

El cemento portland y su potencial uso en ingeniería de tejido óseo. Fase I: estudios de biocompatibilidad-efectos del hidróxido de calcio

Daniel Gallego^{a}, Luis Ernesto López^a, Derek Hansford^b,
Jonas Klemas^b*

^aGrupo de Investigación en Ingeniería Biomédica CES – EIA, Instituto de Ciencias de la Salud, Escuela de Ingeniería de Antioquia.

^bBiomedical Engineering Department-The Ohio State University, The Ohio MicroMD Laboratory.

(Recibido el 21 de octubre de 2005. Aceptado el 8 de noviembre de 2005)

Resumen

Actualmente existe una creciente e insatisfecha demanda de substitutos óseos con buen desempeño, tanto desde el punto de vista biológico como mecánico. Basados en las excelentes propiedades mecánico-estructurales del cemento pórtland, se plantea un estudio exploratorio de biocompatibilidad de este material. Se prepararon substratos de cemento pórtland gris tipo I bajo diferentes tratamientos (neutralizado-SN, carbonatado-SC, y no neutralizado-SnN), los cuales fueron luego sometidos a un ensayo de contacto directo con células CHO y HOS durante 24 h. Los substratos se caracterizaron por SEM, y tinciones con fnotftaleía para determinar su pH; mientras que la evaluación del estado del cultivo fue realizada por microscopía de contraste de fase. Los resultados indican que el pH fue mayor para SnN ($> 12,0$), seguido de SN, y finalmente de los SC ($\approx 7,4$); de igual manera se observó que la citotoxicidad de los substratos disminuyó en proporción al valor del pH. Se postula que el Ca(OH)_2 formado durante la hidratación del cemento es el causante del efecto tóxico de éste, y que al agotar las fuentes de Ca(OH)_2 , ya sea por carbonatación o neutralización, se afecta de manera positiva la biocompatibilidad del cemento pórtland.

----- *Palabras clave:* biocompatibilidad, carbonatación, carbonato de calcio, citotoxicidad, contacto directo.

* Autor de correspondencia: teléfono: +97+4+3053500. ext 243, fax: +97+4+ 5672001, correo electrónico: gallego-perez.2@osu.edu (D. Gallego P.).

Potential applications of portland cement on bone tissue engineering. Phase I: biocompatibility studies—calcium hydroxide effects

Abstract

There is an increasing and unfulfilled demand of bone substitutes with optimal mechanical and biological properties. Based on the excellent mechanical and structural properties of Portland Cement, a biocompatibility exploratory study of this material was proposed. Plain substrates were fabricated with Gray Type I Portland Cement under different conditions (Neutralized-SN, Carbonated-SC, not neutralized-SnN), which were then used to conduct a Direct Contact Assay with CHO and HOS cells for 24h. The substrates were characterized by SEM, and phenolphthalein assays to determine the pH value, while the cell culture assays were evaluated by Phase Contrast Microscopy. The results show that SnN had the highest pH value ($> 12,0$), followed by SN, and finally by SC ($\approx 7,4$); it was also observed that the cytotoxicity of the substrates diminished in proportion to the pH value. It is proposed that the cytotoxicity of Portland Cement is caused by the Ca(OH)_2 formed during the hydration of this material. Thus, by lowering the amount of Ca(OH)_2 , either by carbonation or neutralization, the biocompatibility of the material is positively affected.

----- *Key words:* biocompatibility, calcium carbonate, carbonation, cytotoxicity, direct contact.

Introducción

La práctica clínica ortopédica para el tratamiento de enfermedades degenerativas y fracturas con pérdida de fragmentos óseos grandes, demanda de la producción de materiales substitutivos, para lo cual se han utilizado con éxito materiales autólogos o alogénicos, pero su uso es limitado debido a su baja disponibilidad, la alta inmunogenicidad y la morbilidad de las zonas del cuerpo utilizadas como donantes de tejido [1].

