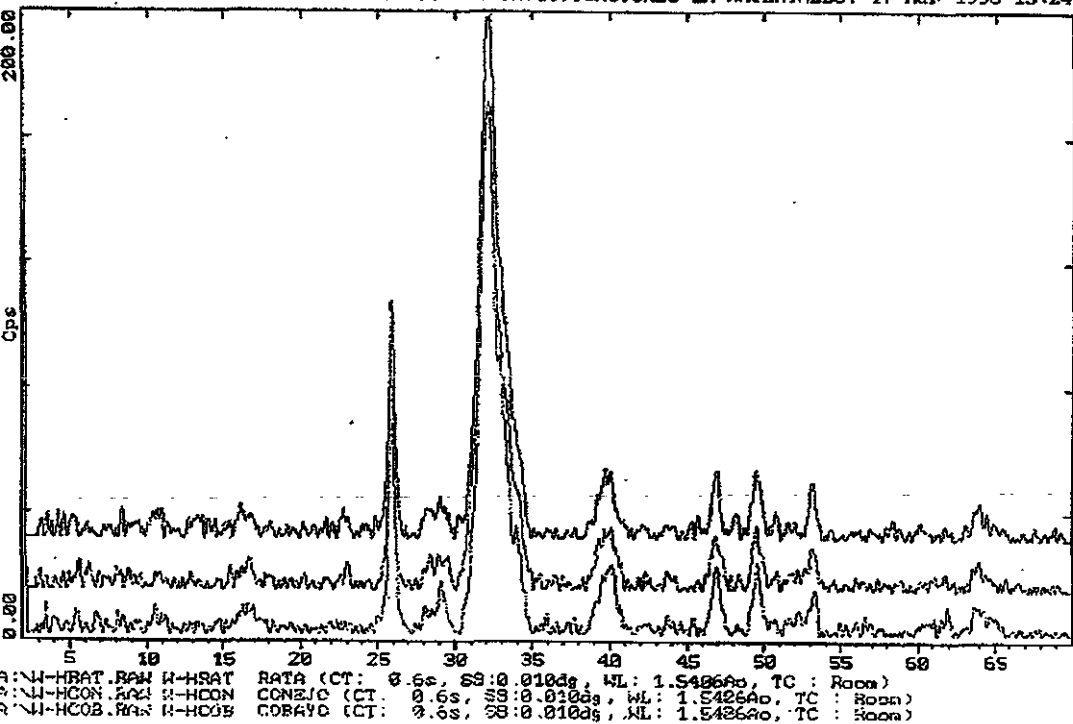


Fig. 6. Difractograma que muestra las intensidades de la composición del hueso de rata, cobayo y conejo, notese la similitud de la composición.

