

La hidroxiapatita asociada al sulfato cálcico como material de sustitución ósea. Aspectos biológicos.

J.J. MORALES DE CANO, A. GARCÍA RUZAFÁ Y J.A. HERNÁNDEZ HERMOSO.
Servicio de Cirugía Ortopédica y Traumatología.
Ciudad Sanitaria y Universitaria de Bellvitge. Barcelona.

Resumen

La cirugía ortopédica y máxilo-facial necesitan realizar en muchas ocasiones resecciones masivas de tejido óseo. Esto ha hecho que se haya propuesto la utilización de materiales inertes como substitutos óseos, gracias a la habilidad que tienen de permitir la regeneración del hueso, tanto en el campo de la medicina como en el de la odontología. Nuestro trabajo tiene por objetivo estudiar un biomaterial compuesto de hidroxiapatita y sulfato cálcico como material de sustitución ósea en forma de cilindros.

Se han intervenido 75 animales de experimentación (conejo Albino de Nueva Zelanda), divididos en tres grupos, cada uno de ellos compuesto por 25 animales. En el grupo I o control, los animales fueron intervenidos quirúrgicamente realizándoseles una cavidad a nivel metafisario en el fémur sin realizar implantes. A los animales del grupo II y III se les realizó la misma intervención, pero se les implantó un cilindro de hidroxiapatita (HA) y sulfato cálcico a dos concentraciones diferentes, 50% - 50% y 70% - 30% respectivamente. El estudio ha demostrado una regeneración ósea de la cavidad rellena a expensas de la rápida reabsorción del yeso, y de una lenta reabsorción de la hidroxiapatita.

Palabras clave: Biomateriales, sulfato cálcico, hidroxiapatita, osteoconducción, substitutos óseos, conejo.

Introducción

La cirugía ortopédica y máxilo-facial necesitan realizar en muchas ocasiones resecciones masivas de tejido óseo (tumores, infecciones, cirugía protésica, etc.), esto nos obliga a dejar cavidades óseas extensas debilitadas por la pérdida del hueso resecado. Estas cavidades presentan una disminución en la resistencia mecánica ósea y por tanto, son tributarias de provocar complicaciones como la aparición de fracturas patológicas, reactivaciones sépticas, aflojamientos precoces en la cirugía endoprotésica, etc.

Para evitar estas complicaciones podemos recurrir a la utilización de injertos óseos. El injerto

más usado es el autoinjerto, pero éste tiene la limitación del propio paciente, no siendo suficiente para rellenar cavidades extensas. El otro tipo de injerto habitualmente usado es el aloinjerto, aunque su utilización está limitada debido a reacciones de hipersensibilidad que pueden producir, así como la posibilidad de servir de vehículo de transmisión de enfermedades infecciosas. Por otra parte la utilización de los bancos de hueso para obtención de aloinjerto representa un coste económico importante para su mantenimiento^{6,41}.

Esto ha hecho que en los últimos años algunos autores hayan propuesto como substitutos óseos la utilización de materiales sintéticos gracias a la habilidad que tienen de permitir la regeneración del hueso^{3, 7, 8, 9, 10, 12, 16, 17, 24, 32, 33, 35}. Los materiales más utilizados con este fin son los derivados de los fosfatos cálcicos, estos son usados para la reparación ósea por su biocompatibilidad, y por sus características físicas y químicas similares a la hidroxiapatita componente de la matriz ósea^{3, 7, 8, 9, 10, 12, 16, 17, 24, 32, 33, 35}. El fosfato cálcico está basado en la hidroxiapatita

Correspondencia:

J.J. Morales de Cano
La plana nº 15. San Cugat del Vallés.
08190 Barcelona
Spain

estequiométrica obtenida del coral mediante un proceso de cambio hidrotermal. Este proceso hidrotermal nos da una hidroxiapatita con una estructura interna microporosa similar al hueso^{12, 13, 35}. La estructura micropórica tiene unos poros de un diámetro de entre 190 y 230 μm , preparados para permitir el paso de vasos y depósito de hueso. Están suficientemente descritos los eventos bioquímicos y celulares que se producen en la formación ósea heterotópica que se produce inducida por el implante subcutáneo de matriz ósea desmineralizada^{3, 9, 19, 20, 30, 31, 44}.