De manera alternativa se propone la reconstrucción de tejidos mediante el cultivo de células específicas en matrices tridimensionales [2-4], de esta manera se podrían obtener materiales de relleno apropiados para los defectos ortopédicos e implantes con mejores características y comportamiento mecánico que las utilizadas actualmente, lo cual está revolucionando el tratamiento de este tipo de patologías [5].

La ingeniería de tejidos surge como respuesta a la necesidad de regenerar órganos dañados o crear tejidos nuevos, con fundamento en los conocimientos básicos de la biología celular y molecular, combinado con la investigación de biomateriales, lo cual ha proporcionado las herramientas esenciales para tener un acercamiento práctico a la biorregeneración [6].

En el caso de la ingeniería de tejido óseo se requiere el desarrollo de matrices tridimensionales [7, 8], construidas con materiales biocompatibles; es decir, que no tengan efectos deletéreos sobre las células con las que entren en contacto, pero que además tengan propiedades bioactivas, que contribuyan a la proliferación celular, al mantenimiento de la función del tejido y en algunos casos que puedan ser modificados para que mantengan el fenotipo de las células, y que además permitan dar forma y regulen el tamaño de los nuevos tejidos [5].

Teniendo en cuenta lo anterior, se han estudiado una gran variedad de materiales construidos en polímeros naturales y sintéticos [9], encontrándose algunos con buen potencial, como los polímeros de ácido poliláctico (PLA), ácido

poliglicólico (PGA) y sus copolímeros (PLGA) [10, 11], los cuales tienen excelentes propiedades de biocompatibilidad y bioactividad [12], al igual que algunos materiales metálicos, cerámicos y biovidrios [13]; sin embargo, ninguno de estos reúne todas las características adecuadas, especialmente en lo pertinente a sus propiedades mecánicas y estructurales que les permitan ser utilizados con éxito en las aplicaciones de la ingeniería de tejido óseo [14].

Una opción importante la representa el Cemento Portland (CP), el cual tiene una composición química similar a la del Agregado de Mineral Trióxido (*Mineral trioxide aggregate, MTA*) que es ampliamente usado como material de relleno en endodoncia [15]. Se sabe que estos productos tienen un efecto citotóxico y antibacterial, debido a que presentan altos niveles de hidróxido de calcio ($\text{Ca}-(\text{OH})_2$) generado en el proceso de hidratación [16], hecho que es beneficioso en los tratamientos odontológicos [17] pero no en el caso de la ingeniería de tejido óseo; sin embargo algunos autores sugieren que estos materiales podrían estimular una respuesta biológica positiva en la proliferación de osteoblastos humanos [18]. Lo anteriormente descrito, además del bajo costo del CP, hacen de este material una opción interesante para tener en cuenta en la construcción de matrices tridimensionales para la ingeniería de tejido óseo. Aquí se describe el desarrollo de un estudio para evaluar el desempeño biológico de este material.

Materiales y métodos

Fabricación y caracterización de los substratos de cemento pórtland

Se fabricaron substratos planos de cemento pórtland gris tipo I (Cementos Rioclaro, Colombia), para lo cual una proporción 2:1 de cemento y agua destilada se homogeneizó mediante agitación manual, y luego fue vertida en moldes de silicona de 2 cm de diámetro y 0,5 de profundidad. La mezcla se dejó endurecer por 24 h, luego de las cuales fueron removidos los substratos del molde y finalmente se hidrataron en un autoclave (Tuttnauer, DE) a

134 °C y aproximadamente 35 psi durante 24 h. Previo a los ensayos de cultivo celular, parte de estos sustratos fueron neutralizados por medio de lavados repetidos en PBS y medio de cultivo a 37 °C durante 20 min; se obtuvieron inicialmente dos tipos de sustratos diferentes: neutralizados (SN) y no neutralizados (SnN).

