

Preparación y evaluación de una pasta ósea para aplicaciones médicas

Preparation and evaluation of a bone paste for medical applications

Diana Marcela Escobar^{1*}, Carlos Jaramillo²

¹Programa de Bioingeniería, Facultad de Ingeniería. Universidad de Antioquia. A. A. 1226, Medellín, Colombia.

²Escuela de Medicina Veterinaria, Facultad de Ciencias Agrarias Universidad de Antioquia. A. A. 1226, Medellín, Colombia.

(Recibido el 6 de agosto de 2008. Aceptado el 26 de mayo de 2009)

Resumen

En este artículo se evalúan las características osteoinductivas y osteoconductoras de una pasta ósea preparada a partir de fosfato de calcio tipo hidroxiapatita, proteína morfogenética ósea y colágeno, capaz de inducir la diferenciación de células locales a células formadoras de hueso. La pasta preparada fue implantada en la región dorsal a nivel inter escapular, en 35 conejos de Raza Blanca de Nueva Zelanda, los cuales se distribuyeron en 7 grupos de evaluación (7, 14, 21, 28, 35, 42 y 49 días) transcurridos estos tiempos se retiraron los implantes para ser evaluados histológicamente por microscopía óptica convencional y así caracterizar los diferentes elementos tisulares. Los resultados obtenidos se analizaron por método factorial de correspondencias múltiples con clasificación jerárquica, el cual mostró que se logra estimular la inducción de hueso en sitios ectópicos, teniendo actividad osteogénica, sin embargo, la alta cantidad de linfocitos y de eosinófilos, evidencian respuesta inflamatoria alrededor del implante.

----- *Palabras clave:* Fosfato de calcio, osteoconducción, osteoinducción.

Abstract

The osteoinductive and osteoconductive characteristics of a bone paste (composed of calcium phosphate type hydroxyapatite, collagen and bone morphogenetic protein) able induce cell differentiation local bone-forming cells was evaluated in this work. The paste was implanted in a dorsal region

* Autor de correspondencia: teléfono: + 57 + 4 + 219 55 88, fax: + 57 + 4 + 263 82 82, correo electrónico: descobar@udea.edu.co (D. Escobar)

level inter scapular of 35 New Zealand white rabbits, which were distributed at 7 assessment panels (7, 14, 21, 28, 35, 42 and 49 days). Then, implants were removed for histological evaluation by conventional optical microscopy and the different elements tissue characterized. The results were analyzed using the multi-factorial correlation with hierarchical classification, which showed that implants stimulate the induction of bone in ectopic sites, with osteogenesis activity. However, the high amount of lymphocytes and eosinophils evidence inflammatory response around the implant.

----- **Keywords:** Calcium phosphate, osteoconduction, osteoinducción

Introducción

Defectos, traumas, resecciones e incluso infecciones causan daños en el sistema esquelético, para lo cual se hace necesario la regeneración ósea y para ello, el uso de materiales de elevado potencial regenerativo en el campo de la ortopedia y cirugía maxilofacial, ha llevado a investigar en nuevos materiales que logren sustituir el hueso [1,2]. En estos casos, un injerto de hueso autólogo es lo más óptimo para tal efecto, sin embargo, estudios recientes han reportado morbilidad del sitio donador hasta de un 10% [3], disminuyendo su uso. Además, las cantidades de material de que se dispone suelen ser insuficientes y es imposible controlar la resorción del mismo. Por tal motivo se han buscado alternativas a este tipo de injertos, utilizando cerámicas de fosfato de calcio y compuestos de cerámicas [2-4]. Entre las cerámicas más utilizadas se encuentran los fosfatos de calcio tipo hidroxiapatitas, cuya composición química es similar a la encontrada en los huesos y dientes de los mamíferos, haciendo que su osteointegración sea excelente, aunque la principal desventaja es su elevada fragilidad, y sus pobres propiedades mecánicas, ya evaluadas en ensayos “*in vitro*” [5]. La efectividad de este tipo de cerámicos han sido confirmadas en diversos experimentos “*in vivo*” desde el campo clínico hasta la ortopedia y la cirugía maxilofacial [6-8]. El trabajo con mezclas de materiales de diversos tipos ha sido desde algún tiempo la base de investigaciones realizadas por investigadores como Friess y colaboradores [9], quienes fabricaron mezclas de colágeno y proteínas morfogenéticas o Rivera y colaboradores [10] quienes mezclaron proteínas

