
**RESULTADOS DE LA OSTEOINTEGRACIÓN CON HIDROXIAPATITA
CORALINA TRATADA TÉRMICAMENTE: ANÁLISIS ULTRAESTRUCTURAL
EN RATAS SPRAGUE DAWLEY**

Yépez Jenair¹, Ortiz Reynaldo², Velazco Gladys³, González Anajulia³.

- 1. Universidad de Los Andes. Facultad de Odontología. Cátedra de Cirugía Bucal.**
- 2. Universidad de Los Andes. Facultad de Ciencias. Laboratorio de Electroquímica.**
- 3. Universidad de Los Andes. Facultad de Odontología. Laboratorio Integrado de Biología Celular y Molecular (LIBCEM).**

Autor Corresponsal: Facultad de Odontología, Calle 23 entre avenidas 2 y 3, Cátedra de Cirugía Bucal, Universidad de Los Andes (ULA), Mérida-Venezuela. Telef.: 0274-2402372.

E-mail: jenayegui@gmail.com

RESUMEN

Tanto por efectos de la edad, como por alteraciones en las condiciones sistémicas del individuo, muchos pacientes pueden desarrollar patologías óseas que generan defectos críticos y obstaculizan la regeneración idónea del tejido lesionado. La hidroxiapatita se considera el material más atractivo para implante óseo, debido a su similitud tanto en composición como en características biológicas con el hueso natural. Se siguen probando y modificando las técnicas para la generación de formulaciones naturales y sintéticas de hidroxiapatita, con el fin de reproducir mejor las características del hueso natural. Los estudios de estructura de superficie facilitados por la Microscopía Electrónica de Barrido (MEB), constituyen una herramienta eficaz para evaluar ultraestructuralmente las propiedades físicas de un determinado biomaterial para regeneración ósea guiada. El objetivo de este trabajo es evaluar ultraestructuralmente la osteointegración de la



hidroxiapatita coralina porosa tratada térmicamente, en defectos en tibias de ratas Sprague Dawley. Se seleccionaron 9 ratas macho adultas, de la cepa Sprague Dawley, de 4-5 meses de edad, con un peso comprendido entre 250gr-300gr. 3 ratas fueron sacrificadas a las 2, 4 y 6 semanas postoperatorias. Se observó osteointegración positiva en el 66,6% de los casos. Se concluye que el tratamiento térmico de la hidroxiapatita a 1350°C no altera sus propiedades, al contrario, aumenta sus componentes inorgánicos (Calcio y Fosfato), mejorando las propiedades de resistencia, cristalinidad, configuración del grano, mayor porosidad, lo cual mejora los procesos de osteointegración y osteoconducción, por lo que la regeneración ósea se ve acelerada y favorecida.

PALABRAS CLAVE: Regeneración ósea, hidroxiapatita coralina, microscopía electrónica de barrido.

RESULTS OSSEOINTEGRATION HYDROXYAPATITE HEAT-TREATED CORAL : ULTRASTRUCTURAL ANALYSIS IN SPRAGUE DAWLEY RATS

ABSTRACT

Not only by effects of age, but also alterations in the systemic conditions of the individual, many patients may develop bone pathologies that generate critical defects and difficult the ideal regeneration of the injured tissue. Hydroxyapatite is considered most attractive bone implant material, because of their similarity in composition and biological characteristics with natural bone. Continuing testing and modifying techniques are being done to generate natural and synthetic hydroxyapatite formulations, in order to better reproduce the characteristics of natural bone. Studies of surface structure provided by the Scanning Electron Microscopy (SEM) are an effective tool for evaluating ultrastructural physical properties of a given biomaterial for guided bone regeneration. The aim of this work is to evaluate ultrastructural osseointegration of thermal treated porous coralline hydroxyapatite in defects in tibias of Sprague Dawley rats. Nine adult male rats, Sprague Dawley strain, 4-5 months old, were selected weighing between 250g-300g. 3 rats were sacrificed at 2, 4 and 6 weeks postoperatively. Positive osseointegration was observed in the 66.6% of cases. We conclude that thermal treatment of the hydroxyapatite to 1350°C does not alter its properties, contrary, it increases the inorganic components (calcium and phosphate), improving the strength properties, crystallinity, grain configuration, major porosity, which enhances the osseointegration and osteoconduction processes, therefore the bone regeneration is accelerated and favored.

KEYWORDS: Bone regeneration, coralline hydroxyapatite, scanning electron microscopy.

INTRODUCCIÓN

El remodelado óseo constituye un proceso biológico complejo, que ocurre durante toda la vida, pero sólo hasta la tercera década el balance es positivo. Es precisamente en la treintena cuando existe la máxima masa ósea, que se mantiene con pequeñas variaciones hasta los 50 años; a partir de aquí, existe un predominio de la reabsorción y la masa ósea empieza a disminuir (1).