De igual manera se fabricó por separado un tipo adicional de sustrato (carbonatado) utilizando el proceso de obtención anteriormente mencionado, pero con la diferencia de que este tipo de muestras se dejaron endurecer e hidratar en una incubadora a 37 °C, 20% de CO₂ y aproximadamente 95% de humedad durante 8 días; dando como producto un sustrato carbonatado (SC). Las muestras finalmente se evaluaron cualitativamente por medio de microscopía electrónica de barrido (MEB), y con fenoltaleína (ProtoKimica, Colombia) para verificar alcalinidad en las muestras.

Cultivo celular

Se utilizaron dos líneas celulares diferentes en cada experimento: una de osteosarcoma humano —HOS— (ATCC, USA), la cual fue propagada en recipientes de cultivo de 75 cm² (Corning, NY, USA), utilizando medio mínimo esencial Eagle's (MEM, SIGMA, USA), suplementado con 10% de suero bovino fetal (SBF, Invitrogen, USA) y 1% de una mezcla de antibióticos (penicilina y estreptomycin) (Sigma, USA), en una incubadora bajo una atmósfera húmeda con 5% de CO₂ a 37 °C; y una línea de células de ovario de hámster

Chino-CHO (ATCC, USA) cultivadas en medio RPMI 1640 (SIGMA, USA), suplementado con 5% de SBF y 1% de antibióticos, bajo las condiciones antes descritas.

Una vez se alcanzó la confluencia en los recipientes de cultivo, las células en monocapa fueron tratadas con tripsina (Irving Scientific, CA, USA) y subcultivadas en recipientes de 6 posos (Corning, NY, USA) a una densidad inicial de 1×10^5 células/mL (4 réplicas por cultivo), luego fueron incubadas durante 24 horas antes de exponerlas a los diferentes sustratos (SN, SnN, y SC) con el fin de permitir la adecuada adherencia; y como control negativo se utilizó poliestireno, material del cual están contruidos los recipientes de cultivo.

Ensayo de Citotoxicidad

Para la evaluación del efecto citotóxico del cemento pórtland se utilizó una variante del ensayo de contacto directo [19], para lo cual se modificó uno de los parámetros de calificación (tabla 1). Todas las muestras de cemento fueron esterilizadas en un autoclave a 134 °C y alrededor de 35 psi durante 30 min. Los sustratos (SN, SnN y SC) se pusieron en contacto con los cultivos durante 24 h, luego de lo cual se removió el medio, y se evaluó la morfología de las células remanentes y la apariencia del cultivo en un microscopio invertido de contraste de fases (TMS, Nikon, USA). Cada cultivo recibió una calificación de acuerdo con los parámetros mostrados en la tabla 1.

Tabla 1 Calificaciones para el ensayo de contacto directo (ECD)

<i>Calificación</i>	<i>Reactividad</i>	<i>Descripción</i>
0	Ninguna	No se detecta ninguna célula muerta o mal formada bajo la muestra
1	Leve	Se observan algunas células muertas o mal formadas bajo la muestra
2	Media	Zona de células muertas limitada al área cubierta por la muestra
3	Moderada	La zona se extiende hasta 0,5 cm más allá del área cubierta por la muestra
4	Severa	La zona se extiende 1 cm más allá de área cubierta por la muestra, pero no compromete todo el recipiente

La viabilidad de las células remanentes fue analizada utilizando el método de la exclusión con Azul de Tripiano [20, 21]; donde la proporción de células viables y no viables fue determinada usando una Cámara de Neubauer (Clay Adams, NJ, USA).

Resultados

Fabricación de substratos

Con la metodología descrita se logró obtener placas de cemento pórtland de 2 cm de diámetro por 3 mm de espesor aproximadamente, de consistencia fuerte, aspecto y estructura macroscópica superficial homogénea. Los análisis mediante microscopía electrónica de barrido (figura 1) mostraron una microestructura granular típica del cemento pórtland después de procesado.

Las pruebas realizadas con fenolftaleína muestran que los SnN y SN, mantienen un pH considerablemente alcalino (tinción rojo a púrpura) que se podría ubicar por encima de un valor de 12,0; mientras que al realizar estos ensayos en los SC, el cemento no cambió de color, lo que indica que el pH para estas muestras se encuentra aproximadamente por debajo de 9,0 (figura 2).