La propiedad más buscada en estos biomateriales ha sido la osteoinducción, es decir, la capacidad de estimular la formación de hueso. Sin embargo no se ha podido demostrar esta propiedad en ninguno de los materiales estudiados. Parece ser que la capacidad de osteoinducción estaría reservada a las proteínas no colágenas formadoras de hueso (bone morphogenetic protein) descritas por Urist, y que forman parte de la matriz ósea^{42, 43}, en contra de las teorías de Takoaka y Glass^{11, 40}. Otras proteínas de la matriz ósea que en un principio se pensó que también actuarían como inductoras de la osteogénesis se han descartado recientemente, como es el caso de la osteogenina y osteocalcina entre otras^{36, 37, 38, 39}.

La utilización del sulfato cálcico y la hidroxiapatita como materiales de sustitución ósea es un hecho conocido en la bibliografía. Sin embargo, estos materiales poseen propiedades diferentes, que pueden complementarse. El sulfato cálcico ha demostrado ser un material de una rápida absorción aunque estimula la actividad celular osteoblástica. Por su parte la hidroxiapatita es un material de claro efecto osteogénico pero de con una excesiva lentitud en su reabsorción.

Presentamos un estudio experimental de un *composite* de hidroxiapatita y sulfato cálcico.

Materiales y métodos

Material de implante

Utilizamos la hidroxiapatita micrométrica asociada al sulfato cálcico en forma de cilindros de un tamaño de 11 mm de longitud por 6 mm de diámetro. Para la elaboración de los cilindros se utilizó la mezcla de sulfato cálcico hemihidrato y una mezcla de hidróxido de calcio más fosfato cálcico monohidrato para la formación de la hidroxiapatita. Durante la mezcla se le añadió el equivalente al 50% en peso de la mezcla de H_2O . Después se

introdujo la pasta formada en un molde cilíndrico, se comprimió bajo una presión constante de 15 Kg/cm² y se introdujo en una estufa durante un tiempo de 24 horas a una temperatura constante de 85°C. Así pues la composición de los cilindros, tras su elaboración era:

- Grupo de cilindros del 50% - 50%: 49,9% de hidroxiapatita + 0.030% de hidróxido cálcico + 0.044% de fosfato cálcico monohidrato + 50% de sulfato cálcico hemihidrato.

- Grupo de cilindros del 70% - 30%: 69.9% de hidroxiapatita + 0.030% de hidróxido cálcico + 0.044% de fosfato cálcico monohidrato + 30% de sulfato cálcico hemihidrato.

El material fue envasado en viales, precintados y esterilizados con rayos gamma a una dosis de 25 KGray, en el Centro Aragamma. (Figura 1).

Animal de experimentación

El estudio se realizó en el conejo albino de Nueva Zelanda, todos machos y adultos con edades comprendidas entre 4 y 5 meses, con un peso de 3,5 - 4 Kg. Los animales fueron cuidados en el estabulario con las normas habituales (temperatura de la habitación de 20°C, humedad relativa de 55.5%, cambio del aire 20 veces / hora).

En total hemos intervenido 75 animales de experimentación, divididos en tres grupos:

1. Animales del grupo I o grupo control, constituido por 25 animales. Estos animales fueron intervenidos realizándoles una cavidad metafisaria distal en el fémur, sin colocación de implante.

2. Animales del grupo II, constituido por 25 animales. Estos animales han sido intervenidos de igual manera que los del grupo control, pero en este caso se les implantó un cilindro de sulfato cálcico e hidroxiapatita al 50%.

3. Animales del grupo III, constituido por 25 ani-



Figura 1 Cilindros de hidroxiapatita y sulfato cálcico 50-50%

males. Estos animales han sido intervenidos realizándoles implante del material constituido por sulfato cálcico 30% e hidroxiapatita 70%.

Técnica Quirúrgica

Todos los animales fueron intervenidos bajo anestesia general endovenosa con una mezcla de ketamina y xilacina. Se realizó una incisión medial a nivel del tercio distal femoral con abordaje subvasto medialis de la zona metafiso-diafisaria del fémur mediante una broca de 6 mm. Estas cavidades fueron rellenadas mediante el material sujeto de estudio (Figura 2). Al finalizar la intervención quirúrgica la extremidad intervenida de los animales fue inmovilizada mediante un vendaje de yeso pelvipédico.