Tanto por efectos de la edad, como por alteraciones en las condiciones sistémicas del individuo (alteraciones hormonales, genéticas, vasculares, nutricionales, neoplasias, entre otras), muchos pacientes pueden desarrollar patologías óseas (atrofia alveolar, enfermedad periodontal, lesiones osteolíticas, infecciones, entre otras) que debilitan los huesos y generan defectos óseos con ausencia de una o más paredes (defecto abierto), lo cual obstaculiza la regeneración idónea del tejido lesionado (2).

El sustento de una pieza dentaria en cavidad bucal y la calidad de los tratamientos restauradores, depende de las condiciones que presente el tejido óseo, lo cual hace que se practiquen diferentes procedimientos para estimular los procesos de cicatrización ósea, aumentar y conservar el volumen del tejido y garantizar el éxito de cualquier

terapéutica (3). Por ello, el desarrollo continuo de nuevos biomateriales ha provocado que en la cirugía bucal sea común el uso de injertos o rellenos óseos de diferente procedencia y composición, para lograr una recuperación del paciente de manera rápida y segura (4).

Dentro del amplio rango y variedad de materiales para regeneración, están teniendo auge aquellos de origen natural o sintético (aloinjertos, aloplásticos, etc), con características osteoinductivas y osteoconductoras, que interaccionan con el componente biológico y promueven la máxima expresión de mecanismos de reparación y cicatrización (5). En el caso de defectos óseos generados por heridas quirúrgicas o patologías, el hueso xenogénico (usualmente de origen bovino), se ha convertido en una alternativa para este reemplazo por su bajo costo y facilidad de obtención; sin embargo, existen riesgos de infección, reacción inmunológica e irritación con la aplicación de dicho material ⁶. Ante esto, la hidroxiapatita se presenta como una opción viable, pues constituye el mayor componente inorgánico del hueso mineral y se considera el material más atractivo para implante óseo, debido a su similitud tanto en composición como en características biológicas con el hueso natural (2,7,4,6,8).

La hidroxiapatita [$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$] es una cerámica policristalina formada por fosfato de calcio cristalino y representa un depósito del 99% del calcio corporal y 80% del fósforo total. En el hueso, la hidroxiapatita se encuentra como cristales planos de 20 a 80 nm de largo y de 2 a 5 nm de espesor, siendo el componente fundamental del tejido óseo y dental de todos los vertebrados; razón por la cual, los materiales a base de hidroxiapatita no provocan reacción inmunológica al ser implantados en el lecho receptor. Numerosas experiencias preclínicas y clínicas han demostrado que las cerámicas de hidroxiapatita son biocompatibles, bioactivas, bioestables y osteoconductoras (2, 4).

La hidroxiapatita (HA) se obtiene por precipitación química, al añadir una solución fosfatada a otra con iones de Ca^{++} en condiciones controladas; las de origen cerámico están constituidas por partículas esféricas de alta densidad y gran pureza, obteniéndose por calentamiento de los fosfatos cálcicos amorfos. El medio que se utiliza y las temperaturas a las que se elabora este tipo de hidroxiapatita, determinan la estructura cristalina del material, así como la porosidad y la solubilidad. La HA natural, se puede obtener de 3 seres vivos: bovinos, corales y algas (9).

Cabe destacar que los procesos de osteointegración y osteoconducción del

material, están influenciados por sus propiedades físicas y químicas, incluyendo el tamaño del grano, morfología del grano, estructura cristalina, porosidad, textura superficial y proporción Ca:P^4 . Por tanto, los estudios de estructura de superficie facilitados por la Microscopía Electrónica de Barrido (MEB), constituyen una herramienta eficaz para evaluar ultraestructuralmente las propiedades físicas de un determinado biomaterial para Regeneración Ósea Guiada. Las principales utilidades del MEB son la alta resolución ($\sim 100 \text{ \AA}$), la gran profundidad de campo que le da apariencia tridimensional a las imágenes y la sencilla preparación de las muestras (10).

En el Instituto Universitario de Tecnología de la Región Capital (IUTRC) y en la Universidad Simón Bolívar de Venezuela, se están obteniendo muestras de hidroxiapatita por sinterización, prensado con agarosa y tratamiento térmico a 1350°C por 30 min., cuya eficiencia no han sido estudiada en seres humanos, por lo que esta investigación tiene como propósito evaluar ultraestructuralmente (con microscopio electrónico de barrido) la osteointegración de la hidroxiapatita coralina porosa tratada térmicamente, en defectos en tibias de ratas Sprague Dawley.

METODOLOGIA

Procedimiento quirúrgico:

Cumpliendo con los lineamientos del Código de Bioética y Bioseguridad, y contando con la aprobación del presente estudio en animales de experimentación, por parte de la Comisión de Bioética del Bioterio de la Universidad de Los Andes (BIOULA) (protocolo CE BIOULA/019), se seleccionaron 9 ratas macho adultas, de

la cepa Sprague Dawley, de 4-5 meses de edad, con un peso comprendido entre 250gr-300gr, (Figura 1).

