

Análisis semicuantitativo del calcio y fósforo en los tejidos calcificados de la mandíbula

HENRÍQUEZ-TÁVARA N; GARCÍA-MOLINA JA; GRECO-MACHADO Y; CARVALHO-LOBATO P;
BELMONTE-CALDERÓN A; SERRA-RENOM I; MANZANARES-CÉSPEDES MC.

Unidad de Anatomía Humana
Departamento de Anatomía y Embriología Humana.
Universidad de Barcelona, España.

Resumen

El objetivo de nuestra investigación es realizar un estudio microanalítico semicuantitativo del calcio y el fósforo en los tejidos calcificados de la mandíbula. Dentro de este estudio se pretende calcular el valor de la ratio Ca/P por métodos semicuantitativos y compararlo con los valores estequiométricos de la ratio Ca/P de la hidroxiapatita referidos en la literatura; conocer los valores de la ratio Ca/P obtenidos para el tejido condroide, el hueso lamelar, el hueso fibrorreticular y el cartilago calcificado en las muestras fetales, por una parte, y adultas, por otra; y si existen o no diferencias significativas en la proporción Ca/P obtenidos para feto y adulto. El análisis morfológico de los tejidos calcificados fue realizado por medio de Microrradiografía Electrónica de Barrido (MEB) por electrones retrodispersados (Backscattering), y los resultados permiten afirmar que la ratio obtenida por análisis semicuantitativo mediante dispersión de rayos X de los tejidos calcificados (condroide, hueso lamelar y fibrorreticular) se encuentra más próxima a 1, y que no existen diferencias significativas entre las muestras fetales y de adulto en los tejidos analizados.

Palabras Clave: tejidos calcificados, microscopía electrónica de barrido, retrodispersión, análisis semicuantitativo.

Abstract

The aim of the current investigation is to carry out a semiquantitative microanalysis study of calcium and phosphorus in the calcified tissues from the jaw. This study is aimed first, to estimate the value from the Ca/P ratio by semiquantitative methods and compare it with the stoichiometric values from the Ca/P ratio for hydroxyapatite referred by the literature; to know the Ca/P ratio values measured in the condroid tissue, lamellar bone, woven bone and calcified cartilage at the foetal and adult samples; and if significant differences at the Ca/P proportion obtained for foetal and adult samples are found. The morfologic analysis of calcified tissues was done through scanning electron microscopy (SEM) by backscattered electrons, and the results showed that the ratio obtained by semiquantitative analysis by means of X ray electron dispersion of the calcified tissues (condroid, lamellar bone, and woven bone) is close to 1. No significant differences between the foetus and adult samples at the analyzed tissues were found.

Key words: calcified tissues, scanning electron microscopy (SEM), backscattering, semiquantitative analysis.

Correspondencia:

M^a Cristina Manzanares Céspedes
Unidad de Anatomía, Campus de Bellvitge-UB
Pavelló de Govern, 5^a planta, despatx 5305
08907 L'Hospitalet de Llobregat, España.
Teléfono: 93-4024261
Fax: 93-4029082
e-mail: cmanzan@bellvitge.bvg.ub.es

Introducción

El hueso es una combinación única de células de muchos tipos, las cuales sintetizan un característico subgrupo de componentes de tejido conectivo¹. Además de las funciones del hueso obviamente relacionadas con el esqueleto (soporte, protección y locomoción), el hueso es un importante reservorio de elementos hematopoyéticos, células madre y minerales. Almacena el 99% del calcio del cuerpo, 80% del fosfato y un alto porcentaje de las reservas de magnesio, sodio y carbonato; actúa como un mecanismo de defensa contra la acidosis y asiste al sistema renal y respiratorio a mantener el balance ácido-básico².

El tejido óseo contiene un 60% de sustancias minerales, 20% de agua y 20% de componentes orgánicos. Alrededor del 90% de la matriz orgánica del tejido óseo está representado por fibras de colágeno tipo I y el 10% restante por sustancias no colágenas; de ellas el 8% son glicoproteínas, fosfoproteínas y proteoglicanos y el 2% restante compuestos que aún no han podido ser caracterizados³.