Los animales fueron sacrificados a tiempos diferentes: entre 3 días y 5 semanas los animales pertenecientes al grupo I, y entre 3 días y 12 semanas los animales pertenecientes al grupo II y III.

Estudios Postoperatorios

Desde el momento de la intervención y hasta el sacrificio de los animales se realizó el seguimiento de los siguientes parámetros:

1. Determinaciones bioquímicas:

- Calcemia.
- Fosfatemia.
- Determinación de fosfatasas alcalinas séricas.

Estas determinaciones se realizaron preoperatorias, a las dos y seis semanas.

2. Estudio radio: se realizaron controles radiográficos cada quince días desde el momento de la intervención hasta el sacrificio de los animales.

3. Estudio histológico: al producirse el sacrificio de los animales. Se realizó mediante:

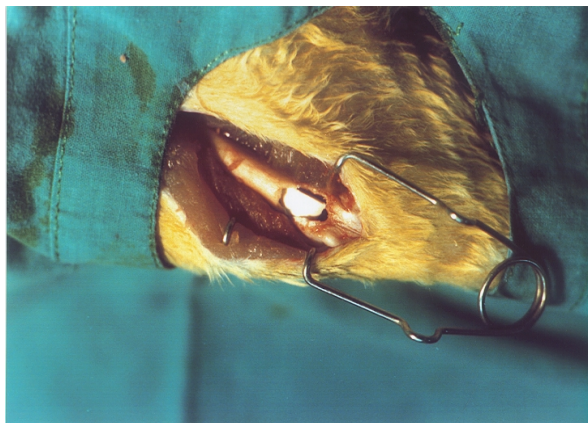


Figura 2 Implantación del material en el fémur del animal de experimentación

- Estudio histológico descriptivo con microscopía óptica de hueso descalcificado y sin descalcificar.

- Estudio histomorfométrico analizando:

- Superficie de material implantado.
- Superficie de hueso formado.

Tratamiento estadístico de los resultados

Los datos obtenidos en los resultados fueron tratados estadísticamente mediante las pruebas de Chi-cuadrado, t de Student y prueba de Wilcoxon, fijándose la significación estadística en $p < 0.05$.

Resultados

Determinaciones Bioquímicas

Los resultados de las determinaciones de calcio en suero nos dieron en los animales del grupo I cifras comprendidas entre 13.98 y 15.30 mg/dl. En los animales del grupo II y III los valores obtenidos oscilaron entre 11.80 y 15.90 mg/dl. Todos los resultados nos muestran valores dentro de la normalidad. El tratamiento estadístico de estas determinaciones entre los animales del grupo I, II y III fue de $p > 0.05$, por consecuencia, sin diferencia estadísticamente significativa.

En cuanto a la cuantificación del fosfato inorgánico en plasma, los valores oscilaron entre 4.35 y 7.65 mg/dl en el grupo control, y sin diferencias con las determinaciones de los conejos de los grupos II y III.

La determinación de las fosfatasas alcalinas en los animales del grupo I nos dieron cifras comprendidas entre 116 y 230 U/l. Por su parte las determinaciones en los animales del grupo II nos dieron cifras entre 70 y 380 U/l. (Gráfica nº1). Los resultados del grupo III mostraron valores comprendidos entre 96 y 280 U/l.

Los resultados de las determinaciones analíticas demuestran que los animales del grupo II presentan unos valores mayores que los otros grupos, aunque no llegan a mostrar diferencias estadísticas en lo que se refiere al calcio y fosfato, pero sí hemos hallado diferencia estadísticamente significativa en lo que concierne a las fosfatasas alcalinas séricas.