morfogenéticas e hidroxiapatita con el fin de inducir la diferenciación celular de tipo osteoblástico. Con el fin de realizar un aporte en el área, se planteó la idea de preparar una pasta maleable con características osteoconductoras y/o osteoinductivas, que mejore su manipulación a la hora de ser implantada, combinando fosfato de calcio, proteínas morfogenéticas y colágeno sin que esto altere las propiedades buscadas en la pasta. Por otro lado, la pasta a producir y evaluar satisficiera las necesidades de la medicina en el campo de la cirugía plástica y ortopédica de producir un material fácil de manipular y almacenar, que se adhiriera al sitio de implante, mostrando tanto actividad osteoinductiva como osteoconductoras, además térmicamente entrecruzable, lo cual le proporciona la rigidez para un implante óseo y sustancialmente bioabsorbible.

Procedimiento experimental

Síntesis y caracterización del fosfato de calcio

La obtención del fosfato de calcio tipo hidroxiapatita se realizó mezclando sales precursoras de nitrato de calcio y fosfato de amonio (ajustadas en pH con solución amoniacal al 25%) en un reactor plástico con agitación constante por 24 horas a temperatura ambiente, siguiendo la metodología usada de trabajos anteriores [11,12]. Una vez completada la reacción, se lavó el precipitado con abundante agua destilada hasta eliminar los subproductos generados y el precipitado obtenido se secó a 120 °C por 4 horas para eliminar completamente la humedad. Una pequeña fracción del polvo obtenido se calcinó

a 1050°C por 4 horas para evaluar la cristalinidad, y la cantidad de muestra restante fue calcinada a 750°C por 4 horas para obtener el fosfato semicristalino necesario para la fabricación de la pasta ósea deseada.

Difracción de Rayos X (DRX)

Se realizaron difractogramas a temperatura ambiente utilizando un difractómetro marca Siemens D 501 con radiación de ánodo de cobre monocromático, con filtro de níquel y detector proporcional (CuK_α , $\lambda = 1.5406 \text{ \AA}$). Los difractogramas fueron corridos en un rango de 2θ entre 5° y 50° , con un paso de 0.08° y 2 segundos por paso.

Espectroscopía de Infrarrojo (IRTF)

La prueba espectroscópica se llevó a cabo en el espectrofotómetro de infrarrojo MATTSON 5000 del laboratorio de Métodos Analíticos de la Universidad de Antioquia usando un espectro fundamental entre 450 y 4000 cm^{-1} y utilizando una pastilla de bromuro de potasio (KBr).

Microscopía Electrónica de Barrido (MEB)

Las pruebas de microscopía electrónica de barrido se realizaron en el equipo JEOL JSM-590LV de la Universidad Nacional sede Medellín.

Preparación de la pasta ósea

El fosfato de obtenido fue llevado a tamaño de partícula promedio de $400 \mu\text{m}$ mediante macerado en mortero de ágata según lo reportado por Gauthier y colaboradores [2] y esterilizado con luz ultravioleta para análisis microbiano por recuento total recuento total de mohos, levaduras y microorganismos aerobios mesófilos.

La pasta ósea fue preparada mezclando el fosfato de calcio obtenido con proteínas morfogenéticas óseas (GEN-PRO 950.1 Baumer S.A Brasil-A) y colágeno (GEL-COL 960.2 Baumer S.A Brasil) en presencia de solución fisiológica estéril (en reemplazo del agua) en proporción

HA:COL:PMO:H₂O de 60:20:10:10 % w/w, semejante a la composición del hueso natural en la literatura [13].