Para el análisis microscópico de los tejidos calcificados, a diferencia de otras técnicas histológicas tanto clásicas⁴ como las más recientemente utilizadas, donde los tejidos sufren una decalcificación mediante sustancias fijadoras⁵⁻⁶, nuestra investigación propone utilizar un método que permita dicho análisis sin que los tejidos tengan que ser previamente sometidos a decalcificación⁷. Otras técnicas de evaluación de la calcificación como la microrradiografía requieren secciones muy finas, ya que los niveles de gris están directamente relacionados con el espesor y la densidad de la muestra. La microrradiografía está basada en los diferentes grados de absorción de los rayos X que pasan a través de las muestras, y ha venido siendo utilizada desde 1952 para visualizar la mineralización del hueso y también cuantificarla⁸. Más recientemente se han puesto en práctica nuevos métodos para la determinación de la *ratio* Ca/P del hueso, uno de ellos la absorciometría por rayos X empleado recientemente por Fountos y Tzaphlidou⁹

Dentro del estudio microanalítico se pretende llegar a un valor aproximado de la *ratio* Ca/P de cada tejido calcificado presente en nuestras muestras y compararlos con valores estequiométricos obtenidos para la *ratio* Ca/P de la hidroxapatita¹⁰ siendo este de alrededor de 1,6. Se pretende en otro punto conocer si existen o no diferencias significativas en la proporción Ca/P obtenidos para los tejidos

calcificados presentes en las muestras fetales por una parte, y adultas por otra: el tejido condroide, el hueso lamelar, el hueso fibrorreticular y el cartílago calcificado.

Material y métodos

Se eligieron 30 ratas Wistar como especímenes adultos que permanecieron en el Estabulario de la Universidad de Barcelona hasta tener la edad de seis semanas, edad a la que son ya consideradas adultas. Las ratas fueron alimentadas de forma convencional y sacrificadas a las seis semanas (por sobredosis anestésica según especificaciones legales) para realizar los cortes específicos. Como material fetal se utilizaron diferentes preparaciones provenientes de feto humano lo suficientemente desarrollados como para presentar material óseo en su constitución¹¹. Los fetos seleccionados de la colección del Departamento de Anatomía y Embriología de la Universidad de Barcelona, tenían unas medidas de 22, 23, 25 y 37 centímetros de distancia vértex-coccis. Se realizaron las secciones de las cabezas de las ratas adultas y de las mandíbulas fetales en sentido sagital para preservar al máximo todos los tejidos de la mandíbula y observar en su conjunto dientes, alvéolos y rama mandibular ascendente por medio de un sistema de sierra de banda (EXAKT, Nordenstedt, Alemania).

Las muestras deshidratadas fueron sumergidas en un medio de inclusión (Tecnovit T7200, Kulzer, Wehrheim, Alemania), y seguidamente se llevó a cabo el proceso de fotopolimerización automático durante 8 horas a una temperatura menor de 40°C. Los bloques de tejidos polimerizados fueron micropulidos para obtener una superficie perfectamente plana, lo que permite el estudio mediante electrones retrodispersados sin efectos artefactuales.

Para la observación por Microscopía Electrónica de Barrido, observación más utilizada por los diferentes autores para el análisis de la sustancia inorgánica de los tejidos óseos¹², las muestras fueron recubiertas con un material conductor específico (carbono coloidal) que no enmascara el espectro microanalítico del fosfato.

El método empleado para la adquisición de los espectros fue el siguiente: Se colocó la muestra en el MEB y se esperó unos 15 minutos a que se realizara el vacío. Se introdujeron las constantes de estudio y definieron los intervalos para la obtención de los espectros con ayuda del detector de microanálisis por separación de energía de rayos X

(AN-10000, LINK-OXFORD, Inglaterra). Se visualizó la muestra por backscattering en busca de zonas de hueso fibrorreticular, zonas de hueso lamelar, zonas de cartílago calcificado y zonas de tejido condroide del área mandibular. Localizada la zona del tejido a analizar se llevó el haz electrónico de observación a 75.000 aumentos, se comprobó la corriente de sonda y se realizó la adquisición del espectro microanalítico, como mínimo con cinco lecturas de cada zona para aumentar la fiabilidad de los datos. Se obtuvo un total de 3.700 lecturas, para todos los tejidos en todas las muestras.

Los datos fueron procesados con ayuda de los programas Symantec Great Works, Cricket y Statview del sistema Apple (Cupertino, California). Para obtener la relación calcio/fósforo se calculó el «background» o ruido de fondo del calcio y del fósforo por separado sumando el valor bruto y neto de cada elemento en el espectro y dividiéndolo después por el valor bruto, obteniendo el valor (pick-background) de cada elemento. Se repitió la misma operación para cada zona de tejido analizada y se estableció una relación entre el calcio y el fósforo

presente en dicho tejido para cada muestra (análisis semicuantitativo).