Estudio radiográfico

Las radiografías realizadas en el postoperatorio inmediato a los animales intervenidos nos muestran la zona metafiso-diafisaria del hueso donde ha sido implantado el material con un aumento de la densidad ósea debida al aspecto radiopaco del material

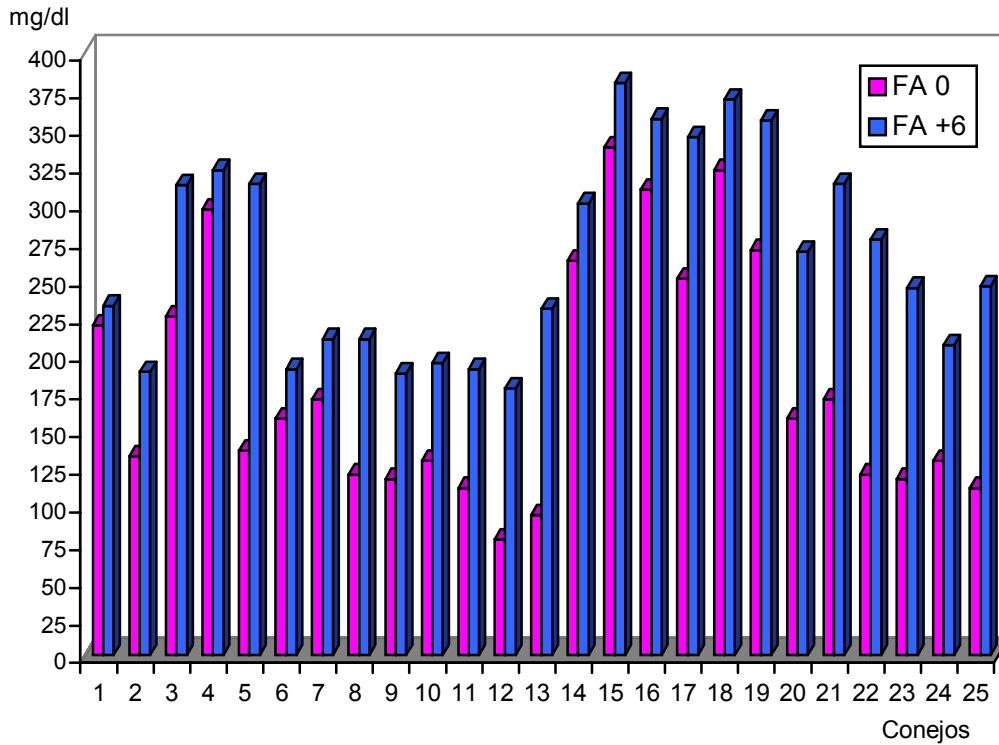


Gráfico 1 Comparación de las determinaciones de fosfatasa alcalina sérica entre los animales del grupo control y los del grupo II, a las seis semanas. Se observa aumento significativo en los resultados del grupo II.

implantado (Figura nº 3). Este aumento de densidad ósea va disminuyendo paulatinamente en las semanas que siguen a la intervención. Al mismo tiempo, observamos una fragmentación de los cilindros implantados, tanto en el grupo II como en el grupo III (Figura nº4). En el momento del sacrificio de los animales no se ha evidenciado una reabsorción completa del material, persistiendo el implante. Aun así la fragmentación y reabsorción del implante son más evidentes en el grupo II que

en el grupo III.

Estudio Histológico

En las preparaciones realizadas a los tres días después de la intervención se puede apreciar como el material implantado está rodeado de tejido hemorrágico en muy poca cantidad, favorecido por la agresión quirúrgica. A las dos semanas, en los animales del grupo II, observamos muy poco tejido infamatorio con escasa celularidad, y casi nula reacción de cuerpo extraño. El hallazgo de células

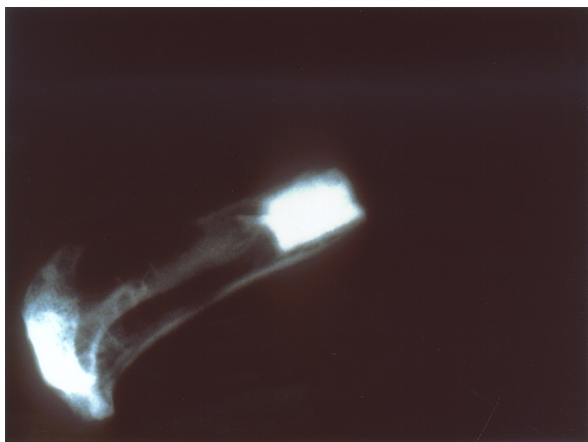


Figura 3 Radiografía postoperatoria del fémur de un animal de experimentación del grupo II. Zona metáfiso-diafisaria con aumento de densidad ósea correspondiente a la zona del implante del material.