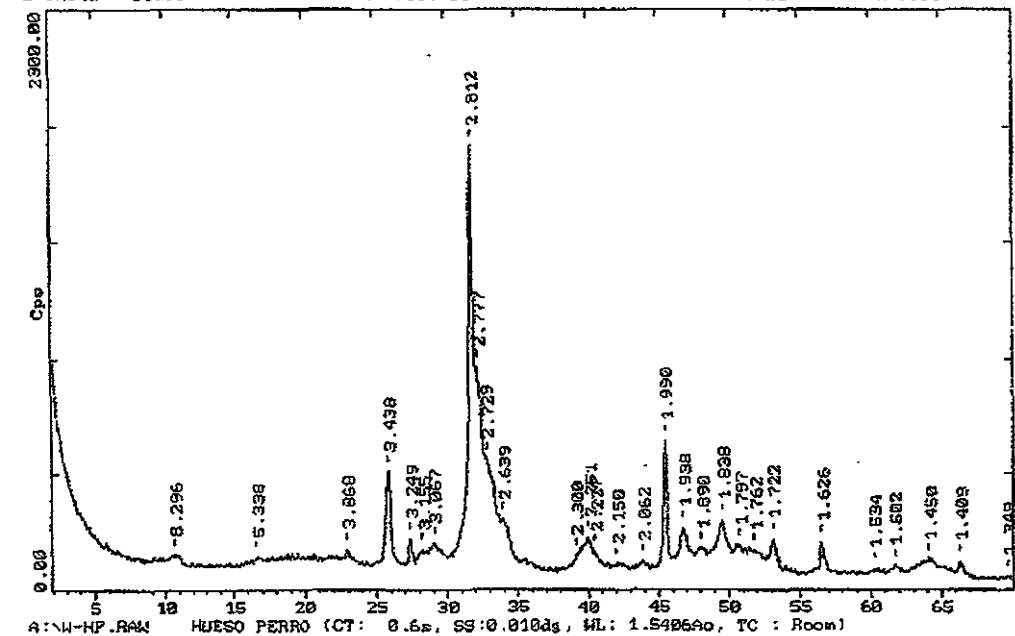
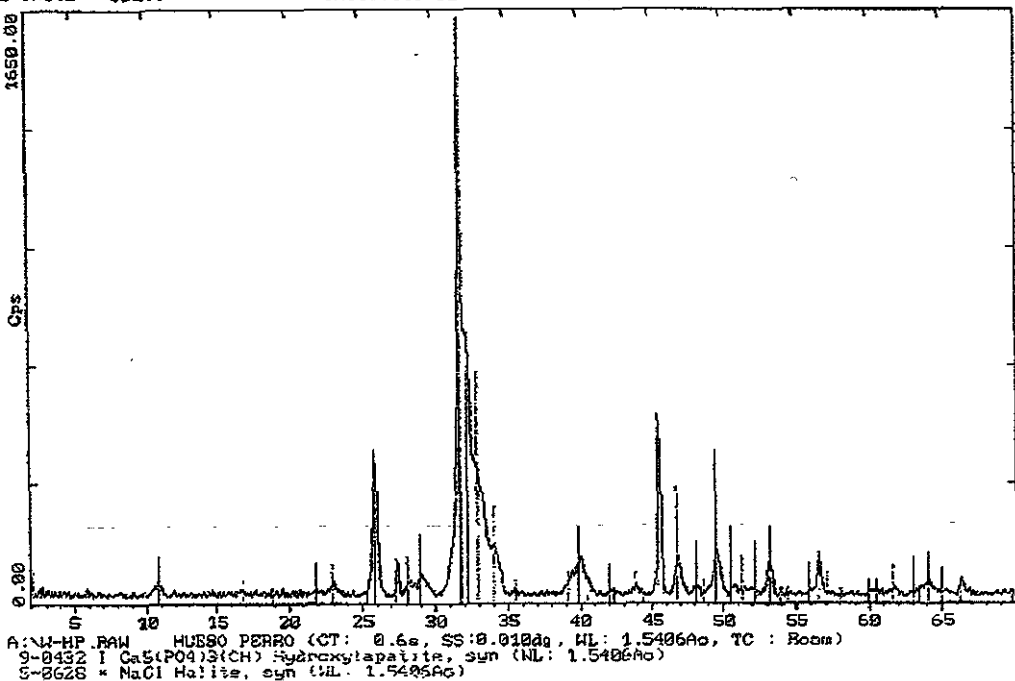


Fig.7. Difractograma de hueso de perro observando las intensidades características de la hidroxiapatita.

El hueso humano fué el espécimen en el cual se obtuvieron los picos más representativos y marcados que en las otras especies, en la figura 6 se aprecia gran cristalinidad del material y la composición única correspondiente a la hidroxiapatita.

Infrarrojo:

Los espectros obtenidos en el espectrómetro de FT-IR muestran la presencia de grupos funcionales correspondientes al (PO_4) , CO_3 y OH^- . El corrido de las muestras se hizo en un rango de 400cm^{-1} a 4000cm^{-1} y en todos los casos se observaron la presencia de bandas de absorción características para dichos grupos funcionales. Los espectros no variaron de una a otra especie, sin embargo lo más notable entre los espectros fué la diferencia entre la intensidad cuando se observaba en transmitancia.

En la figura 9 se encuentra representada la comparación entre la muestra de rata, cobayo y conejo, en ella se puede apreciar la gran similitud entre estas especies.

Los espectros obtenidos para las muestras de hueso de perro y humano muestran un espectro similar a los especímenes, siendo notable la expresión de las bandas correspondientes al CO_3 y al PO_4 .(Figura 10 y 11)