Todos los valores de las *ratios* Ca/P obtenidos fueron sometidos a un test de ANOVA con el fin de conocer si existen diferencias significativas para cada tejido entre las muestras fetales y las procedentes de tejido adulto, siguiendo el método descrito por Hong, Hengchang y Groot¹³.

Resultados

Para la *ratio* Ca/P se tomaron un total de 740 medidas de los diferentes tejidos óseos (condroide, lamelar, y fibrorreticular) tanto en feto como en adulto, cuya distribución se muestra en la Tabla 1. Los resultados obtenidos por Microanálisis son válidos y comparables ya que se han trabajado siempre con constantes determinadas: voltaje de aceleración, corriente de sonda, distancia de trabajo, ángulo sólido entre la muestra y el detector.

Una vez llevados a cabo los cálculos del test de ANOVA con un 99% de significación, el valor de Fisher PLSD en las Tablas 2, 3 y 4 nos señala que

Tabla 1: Distribución del número de medidas tomadas para la *ratio* Ca/P. Cada medida corresponde a la media de 5 lecturas obtenidas en el mismo tejido.

Medidas	Tejido Condroide	Tejido Fibrorreticular	Tejido Lamelar
Feto	95	115	80
Adulto	145	195	110

Tabla 2: One Factor ANOVA.

Valores obtenidos para la comparación entre tejido condroide fetal (fcon) y tejido condroide adulto (acon).

Comparison:	Mean Diff.:	Fisher PLSD	Scheffe F-test:	Dunnett t:
fcon vs. acon	1.123E-3	7.373E-3	.168	.409

Tabla 3: One Factor ANOVA.

Valores obtenidos para la comparación entre tejido fibrorreticular fetal (fwb) y tejido fibrorreticular adulto (awb).

Comparison:	Mean Diff.:	Fisher PLSD	Scheffe F-test:	Dunnett t:
fwb vs. awb	-7.409E-3	.012	2.522	1.588

Tabla 4: One Factor ANOVA.

Valores obtenidos para la comparación entre tejido lamelar fetal (flb) y tejido lamelar adulto (alb).

Comparison:	Mean Diff.:	Fisher PLSD	Scheffe F-test:	Dunnett t:
flb vs. alb	4.960E-3	7.497E-43	3.238	1.799

no existen diferencias estadísticamente significativas para la *ratio* Ca/P entre los tejidos fetales y adultos.

Por lo que hace a la *ratio* Ca/P entre los diferentes tejidos fetales analizados, habiendo realizado el cálculo de ANOVA con un 99% de significación, las Tablas 5, 6 y 7 señalan un valor de Fisher PLSD que indica que no existen diferencias estadísticamente significativas. En las muestras de especímenes adultos, el test de ANOVA con un 99%

de significación (Tablas 8, 9 y 10) indica que no existen diferencias estadísticamente significativas entre los tres tejidos analizados (condroide, hueso fibrorreticular y hueso lamelar).

Para el tejido condroide los valores semicuantitativos de la *ratio* Ca/P oscilan entre 1,05 y 1,11; y su media entre 1,07 y 1,075 (Gráfica 1). La Gráfica 2 indica que los valores de la *ratio* Ca/P para el hueso fibrorreticular oscilan entre 0,94 y 1,10; y su media entre 1,06 y 1,08. Y los valores de

Tabla 5: One Factor ANOVA.

Valores obtenidos para la comparación entre tejido condroide fetal (fcon) y tejido lamelar fetal (lbf).

Comparison:	Mean Diff.:	Fisher PLSD	Scheffe F-test:	Dunnett t:
fcon vs. lbf	-3.530E-3	.01	.997	.999

Tabla 6: One Factor ANOVA.

Valores obtenidos para la comparación entre tejido fibrorreticular fetal (wbf) y tejido lamelar fetal (lbf).

Comparison:	Mean Diff.:	Fisher PLSD	Scheffe F-test:	Dunnett t:
wbf vs. lbf	-.012	.019	2.915	1.707

Tabla 7: One Factor ANOVA.

Valores obtenidos para la comparación entre tejido condroide fetal (fcon) y tejido fibrorreticular fetal (wbf).

Comparison:	Mean Diff.:	Fisher PLSD	Scheffe F-test:	Dunnett t:
fcon vs. wbf	8.593E-3	.018	1.669	1.292

Tabla 8: One Factor ANOVA.