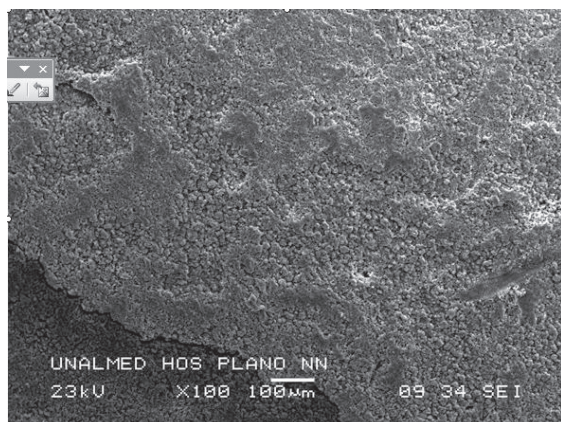


Figura 1 Micrografía electrónica de barrido de un substrato de cemento no neutralizado (SnN) a 100 aumentos. Se aprecia una estructura granular superficial típica del cemento



(a)



(b)

Figura 2 (a) Fotografía tomada bajo el estereomicroscopio (20 aumentos) de un SnN después de ser sometido al ensayo con fenolftaleína. (b) fotografía tomada bajo el estereomicroscopio (20 aumentos) de un SC después de ser sometido al ensayo con fenolftaleína

Pruebas de citotoxicidad

Los resultados sugieren un efecto tóxico significativo del cemento pórtland, tanto en los SN, como en los SnN, mostrando una tendencia de mayor toxicidad en el segundo caso cuando se evaluaron mediante el ECD. Estas observaciones se resumen en la tabla 2, donde se muestra la valoración del estado del cultivo de acuerdo con los parámetros definidos en la tabla 1. Los cultivos en presencia de SN presentaron zona de células muertas limitadas al área cubierta por la muestra, lo cual corresponde a una calificación 2 y una reactividad media; mientras que para el caso de los cultivos realizados en presencia de

SnN, en la mayoría, la zona de células muertas se extendió más allá del área cubierta por el sustrato (aproximadamente 2 mm), lo que sugiere una calificación 3 y un grado de reactividad moderado.

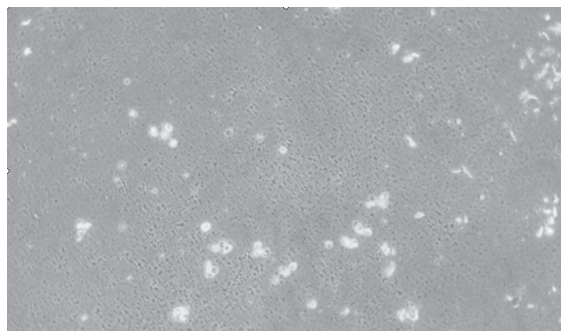
Las observaciones hechas en los cultivos en presencia de SC muestran disminución considerable de reactividad. La apariencia de los cultivos es muy similar a los controles negativos, y sólo se observaron unas pocas células muertas o mal

formadas en el área cubierta por la muestra, lo cual sugiere un grado de reactividad leve y calificación de 1.

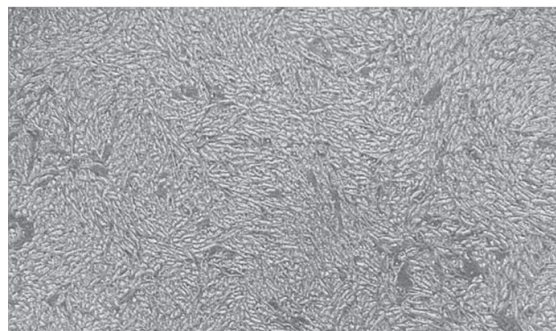
Al evaluar las células remanentes, se encontró que los valores promedio de viabilidad se encuentran todos entre el 95 y 99%, lo cual sugiere que el efecto citotóxico de los sustratos es localizado, y no se difunde de manera significativa a las células ubicadas por fuera de las áreas delimitadas por los sustratos.