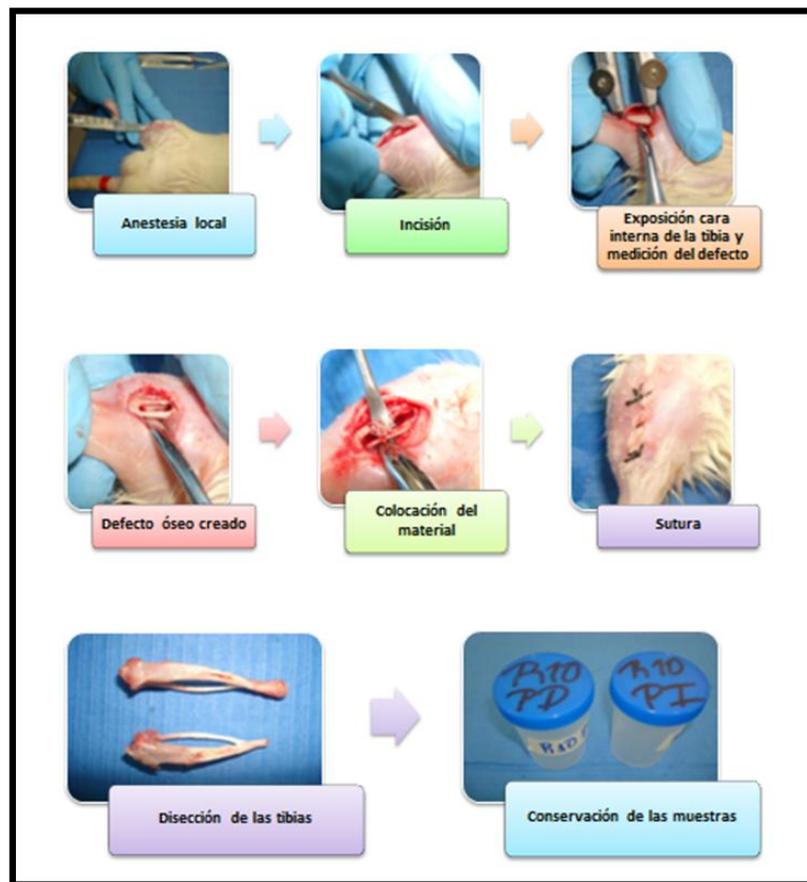


Figura 1. Procedimiento quirúrgico seguido en los animales de experimentación.

Los animales se sedaron inicialmente con inyección de 0,5 ml aproximadamente de Tiopental (20 – 40 mg/Kg de peso) vía intraperitoneal. Luego, previo rasurado y asepsia con Clorhexidina de la región operatoria, los animales se anestesiaron localmente con 0,25ml de Lidocaína al 2% con Adrenalina 1:100.000. Con una hoja de bisturí N° 15 estéril, se realizó una incisión lineal en la cara interna del muslo y se procedió a separar los tejidos musculares con periostótomos (Legra P9), hasta identificar y descubrir la cara interna de la tibia de cada pata. A continuación, se empleó una fresa tallo largo troncónica #702, a baja velocidad e irrigación constante con solución fisiológica, para crear defectos óseos lineales de aproximadamente 1 cm de longitud, 4 mm de profundidad hasta llegar a médula ósea y 5mm de ancho (defectos críticos para el animal), en la cara interna de las tibias de ambas patas. Se rellenó el defecto óseo de una de las patas (pata derecha-experimental) con la hidroxiapatita coralina porosa tratada térmicamente (a 1350 °C), quedando el defecto óseo de la pata restante como muestra control, sin rellenar. Se limpiaron y suturaron las heridas en dos planos, el plano muscular con sutura reabsorbible Vicryl® 4-0 y el plano de la piel con sutura no reabsorbible seda negra 4-0. Se administró la medicación analgésica y

antibiótica postoperatoria. Los animales se colocaron en sus jaulas individuales con agua y alimento para su evolución. Se realizó un seguimiento clínico posquirúrgico a las 2, 4 y 6 semanas, valorándose las condiciones del microambiente de cada caja y parámetros clínicos de los animales, para luego proceder a la eutanasia de 3 animales en el orden temporal descrito. La obtención de las muestras para la valoración ultraestructural con Microscopio Electrónico de Barrido (MEB), se realizó mediante extirpación en bloque de cada una de las tibias utilizando micromotor y discos estériles nuevos, obteniéndose un total de 18 muestras durante todo el experimento. Posteriormente, se realizó la valoración macroscópica con microscopio de luz, seguida de inmersión en formalina al 10% tamponada, para su procesamiento para Microscopía electrónica de barrido.