Valores obtenidos para la comparación entre tejido condroide adulto (acon) y tejido fibrorreticular adulto (wba).

Comparison:	Mean Diff.:	Fisher PLSD	Scheffe F-test:	Dunnett t:
acon vs. wba	6.0124E-5	5.349E-3	8.889E-4	.03

Tabla 9 : One Factor ANOVA.

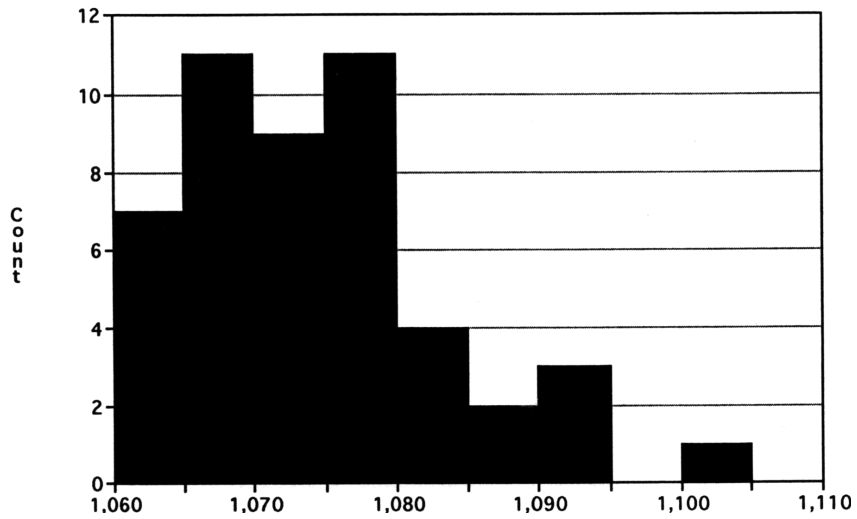
Valores obtenidos para la comparación entre tejido condroide adulto (acon) y tejido lamelar adulto (lba).

Comparison:	Mean Diff.:	Fisher PLSD	Scheffe F-test:	Dunnett t:
acon vs. lba	3.0721E-4	5.859E-3	.02	.141

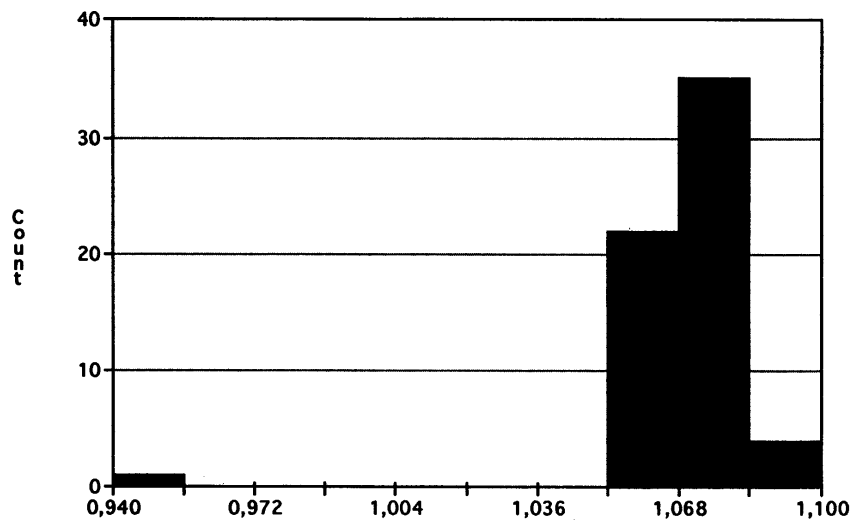
Tabla 10: One Factor ANOVA

Valores obtenidos para la comparación entre tejido lamelar adulto (lba) y tejido fibrorreticular adulto (wba).