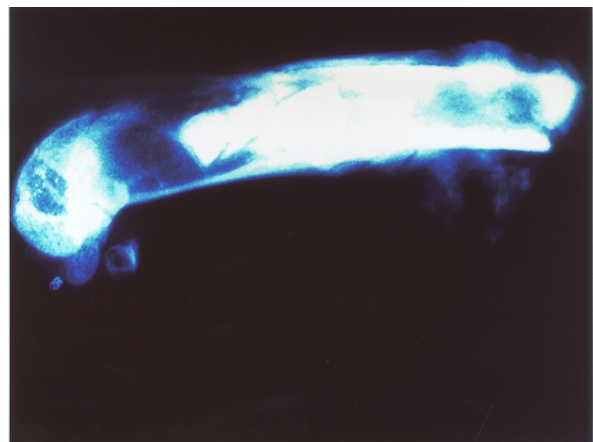


Figura 4 Radiografía a las seis semanas del implante, en un animal del grupo II. Se aprecia discreta disminución de la zona radiopaca, y fragmentación del cilindro implantado.

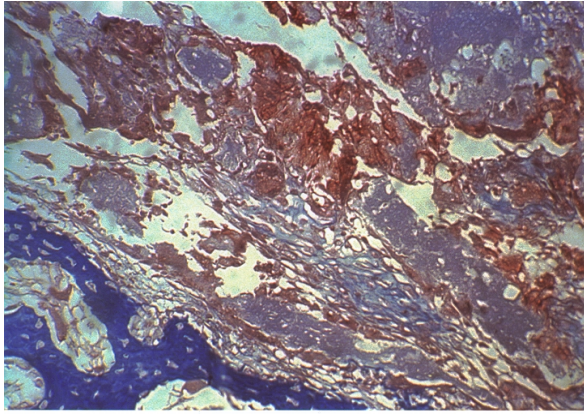


Figura 5 MO 400x Tricrómico de Masson: A las dos semanas del implante, se observa importante actividad osteoblástica.

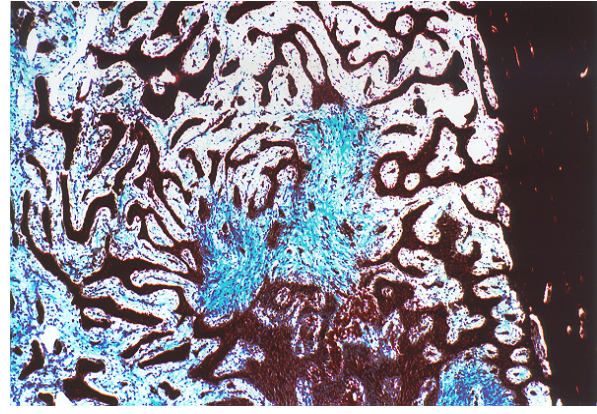


Figura 6 MO 400x. Tricrómico de Masson. Seis semanas después del implante.

gigantes a cuerpo extraño es excepcional. Esto nos indica la buena tolerancia del animal al material implantado. En algún punto se aprecia la aparición de ribetes con actividad osteoblástica y hueso plexiforme neoformado (Figura nº5). Esto mismo ocurre en los animales del grupo III, pero con menor intensidad.

A las seis semanas, en los animales del grupo II no se aprecia tejido fibroso cicatricial. Sí vemos abundante formación de hueso plexiforme neoformado con importante actividad osteoblástica y osteoclástica (Figura nº6). Esta actividad es especialmente importante en aquellas zonas cercanas al endostio. La formación de tejido óseo se realiza respetando los cristales de hidroxiapatita, de tal manera que las trabéculas óseas rodean y engloban dichos cristales.

El estudio histomorfométrico en los animales del grupo II demuestra una mayor reabsorción del material implantado, con mayor formación de tejido óseo que en los animales del grupo III. Estos fenómenos de remodelación ósea son más evidentes con el paso del tiempo. Por otra parte, el área de superficie del hueso formado en los animales del grupo control es notablemente inferior que en los animales del grupo II.

El estudio histológico muestra una buena tolerancia del material implantado sin reacción a cuerpo extraño, poca reacción inflamatoria y abundante formación ósea.