Procesamiento MEB:

Se realizó el corte de las muestras de tibia de ratas en sentido transversal, obteniéndose muestras circulares de 2 a 3 mm de grosor, con cuchilla de diamante de 6''x 0,020'' (Sectioning Saw Marca UKAM), con operación semiautomática a 2000 r.p.m. (equipo Smart Cut 6001 Model XP Precision) e irrigación abundante para evitar sobrecalentamiento del tejido (Figura 2)

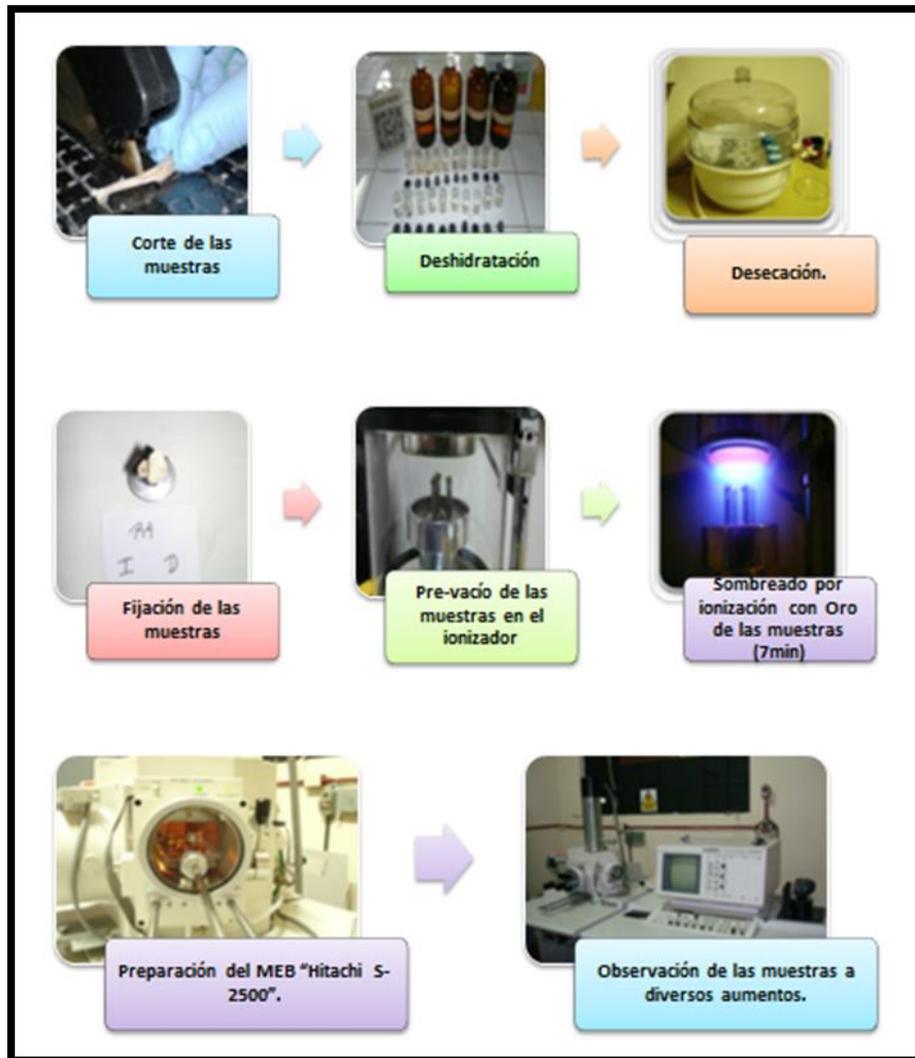


Figura 2. Procesamiento para MEB.

Dichas muestras fueron sometidas a procesos de deshidratación, desecación, fijación a una base metálica con emulsión de Acetato de Amilo, pre-vacío de las muestras en ionizador y sombreado por ionización con Oro (7min). Seguidamente, se preparó el MEB "Hitachi S-2500" (voltaje de aceleración 10KV; altura 8mm; ángulo 0) para la observación de las muestras a diversos aumentos y obtención de imágenes digitales. Ultraestructuralmente, se evaluaron los parámetros referidos a la formación de la interfase HA-hueso y continuidad de la interfase, los cuales permiten evaluar la osteointegración del biomaterial. Se consideró **osteointegración positiva** en dos casos: cuando no existía separación evidente entre la hidroxiapatita y el hueso adyacente, y cuando se observó una ligera interfase y ésta era continua. La **osteointegración fue negativa** cuando existía separación evidente entre la hidroxiapatita y el hueso, y cuando la interfase observada era discontinua.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Desde el punto de vista clínico y macroscópico, se constató una excelente evolución de los tejidos blandos que recubren los defectos óseos creados en las tibias de los animales. Las alteraciones encontradas en los primeros días del