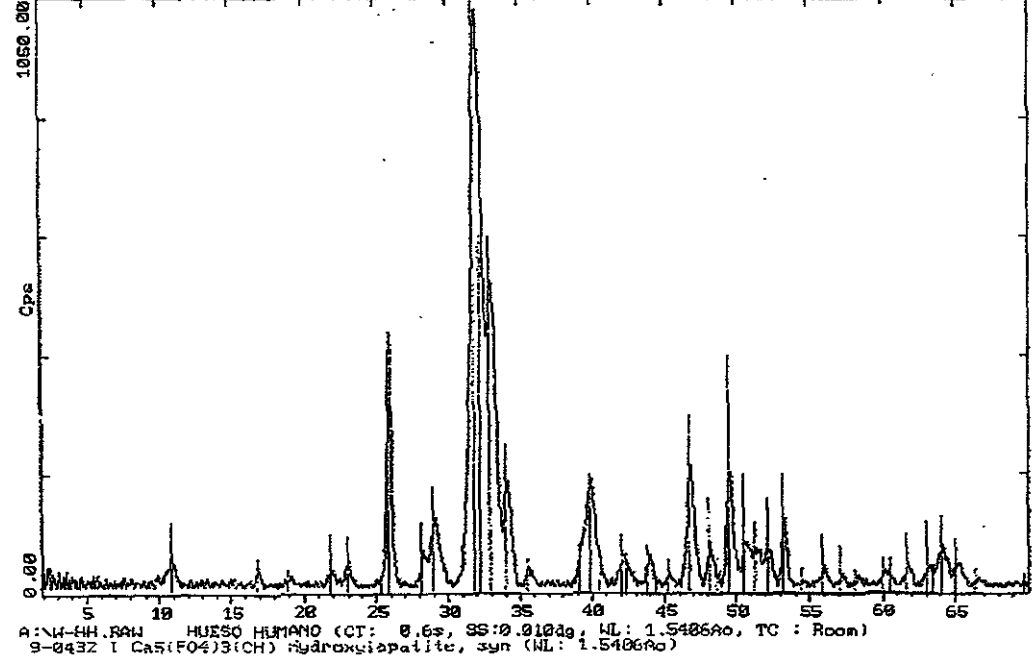
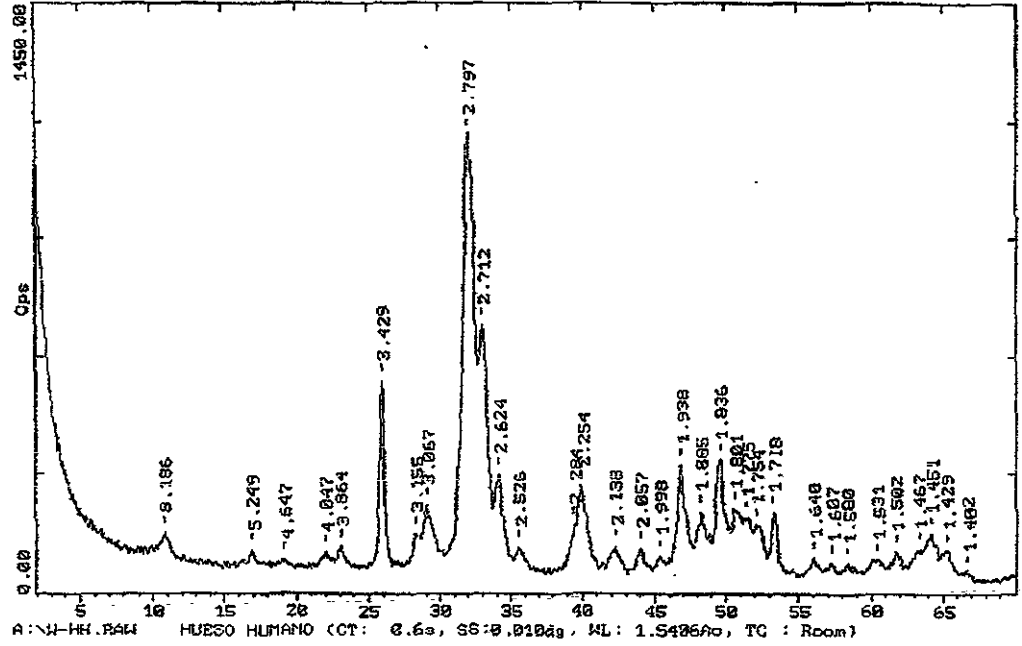


Fig 8. Difractograma de cristalinidad y composición de la hidroxiapatita de huso humano.