Discusión

Las cerámicas de fosfatos cálcicos se consideran materiales bioactivos según la definición propuesta por Williams⁴⁵ en 1987: «Material que induce una actividad biológica específica». Las cerá-

micas de fosfato cálcico actúan interaccionando con el hueso reabsorbiéndose más o menos lentamente dependiendo del tipo y de la porosidad del material^{4,5,34}. Esto ha hecho que la hidroxiapatita pueda ser considerada como un material biocompatible^{1,21}. Por esta razón se ha utilizado como material de relleno cavitario²³, o como material de recubrimiento^{2,29}. Otro de los biomateriales que se ha demostrado osteoconductor y biocompatible es el sulfato cálcico^{25,26,27,28}.

Los estudios histológicos de los fosfatos cálcicos han demostrado que aunque no son materiales que puedan actuar como osteoinductores, si que actúan como soporte del crecimiento óseo, lo que se ha denominado osteoconducción⁴⁵. La utilización de la hidroxiapatita en forma de granos compactos con una porosidad baja presenta grandes inconvenientes¹⁸ ya que no permite la formación de las trabéculas óseas recién formadas. En nuestro trabajo, hemos confeccionado un *composite* asociando sulfato cálcico e hidroxiapatita, materiales de características intrínsecas diferentes. Hemos podido comprobar como el sulfato cálcico se reabsorbe rápidamente permitiendo el crecimiento de tejido óseo recién formado entre la hidroxiapatita. De esta manera podemos ver las trabéculas óseas formadas entre los cristales de hidroxiapatita que aun no se han reabsorbido. Esto nos permite mantener la resistencia mecánica del hueso mientras se produce una neoosteogénesis.

Para algunos autores la hidroxiapatita es la cerámica que tiene mas poder osteogénico según los estudios realizados con microrradiografías²², pero por el contrario, tiene una gran estabilidad en el tiempo^{4,5} cosa que se traduce por una muy lenta reabsorción, en contra de lo que ocurre con el sulfato cálcico. Esto ha dado lugar a que algunos autores

propongan la utilización de materiales bifásicos, con la idea de que el implante se comporte con dos maneras de reabsorción: una rápida y una lenta. Nuestro material se ha comportado como un *composite* bifásico^{4, 5, 14}.

La evaluación clínica de los implantes es difícil de cuantificar, pero sin embargo los parámetros bioquímicos de calcio y fosfatasa alcalina séricos nos sirven como valoración indirecta de un aumento de la actividad osteoblástica en los animales del grupo II con respecto a los grupos I y III. Los resultados en el grupo III siguen una evolución similar al grupo II pero con menor intensidad.

Desde el punto de vista mecánico, gracias al *composite* bifásico utilizado, la HA cumple la función de esqueleto mientras el sulfato cálcico, de rápida reabsorción, induce también la colonización por hueso neoformado entre los cristales de hidroxiapatita.

En contra estudios realizados con HA compacta, en nuestro estudio no hemos comprobado la formación de tejido fibroso que encapsule el implante, ni tampoco se forma una reacción generalizada de cuerpo extraño.

Algunos autores han descrito alteraciones en el calcio plasmático en animales a los que se les han implantado algunos tipos de materiales²⁵. En nuestro estudio hemos comprobado incremento de las cifras de calcio sérico, manteniéndose dentro del rango de los valores fisiológicos. No hemos podido hallar diferencias significativas en las determinaciones de calcio ni fósforo en los animales de los grupos a estudio.

Conclusiones

Como resumen de nuestro trabajo podemos afirmar que el *composite* formado por hidroxiapatita y sulfato cálcico es un material biocompatible, sin reacción a cuerpo extraño. Actúa como osteoconductor de forma bifásica.

La proporción de los dos materiales utilizados definirá la intensidad y rapidez de la reacción biológica.

Agradecimientos

Este estudio se ha realizado gracias a la subvención de la beca CICYT (Ref. MAT98-0976-C02-02).