postoperatorio estuvieron relacionadas con el trauma quirúrgico y la respuesta de los tejidos a este, observándose una significativa respuesta clínica con el uso de este material como injerto o relleno. Estas apreciaciones coinciden con los estudios llevados a cabo por Rodríguez et al. 4, Quintana et al. (11,12,13,14), Díaz et al. (15), Velazco et al. (16), quienes refieren que la hidroxiapatita tanto natural como sintética posee una alta biocompatibilidad y biofuncionabilidad, por lo que constituye un material implantológico ideal. Los autores realizaron investigación en humanos y no reportaron reacciones adversas en los pacientes estudiados. Con respecto a los parámetros evaluados ultraestructuralmente con microscopio electrónico de barrido, para determinar la osteointegración del material, los resultados del presente estudio reflejan la formación de una interfase entre la hidroxiapatita y el hueso, desde las semanas iniciales de valoración (2 semanas) en el 100% de las muestras experimentales (Gráfico 1). El 100% de las muestras control tuvieron ausencia de formación de interfase hueso-material, puesto que no fue colocado ningún relleno óseo en los defectos creados. En el Gráfico 1 se evidencia que, a las 2 semanas, la interfase formada fue continua para el 66,6% de los casos del grupo experimental (Figura 3).

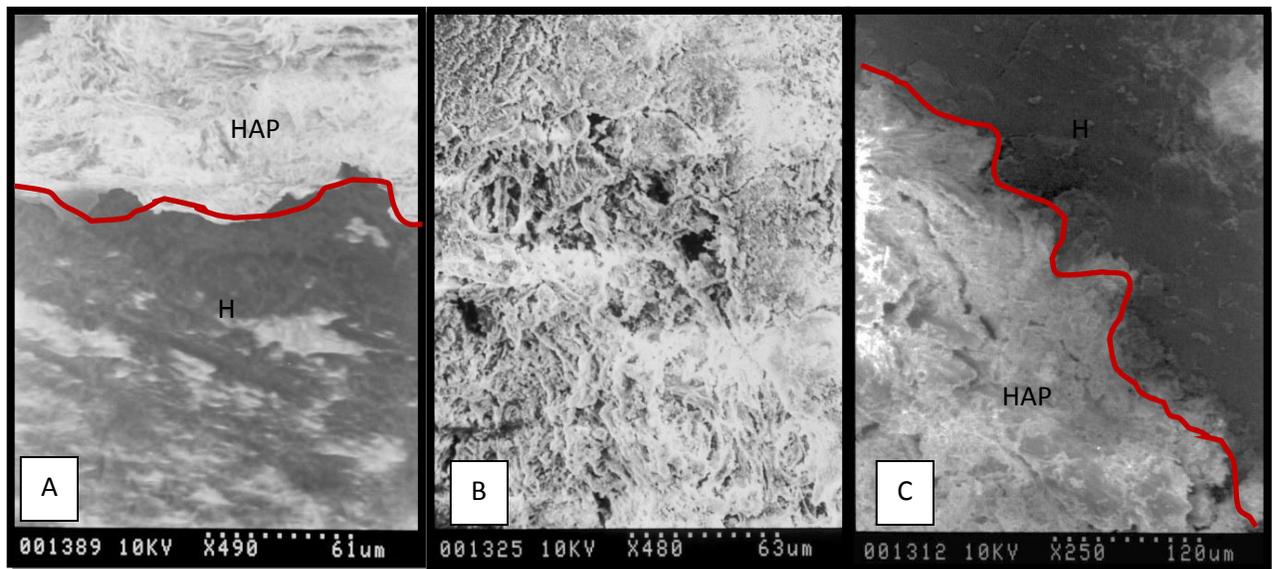


Figura 3. Microfotografías con Microscopio Electrónico de Barrido a 490X, 480X y 250X, respectivamente. a. Muestras evaluadas a las 2 semanas; b. Muestras evaluadas a las 4 semanas; c. Muestras evaluadas a las 6 semanas. Se observa interface (línea roja) continua en a y c; ausencia de interface en b. h=hueso. hap=hidroxiapatita.

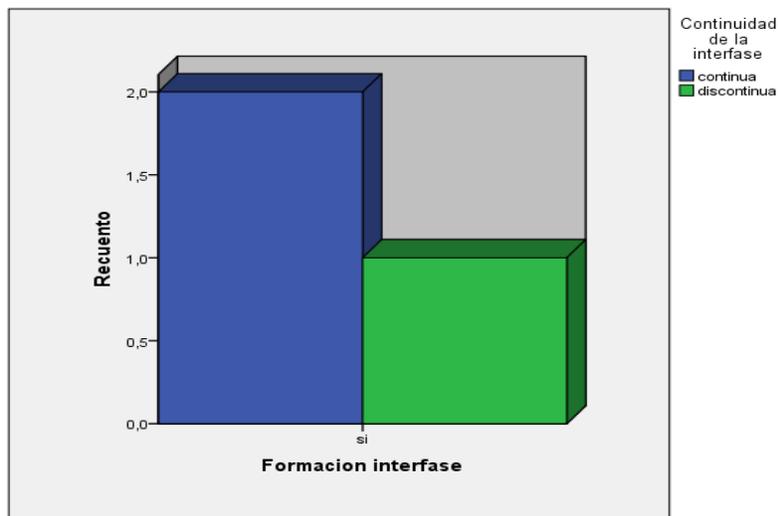


Gráfico 1. Frecuencia de observación de interfase hidroxiapatita-hueso y continuidad de la interfase, en las muestras evaluadas a las 2 semanas.