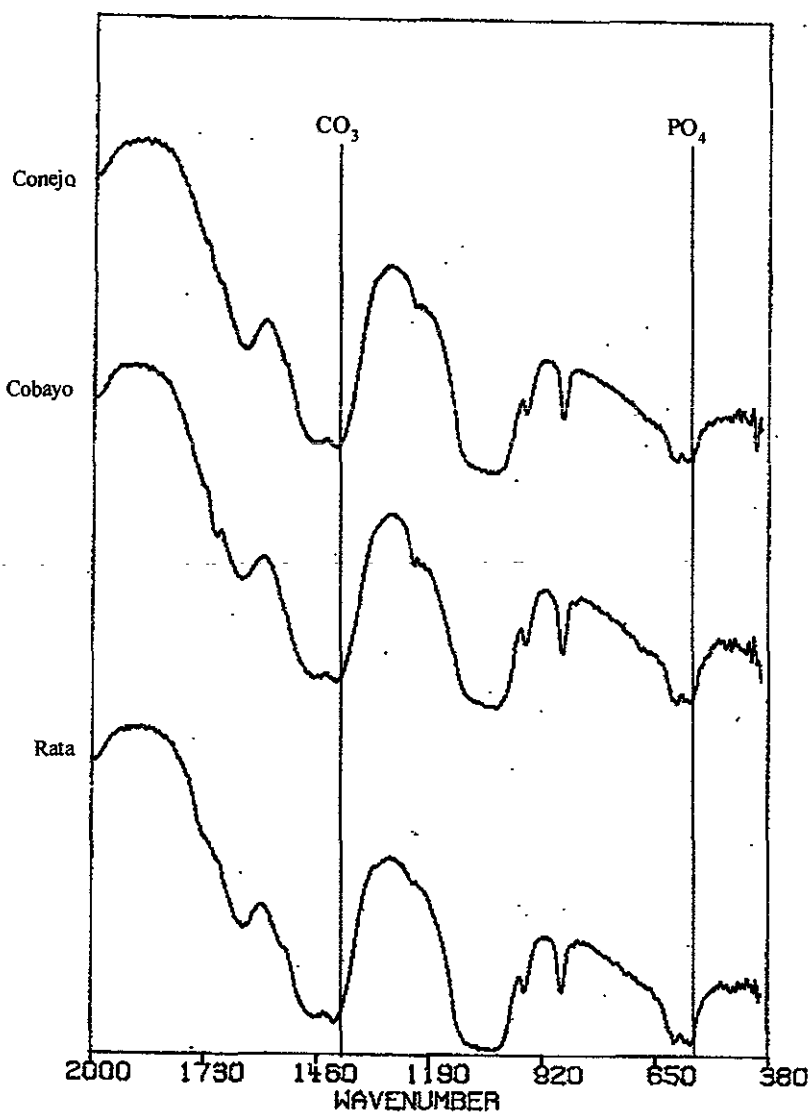


Fig. 9. Espectro de FT-IR comparando las muestras de rata, cobayo y conejo mostrando la gran similitud correspondiente a (PO₄), CO₃, OH

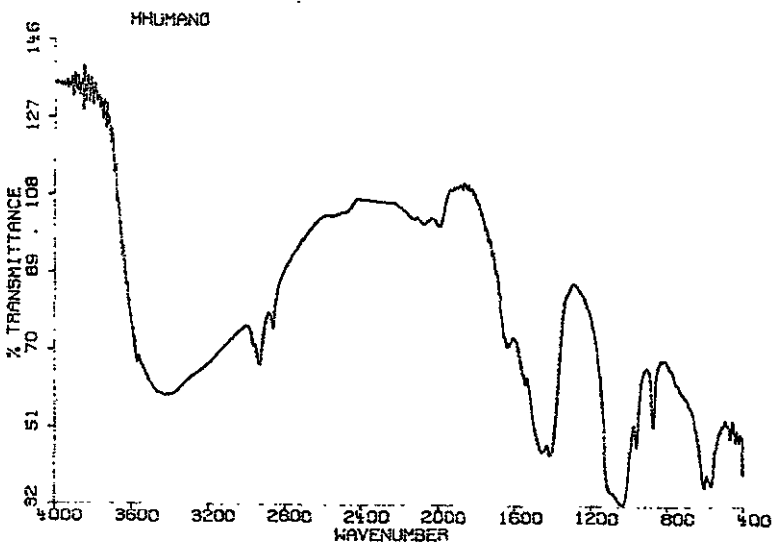
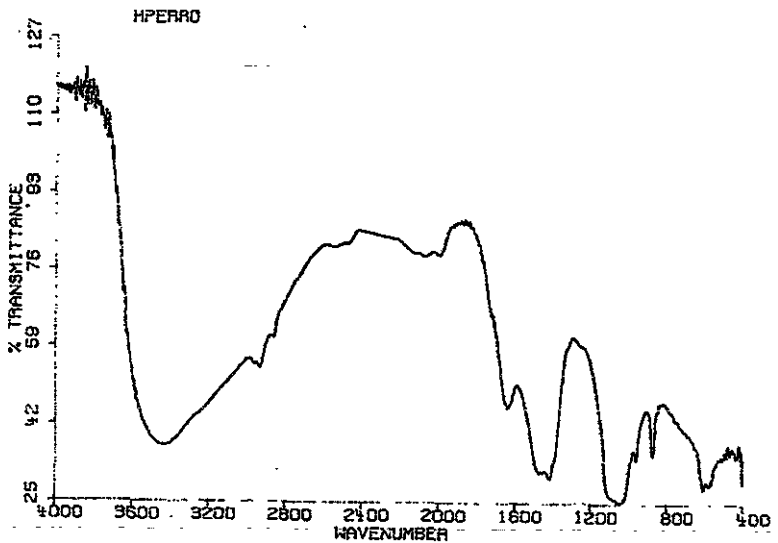


Fig. 10 y 11. Espectro de FT-IR comparando las muestras de hueso perro y humano mostrando la gran similitud correspondiente a (PO_4) , CO_3 , OH

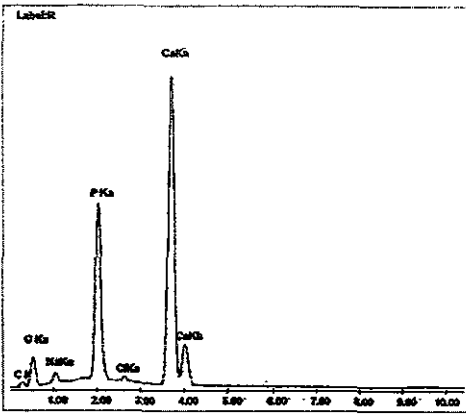
Microanálisis.

