

LA HIDROXIAPATITA, SU IMPORTANCIA EN LOS TEJIDOS MINERALIZADOS Y SU APLICACIÓN BIOMÉDICA

Margarita Victoria García-Garduño^{1,2} y José Reyes-Gasga¹

¹Instituto de Física, UNAM. Apdo. Postal 20-364, C.P. 01000, México, D.F. ²División de Estudios de Posgrado e Investigación, Facultad de Odontología, UNAM, Circuito Institutos s/n, Ciudad Universitaria, C.P. 04510, Coyoacán, México, D.F. E-mail marvicgg@servidor.unam.mx

RESUMEN

La hidroxiapatita en los tejidos mineralizados reviste una gran importancia ya que se ha demostrado que es un material biocompatible, con aplicación biomédica en Odontología, Ortopedia y Cirugía Máxiloacial. Es el cristal principal de huesos y dientes ya que les confiere su dureza característica y, acompañado por la colágena, los huesos presentan determinada elasticidad. En la naturaleza se le encuentra formando parte de rocas metamórficas. En los tejidos vivos, la hidroxiapatita y sus precursores están organizados en diferentes grupos animales como los corales, estrellas de mar, etc. Como biomaterial se realizan investigaciones para determinar sus formas óptimas de aplicación, ya que la hidroxiapatita de diferentes orígenes da resultados distintos, y como biomaterial constituye un reto en la investigación ya que no se descarta que por los avances en medicina genómica pueda contribuir a reconstruir órganos a partir de células madre. En este trabajo se revisa y analiza las propiedades físicas, químicas y de biocompatibilidad de la hidroxiapatita a través de las investigaciones reportadas en el tema y los trabajos publicados por los autores en el campo del esmalte dental humano.

Palabras Clave: Biomateriales, esmalte dental, hidroxiapatita, precursores.

ABSTRACT

The hydroxyapatite is an important structural component of mineral tissues and a great deal for researchers because its biocompatibility, which have biomedical applications in Dentistry, Orthopedics, and Maxillofacial Chirurgic. Hydroxyapatite is the main crystal of hard tissues, bone and teeth. There are many experimental investigations on this crystal that includes its nucleation, growth, and morphology, and thermodynamics behavior. In nature it is found in sedimentary rocks. As biomaterial, hydroxyapatite and its precursors are synthesized from sea shells, and corals. Hydroxyapatite has many perspectives in medicine and it will be an important element for the medicine genomic. In this work we review and go trough the study of hydroxyapatite given an example of its analysis in the field of human tooth enamel.

Key Words: Biomaterials, human tooth enamel, hydroxyapatite, precursors.

INTRODUCCIÓN

La hidroxiapatita (HAP) es un biocristal, formado por átomos de calcio, fósforo, e hidrógeno, de acuerdo con la fórmula $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{HO})_2$. La HAP está presente en dientes y huesos confiriéndoles su dureza característica, pertenece a la familia de las apatitas, presenta una estructura hexagonal, con el grupo espacial $P6_3/m$ (Fig. 1). En la naturaleza las apatitas se pueden encontrar formando parte de las rocas sedimentarias y metamórficas¹. En los huesos está

Nota: Artículo recibido el 09 de octubre de 2006 y aceptado el 14 de noviembre de 2006.

siempre acompañada de estructuras orgánicas como la colágena². Otras apatitas de importancia biológica son la fluroapatita y la cloroapatita³⁻⁵.

Los principales componentes químicos de la hidroxiapatita son el calcio y el fosfato. Sin embargo, la HAP natural contiene porcentajes mínimos de sodio, cloro, carbonatos y magnesio, los cuales juegan un papel preponderante en la función remodeladora del hueso⁶. Por esta razón, no se le considera una apatita pura. Las hidroxiapatitas sintéticas, que se obtienen a partir de fosfatos dicálcicos y tricálcicos a través de un proceso de síntesis

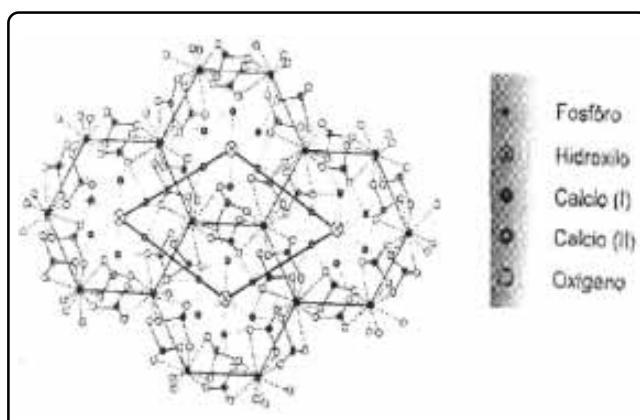


Figura 1. Arreglo atómico en la celda unitaria hexagonal de la hidroxiapatita, mostrando las posiciones atómicas del Ca, P, O e H dentro de la celda unitaria.