Tabla 2 Resultados de la evaluación con el método de ensayo de contacto directo (ECD)

Substrato	Línea celular									
	HOS					CHO				
	Calificación					Calificación				
	Moda					Moda				
SN	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
SnN	3	3	3	3	3	3	2	3	3	3
SC	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1



(a)



(b)

Figura 3 (a) Apariencia de un cultivo de células CHO (20 aumentos) en presencia de un SnN (área en contacto con la muestra). (b) Apariencia de un cultivo de células CHO (20 aumentos) en presencia de un SC (área en contacto con la muestra)

Discusión y conclusiones

En general se observó un efecto tóxico significativo del cemento para los SN y SnN, pero dicho efecto se vio considerablemente disminuido en los SC. La toxicidad correspondiente a los sustratos cementíceos hidratados en el autoclave se puede atribuir a la alta alcalinidad de dichas muestras. Durante el proceso de hidratación del cemento pórtland se producen altas cantidades de

hidróxido de calcio Ca(OH)_2 , el cual mantiene el pH del cemento usualmente en un valor por encima de 12,0; este material (hidróxido de calcio) es comúnmente utilizado en tratamientos endodónticos [22-24], y al ser puesto en un medio acuoso, se disocia liberando iones Calcio (Ca^{++}) e hidroxilo (OH^-), y por acción de estos últimos se crea un ambiente alcalino muy hostil para las células, lo cual explica el efecto degenerativo

observado [25]. Adicionalmente, hay reportes que muestran que el hidróxido de calcio es un agente de granulomas típicos, e inhibidor parcial del proceso de cicatrización [26].

El efecto citotóxico se redujo en SN probablemente por una liberación previa de iones $(OH)^-$, provenientes del hidróxido de calcio (subproducto de la hidratación del cemento pórtland) durante el proceso de neutralizado seguido en estas muestras, lo cual pudo disminuir el pH de la muestra, fomentando así un ambiente “menos hostil” para las células cultivadas en presencia de estos sustratos.

Por otro lado, la alta biocompatibilidad observada en los sustratos hidratados en la incubadora bajo una atmósfera de CO_2 (SC), se debe a la disminución casi total del hidróxido de calcio dentro del cemento por carbonatación del material [27], produciéndose así carbonato de calcio ($CaCO_3$), lo cual se refleja en una disminución del pH de la muestra (corroborando los resultados con fenolf-taleína) y haciendo el material más compatible con los tejidos biológicos. La muerte celular observada en estos cultivos, al ser tan insignificante, es posible que se haya dado por daño mecánico ligado con el movimiento de la muestra cementicia en el medio líquido; sin embargo, es recomendable hacer ensayos de citotoxicidad con métodos más cuantitativos como el MTT [28, 29] o ensayos de proliferación celular [30, 31], para determinar con exactitud hasta dónde se afecta de manera positiva la biocompatibilidad del cemento pórtland por carbonatación de éste.

La producción de Carbonato de Calcio en el Cemento Portland durante su hidratación, puede evidentemente aumentar la Biocompatibilidad e incluso la Bioactividad de este material. A parte del hecho de que el contenido inorgánico mineral del hueso está compuesto principalmente por Carbonato de Calcio y Fosfato de Calcio [32], hay también evidencias que muestran las capacidades del $CaCO_3$ de actuar como un tampón en solución, manteniendo el pH del medio dentro de un rango fisiológico (aproximadamente 7.4) [33]; además, se ha mostrado que el $CaCO_3$

puede fomentar la adherencia y proliferación celular [34]. El Carbonato de Calcio es también parte de los componentes principales de la fase mineral de varios Biomateriales derivados de Corales, comúnmente usados en implantes óseos, los cuales han mostrado ser biocompatibles, osteoinductivos (promotores del crecimiento del tejido óseo) y reabsorbibles [35 - 39].