Procedimiento quirúrgico

Se escogieron 35 conejos de Raza Blanca de Nueva Zelanda, los cuales se distribuyeron en 7 grupos para evaluación (7, 14, 21, 28, 35, 42 y 49 días). Los conejos fueron anestesiados con ketamina de 15 mg/kg, depilados y lavada la zona de implante con clorhexidina al 0,2%. Se realizó una incisión longitudinal de 1,5 cm bajo la piel dorso lumbar, donde se implantaron 50 mg de pasta ósea maleable, se suturó con vicryl 2° y se desinfectó el área nuevamente con clorhexidina. El tratamiento post quirúrgico consistió en la aplicación de ampicilina cada 12 horas.

Evaluación clínica e histológica

Inicialmente se evaluaron 5 conejos durante cuatro días midiendo temperatura, grado de inflamación, edema y limitación funcional como parte de una prueba piloto. Posteriormente se continuó con la evaluación del grupo de conejos restantes y transcurridos los tiempos de evaluación se retiraron los implantes y se tomaron biopsias para evaluación histológica cada semana hasta los 49 días a partir de la intervención. Las muestras obtenidas se observaron por microscopía óptica, cortadas en un micrótomo Reichert 2025 y teñidas con el método convencional de hematoxilina-eosina y el tricrómico de Masson, adecuado para caracterizar los diferentes componentes mesenquimales. En la descripción microscópica se tuvieron en cuenta parámetros como Inflamación (tejido conjuntivo fibroso: fibroblastos y fibrocitos) y formación ósea (osteoblastos, osteoclastos, trabéculas, láminas óseas).

Análisis estadístico

Se utilizó el paquete estadístico SPADN versión 3.0 realizando un análisis factorial de correspondencia con clasificación jerárquica para evaluar similitudes y disimilitudes de los conejos con las variables propuestas y suplementada por

la variable semana. El análisis factorial se complementó con porcentajes para cada variable y modalidad.

Resultados y discusión

Difracción de Rayos X (DRX).

En la figura 1 se presenta el difractograma de la muestra calcinada a 1050°C (comparado con el reportado en la base de datos CPDS Card), en el se observan los picos más relevantes de la hidroxiapatita, con mayor intensidad a $2\theta = 31,8$ correspondiente al plano (211), acompañado por dos picos de menor intensidad a $2\theta = 32$ y $2\theta = 33$ correspondientes a los planos (112) y (300) respectivamente, y algunos picos secundarios a $2\theta = 25,5$ correspondiente al plano (002), $2\theta = 34$ correspondiente al plano (202); $2\theta = 39,5$ correspondiente al plano (310), $2\theta = 47$ correspondiente al plano (222) y $2\theta = 49$ correspondiente al plano (213). Se presenta también un pico a $2\theta = 30,8$ correspondiente al plano (0210) que es el pico principal del fosfato tricálcico y los picos secundarios a $2\theta = 27,6$ y $2\theta = 34$ de menor intensidad evidenciando la presencia de aproximadamente un 10% de esta fase.

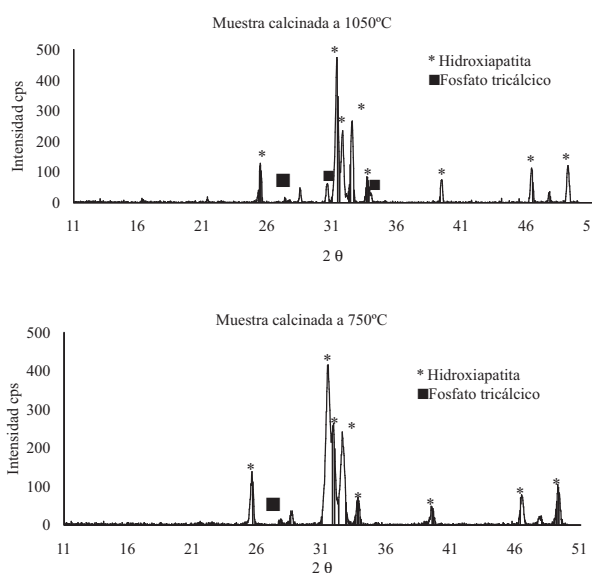


Figura 1 Difractogramas de las muestras calcinadas a 1050°C y 750°C

En la muestra calcinada a 750°C se observan los mismos picos evidenciándose una drástica disminución de la cristalinidad en los picos y cambios en el ancho a causa de la temperatura de calcinación, evidenciado por el pico principal correspondiente al plano (211), el cual exhibe intensidades de 490 y 430 c.p.s en la muestra tratada a 1050 y 750°C respectivamente.