A las 4 semanas postoperatorias, los indicadores cambian observándose la formación de la interfase en el 33,3% de los casos experimentales y ausencia de dicha separación material-hueso en el otro 66,6%.

Se denota que la interface formada fue continua y homogénea (Figura 3 y Gráfico 2).

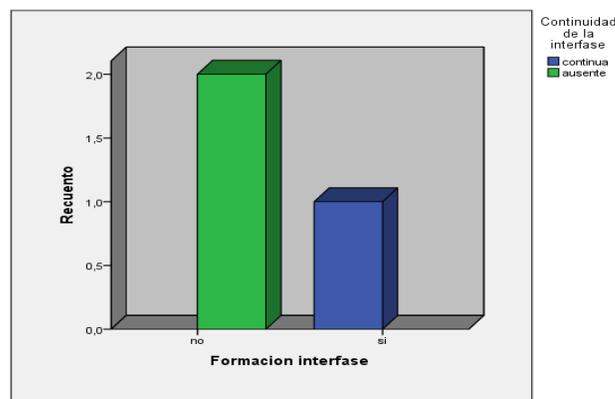
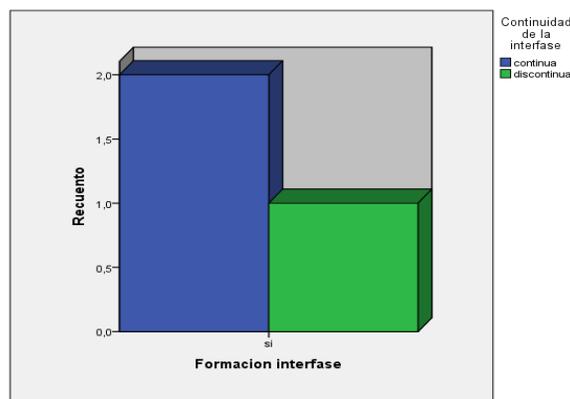


Gráfico 2. Frecuencia de observación de interfase hidroxiapatita-hueso y continuidad de la interfase, en las muestras evaluadas a las 4 semanas.

En el gráfico 3, se evidencia el comportamiento de la hidroxiapatita en relación con la formación y continuidad de la interfase, a las 6 semanas de valoración. Los resultados indican que se

observó la formación de la interfase en el 100% de los casos experimentales, con características de continuidad y homogeneidad en el 66,6% de los casos (Figura 3).



Recibido: 25-02-2015
Aprobado: 1-04-2015

Gráfico 3. Frecuencia de observación de interfase hidroxiapatita-hueso y continuidad de la interfase, en las muestras evaluadas a las 6 semanas.

Los parámetros referidos a la interfase y continuidad, permiten evaluar la osteointegración del biomaterial. A las 2 semanas de evaluación, se consideró **osteointegración positiva** puesto que se observó una ligera interfase continua. A las 4 semanas postoperatorias la **osteointegración fue positiva** para todas las muestras consideradas, dado que no existía separación evidente entre la hidroxiapatita y el hueso. Sin embargo, a las 6 semanas el comportamiento fue similar al observado en las valoraciones iniciales con formación de la interfase en el 100% de los casos experimentales; no obstante, la **osteointegración fue positiva** en el 66,6% por la continuidad y homogeneidad entre el contacto hueso-hidroxiapatita. Estos hallazgos denotan que la hidroxiapatita, independientemente de su origen, ofrece buenas propiedades de integración y compatibilidad con el tejido óseo, lo que se explica por su similitud en composición química, estructural y biológica con el hueso (2,7,4,6,8). De igual forma, los resultados en cuanto a osteointegración ponen de manifiesto que la hidroxiapatita es un excelente osteoconductor, puesto que desde su implantación en un defecto óseo actúa como relleno y andamio para acelerar la actividad celular en pro de la regeneración ósea; así lo afirman autores como Tellez et al. (17), Quintana et al.