relativamente simple, presentan una pobre resistencia mecánica, además de disolverse fácilmente, lo cual no es deseable para utilizarla como biomaterial de sustitución ósea⁷. Si la hidroxiapatita biológica se combina con sustancias extraídas del mismo paciente, como el plasma rico en plaquetas, los resultados se optimizan sobre todo en la osteorregeneración⁸⁻¹¹

La HAP, o sus precursores, también se pueden encontrar en exoesqueletos como el de la estrella de mar *Mellita sp*, en los corales marinos, en los esqueletos de los vertebrados, en el esmalte y dentina de los dientes, en especies de bovinos y porcinos (Fig. 2).

El esmalte y la dentina de los dientes y el esqueleto son tejidos mineralizados. La función del esqueleto es, entre otras, de soporte y protección, mientras que para los dientes, su función es alimenticia. Cuando el calcio se unió a los fosfatos y carbonatos, en un inicio evolutivo se formaron exoesqueletos protectores y dientes que no requirieron la presencia de mandíbulas, como en la *lamprea*. En algunos animales sin esqueleto el músculo actúa como una epidermis endurecida o sobre una cavidad corporal llena de líquido. En animales más complejos los músculos actúan sobre estructuras duras compuestas de quitina, y en los vertebrados los músculos se insertan sobre los huesos, transmiten la contracción del tejido muscular y la transforma en la variedad de movimientos que el animal realiza. El esqueleto además

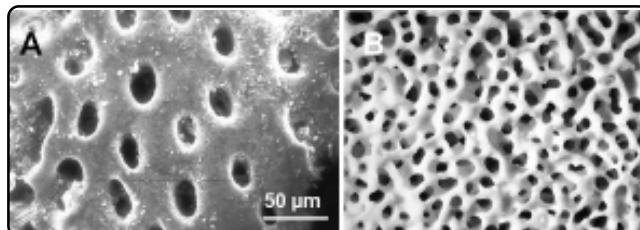


Figura 2. Imágenes de MEB del esqueleto de la estrella de mar *Mellita* (A) y del esqueleto del coral (B). Ambas estructuras son fuente de materia prima para la obtención de la HAP y precursores.

participa en el sostén del animal y protege los órganos internos¹². En los vertebrados, y sobre todo en seres humanos, el hueso se vuelve un importante almacén de calcio, y la parte medular ósea es formadora de sangre⁶.

En el esqueleto humano existe una gran variedad de formas óseas, tamaños, y dureza. Huesecillos tan pequeños como un grano de arroz, los encontramos en el oído medio, tan largos de hasta casi medio metro o más, como el fémur, o de forma tan sofisticada como el esfenoides, que es un hueso nasal, hasta la simpleza de un hueso plano craneal. Algunos huesos son tan delgados como una hoja de papel, tal es el caso del hueso orbitario, y algunos tan gruesos y duros como la zona petrosa del mastoides; cada uno de estos huesos están diseñado con precisión genética¹³.

Tanto los huesos como la parte mineralizada de los dientes no son estáticos, sino que existe una importante dinámica que cambia a lo largo de la vida. Cuando los tejidos quedan diferenciados, después de la adolescencia, la dinámica es mantener la forma y función mediante actividades nerviosas y hormonales. Dicha actividad requiere de órganos como el riñón, el intestino y el hígado, así como la estimulación adecuada de los rayos ultravioleta del sol sobre la piel^{6,13}.

CALCIO, FOSFATOS, MAGNESIO Y TEJIDOS MINERALIZADOS

Antes de entender cuál es el comportamiento de la HAP en tejidos estructurados con comportamiento complicado es necesario entender de dónde proviene este interesante cristal. Todo empieza por el calcio. El calcio es un elemento con gran relevancia, no sólo para la estructura y el funcionamiento posterior de los tejidos mineralizados, sino también acompañando la función integral de los individuos. Es un elemento esencial para que los individuos vivan y tengan excitabilidad nerviosa, contracciones musculares, paso de sustancias a través de sus membranas, y actividad hormonal. En los humanos el calcio ocupa el quinto lugar en importancia de los elementos que lo componen, atrás del sodio y del potasio, y es el tercer catión más importante en el espacio extracelular. El 99% del calcio en humanos se haya en huesos y dientes como parte de la HAP y el 1% se encuentra en el líquido extracelular⁶.