Bibliografía

1. **Beirne OR, Grenspan JS.** "Histologic evaluation of tissue response to hidroxyapatite implanted on human mandibles." *J. Dent. Res.*, 64: 1152, 1985.
2. **Block MS, Kent JN, Kay JF.** "Evaluation of hidroxyapatite coated titanium dental implants in dogs." *J.oral Maxilofacial Surg.*, 45: 601, 1987.
3. **Chiroff RT, White E, Roy D, Weber J.** "Tissue ingrowth of replamineform implants." *J. Biomed. Mater. Res.*, 6: 29-45, 1975.
4. **Daculsi G, legeros RZ, Mitre D.** "Cristal dissolution of biological and ceramic apatites." *Calcif. Tiss. Int.*, 1988.
5. **Daculsi G, Passuti N, Martin S, Deudon C, legeros RZ, Raheer S.** "Macroporous calcium phosphate ceramic for long bone surgery in humans and dogs. Clinical and histological study." *J. Biomedical Mat. Research.*, 24: 379-396, 1990.
6. **Doll B.A., Towle H.J., Hollinger J.O., Reddi A.H., Mellonig J.T.** "The osteogenic potential of two composite graft systems using osteogenin." *J. Periodontal.*, 61: 745-750, 1990.
7. **Drobeck HP.** "Histopathologic observations for long term soft tissue responses following implantation of random shaped particles and discs of durapatite." *J. Oral Maxillofac. Surg.*, 42(3): 143-149, 1984.
8. **Eysel W, Roy DM.** "Topotactic reaction of aragonite to hidroxyapatite." *Z. Kristollographic*, 141: 11-15, 1975.
9. **Finn R, Brammer JA.** "Interpositional "grafting" with autogenous bone and coralline hidroxyapatite." *J. Maxillofac. Surg.*, 8: 217-227, 1980.
10. **Froum S, Stahl SS.** "Human intraosseus healing responses to the placement of tricalcium phosphate ceramic implants. II. 13 to 18 months." *J. Periodontol.*, 58: 103-109, 1987.
11. **Glass DA, Mellonig JT, Towle HJ.** "Histologic evaluation of bone inductive proteins complexed with coralline hidroxyapatite in an extraskeletal site of the rat." *J. Periodontol.*, 60: 121-126, 1989.
12. **Han T, Carranza FA, Kenney EB.** "Calcium phosphate ceramics in dentistry." *J. West Soc. Periodont. Abstr.*, 32: 88, 1984.
13. **Holmes RE.** "Bone regeneration within a coralline hidroxyapatite implant." *Plast. Reconst. Surg.*, 63: 626-633, 1979.
14. **Iwano T, Kurosawa H., Murase K.** "Tissue reaction collagen-coated porous hidroxyapatite." *Clin. Orthop.*, 268: 243-252, 1991.
15. **Jarcho M, Bolen CH, Thomas MB, Bobick J, Kau JF, Doremus RH.** "Hidroxyapatite synthesis and characterization in dense polycrystalline form." *J. Matr Sci.*, 11: 2027-2035, 1976.
16. **Jarcho M.** "Calcium phosphate ceramic as hard tissue prosthetics." *Clin. Orthop.*, 157: 259-277, 1981.