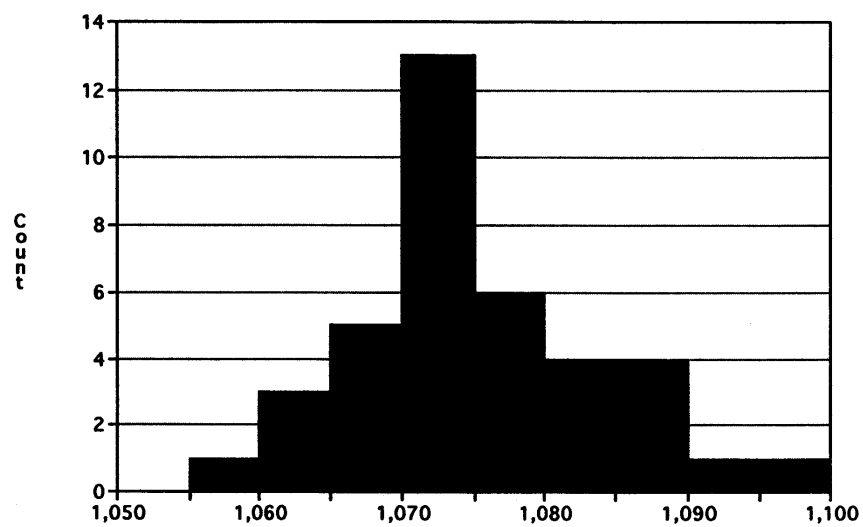
Comparison:	Mean Diff.:	Fisher PLSD	Scheffe F-test:	Dunnett t:
lba vs. wba	-2.4709E-4	5.717E-3	.013	.115



Gráfica 1: Distribución de los valores de la *ratio* Ca/P en el Tejido Condroides.



Gráfica 2: Distribución de los valores de la *ratio* Ca/P en el Tejido Fibrorreticular.



Gráfica 3: Distribución de los valores de la *ratio* Ca/P en el Tejido Lamelar.

la *ratio* Ca/P para el hueso lamelar oscilan entre 1,05 y 1,10; y una media que se encuentra entre 1,07 y 1,075 (Gráfica 3).

Comparando los valores obtenidos de la *ratio* Ca/P para los tejidos condroide, hueso lamelar y fibrorreticular (Gráficas 4, 5 y 6) se observa que los valores medios de la *ratio* Ca/P se encuentran alrededor de 1 (entre 0,94 y 1,11).

El proceso matemático de los datos ha reflejado que no existen diferencias significativas entre un grupo y otro, por lo que se podría concluir que una vez el tejido se ha calcificado es el mismo cualitativamente tanto en feto como en adulto. No se logró comparar los valores de cartilago calcificado obtenidos ya que el número de mediciones de los valores fetales no ha sido suficiente, lo que se atribuye al hecho de que los cortes de mandíbula observados están más cerca de la sínfisis mandibular que de la zona condilar, por lo que no se han encontrado datos suficientes para este tejido, cuya presencia es infrecuente en esta área¹⁴.

No existieron diferencias significativas entre las *ratios* Ca/P obtenidos para los tres tejidos (condroide, hueso lamelar, hueso fibrorreticular) ni en feto, ni tampoco en adulto.

Discusión y conclusiones

Los métodos clásicos comúnmente utilizados para el estudio microscópico de los tejidos tenían el inconveniente de tener que descalcificar los tejidos antes de su observación y análisis²⁻⁴⁻⁵. Esto permitía un buen análisis de la parte orgánica de los tejidos pero relegaba a un segundo plano la parte inorgánica. El método Exakt-Kultzer (Nordestedt, Alemania) permite la visualización directa de los tejidos sin tener que descalcificar el material. Gracias al sistema de sierra se consigue el corte preciso de los materiales incluidos en plásticos rígidos y con el pulido se puede rebajar la muestra hasta el punto necesario, de modo que puede ser visualizada tanto por Microscopía Óptica¹⁵

, previa tinción de las muestras, como por Microscopía Electrónica¹⁶, ya sea convencional o con electrones retrodispersados (Backscattering). La localización de los tejidos y su morfología han sido comprobados por retrodispersión obteniéndose una visualización comparable a la obtenida por microrradiografía en los trabajos de Goret-Nicaise¹⁴. Nuestros resultados, por tanto, se refieren a mediciones llevadas a cabo tras la identificación del tejido calcificado sometido a estudio.