El análisis elemental realizado en las muestras del hueso de los distintos modelos animales permitió determinar el contenido porcentual en peso de los principales elementos del hueso, entre estos se determinó el Ca^{+2} , P^{+5} , Mg^{+2} , Na, ya que son los que se encuentran en mayor proporción en este tejido.

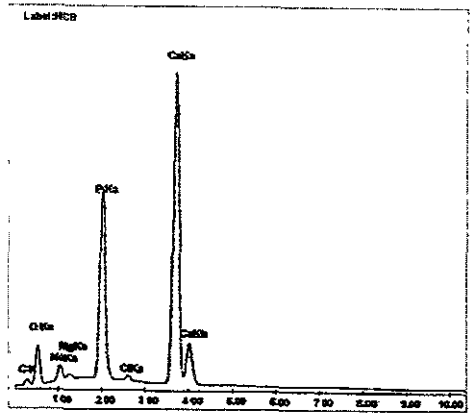
Las gráficas muestran las relaciones de las longitudes de onda características de cada una de los elementos. En la gráfica 9 se encuentran los espectros de la longitud de onda para el Ca^{+2} , P^{+5} , Mg^{+2} y Na tanto del hueso del perro, cobayo, rata y conejo; en todos ellos se identifican fácilmente la presencia de Ca^{+2} y P^{+5} , sin embargo la presencia de elementos extraños tales como Na y Cl^{+1} parecen ser consecuencia del proceso de preparación de la muestra, más que parte integrante del hueso. En la tabla 3 se encuentra concentrada la proporción porcentual cualitativa de la concentración del Ca/P, es decir el cociente de la relación elemental de estos dos componentes de la hidroxiapatita.

En dicha tabla se aprecia que la media de la relación Ca/P se encuentra en un rango de 1.97 a 2.25 entre las distintas especies, siendo el perro la especie (1.97) que se acercó mas a la proporción de 1.67 de la estequiometría de la hidroxiapatita.

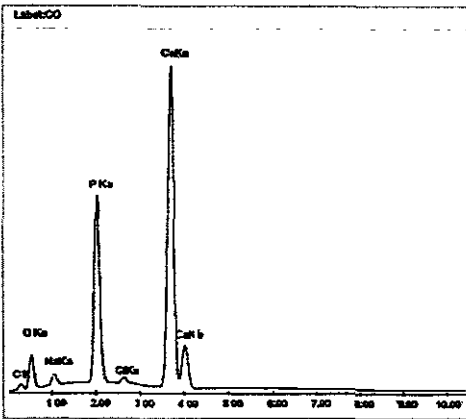
El espectro del microanálisis del hueso de humano también mostró los elementos básicos de la hidroxiapatita. Sin embargo, también se observaron trazas de Al^{+3} , Si^{+4} y Cl^{+1} , los cuales pueden intepretarce como contaminantes de la muestra que se incorporaron durante la preparación. El cociente Ca/P en el hueso humano fué de 2.245, lo cual está muy alejado del 1.67 de la hidroxiapatita de referencia. (Tabla 4).



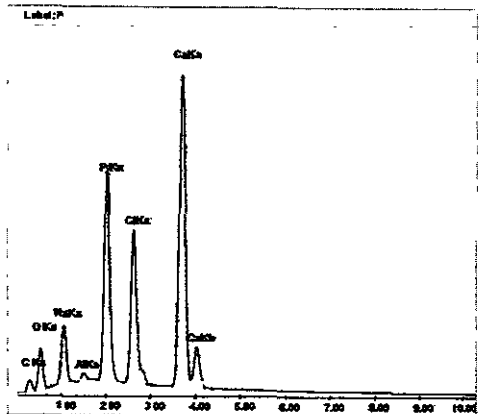
1



2



3



4

Fig. 10. Microanálisis del hueso de rata (1), cobayo (2), conejo (3), y perro (4).