Espectroscopía de infrarrojo

En la figura 2 se muestra el espectro obtenido de la muestra tratada a 750°C.

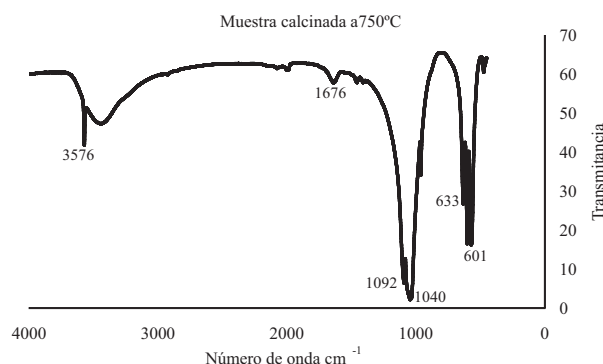


Figura 2 Espectro FTIR de la muestra calcinada a 750°C

El espectro de infrarrojo reportado en la literatura para una hidroxiapatita cristalina presenta bandas en 3600, 3578, 3500 y 633 cm^{-1} correspondientes a grupos OH^- y bandas en 474, 571, 601, 692, 1032, 1040, 1087 y 1092 cm^{-1} correspondientes a grupos PO_4^{3-} . La muestra tratada a 750°C presenta bandas en 478, 571, 604, 633, 963, 1051, 1095, 3450 y 3600 cm^{-1} , lo cual significa que se ha logrado obtener un fosfato tipo hidroxiapatita de muy baja cristalinidad como se requiere para fabricar la pasta maleable y bioabsorbible.

Microscopía electrónica de barrido

En la figura 3 se muestran las micrografías obtenidas de la hidroxiapatita sintetizada y calcinada a 750°C a diferentes aumentos. En las micrografías obtenidas se logra observar la presencia de granos de fosfato de calcio con geometría regular alarga-

da con tamaño de partícula de aproximadamente $400\mu\text{m}$ (arriba), los cuales al ser observados a mayores aumentos (abajo) revelan una superficie con gran rugosidad, lo cual, según lo encontrado por Gauthier y colaboradores [2] es un tamaño adecuado que facilita la reabsorción del material al entrar en contacto con el organismo.

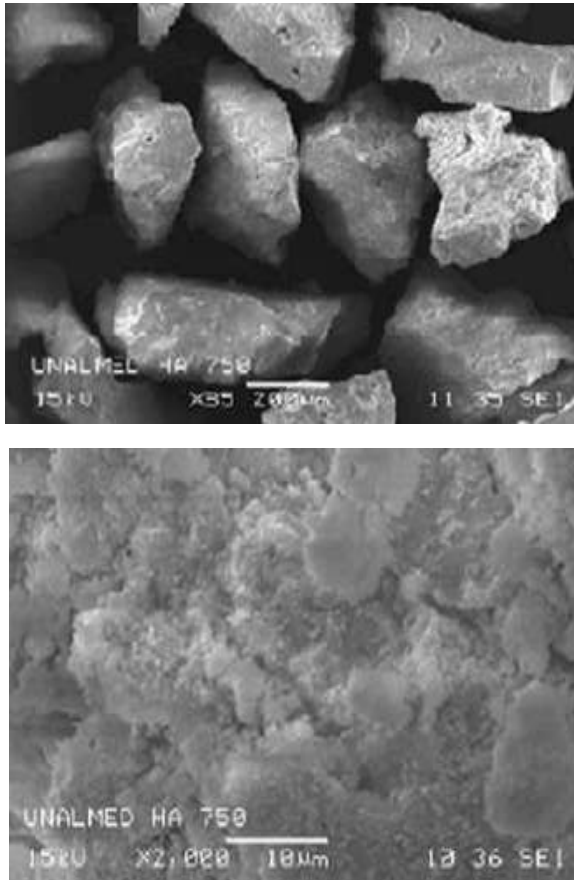


Figura 3 Microscopías de la muestra de HA calcinada a 750°C a diferentes aumentos.