El valor obtenido de la *ratio* Ca/P para los teji-

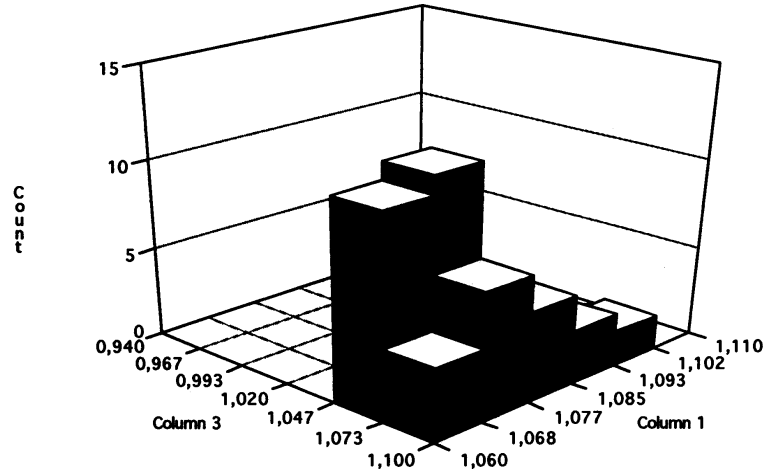
dos calcificados de la mandíbula que se han analizado, oscila entre 0,9 y 1,11. La media de los valores Ca/P para los tres tejidos tanto fetales como adultos se encuentra alrededor de 1,07. Los valores medios de la *ratio* Ca/P (0,9 y 1,11) se han comparado gráficamente con los valores de los tres tejidos analizados fetales y adultos, y se ha obtenido que el valor correspondiente a la *ratio* Ca/P no es el mismo que el que la literatura atribuye a la hidroxiapatita (1,67)¹⁰.

En este punto, las experiencias de Neuman y Bareham¹⁷ ya demostraron por un método indirecto que existía un fosfato cálcico secundario, la bruxita, aparte de la hidroxiapatita. Debido a que la bruxita se considera un componente inestable, daba un valor de la *ratio* Ca/P menor que el de la hidroxiapatita y ello podría disminuir la *ratio* Ca/P en los tejidos óseos analizados.

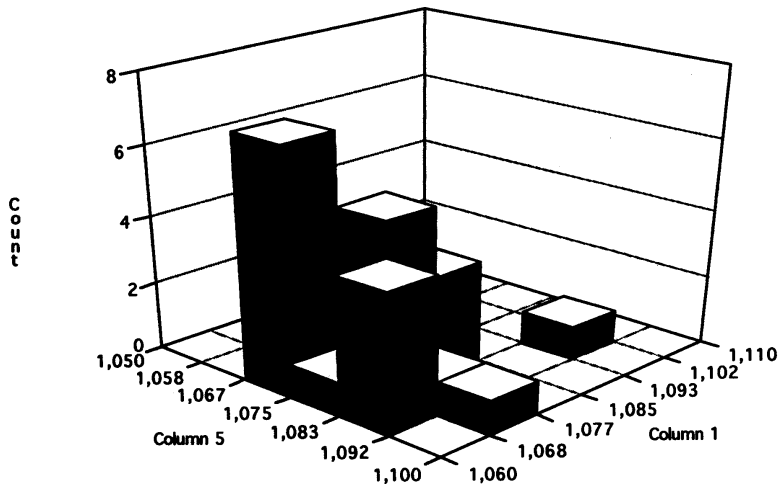
En 1.979 la bruxita pudo ser visualizada por Cristalografía por Rayos X en ciertos tejidos (tejidos poco mineralizados, hueso recientemente sintetizado con poco depósito mineral), aunque su significación no quedaba clara¹⁸, no se pudo identificar su localización exacta, las fases iniciales de la mineralización y su posible coexistencia con la hidroxiapatita en las mismas o localizaciones diferentes en el tejido calcificado. La localización de la fase mineral en el hueso es de vital importancia para asegurar sus funciones como reservorio iónico y su papel en la mineralización. Mediante técnicas de decalcificación, en las que aparecían unos espacios contiguos a las fibras de colágeno, se aseguraba que aquellos corresponden a la localización de la fase mineral¹⁸⁻¹⁹.

En 1.991 Iijima y cols.²⁰ propusieron la posible existencia de un precursor de fosfato octocálcico (de *ratio* Ca/P menor) observado por Microscopio Electrónico de Transmisión, que coexiste con la hidroxiapatita y que puede formar hidroxiapatita en presencia de flúor, sin embargo sus estudios fueron realizados *in vitro*. Nuestra investigación realizada sobre tejidos y de modo directo no se contradice con el trabajo de Iijima y cols.²⁰, ya que el fosfato cálcico, por tener una *ratio* menor a la de la hidroxiapatita podría hacer que el valor de la misma disminuyese hasta los valores obtenidos, de alrededor de 1.