Label:H

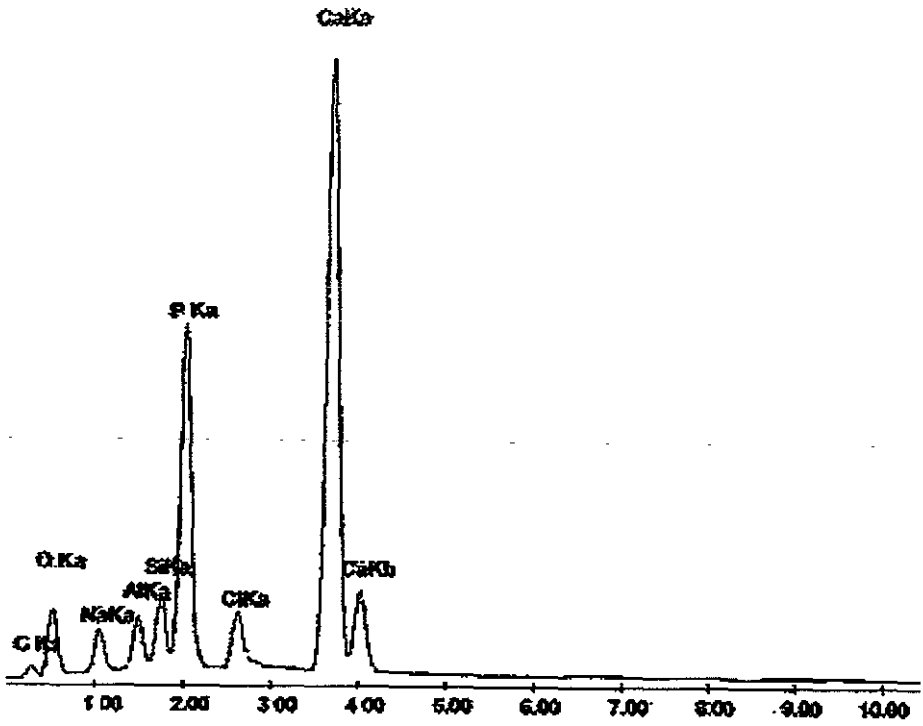


Fig. 11. Microanálisis de Rayos-X del hueso de

Modelo Animal	Relacion		Total	Media Ca/P
	CaK	PK	CaK/PK	
Rata	42.92	19.01	2.25	2.25
Cobayo	38.09	18.22	2.09	2.155
	40.48	18.23	2.22	
Conejo	41.38	18.75	2.2	2.27
	43.03	18.35	2.34	
Perro	27.86	14.34	1.92	1.97
	29.44	14.51	2.02	
Humano	31.85	13.77	2.31	2.245
	36.6	16.74	2.18	

Tabla 4. Composición cualitativa del hueso de los distintos modelos animales

DISCUSIÓN:

El desarrollo de material de injerto involucra necesariamente la prueba de estos materiales en los tejidos donde serán colocados, es decir la realización de prueba de biocompatibilidad ya sean en modelos *in vivo* o *in vitro* (Stanley HR, 1990). En el caso de los modelos *in vivo* no se ha determinado alguna diferencia en cuanto la respuesta que puede provocar la colocación de un material extraño, es decir, que el mismo material puede establecer diferencias de respuesta en función de las diferencias de composición química y de propiedades físicas del tejido óseo en cada especie animal.

La respuesta observada en los materiales de reparación y sustitución ósea elaborados ya sea de recursos naturales, como en el caso de la hidroxiapatita y coralina (InterporeTM, OsteónTM) (Holmes RE, 1988), la hidroxiapatita derivada de algas (ArgiporeTM) o de cualquier otro recurso natural (Araiza MA, *et.al*, 1996), así como las elaboradas por vía sintética (SyntograftTM, OstegraftTM) han sido probados en animales presentan aceptación, sin embargo, en ninguno de los casos se ha determinado la influencia que pueden ejercer las características físicas y químicas de cada una de la especies que han sido utilizadas. Este aspecto adquiere gran relevancia cuando considerando que aunque químicamente todos los especímenes están compuestos de la misma sustancia, es decir la hidroxiapatita, la presencia de compuestos adicionales puede conferirles propiedades distintas. En la compración del análisis químico obtenido por MRx se aprecia primero una diferencia en la media del cociente Ca/P entre las distintas especies, es decir se encuentran alejados de 1.67 determinado por la hidroxiapatita de referencia. Esta variación puede ser explicada por la presencia de fases cálcicas difrentes a la hidroxiapatita, es decir la existencia de especies de carbonato, que en cantidades significativas puedan estar presentes. El Mrx se detecta muy debilmente la presencia de C, y es por ello que podemos interpretar su presencia en el material. Esta diferencia puede ser significativa para la composición de la hidroxiapatita, el comportamiento biológico podría ser afectado cualitativamente por la presencia de los carbonatos y otras fases cristalinas, aunque sus valores se encuentran dentro de los parámetros ya reportados por LeGeros (1991) y Mc Connel (1970).

La diferencia en la presencia de carbonato lo comprobamos al analizar los espectros de infrarrojo de cada una de las especies ya que en todos ellos es evidente la presencia de la banda de intensidad en el $1410 \text{ a } 60 \text{ cm}^{-1}$, lo cual demuestra la existencia de carbonatos en cada una de las especies.