Evaluación clínica

En la prueba piloto se presentó un aumento leve de temperatura en el primero y segundo día para algunos de los conejos. Se observó además un edema moderado el primer día en tres de los conejos y alguna inflamación, hecho que no ocurrió en días posteriores, como se muestra en la tabla 1.

En la evaluación de las semanas 2 a 7 hubo un aumento leve de temperatura en el primer día,

mientras que en los demás días se mantuvo la temperatura promedio de los animales. Se observó un edema moderado e inflamación el primer día en uno de los conejos, hecho que no ocurrió en días posteriores y tampoco en ninguno de los demás conejos evaluados.

Evaluación histológica

En la tabla 2 se presenta el crecimiento celular según el número de semanas evaluadas.

Los resultados de este estudio muestran que hubo reacción osteogénica en un grado de leve a moderado, caracterizada por la abundante presencia de infiltrado eosinófilo, como puede observarse en la figura 4, en concordancia con Pollick [14], quien reportó crecimiento óseo en el 67% de los implantes colocados en tejidos blandos.

Se encontró que el nuevo hueso estaba en contacto directo con el implante, demostrando una respuesta osteofílica sin una interfase aparente de tejido blando. Según Johnson [15], combinando colágeno con fosfato de calcio se aumenta la formación de tejido óseo en defectos radiales caninos, en comparación con fosfato tricálcico solo.

Otro importante hallazgo en este estudio fué la respuesta de los tejidos blandos al implante, manifestada por una persistente reacción inflamatoria, caracterizada por presencia de eosinófilos, células gigantes multinucleadas y neutrófilos como se logra observar en la figura 5, en concordancia con lo encontrado por Kurashina [16] y Johnson [17].

De acuerdo a la elevada presencia de células potencialmente osteogénicas (láminas óseas, trabéculas y osteoblastos), la pasta ósea implantada mostró ser biocompatible y osteoinductiva corroborando lo encontrado por Hsu [18] dada la asociación de las partículas de fosfato de calcio con proteínas morfogenéticas y colágeno, formando un biocompuesto, lo que se atribuye principalmente al colágeno, como lo reportan Reddi [19] y Chevally [20], quienes han comprobado en sus estudios que es biocompatible y osteoconductor.

Aunque la reacción adversa del tejido ha sido generalmente atribuida a la pasta no incorporada según Pioletti [21] quien reporta que pequeñas partículas suscitan una reacción inflamatoria

causando decrecimiento de la viabilidad de los osteoblastos, los resultados de este estudio no evidencian efecto alguno del tamaño de partícula de la pasta preparada.

Tabla 1 Seguimiento a grupo de prueba piloto

Conejo	Peso (g)	Día 1			Día 2			Día 3			Día 4						
		Temperatura	Edema	Exudado	Inflamación	Temperatura	Edema	Exudado	Inflamación	Temperatura	Edema.	Exudado	Inflamación	Temperatura	Edema	Exudado	Inflamación
1	2300	39,3	+		+	38,6				38,5							38,6
2	2000	39,5	+			39,1				39,0							39,1
3	1900	38,9			+	38,5				38,4							38,7
4	2000	39,2			+	38,9				38,8							38,7
5	2000	39,4	+			39,3				39,1							39,0

Tabla 2 Crecimiento celular según el número de días de implantación

Estructura	Semana 1 (%)	Semana 3 (%)	Semana 5 (%)	Semana 7 (%)
Fibroblastos	66,6	66,6	33,3	66,6
Fibroцитos	33,3	39,9	33,3	33,3
Osteoblastos	33,3	46,65	66,6	66,6
Osteocitos	0,0	73,3	66,6	33,3
Osteoclastos	0,0	66,6	66,6	0,0
Trabéculas	33,3	33,3	33,3	33,3
Lámina ósea	13,32	46,62	86,58	73,3
Linfocitos	66,6	66,6	33,3	66,6
Eosinófilos	13,32	66,6	86,58	66,6
Célula Gigante	19,98	66,6	53,28	0,0
Célula Cuerpo Extraño	0,0	33,3	33,3	0,0
Necrosis	0,0	13,32	13,32	27