(13,14), quienes demostraron excelentes resultados en cuanto a la tolerancia y biocompatibilidad del material, lográndose una excelente restauración estética, al osteointegrarse y actuar como barrera para evitar la invaginación de tejidos blandos. El hecho de evidenciar la ausencia de separación entre HA-hueso a las 4 semanas y volver a observar la formación de interfase a las 6 semanas, se explica por los procesos de remodelado óseo fisiológicos. A las 4 semanas, culmina la epitelización del defecto, hay reabsorción de la cortical y nuevo trabeculado óseo (18,19), por lo que en ese período no se denota separación. A las 6 semanas, comienza un proceso de reabsorción y aposición ósea alternado para la adaptación del hueso a los cambios funcionales, por lo que, ultraestructuralmente, va a haber diferencias en la electrodensidad que hacen evidente una ligera separación entre el tejido y el material. La observación de interfase a las 6 semanas también se puede explicar por el reporte de experiencias clínicas en la aplicación de hidroxiapatita, en las cuales los autores¹⁶ exponen que existe tendencia a la exfoliación de algunas partículas del material, quedando escondidas en la sangre, pues no se ha demostrado en ningún estudio migración del material, al contrario, muy buena adaptabilidad,

debido a que la hidroxiapatita es rodeada rápidamente de tejido conectivo, hueso dentro de las porosidades y forma una estructura tipo puente entre la HA y el hueso, conocida como apatita biológica (12,13,14). La naturaleza y el grado de respuesta del tejido dependen de las características del material, tales como su composición química, textura de la superficie, porosidad, densidad, forma y tamaño de las partículas (4,6,20,21). Con base en estas características, los avances continuos en el campo de la biotecnología, han originado resultados impresionantes en cuanto a la biocompatibilidad y capacidad para estimular la formación de tejido óseo que tienen los biomateriales de última generación. Respecto a la hidroxiapatita coralina, se demostró que el tratamiento térmico del material mejora sus propiedades mecánicas de resistencia, así como su configuración cristalina y estructura superficial, tal como lo manifiesta Takana et al. (22) Las características observadas en la estructura de la hidroxiapatita de origen natural (coralina), orientan a considerarla como un biomaterial con mejores propiedades de osteoconducción, concordando con Carvalho et al. (23) quienes afirman que el incremento en la porosidad del material parece beneficiar y mejorar el proceso de osteoconducción, así lo demostraron en su estudio observando que a las 12 semanas postquirúrgicas, la formación ósea evidenciada en los defectos obturados con hidroxiapatita bovina

natural fue mayor, lo que se explica por las características estructurales de mayor porosidad que ofrece este tipo de hidroxiapatita.

De igual forma, Díaz et al. (15) refieren que si la hidroxiapatita cuenta con mayor porosidad, es más susceptible de ser rodeada rápidamente por tejido conectivo y hueso maduro dentro de las porosidades, formándose una estructura tipo puente entre ella y el hueso, conocida como apatita biológica, lo que le confiere propiedades de biocompatibilidad y osteointegración positiva.

CONCLUSION

Se demostró que el tratamiento térmico del material mejora sus propiedades mecánicas, así como su configuración cristalina y estructura superficial. En la mayoría de los casos experimentales, se observó osteointegración positiva del biomaterial, lo que denotó su biocompatibilidad, bioactividad y bioestabilidad. Los estudios de estructura de superficie facilitados por la Microscopía Electrónica de Barrido (MEB), constituyen una herramienta eficaz para evaluar las propiedades físicas de un determinado biomaterial para Regeneración Ósea Guiada, así como valorar la calidad ósea obtenida luego de su aplicación en defectos óseos.

REFERENCIAS

1. Fernández I, Alobera M, Pingarrón M, Blanco L. Bases fisiológicas de la regeneración ósea II. El proceso de remodelado. Med Oral, Pat Oral y Cir Bucal. [Revista en internet] 2006 [consultado 01 Mayo 2008]; 11(1): E151-7. Disponible en: <http://www.medicinaoral.com/medoralfree01/v11i2/medoralv11i2p151e.pdf>
2. Dinatale E, Guercio E. Regeneración Ósea Guiada (GBR). Revisión de la Literatura. Acta Odontol Venez. 2008; 46 (4).
3. Maestre-Ferrín L, Boronat-López A, Peñarrocha-Diago M, Peñarrocha-Diago M. Augmentation procedures for deficient edentulous ridges, using onlay autologous grafts: An update. Med Oral Patol Oral Cir Bucal. 2009;14(8): e402-7.
4. Rodríguez O, Pérez M, Pérez O, Nodarse M. Experiencias en la aplicación de biomateriales en cirugía maxilofacial. Rev Cubana Estomatol. [Revista en internet] 2006 [consultado 07 Mayo 2009];43(1). Disponible en: http://bvs.sld.cu/revistas/est/vol43_1_06/est05106.htm
5. Hirota M, Matsui Y, Mizuki N, Kishi T, Watanuki K, Ozawa T, Fukui T, Shoji S, Adachi M, Monden Y, Iwai T, Tohnai I. Combination with allogenic bone reduces early absorption of β -tricalciumphosphate (β -TCP) and enhances the role as a bone regeneration scaffold. Experimental animal study in rat mandibular bone defects. Dental Materials Journal. 2009; 28(2):153-161.
6. Sequeda LG, Díaz JM, Gutiérrez SJ, Perdomo SJ, Gómez OL. Obtención de hidroxiapatita sintética por tres métodos diferentes y su caracterización para ser utilizada como sustituto óseo. Rev Colomb Cienc Quím Farm. [Revista en internet] 2012 [consultado 16 abril 2014]; 41(1):50-66. Disponible en: www.farmacia.unal.edu.co
7. Zhou YN, Xia LG, Xu YJ. Research progress of nano-hydroxyapatite complexes in bone tissue regeneration [abstract]. Shanghai kou qiang yi xue = Shanghai journal of stomatology. 2014;23(2):248-52.
8. Diaz E, Martínez D. Obtención de hidroxiapatita utilizando el método de sinterización [Tesis]. Bucaramanga: Universidad Industrial de Santander. Facultad de Ingenierías Fisicoquímicas. Escuela de Ingeniería Química; 2007.
9. López M, Kitrilakis A, Carbone C. Desarrollo y Evaluación In Vivo de un Biomaterial a base de