Uno de los principales factores considerados para el desarrollo de los biomateriales es la porosidad que deben poseer, es decir que reproduzcan el diámetro promedio observado en el tejido óseo humano, el cual considera entre $100 \text{ y } 150 \text{ }\mu\text{m}$ (Holmes RE, 1988). Sin embargo, apesar de que existen materiales que consideran este diámetro de poro, tal como el Interpore y el Proosteón, algunos otros consideran que el diámetro mínimo debe oscilar entre $30 \text{ y } 50 \text{ }\mu\text{m}$ (Algipore) (Kasper KC, 1988). Esta variabilidad en los materiales podría ser explicada por la diferencia en la respuesta celular que se puede provocar. En este estudio se determino el diámetro promedio del tejido óseo así como la distribución y densidad del mismo encontrando diferencias importantes entre cada especie. Este aspecto es importante por qué aunque los modelos animales pequeños han sido muy utilizados, la distribución de los poros así como su tamaño es muy variable y alcanzan muy cercanamente los parámetros del hueso humano sólo cuando son animales maduros, esto quiere decir que el momento en que deben ser empleados es cuando son adultos y sus procesos celulares son maduros. La especie animal que mostró más similitudes en la distribución y tamaño de los poros en el tejido óseo fue el perro, es por ello que es el modelo que más se asemeja, por lo menos en estas características, en cuanto al número de poros al hueso humano, también es el que presentó mayor densidad en la superficie externa que cualquier otra especie. Estas características corroboran la información respecto a la confiabilidad del perro como modelo animal en pruebas de histocompatibilidad (Vriesendorp, HM, 1986). Sin embargo cuando se determinó hacia la parte interna, el cobayo fue la especie que mostro mayor densidad (120 p/mm^2). Es importante recordar que la densidad, así como el tamaño de los poros, son los determinantes de la regeneración y paso de componentes y sustancias celulares.

Una de las principales características que determinan la respuesta ya sea del material o del tejido receptor es la superficie, y ésta estará relacionada con la densidad y tamaño de los poros. En este estudio, el análisis de la textura entre

las diferentes especies bajo el microscopio electrónico de barrido mostró las características de superficie están en contacto con los materiales que son implantados, aunque la composición química fundamental del hueso en las diferentes especies es la hidroxiapatita, como principal constituyente, también pudieron ser establecidas diferencias en cuanto a la distribución, densidad y tamaño del poro, así también como diferencia en la composición elemental del hueso, encontrándose cocientes Ca/P muy por arriba de 1.67 descrito para la hidroxiapatita, interpretándose el exceso de calcio como la existencia de fases cálcicas en forma de carbonato, y la presencia de trazas de Al^{+3} , Si^{+4} , y Cl^{+1} como contaminantes incorporados durante la preparación de las muestras. En conjunto estas diferencias fisico-químicas podrían determinar diferencias en el comportamiento del huésped en relación con los materiales de implante es por ello que es necesario continuar con líneas de investigación dirigidas a clarificar esta posible relación.

CONCLUSIONES:

1. Se determinaron diferencias en las características fisico-químicas en las distintas especies animales.
2. El perro es el modelo animal que posee las características fisico-químicas más cercanas al humano.
3. El cociente de la relación Ca/P en todos los modelos animales fue mayor a 1.67.
4. En todos los especímenes estudiados existe una gran proporción de CaCO_3 .

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.

1. Araiza MA, Portilla J, Hernández JC, Arita I, Castaño UM.: Physicochemical characterization of an invertebrate skeleton and its possible use as biomaterials. *Ceramic Transactions*, 1996. pp. 67, 27-36.
2. Armenta PS. :Histología. Ed. Manual Moderno, México D.F., 1975, pp.51-61.
3. Barrio-Paredes, Rafael A.: Formación de imagen en el Microscopio Electrónico. Universidad Autónoma de México. 1982. pp. 94.
4. Banks W.J, Histología Veterinaria Aplicada. Manual Moderno., México D.F. 1986. pp. 148-151.
5. Black - J., Biological performance of materials. Fundamentals of Biocompatibility, 2nd. ed., 1992. Morcel Dekker, Inc, N.Y.
6. Borysenko M: Histología funcional. Editorial Limusa. 1985. pp. 68-79.
7. Colthup, NB., Daly, L.H., Wiberley, S.E.: Introduction to infraed and Raman spectroscopy, 3rd Edition, Academic Press, Inc, San Diego CA. 1990. pp. 547.
8. Copenhaver WM, Kelly DE. : Tratado de Histología. 17a Edición. Editorial Interamericana. México D.F., 1981. pp. 175-199.
9. Davison, W.L., : X-Ray Diffraction Methods to powders and Metals in physical Methods in Modern Chemical Analysis. By Kuwand, Theodore. Academic Press, Vol. 2, N.Y., 1980. pp. 411.
10. Doherty MJ, Schlag G, Schwarz N, Mollar RAB, Nolan PC, Wilson DF.: Biocompatibility of xenogeneic bone, commercially available coral, a bioceramic and tissue sealant for human osteoblast. *Biomaterials*.1994, 15(8): 286-294.
11. Fawcett DW. : Tratado de Histología, Décimo primera edición, Editorial Interamericana, 1988, pp.199 - 237.