La constancia del calcio extracelular está regulada de manera muy precisa, ya que presenta un papel clave en muchos procesos fisiológicos: por ejemplo, si aumenta por arriba de sus valores normales se da lugar a una depresión progresiva del sistema nervioso y la disminución del calcio sistémico da lugar a la tetania¹². El calcio, por su tamaño y radio atómico, es el catión más importante en el líquido extracelular para mantener la constancia homeostática de los individuos así como para el transporte de sustancias, bombas metabólicas, actividades excitables y mecánicas en nervios y músculos. Sin calcio no se efectuarían estas actividades.

El metabolismo del calcio es complicado. La acción de los rayos ultravioleta sobre la piel acciona la síntesis de la vitamina D, conjuntamente con el funcionamiento del hígado, intestino y riñón, con el delicado control endocrino de las glándulas tiroides y paratiroides. Todos estos sistemas son dinámicos, presentan una remodelación constante, el hueso viejo es digerido y el hueso nuevo se sintetiza con una acción combinada de los osteoclastos y los osteoblastos. Lo mismo ocurre en el esmalte y la dentina, pero en este caso se llaman odontoclastos y osteoclastos, por lo que concluimos que la conservación de forma y función ósea y dental son totalmente dinámicas, interviniendo hormonas como la somatotrofina u hormona del crecimiento⁶.

Podríamos en este espacio preguntarnos cómo surge HAP. Esta cuestión ha sido analizada en las diferentes líneas de investigación acerca de la biominerización. Se sabe mucho acerca de los tejidos biominerizados y cómo varía en los diferentes organismos. Sin embargo, se sabe muy poco acerca de los aspectos moleculares y su interacción, del control genético y celular. Algunos investigadores proponen modelos explicando que este evento evolutivo se observa en las bacterias magnéticas que inducen biológicamente la mineralización¹³. Los carbonatos de calcio constituyen la parte protectora de los huevos, por ejemplo; la quitina que forma parte de los exoesqueletos, etc.¹⁴

En el caso del fósforo, para los tejidos mineralizados tiene una regulación estricta. En las células, el fósforo participa en una gran cantidad de funciones, ya que forman parte de la estructura del ATP, almacenan y transducen la energía química mediante la fosforilación y la desfosforilación de proteínas. También los fosfatos forman parte del ADN y el ARN, por lo que son indispensables para la transmisión y codificación genética. Forman parte del AMPc que es un segundo mensajero indispensable para la formación de hormonas.

La presencia de magnesio en tejidos mineralizados es importante a pesar de que existe en pocas cantidades, ya que la mineralización ósea es dependiente del Mg. En el ser humano el magnesio se encuentra en aproximadamente 50 g de los cuales el 50%, se encuentra en el sistema óseo. Este ión divalente se convierte en indispensable ya que muchas reacciones de segundo mensajero o de transducción se llevan a cabo sólo en su presencia¹⁵.

COMPORTAMIENTO TÉRMICO DE LA HAP

La forma de estudiar tejidos mineralizados ha constituido un reto para los investigadores, ya que se han tenido que diseñar técnicas especiales para los tratamientos histológicos y preparación de muestras para Microscopía Electrónica. Estas preparaciones son diferentes a las técnicas de preparación de los tejidos blandos. La aplicación de técnicas espectroscópicas y de análisis químicos para conocer el comportamiento de este dinámico cristal se han desarrollado en paralelo con los avances tecnológicos. A partir de las variaciones térmicas en el esmalte dental humano, los investigadores concluyeron que este material responde como conductor en un punto crítico de 200°C, además se demostró por rayos X que la estructura hexagonal se vuelve más definida¹⁶.

Con las técnicas de rayos X y análisis químico, Ramer¹⁷ observó las fases del esmalte, dentina y hueso, e identificó los componentes de fosfatos de calcio, con estructura de la HAP (Fig. 3).