La introducción de materiales puzolánicos como metacaolín en el cemento, en teoría también podría reducir el efecto tóxico de este material causado por el hidróxido de calcio, ya que las puzolanas proveen una fuente de sílica, la cual reacciona con el hidróxido de calcio libre, produciendo así una matriz adicional y similar a la de hidrato de silicato de calcio (C-S-H) que se forma normalmente en el cemento durante el proceso de hidratación, incrementando así las propiedades mecánicas del cemento a largo plazo [40].

Se presentaron dos formas posibles de disminuir la citotoxicidad del cemento pórtland, afectando su alcalinidad por medio de la reducción de los niveles de hidróxido de calcio. Se espera que las características mecánicas del cemento no se vean afectadas de manera negativa, ya que para ambos casos (carbonatación o adición de puzolanas) el compuesto directamente implicado es el hidróxido de calcio, el cual no tiene como función principal darle fortaleza a la pasta de cemento (uso característico de la matriz C-S-H) [16, 41]. El hidróxido de calcio puede tener implicaciones más importantes cuando se habla de concreto; ya que por la alta alcalinidad que éste aporta al cemento pórtland, el acero utilizado como refuerzo en el concreto es “pasivado” (formación de una capa delgada de óxido), protegiéndolo así de futuras corrosiones [42].

Cualquiera sea el método escogido para lograr un mayor grado de Biocompatibilidad y Bioactividad del Cemento Portland, y en combinación con sus excelentes propiedades mecánicas; el trabajo futuro se debe enfocar en construir estructuras porosas tridimensionales, imitando la arquitectura del hueso; las cuales trabajarían como matrices implantables y altamente estables, capaces de

promover la regeneración del tejido óseo, y soportar cargas mecánicas asociadas con el remodelamiento del tejido [43, 44]. Actualmente en nuestros laboratorios se está adelantando investigación en la obtención de matrices porosas en Cemento Portland Blanco Tipo I (Cementos Nare, Colombia), a partir de metodologías comúnmente utilizadas para la producción de este tipo de estructuras en polímeros (Particulate Leaching) (figura 4) [45, 46].

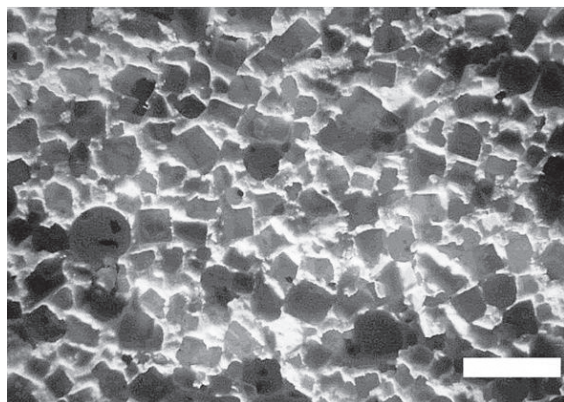


Figura 4 Fotografía (30X) de una matriz porosa en cemento pórtland blanco tipo I, fabricada con el proceso de *Particulate Leaching* (la barra blanca indica una medida de 1 mm)

Agradecimientos

Cementos Rioclaro, Cementos Nare, Laboratorio de Microscopía Avanzada (Universidad Nacional, Medellín), Escuela de Ingeniería de Antioquia, Instituto de Ciencias de la Salud, The Ohio State University y The Ohio MicroMD Laboratory.