Según Villareal [22], modificaciones en la cristalinidad del biomaterial por el proceso de sinterización pueden también jugar un papel importante en la adhesión celular, en la proliferación, diferenciación y metabolismo de las células osteogénicas. Así en el fosfato calcinado a 1100° C durante 7 horas presentaron más alta proliferación, diferenciación y mineralización que aquellas células osteogénicas mostradas en la muestra no sinterizada.

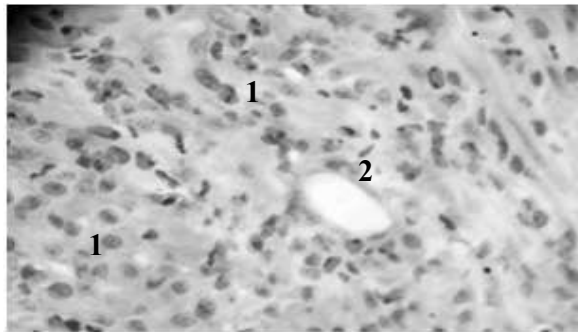


Figura 4 Reacción inflamatoria del tejido a la primera semana post-implante (¹Eosinófilos, ²Inflamación circundante)

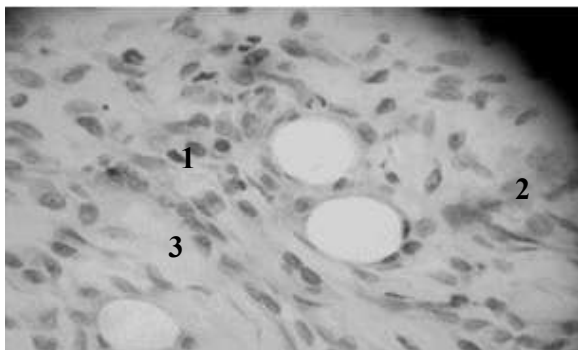


Figura 5 Formación de vasos sanguíneos y respuesta inflamatoria a la segunda semana (¹Eosinófilos, ²Neutrófilo, ³Células gigantes)

En este estudio se presentó leve reabsorción del implante. Por ello, es necesario tener en cuenta que el porcentaje de degradación de los implantes porosos de fosfato cálcico es una propiedad importante para su aplicación clínica. Para aplicaciones ortopédicas donde se soporta hueso, la

biodegradación es deseable, mientras que en cirugía craneofacial se desea que los implantes no se degraden, en concordancia con lo expuesto por Pollick [4].

En concordancia con Concannon [23] y Ono [24], se reporta la presencia de hueso desde la tercera semana postimplantación de la pasta ósea, (Figura 6), a la vez que se inició remodelación y proliferación de células hematopoyéticas (Figura 7).

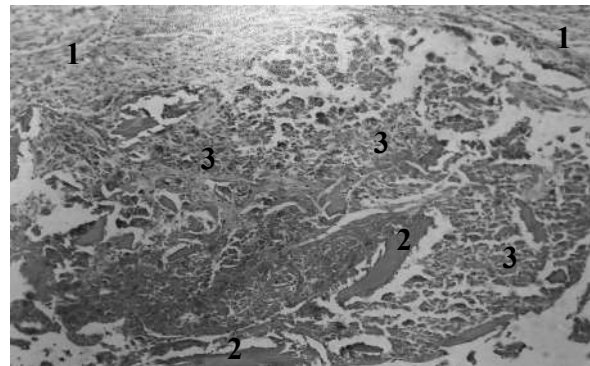


Figura 6 Presencia de Láminas óseas, observadas a la tercera semana post-implante (¹Tejido conectivo, fibras de colágeno, fibroblastos, ²capa de osteoblastos rodeando las recién formadas y ³Eosinófilos).