Las aplicaciones de temperatura en huesos han servido para determinar la edad de los individuos. Hortner (1999) propone que con el análisis del tratamiento térmico del tejido óseo se puede determinar el envejecimiento; los autores sugieren que con los cambios ultraestructurales y de fase en el rango de 600 a 1400°C están influenciados por la edad del individuo, ya que el tamaño de los cristales es dependiente tanto del tratamiento térmico como de la edad¹⁷. A partir de los 600°C la cristalinidad del mineral

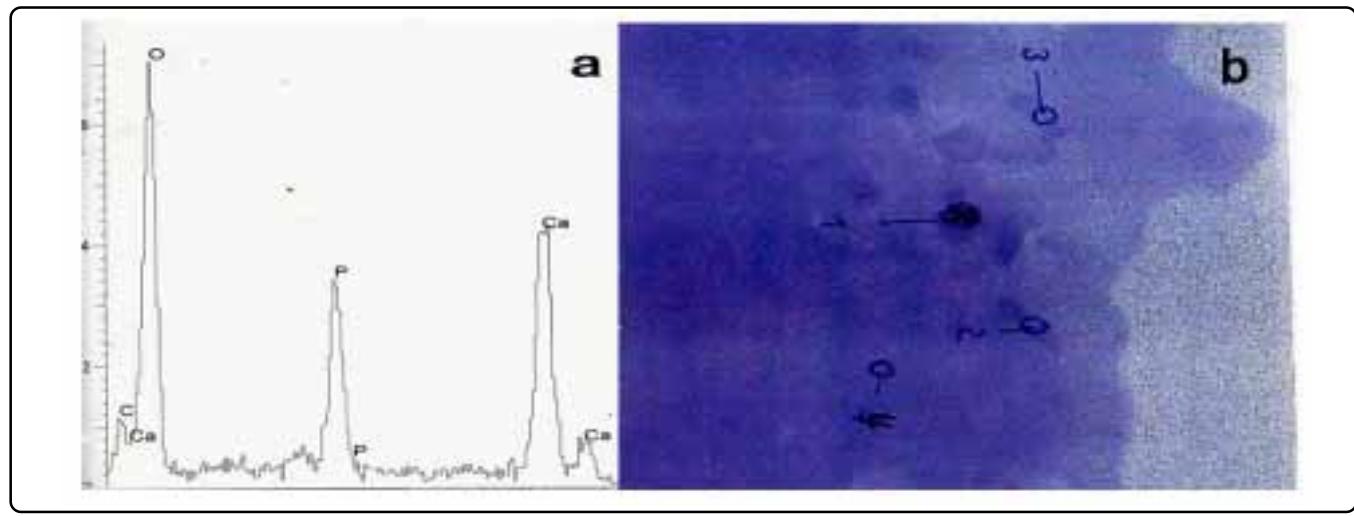


Figura 3. A) Espectro de rayos X característicos (EDS) del esmalte dental humano. Se observa la presencia de Ca, P y O. B) Imagen de MET del esmalte dental humano.

óseo se incrementa dando como resultado una mejor caracterización de la HAP por los estudios de rayos X. Los autores reportan también que hay una descomposición parcial de la fase de hidroxiapatita a óxido de calcio arriba de los 1000°C, de alfa fosfato tricálcico a beta fosfato tricálcico y fosfato de óxido de calcio entre los 1200° y 1400°C, lo que indica que la fase original de la apatita es deficiente en calcio con contenidos de carbonato¹⁸. Actualmente se utiliza la espectroscopía Raman para relacionar la estructura con las reacciones químicas describiendo la dinámica de comportamiento en situaciones experimentales, que ayudan al avance de ciencia básica como de ciencia pura¹⁹.

LA HIDROXIAPATITA Y LA COLÁGENA

El cristal de HAP crece y se compacta para dar dureza tanto al hueso como al diente. El crecimiento lo logra dentro de los seres vivos mediante un complicado proceso que se asocia con la presencia de colágena (Fig. 4). La acción de la colágena sirve de molde para dar lugar al nuevo cristal que crecerá y se diferenciará para establecer en las regiones más externas, las de mayor dureza, mediante un proceso de remodelación. El inicio de la cristalización de la HAP sucede en etapas embrionarias y fetales. Se ha demostrado que en la vida fetal de los ratones este proceso aparece a los 19 días de gestación. De esta manera cabe suponer el inicio de la remodelación constante del diente ocurrir en el tejido óseo, ya que se remoldela a lo largo de la vida^{20,21}.