- Sulfato de Calcio para Regeneración Ósea. [Página en internet] 2007 [consultado 17 Septiembre 2009]. Disponible en: http://www.presi.unlp.edu.ar/secyt/cyt_htm/ebec07/pdf/lopezm.pdf
10. Grágeda M, Montesinos S. Aplicaciones de Microscopia Electrónica de Barrido (SEM) y Análisis de Fractura de una Aleación de Cu-10 Al. [Página en internet] 2000 [consultado 24 Noviembre 2009]. Disponible en: <http://cabierta.uchile.cl/revista/28/articulos/pdf/edu3.pdf>
 11. Quintana J. Utilización de la hidroxiapatita en cirugía maxilofacial. Actualización bibliográfica. Hospital "Ciro Redondo García", Artemisa. Rev Cubana Estomatol. 1998;35(1):16-20.
 12. Quintana J, Rodriguez R, Hernandez A. Empleo de la hidroxiapatita en la reparación ósea periapical. Rev Cubana Estomatol. 2004;41(3).
 13. Quintana J, Gonzalez R, Quintana M. Resultados de 15 años empleando la Hidroxiapatita Coralina® HAP-200 como implante óseo en cirugía maxilofacial. Revista CENIC. Ciencias Químicas. [Revista en internet] 2010 [consultado 21 marzo 2013]; 41:1-9. Disponible en: <http://www.redalyc.org/pdf/1816/181620500016.pdf>
 14. Quintana J, Gonzalez R, Pinilla R, Al-Sadi S, Al-Gothaim A. Quistes periapicales gigantes con fistula cutánea facial tratados con hidroxiapatita coralina HAP-200. Presentación de dos casos. Acta Odontol Venez. 2011;49(2).
 15. Díaz A, Fonseca M, Covo E. Injerto de tejido conectivo subpediculado con utilización de hidroxiapatita para aumento de reborde alveolar: reporte de un caso. Revista de la Facultad de Ciencias de la Salud. Universidad Magdalena. 2008; 5(1).
 16. Velazco G, Ortiz R. Biomateriales a base de hidroxiapatita sintética para reparación ósea (Reporte de un caso). Ciencia Odontológica. 2009;6(1):60-66.
 17. Tellez H, Guerrero F, Torres J. Estudio de la hidroxiapatita natural vs sintética en su aceptación biológica y eficacia regenerativa ósea en modelo animal. Oral. 2009;10(32):533-536.
 18. Calanche I, Florido R. Reparación. Guía didáctica. Mérida, Venezuela: Universidad de los Andes; 2003.
 19. Felzani R. Cicatrización de los tejidos con interés en cirugía bucal: Revisión de la literatura. Acta Odontol Venez [Revista en internet] 2005 [consultado 30 abril

- 2008]; 43(3). Disponible en: http://www.actaodontologica.com/ediciones/2005/3/cicatrizacion_tejidos.asp
20. Spadavecchia U, González G. Obtención de hidroxiapatita nanométrica para aplicaciones médicas. Revista de la Facultad de Ingeniería de la UCV. 2007;22(4):37-44.
21. Paz A, González J, López M, Becquer C, Parodi M. Obtención de nanopartículas de hidroxiapatita empleando disoluciones con elevado contenido de iones calcio y fosfato. Revista CENIC. Ciencias Químicas. [Revista en internet] 2010 [consultado 16 abril 2014]; 41:1-8. Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=181620500003>
22. Tanaka H, Chikasawa M, Kandori K, Ishikawa T. Influence of thermal treatment on the structure of calcium hydroxyapatite. Phys Chem Chem Phys. 2000;2:2647-2650.
23. Carvalho A, Faria P, Gris M, Souza S, Taba M, Palioto D, et al. Effects of granule size on the osteoconductivity of bovine and synthetic hydroxyapatite: a histologic and histometric study in dogs. J of Oral Implant. 2007;33(5):267-276.
- 24.