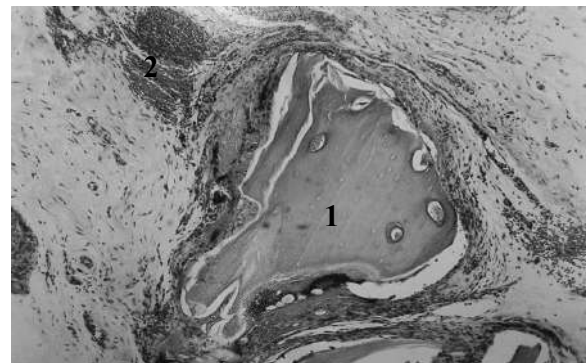


Figura 7 Presencia células óseas en la sexta semana post-implante (¹Trabéculas de tejido óseo, ²Reacción inflamatoria en tejido conectivo)

Conclusiones

Se evidenció respuesta osteogénica de los animales frente al implante con varias semanas de haberse colocado la pasta ósea, aunque se observó

respuesta inflamatoria y en algunos casos reacción de rechazo.

A medida que aumentaban las semanas del implante en los conejos se dió la aparición de vasos sanguíneos alrededor del implante, con formación de trabéculas e infiltrado eosinofílico, siendo severo en la mayoría de los casos.

En términos generales se observó desde el primer periodo de evaluación (semana 1) la presencia de infiltrado polimorfonuclear eosinofílico en diferentes grados.

El biomaterial evaluado presenta buenas propiedades para mejorar la regeneración ósea, entre las cuales se incluye el tamaño de partícula, la presencia de colágeno y la macroporosidad producida por la interacción de los elementos mezclados.

Agradecimientos

Los autores agradecen al Comité para el Desarrollo de la Investigación –CODI- de la Universidad de Antioquia por la financiación del proyecto: “Evaluación de una pasta de hueso maleable para regeneración ósea compuesta por hidroxiapatita, colágeno y proteínas morfogenéticas óseas”

Referencias

1. T. Livingston, T. Tran, J. Mcalary, G. Daculsi. “A comparative study of biphasic calcium phosphate ceramics for human mesenchymal stem-cell-induced bone formation”. *Biomaterials*. Vol. 26. 2005. pp. 3631-3638.
2. O. Gauthier, R. Muller, D. Stechow, B. Lamy, P. Weiss, J. Bouler, E. Aguado, Guy Daculsi. “In vivo bone regeneration with injectable calcium phosphate biomaterial: A three-dimensional micro-computed tomographic, biomechanical and SEM study”. *Biomaterials*. Vol. 26. 2005. pp. 5444-5453.
3. H. Moghadam, G. Sándor, H. Holmes, C. Clokie. “Histomorphometric Evaluation of Bone Regeneration Using Allogeneic and Alloplastic Bone Substitutes Maxillofacial Surgeons”. *Journal of Oral Maxillofacial Surgery*. Vol. 62. 2004. pp. 202-213.
4. R. Chang and A. Kao. “Biomechanical and histological studies of particulate hydroxylapatite implanted in femur bone defects of adult dogs”. *International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*. Vol. 29. 2000. pp. 54 - 61.
5. F. De la Calle. *Estudio de la cinética de disolución de la hidroxiapatita sintética según su grado de cristalinidad en una solución fisiológica artificial*. Trabajo de grado. Facultad de Ingeniería. Universidad de Antioquia. 2004. pp. 69.
6. I. Ono, T. Tateshita, M. Satou, T. Sasaki and M. Matsumoto. “Treatment of large complex cranial bone defects by using hydroxyapatite ceramic implants”. *Plastic and Reconstructive Surgery*. Vol. 104. 1999. pp. 339-349.
7. K. Yoshida. “Osteoinduction capability of recombinant human bone morphogenetic protein-2 in intramuscular and subcutaneous sites: an experimental study”. *Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery*. Vol. 26. 1998. pp. 112-115.
8. G. Pérez. “Hidroxiapatita porosa HAP-200 como bioimplante esférico integrado en el anoftalmos quirúrgico”. *Revista Cubana de Oftalmología*. Vol. 11. 1998. pp. 5-13.
9. W. Friess, H. Uludag, Sh. Foskett and R. Biron. “Bone Regeneration with Recombinant Human Bone Morphogenetic Protein-2 (rhBMP-2) Using Absorbable Collagen Sponges (ACS): Influence of Processing on ACS Characteristics and Formulation”. *Pharmaceutical Development and Technology*. Vol. 4. 1999. pp. 387-396.
10. J. Rivera, C. Riaño, A. Echavarría, P. Monsalve, L. Restrepo y C. Jaramillo. “Injertos óseos - Obtención, caracterización y evaluación de hidroxiapatita Sintética y el compuesto de Hidroxiapatita Sintética porosa – Proteínas Morfogenéticas Óseas en un modelo experimental Lapino”. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*. Vol. 17. 2004. pp. 20-28.
11. A. Noreña. *Obtención y caracterización de hidroxiapatita sintética con porosidad inducida*. Trabajo de grado. Facultad de Ingeniería. Universidad de Antioquia. 2001. pp. 94.
12. A. Echavarría. “Hidroxiapatita sintética de porosidad inducida: Comparación con el hueso calcinado”. *Rev. Fac. Ing. Univ. Antioquia*. Vol. 19. 1999. pp. 56-64.
13. S. Dorozhkin. “Calcium Phosphates and Human Beings”. *Journal of Chemical Education*. Vol. 83. 2006. pp. 713-719.
14. S. Pollick, E. Shors, R. Holmes and R. Kraut. “Bone formation and implant degradation of coralline porous ceramics placed in bone and ectopic sites”. *Journal*