Referencias

1. J. R. Jones, L. L. Hench. "Regeneration of trabecular bone using porous ceramics". *Cur Op Sol State Mat Sci*. Vol. 7. 2003. pp. 301-307.
2. B. D. Boyan, C. H. Lohmann, J. Romero, Z. Schwartz. "Bone and cartilage tissue engineering". *Clin Plast Surg*. Vol. 26. 1999. pp. 629-645.
3. L. G. Griffith, G. Naughton. "Tissue engineering-current challenges and expanding opportunities". *Science*. Vol. 8. 2002. pp. 1009-1014.
4. D. W. Jackson, T. M. Simon. "Tissue engineering principles in orthopaedic surgery". En: *Clin Orthop*. Vol. 367. 1999. pp. 531-545.
5. S. Vogt, Y. Larcher, B. Wilke, M. Schnabelrauch. "Fabrication of highly porous scaffold materials based on functionalized oligolactides and preliminary results on their use in bone tissue engineering". *Eur Cells Mat*. Vol. 4. 2002. pp. 30-38.
6. O. Schultz, M. Sittlinger, T. Haeupl, G. R. Burmester. "Emerging strategies of bone and joint repair". *Arthritis Res*. Vol. 2. 2000. pp. 433-436.
7. F. P. Luyten, F. Dell'Accio, C. de Bari. "Skeletal tissue engineering: opportunities and challenges". *Best Pract Res Clin Rheumatol*. Vol. 15. 2001. pp. 759-769.
8. L. L. Hench, J. M. Polak. "Third-generation biomedical materials". *Science*. Vol. 8. 2002. pp. 1007-1014.
9. K. J. Burg, S. Porter, J. F. Kellam. "Biomaterial developments for bone tissue engineering". *Biomaterials*. Vol. 21. 2000. pp. 2347-2359.
10. C. M. Agrawal, K. A. Athanasiou. "Technique to control pH in vicinity of biodegrading PLA-PGA implants". *J Biomed Mater Res*. Vol. 38. 1997. pp. 105-14.
11. J. C. Middleton, A. J. Tipton. "Synthetic biodegradable polymers as orthopedic devices". *Biomaterials*. Vol. 21. 2000. pp. 2335-2346.
12. R. di Toro, V. Betti, S. Spampinato. "Biocompatibility and integrin-mediated adhesion of human osteoblasts to poly(DL-lactide-co-glycolide) copolymers". *Eur J Pharm Sci*. Vol. 21. 2004. pp. 161-169.
13. D. C. Tancred, A. J. Carr, B. A. McCormack. "Development of a new synthetic bone graft". *J Mater Sci Mater Med*. Vol. 9. 1998. pp. 819-823.
14. K. Hae-Won, L. Seung-Yong, B. Chang-Jun, N. Yoon-Jung, K. Hyoun-Ee, K. Hyun-Man, K. Jea Seung. "Porous ZrO₂ bone scaffold coated with hydroxyapatite with fluorapatite intermediate layer". *Biomaterials*. Vol. 24. 2003. pp. 3277-3284.
15. C. Bargholz. "Perforation repair with mineral trioxide aggregate: a modified matrix concept". *Int Endod J*. Vol. 38. 2005. pp. 59-69.
16. QLC Group of Companies. The hardening of Portland Cement. QLC Group Technical note 1999. http://www.ach.com.au/qcl/pdf_files/Cem_hard.pdf. Consultado Marzo 2005.
17. U. R. Funteas, J. A. Wallace, E. W. Fochtman. "A comparative analysis of Mineral Trioxide Aggregate and Portland cement". *Aust Endod J*. Vol. 29. 2003. pp. 43-44.
18. E. T. Koh, M. Torabinejad, T. R. Pitt Ford, K. Brady, F. McDonald. "Mineral trioxide aggregate stimulates