12. Frank RM, Klewansky P, Hemmerle J, Tenenbaum H.: Ultrastructural demonstration of the importance of crystal size of bioceramic powders implanted into human periodontal lesions. *J. Clin. Periodontol.* 1991; 18:669-680.
13. Gage JP, Francis MJO, Triffitt JT: Collagen and Dental Matrices, Wright-Butterworth & Co, 1989, pp.70-90.
14. Goldstein, J.I, Newbury D.E.; Echlin P., Joy D.C., Flori C., Litshin E. Scanning Electron Microscopy and X Ray Microanalysis. Plenum Press, New York, 1981. pp. 663.
15. Hayes A, Turner IG, Powell KA, Dieppe PA: Crystal aggregates in articular cartilage as observed in the SEM. *Journal of Materials Science: Material in Medicine.* 1992; 3:75-78
16. Ham AW, Cormack DH. :Tratado de Histología. Ed. Interamericana S.A. de C.V.; México D.F.; 1984, pp. 421-498.
17. Hench, LL. : Bioceramics, A clinical success. *Ceramic Bulletin*, 1998, 77:67-74.
18. Holmes RE, Hagler HK: Porous hydroxyapatite as a bone graft substitute in cranial reconstruction: a histometric study. *Plast. Reconstr. Surg.* 1988, 81:662-669.
19. Jenkins, R.: An introduction to X-Ray spectrometry, Ed. Heyden, Landan, Great Britain, 1976. pp. 123.
20. Junqueira LC, Carneiro J.: Histología Básica. 4a. edición. ; Ed. Masson, S.A.; México D.F.; 1996, pp. 121-141.
21. Kasper KC, Ewers R, Simons B.: Algae-derived (pycogene) hydroxyapatite. A comparative histological study. *Int. J. Oral Maxillofacial Surgery*, 17:319.

22. Kent GC, Comparative Anatomy of the Vertebrates, Mineralized Tissues an Introduction to the Skeleton. 7th. edition, 1978. Ed. Mosby year Book. St. Louis Baltimore, Boston. pp.180-187.
23. LeGeros RZ: Calcium phosphates in oral Biology, Monographs in Oral Science, 1991, vol. 15, 46-67.
24. Machlin, Lawrence J. Phosphorous in human nutrition. in Enviromental Phosphorous, Handbook, 1970. pp. 418-419.
25. Martin M, Lamure A, Lacabanne, Betin C, Harman MF. : Characterization of interfases in human calcified tissues., *Biomaterials* 1990, 11: 11-12.
26. Mc Connel, Duncan. Biominerology of Phosphates and Physiological mineralization in Enviromental Phosphorous Handbook, 1970. pp. 425-442.
27. Melby, EC, Jr, Altmay, NH,: Hand book of laboratory Animal Science, Vol. I, II and III, CRC. Press, Cleveland, Ohio, 1974.
28. Michael H. Ross, Edward J. Reith, Lynn J. Romrell. Histología Texto y Atlas color. 2ª Edición. De. Panamericana. México D.F., 1992. pp. 147-181.
29. Mitruka, BM, Rawnsley, HM, and Vdehra, DV,: Models for the study of human Disease, John Wiley and Sons, Inco. *Animal for Medical Research,* 1976.
30. Murray FE: Zoo and Wild Animal Medicine. Ed. W.B. Saunders Company, 1978. pp.334.
31. Narasaratu, TSB, Phebe DE, Some: Physicochemical aspects of hydroxylapatite. *J. of Materials Science.* 1996, 31:1-21.
32. Oatley, C.W.: The Scanning Electron Microscope. Part I the instrument. Cambrige University Press, Great Britain, 1972. pp. 205.

33. Parker, Frank S.: Application of infrared, Raman and Reschance Raman spectroscopy in Biochemistry Plenum Press, N.Y. 1983. pp. 550.
34. Paulsen DF, Acuña-Díaz H.: Histología Básica Editorial El Manual Moderno S.A. de C.V. México D.F., 1981. pp.121-144.
35. Stanley HR, Toxicity testing of Dental Materials, CRC Press, Boca Raton , Florida, 1990, pp.166.
36. Vriesedor p, HM.: Canine histocompatibility testing, in The canine as biomedical research Model, edited by Moshe Shittrine, NY; 1986. pp.134-152.
37. Weiss L, Greep RO, Histology. Fourth Edition. Mc Graw-Hill Book Company. 1977. pp.205-242.
38. Williams RAD, Elliot JC.: Bioquímica Dental básica y aplicada. El Manual Moderno, 1982. pp. 212-227.
39. Willord HH, Merrit LL, Dean JA, Settle FA.: Instrumental Methods of Analysis. 7TH edition, Wadsworth International, 1991. pp.831.