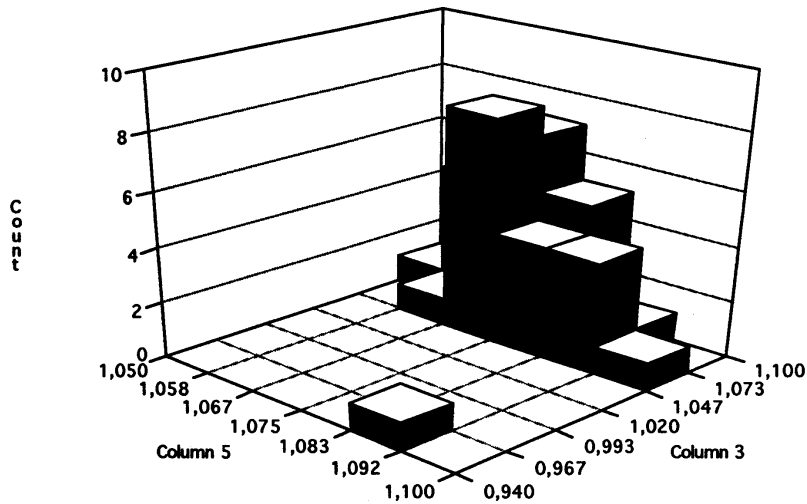
Glimcher¹⁹ en 1991 aseguraba que la fase mineral del hueso aparece depositada en forma de apatita pobremente cristalinizada (no hidroxiapatita) conteniendo carbonato al 5% y fosfato entre 5 y 10%. Con el tiempo la *ratio* Ca/P se acercaba a los valores aproximados de la hidroxiapatita (1,67)



Gráfica 4: Comparación de los valores de la *ratio* Ca/P para el Tejido Condroides y el Tejido Fibrorreticular.



Gráfica 5: Comparación de los valores de la *ratio* Ca/P para el Tejido Condroides y el Tejido Lamelar.



Gráfica 6: Comparación de los valores de la *ratio* Ca/P para el Tejido Fibrorreticular y el Tejido Lamelar.

cuyo contenido en carbonato aumentaba al tiempo que disminuye el fosfato.

En 1992 Roberts y cols.²¹ realizaron un estudio por resonancia nuclear magnética (RNM) y difracción de rayos X de fracciones de huesos embrionarios, encontrando en un principio una apatita pobremente cristalinizada, la cual pudiese ser la causa de disminución de la *ratio* Ca/P observada en nuestra investigación.

Sin embargo, los datos que se exponen en este trabajo demuestran que en el tejido analizado por método directo y no decalcificado el valor de la *ratio* tanto en tejido fetal como en adulto no es de 1,67 sino de alrededor de 1 (0,9-1,1), con lo que el valor de la *ratio* Ca/P se mantiene en el tiempo, siendo además el mismo para todos los tejidos calcificados.

Estudios realizados por Ducheyne y cols.¹⁰ aseguran que el valor estequiométrico de la hidroxiapatita es de 1,67. Sin embargo, más recientemente Zaichick y Tzaphlidou²² han atribuido a la hidroxiapatita un valor estequiométrico de 2,16 y además en sus resultados las *ratios* Ca/P obtenidas mediante análisis de activación de neutrones, oscilan entre 0,98 y 2,85 para el tejido óseo lamelar adulto. En nuestro estudio, de forma homogénea, la *ratio* Ca/P en los tejidos calcificados (condroide, hueso lamelar y fibrorreticular) se encuentra más próximo a 1. Esto no se explica sino con la existencia de otro compuesto coexistente con la hidroxiapatita y responsable de la calcificación de los tejidos con un valor de la *ratio* Ca/P menor que hiciera disminuir la *ratio* Ca/P total en el tejido.

No hemos encontrado diferencias significativas entre las muestras fetales y de adulto en ninguno de los tres tejidos analizados, lo que está también en concordancia con la más reciente literatura²², por lo que podemos concluir que la calcificación de todos los tejidos óseos es semejante y no presentan alteraciones debido a la maduración tisular.

Agredecimientos

Al Prof. R. Fontarnau y la Sra. A. Domínguez, de los Serveis Científico-técnicos de la Universidad de Barcelona, por su valiosa ayuda, tanto técnica como científica, y por su generosa disponibilidad.

A las Sras. S.M. Caballero-Araque y E. Sánchez-García, del laboratorio de Tejidos Calcificados, por su experta preparación las muestras.