Los dientes presentan diferentes formas con un diseño adecuado para su función, ya sea cortar, rasgar, triturar y moler. El esqueleto presenta una actividad en el diseño ontogenético y filogenético, con un orden genético que dará lugar exactamente al diente, hueso o tejido mineralizado con el diseño exacto y requerido por la naturaleza, acompañado también con sustancias orgánicas que constituyen una matriz con la que interacciona²². Como ya hemos analizado, la HAP es el principal componente, el más

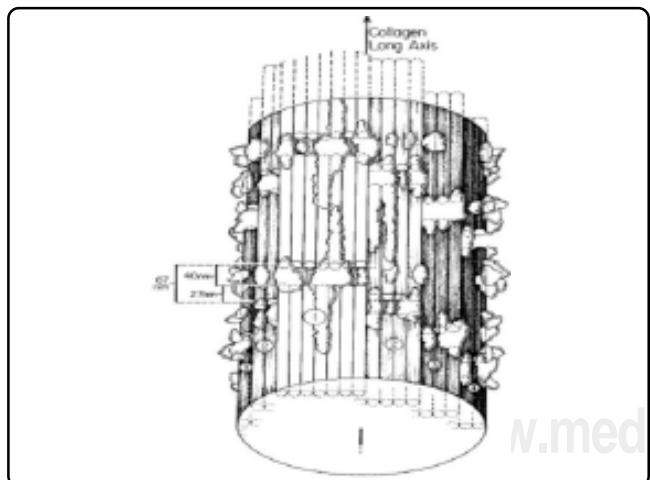


Figura 4. Esquematización del crecimiento de la HAP con fibras de colágena descrita en tendones de tortuga por Landis y col.²

importante, para el soporte de los tejidos mineralizados. En los huesos aparece como el soporte rígido-elástico¹⁹, acompañado de las columnas fibrosas de colágena que constituyen el soporte elástico, formando los conductos de Havers en cuyo centro viajan vasos y nervios.

Tanto huesos y dientes presentan una actividad continua remodeladora, su función no es solamente mecánica. Además de las etapas de crecimiento donde se incrementa la actividad existen en todas las edades una función muy importante de mantenimiento de la forma y de la función. Las células están diseñadas para llevar a cabo la remodelación, el hueso viejo es digerido por los osteoclastos (Fig. 5) y el nuevo hueso se sintetiza por los osteoblastos. El mismo diseño se sigue para el tejido dental; el tejido aquí es más duro y compacto sobre todo en el esmalte dental que constituye el tejido más duro del cuerpo humano. Se han aplicado proteínas morfogenéticas óseas para observar la respuesta en el órgano dental y establecer de manera congruente los mecanismos de ingeniería tisular en la aplicación y en la regeneración tisular guiada en la regeneración de tejidos²³ (Fig. 6).

Es importante considerar cómo se establece la relación entre la colágena y la HAP, ya que se les correlaciona de manera directa para la formación de los nuevos cristales. Comúnmente se asocian los nuevos biocróstales a fases orgánicas. De manera experimental se han crecido *in vitro* cristales de HAP colocando carbonatos de calcio en geles de sílice. El crecimiento se logra por la asociación de los geles de sílice que constituyen una base

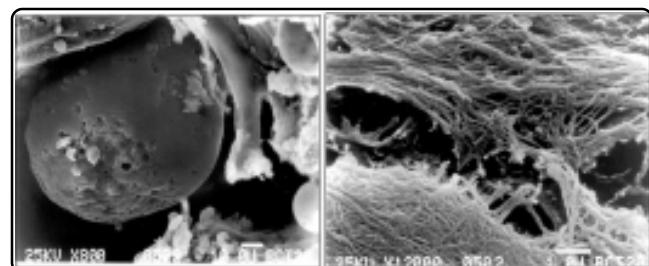


Figura 5. Fisiología ósea equilibrada que muestra un acercamiento de un osteoclasto activo y fibras de colágena importantes en la remodelación ósea.

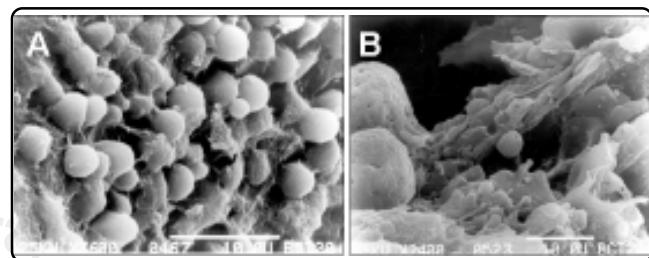


Figura 6. Imágenes de MEB de osteorregeneración mostrando fibras organizadas de colágena y células remodeladoras. En (B) se observan dos osteoclastos demostrando actividad remodeladora ósea.

orgánica¹⁵. En este tipo de investigaciones se ha observado que la precipitación de los fosfatos de calcio está directamente relacionada con la mineralización^{16,17}.