- of Oral and Maxillofacial Surgery*. Vol. 53. 1995. pp. 915-922.
15. K. Johnson, K. Frierson, T. Keller, C. Cook, R. Scheinberg, J. Zerwekh and L. Meyers. "Porous ceramic as bone graft substitutes in long bone defects: a biomechanical, histological, and radiographic analysis". *Journal of Orthopaedic Research*. Vol. 14. 1996. pp. 351-369.
 16. K. Kurashina, H. Kurita, A. Kotani. "Experimental cranio-plasty and skeletal augmentation using an tricalcium phosphate/dicalcium phosphate dibasic/tetracalcium phosphate monoxide cement: A preliminary short term experiment in rabbits". *Biomaterials*. Vol. 19. 1998. pp. 701-706.
 17. M. Johnsson, G. Nancollas. "The role of brushite and octacalcium phosphate in apatite formation". *Oral Biology and Medicine*. Vol. 31. 1992. pp. 61-82.
 18. F. Hsu, S. Chueh, Y. Wang. "Microspheres of hydroxyapatite reconstituted collagen as supports for osteoblast cell growth". *Biomaterials*. Vol. 20. 1999. pp. 1931-1936.
 19. A. Reddi. "Role of morphogenetic proteins in skeletal tissue engineering and regeneration". *Nature Biotechnology*. Vol. 16. 1998. pp. 247-252.
 20. B. Chevallay, D. Herbage. "Collagen-based biomaterials as 3D scaffold for cell cultures: applications for tissue engineering and gene therapy". *Medical and Biological Engineering and Computing*. Vol. 38. 2000. pp. 211-218.
 21. D. Pioletti, H. Takei, T. Lin. "The effects of calcium phosphate cement particles on osteoblast function". *Biomaterials*. Vol. 21. 2000. pp. 1103-1114.
 22. D. Villareal, A. Sogal, J. Ong. "Protein adsorption and osteoblast responses to different calcium phosphate surfaces". *Journal of Oral Implantology*. Vol. 21. 1998. pp. 67-73.
 23. M. Concannon, M. Boschert, C. Puckett. "Bone induction using demineralized bone in the rabbit femur: A long-term study". *Plastic and reconstructive surgery*. Vol. 99. 1997. pp. 1983-1988.
 24. I. Ono, H. Gunji, F. Kaneko, T. Saito, Y. Kuboki. "Efficacy of hydroxyapatite ceramic as a carrier for recombinant human bone morphogenetic protein". *Journal of Craniofacial Surgery*. Vol. 6. 1995. pp. 238-244.