Bibliografía

1. **Robey PG, Bianco P, Termine JD.** Disorders of Bone and Mineral Metabolism. Chapter 11. Ed. Frederic. Coe and Murray J. Favus, U.S.A. 1992.
2. **Mundy GR.** Bone Remodeling and its Disorders. Second Edition. Martin Dunitz Ltd. London, 1999.
3. **Gómez de Ferraris M, Campos Muñoz A.** Histología y Embriología Bucodental. Ed. Médica Panamericana S.A. Madrid-España, 1999.
4. **Gabes M.** Techniques Histologiques. Masson et Cie. Editeurs, Paris, 1968.
5. **Bellows CG, Heersche JNM, Aubin JE.** Inorganic phosphate added exogenously or released from b-glycerophosphate initiates mineralization of osteoid nodules in vitro. Bone and Mineral 1992; 17: 15-29.
6. **Kazuto H, Sadakazu E, Hidehiro O.** Localizational Alterations of Calcium, Phosphorus, and Calcification-Related Organics Such as Proteoglycans and Alkaline Phosphatase During Bone Calcification. J Bone Miner Res 2001; 16:289-298.
7. **Manzanares MC, Calero MI, Franch J, Jiménez MP, Serra I.** Optimization of a Scheduled Study for Undecalcified Samples. Microscopy and Analysis 1997; 31-33.
8. **Grynepas MD, Holmyard D.** Changes in Quality of Bone Mineral on Aging and in Disease. Scanning Microscopy 1988; 2:1045-1054.
9. **Fountos G, Tzaphlidou M.** In vivo measurement of radius calcium/phosphorus ratio by X ray absorptiometry. Applied Radiation and Isotopes 1999; 51:273-278.
10. **Ducheyne P, Groschner M, Volg G, Plenck H, Eschberger J, Fratzl-Zelman N, Koller K, Klaushofer K.** The effect of phase differences on time-dependet variation of the zeta potential of hydroxyapatite. Journal of Biomedical Materials Research 1992; 26:147-168.
11. **Murillo J.** Sistematización de las fases prenatales del desarrollo. Annales del Desarrollo. XIII 15:7-21, 1960.
12. **Tenenbaum H.C, Limeback H, Mc Culloch CAG, Mamujee H, Sukhu B, Torontali M.** Osteogenic Phase-Specific Co-regulation of Collagen Síntesis and Mineralization by b-glycerophosphate in Chock Periosteal Cultures. Bone 1992; 13:129-138.
13. **Hong I, Hengchang X, Groot K.** Tensile strenght of the interface between hydroxyapatite and bone. Journal of Biomedicals Materials Research, C 1992; 26: 7-18.
14. **Goret-Nicaise M.** La symphyse mandibulaire du nouveau-né. Etude histologique et

- microrradiographique. *Rev. Estomatol. Chir. Maxillofac* 1982; 83: 266-272.
15. **Donath K.** Técnica de Separación y Pulido Fino para la Realización de Preparados Histológicos de Tejidos y Materiales No Seccionables. Impreso Exact-kultzer, Nordestedt 1988.
 16. **Manzanares MC, Serra I, Ruano D.** Tissus calcifiés de la symphyse mandibulaire du foetus: analyse semiquantitative. XXXVI Congres du G.I.R.S.O.; 1992.
 17. **Neuman WF, Bareham BJ.** Evidence for the Presence of Secondary Calcium Phosphate in Bone and its Stabilization by Acid Production. *Calcif. Tiss. Res* 1975; 18:161-172.
 18. **Roufosse L.** Identification of Brushite in Bone Mineral. *Journal of Ultrastructure Research* 1979; 68:235-255.
 19. **Glimcher MJ.** Disorders of Bone and Mineral Metabolism. Chapter 12. Ed. Fredric L. Coe and Murray J. Favus, U.S.A.; 1992.
 20. **Iijima M, Tohda H, Suzuki H, Yanagisawa T, Moriwaki Y.** High Resolution Electron Microscopy of Apatite Crystals with Octocalcium Phosphate Inclusion. *Japanese Journal of Oral Biology* 1991; 33:495-499.
 21. **Roberts JE, Bonar LC, Griffin RG, Glimcher MJ.** Characterization of very young mineral phases of bone by solid state 31 phosphorus magic angle sample spinning nuclear magnetic resonance and XRay-diffraction. *Calcif Tissue Int* 1992; 50:42-48.
 22. **Zaichik V, Tzaphlidou M.** Determination of calcium, phosphorus, and the calcium/phosphorus ratio in cortical bone from the human femoral neck by neutron activation analysis. *Applied Radiation and Isotopes* 2002; 56:781-786.