En experimentos actuales se investiga mediante tratamientos térmicos el comportamiento de la fase mineral, para describir de esta manera los cambios que existen en los hidroxilos que componen la HAP, el medio ambiente acuoso y las columnas de colágena, habiéndose comprobado que, a pesar de su composición orgánica, la colágena persiste a lo largo de un tratamiento térmico hasta 400°C^{18,20}.

COMPORTAMIENTO DE LA HIDROXIAPATITA COMO BIOMATERIAL

La HAP es un biomaterial por excelencia. Las investigaciones acerca de la no estequiometría y de la asociación con algunos elementos traza en las apatitas biológicas han sido de enorme relevancia para la investigación de biomateriales que se han utilizado en odontología y ortopedia²².

La HAP es un cristal biocompatible que ha incursionado en la biomedicina como restaurador, se utiliza en ortopedia, odontología y en oftalmología. En ortopedia ha dado excelentes resultados la hidroxiapatita bovina, porcina, y humana. Se han probado también precursores como los fosfatos y carbonatos de calcio sobre todo en la práctica odontológica. Los resultados no dan una forma óptima en el comportamiento de la reparación de los tejidos a pesar de ser compatibles, sin embargo, es necesaria la investigación pura para dilucidar cuáles son los mejores mecanismos de obtención y combinación con otros elementos. Además de conocer la forma de respuesta de los tejidos en una secuencia ordenada²³, es necesario obtener, con base en la ingeniería tisular, avances en la regeneración tisular guiada para que estos biomateriales con diseños adecuados sean útiles²⁰⁻²⁴.

Por otro lado, es importante conocer a este cristal de HAP. Las investigaciones del esmalte dental humano han dado luz al conocimiento de la estructura, origen y función. Con el diseño de técnicas para microscopía electrónica los avances han ido más allá de la clásica descripción de forma de cerradura compactada en un arreglo hexagonal. Si se realiza una observación longitudinal entre la unión del esmalte y la dentina se aprecian estructuras longitudinales en forma de varillas micrométricas, a las que se les ha denominado prismas (Fig. 7). Con observaciones a mayor amplificación usando microscopía electrónica de transmisión (MET), se observan gran cantidad de cristales nanométricos que corresponden a la HAP (Fig. 8), los cuales al ser observados con microscopía de alta resolución (Fig. 9), este cristal presenta la línea oscura que ha sido motivo de múltiples investigaciones^{16,20,25}. Los cristales de HAP están embebidos en material orgánico¹⁹. El conocimiento de este cristal puede generar aplicaciones en biomateriales de materiales de HAP que superen la etapa de que sólo se utilicen como relleno.

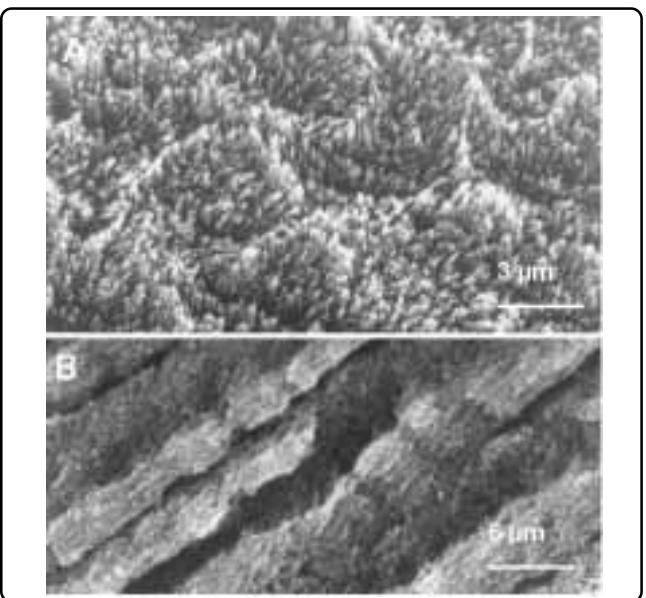


Figura 7. Imágenes de MEB de los prismas del esmalte dental humano en sección transversal (A) y en sección longitudinal (B). En (A) los prismas tienen forma de "cerradura" mientras que en sección longitudinal corren de la unión amelo-dentinaria hacia la superficie del esmalte.