17. **Jarcho M, Salsbury RL, Thomas MB, Doremus RH.** "Synthesis and fabrication of beta-tricalcium phosphate ceramics for potential prosthetic applications." *J. Matr. Sci.*, 14: 142-148, 1979.
18. **Kattagen B.** "Bone with bone substitutes." Ed. Springer-Verlag. Berlin, 1988.
19. **Kenney EB, Lekovic V, Han J, Carranza FA, Dimitrijevic B.** "The use of porous hydroxyapatite implants in periodontal defects." *J. Periodontol.*, 56: 82-88, 1985.
20. **Kenney EB, Lekovic V, Sa Ferreira JC, Han T, Dimitrijevic B, Carranza F.** "Bone formation within porous hydroxyapatite implants in human periodontal defects." *J. Periodontol.*, 57: 76-83, 1986.
21. **Kent JN, Quinn JH, Zide MF.** "Alveolar ridge augmentation using nonresorbable hydroxyapatite with or without autogenous cancellous bone." *J. oral Maxillofac. Surg.* 41: 629, 1983.
22. **Klein CP, Driessen AA, de Groot K,** "Biodegradation behaviour of various calcium phosphate materials in bone tissue." *J. Biomed. Mater. Res.*, 17: 769, 1983.
23. **Meffert RM, Thomas JR, Hamilton KM.** "Hydroxyapatite as an alloplastic graft in the treatment of human periodontal osseous defects." *J. Periodont.*, 56: 63, 1985.
24. **Metsger JS, Drikell TD, Paulsrud JR.** "Tricalcium phosphate ceramic, a resorbable bone implant: Review and current status." *J. Am. Dent. Assoc.*, 105: 1035-1038, 1982.
25. **Morales JJ.** "Estudio experimental del relleno de cavidades óseas con sulfato cálcico impregnado con gentamicina." Tesis Doctoral. Universidad de Barcelona. 1991.
26. **Morales de Cano JJ, Péraire C, García Ruzafa A, Hachem A, Fernández Sabaté A.** "Estudio de la citotoxicidad del sulfato cálcico como material de sustitución ósea." *Biomecánica*, 10: 8-14, 1998.
27. **Morales de Cano JJ, García Ruzafa A, Péraire C, Fernández Sabaté A.** "Estudio de la biocompatibilidad del sulfato cálcico como material de sustitución ósea." *Avances*, 28: 153-164, 1998.
28. **Morales de Cano JJ, Romero Ruiz J, García Ruzafa A, Fernández Sabaté A.** "Estudio experimental del relleno de cavidades óseas con hidroxiapatita asociada a colágeno." *Biomecánica*, Vol. 9: 101-107, 1997.
29. **Ohno K, Sugimoto A, Shiota T.** "Histologic finding of apatite-titanium complex dental implants in the jaw of dogs." *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.*, 71: 426, 1991.
30. **Reddi AH.** "Cell biology and biochemistry of endochondral bone development." *Cell Res.*, 1: 209-226, 1981.
31. **Reddi AH, Anderson WA.** "Collagenous bone matrix-induced endochondral ossification and hemopoiesis." *J. Cell Biol.*, 69: 557-572, 1976.
32. **Redja DA.** "Tricalcium phosphate as a bone substitute." *J. Bioeng.*, 1: 93-98, 1977.
33. **Redja DA.** "Composite materials for hard tissue replacement" (Thesis). Amsterdam, The Netherlands: Free University, 1977.
34. **Renoij W, Hoogendoorn H, Visser WJ, Lentferink RH, Scmitz MG, Van Ieperen H, Oldenburg SJ, Janssen WM, Akkermans LM, Wittebol P.** "Bioresorption of ceramic strontium⁸⁵ labelled calcium phosphate ceramic implants in dog femora." *Clin. Orthop.*, 197: 272, 1985.
35. **Roy DM, Linnehan S.** "Hydroxyapatite formed from coral skeleton carbonate by hydrothermal exchange." *Nature*, 247: 220-222, 1974.
36. **Sampath TK, Reddi AH.** "Dissociative extraction and reconstitution of extracellular matrix components involved in local bone differentiation." *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, 78: 7599-7603, 1981.
37. **Sampath TK, DeSimone D, Reddi AH.** "Role of extracellular matrix in bone induction." *Exp. Cell Res.*, 142: 460-466, 1982.
38. **Sampath TK, Nathanson M, Reddi AH.** "In vitro transformation of mesenchymal cells derived from embryonic muscle into cartilage in response to extracellular matrix components of bone." *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, 81: 3419-3423, 1984.
39. **Sampath TK, Reddi AH.** "Distribution of bone inductive proteins in mineralized and demineralized extracellular matrix." *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 119: 949-954, 1984.
40. **Takoaka T, Nakahara H, Yoshikawa H, Masuhara K, Tsuda T, Ono K.** "Ectopic bone induction on and in porous hydroxyapatite combined with collagen and bone morphogenetic protein." *Clin. Orthop.*, 234: 250-254, 1989.
41. **Tomford WW, Starkweather RJ, Goldman MH** "A study of the clinical incidence of infection in the use of banked allograft bone." *J. Bone Joint Surg.*, 63-: 244, 1981.
42. **Urist MR, Sato K, Brownell AG.** "Human bone morphogenetic protein (hBMP)." *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 173: 194-199, 1983.
43. **Urist MR, Lietze A, Dawson E.** "Beta-tricalcium phosphate delivery system for bone morphogenetic protein." *Clin. Orthop.*, 187: 277-280, 1984.
44. **West TL, Brustein DD.** "Comparison of replamineform coral and bone alloimplants in dog periodontal implants." *J. Dent. Res.*, 57(Spec. Issue): 101, 1978.
45. **Williams DF.** "Definitions in Biomaterials. Progress in Biomedical Engineering." Ed. Elsevier, Amsterdam, 1987.