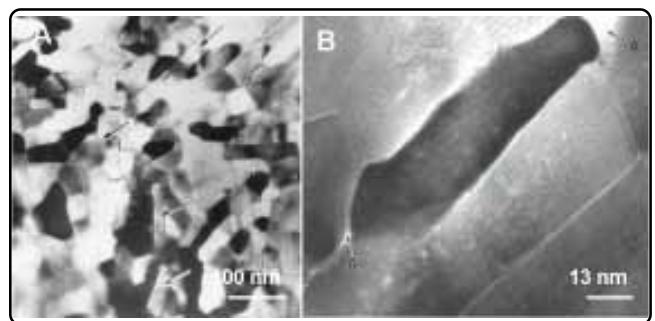


Figura 8. A) Imágenes de MET de los cristales que conforman los prismas del esmalte dental humano. B) A mayor amplificación. Nótese la presencia de la línea oscura (indicada por flechas en (A)) y la existencia de material orgánico rodeando los cristales de HAP (indicado por flechas con la letra "A").

La HAP de diferentes orígenes (bovina, porcina, sintética, coralina, etc.) no se puede utilizar en todo tipo de restauración, ni en las diferentes edades, ya que cambia la respuesta fisiológica ante la dinámica de respuesta en los diferentes sujetos. De tal manera que la HAP coralina no es un buen material en odontología, sin embargo es útil en oftalmología²⁶. También da buenos resultados en prótesis oculares con movimientos conjugados. La HAP de bovinos es útil para reparaciones óseas, aunque no da buenos resultados como rellenos dentales. En todo caso se debe tomar en cuenta la extensión de la reparación, ya que en huesos como la cabeza del fémur da mejores resultados en la reparación con metales como el acero o el titanio, en cambio en la implantación de HAP en prótesis metálicas no da buenos resultados, como tampoco en prótesis de huesos, ni en los implantes dentales.

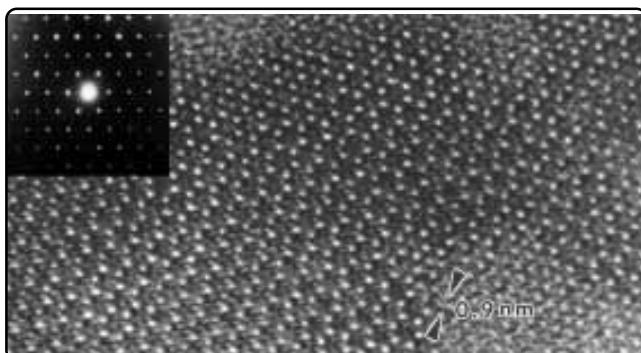


Figura 9. Imagen de MET de alta resolución de uno de los cristales que se muestran en la figura 8. La figura insertada presenta el patrón de difracción de los electrones del cristal en la dirección hexagonal.

Sin embargo, se deben considerar aspectos físicos y químicos importantes del comportamiento de la HAP en su aplicación como biomaterial, tales como resistencia, dureza, porosidad, disolución, adhesividad, etc. No se debe dejar de lado la versatilidad ósea o la intención de su utilización, ya que el medio donde se va a colocar presenta características específicas, considerando que no es lo mismo la utilización como relleno, como soporte o como sustituto. Es difícil actualmente pensar elaborar un órgano dentario completo o la totalidad de un hueso por la gran complejidad de estos sistemas en cuanto a su vascularización, inervación e interacción homeostática tanto con el sistema glandular como con el sistema nervioso, aunque la genómica ofrece perspectivas que pueden llegar a la reparación del hombre por sí mismo utilizando sus propias células madre^{23,27,28}.

AGRADECIMIENTOS

Nuestro agradecimiento a las siguientes personas: Pedro Mexía, Samuel Tehuacanero, Roberto Hernández, Silvia Antuna y Antonio Gómez, por el apoyo técnico para la elaboración de este trabajo. A la M. en O. Ivet Gil Chavarría, M. en O. Mauricio Castaño Mesa, la Dra. Marcela Aguilary al Dr. Ramiro García por sus comentarios y finalmente a la DGAPA-UNAM por el apoyo financiero a través del proyecto IN-117906.

REFERENCIAS

- Smith Deanne, K. Calcium phosphate apatites in nature. In Hydroxyapatite and related materials (eds. Browns, P.W. & Constantz, B., 1995) 46-52 (CRC Press, London, 2000).
- Landis, W.J., et al. Mineralization of collagen may occur on fibril surfaces evidence for conventional and hight voltage Electron Microscopy and three dimensional imaging. *J. Structural Biology* **117**, 24-35 (1996).
- Zapanta Legeros, R. Biological and synthetic apatites. In Hydroxyapatite and related materials (eds. Browns, P.W. & Constantz, B., 1995) 3-28 (CRC Press, London, 2000).
- Naray-Szabo, S. The structure of apatite $(\text{CaF})\text{Ca}_4(\text{PO}_4)_3$. *Z. Crist.* **75**, 387-398 (1992).
- De Jong, W.F. La substance minérale dans le os. *Rev. Tam. Chim.* **4**, (45), 448 (1926).
- Tresguerres, J.A.F. Fisiología humana (McGrawHill Interamericana, 2003) 2^a ed. pág. 983-1020.
- Takeshita, N., et al. Osteoclastic features of multinucleate giant cells responding to synthetic hydroxyapatite implanted in rat jaw bone. *J. Electron Microscopy* **41**, 141-146 (1992).
- Garg, A., Gangenese, D. & Peace, I. Using platelet rich plasma to develop an autologous membrane for growth factor delivery in dental implant therapy. *Dental Morphology Update* **11**, 6 (2000).
- Garg, A. Bone induction with and without membrane and using platelet rich plasma. *Oral Maxillofac. Surg. Clin. North Am.* **13**, 437-448 (2001).
- Max, R.E. & Gang, A.K. The science of platelet-rich plasma (II Quintaessence Pub. Co. Inc., 2005). pág. 3-49.
- Nakashima, M. & Redi, H. The application of bone morphogenetic proteins to dental tissue engineering. *Nature Biotechnology* **21**, 9 (2003).
- Solomon, P., Berg, L. & Martin, D.W. Biología (McGrawHill-Interamericana, México, 2001).
- Mann, S. Biomaterialization. Principles and concepts in bioinorganic materials chemistry (Oxford University Press, London, 2001).
- Brown, E.M. & McLeod, R.J. Extracellular calcium sensing and extracellular calcium signaling. *Physiol. Rev.* **81**, 239-297 (2001).
- Drucker Colín, R. Fisiología médica (Manual Moderno, México, 2005).
- Vargas-Ulloa, L., García-García, R. & Reyes-Gasga, J. Conductivity in human tooth enamel. *J. Materials Science* **34**, 2183-2188 (1999).
- Legeros, R.Z. Calcium phosphates in oral biology and medicine (S. Kangel, Switzerland, 1991).
- Holden, J.L. & Pharkey, J.G. Age and temperature related changes to the ultrastructure and composition of human bone mineral. *J. Bone and Mineral Research* **10(9)** Ireland Elsevier Sci. Blackwell Sci. (1995).
- Kothapalli, C., Wei, M., Vasiliev, A. & Shaw, M.T. Influence of temperature and concentration on the sintering behavior and mechanical properties of hydroxyapatite. *Acta Mineralia* **52**, 5635-5663 (2004).
- Belio-Reyes, A., Vargas-Ulloa, L., Jiménez-García, L.F. & Reyes-Gasga, J. Chemical analysis around the cristal dark line of the human tooth enamel crystallites. *Revista Latinoamericana de Metalurgia y Materiales* **19**, 52-56 (1999).
- Wan, H., et al. Enamel matrix protein interactions. *J. Bone and Material Research* **20**, 6 (2005).
- Ratner, D., Buddy & Hoffman, J.A. An introduction to materials in medicine (Academic Press, USA, 1996).
- Governa, M., et al. Hydroxyapatite orbital implant covered with facia lata, in post nucleation eye reconstruction. *Eur. J. Plast. Surg.* **26**, 331-334 (2003).
- Lavernia, C. & Shoenung, J.M. Calcium phosphate ceramics as bone substitutes. *Am. Ceram. Soc. Bull.* **70**, 95-100 (1991).
- Vargas-Ulloa, L., García-García, R., & Reyes-Gasga, J. *In situ* observation on fractal structures and electrical conductivity in human tooth enamel characterized by electron microscopy. *Acta Microscópica* **6**, 1-10 (1997).
- Duailibi, M.T., et al. Bioengineered Teeth from cultured rat tooth bud cells. *J. Dent. Res.* **83**, 523-528 (2004).
- Karsenty, G. The genetic transformation of bone biology. *Genes and Development* **13**, 3037-3051 (1999).
- Yamamoto, M. et al. Analysis of tooth formation by re-aggregated dental mesenchyme from mouse embryo. *J. Electron Microsc. (Tokyo)* **52**, 559-566 (2003).