- a biological response in human osteoblasts". *Biomed Mater Res*. Vol. 5. 1997. pp. 432-439.
19. S. J. Northup, J. N. Cammack. "Mammalian cell culture models". *Handbook of biomaterial evaluation: scientific, technical, and clinical testing of implant materials*. 2.^a ed. Taylor & Francis. Ann Arbor. 1999. pp.325-339.
20. J. P. Kaltenbach, M. H. Kaltenbach, W. B. Lyons. "Nigrosin as a dye for differentiating live and dead ascites cells". *Exp Cell Res*. Vol. 15. 1958. pp. 112-117.
21. R. I. Freshney. "Cytotoxicity". *Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique*. Wiley. New York. 2000. p. 331.
22. M. Pawinska, E. Skrzydlewska. "Release of hydroxyl ions from calcium hydroxide preparations used in endodontic treatment". *An Acad Med Bialost*. Vol. 48. 2003. pp. 145-149.
23. M. K. Caliscan, M. Tûrkûn. "Prognosis of permanent teeth with internal resorption: a clinical review". *Endod Dent Traumatol*. Vol. 13. 1997. pp. 75-78.
24. S. J. Clark, P. Eleazer. "Management of a horizontal root fracture after previous root canal therapy". *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. Vol. 89. 2000. pp. 220-223.
25. S. Seltzer. *Endodontology Ciologic considerations in endodontic procedures*, 2^a ed, Philadelphia, Lea & Felager Co. 1988. pp. 281-325.
26. R. Weinstein, M. Goldman. "Apical hard tissue deposition in adult teeth of monkeys with use of calcium hydroxide". *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*. Vol. 43. 1977. pp. 627-630.
27. G. J. Verbeck. *Carbonation of Hydrated Portland Cement*. Research and Development Laboratories of the Portland Cement Association. Bulletin 87. 1958.
28. S. H. Inayat-Hussain, N. F. Rajab, H. Roslie, A. A. Hussin, A. M. Ali, B. O. Annuar. "Cell death induced by hydroxyapatite on L929 fibroblast cells". *Med J Malaysia*. Vol. 59. 2004. pp. 176-177.
29. T. G. Van Kooten, C. L. Klein, H. Kohler, C. J. Kirkpatrick, D. F. Williams, R. Eloy. "From cytotoxicity to biocompatibility testing in vitro: cell adhesion molecule expression defines a new set of parameters". *J Mater Sci Mater Med*. Vol. 8. 1997. pp. 835-41.
30. J. Wen, H. Q. Mao, W. Li, K. Y. Lin, K. W. Leong. "Biodegradable polyphosphoester micelles for gene delivery". *J Pharm Sci*. Vol. 93. 2004. pp. 2142-57.
31. G. Ciapetti, P. Roda, L. Landi, A. Facchini, A. Pizzoferrato. "In vitro methods to evaluate metal-cell interactions". *Int J Artif Organs*. Vol. 15. 1992. pp. 62-66.
32. I. H. Kalfas. "Principles of bone healing". *Neurosurg Focus*. Vol. 10. 2001. Article 1.
33. C. Schiller, M. Epple. "Carbonated calcium phosphates are suitable pH-stabilising fillers for biodegradable polyesters". *Biomaterials*. Vol. 24. 2003. pp. 2037-2043.
34. T. Serizawa, T. Tateishi, M. Akashi. "Cell-compatible properties of calcium carbonates and hydroxyapatite deposited on ultrathin poly(vinyl alcohol)-coated polyethylene films". *J Biomater Sci Polym*. Vol. 14. 2003. pp. 653-663.
35. G. Guillemin, J. Patat, J. Fournié, M. Chetail. "The use of coral as a bone graft substitute". *J Biomed Mater Res*. Vol. 21. 1987. pp. 557-567.
36. M. Richard, E. Aguado, G. Daculsi, M. Cottrel. "Ultrastructural and electron diffraction of the bone-ceramic interfacial zone in coral and biphasic calcium phosphate implants". *Calcif Tissue Int*. Vol. 62. 1998. pp. 437-442.
37. F. Roux, D. Brasnu, B. Loty, B. Georges, G. Guillemin. "Madrepore coral: a new bone graft substitute for cranial surgery". *J Biomed Mater Res*. Vol. 69. 1988. pp. 510-513.
38. J. Ouhayoun, A. Shabana, S. Issakian. "Histological evaluation of natural coral skeleton as a grafting material in miniature swine mandible". *J Mater Sci Med*. Vol. 2. 1992. pp. 222- 228.
39. R. Kania, A. Meunier, M. Hamadouche, L. Sedel, H. Petite. "Addition of fibrin sealant to ceramic promotes bone repair: long term study in rabbit femoral defect model". *J Biomed Mater Res (Appl Biomater)*. Vol. 43. 1998. pp. 38-45.
40. American Society for Testing and Materials, 1975, ASTM C595, *Standard Specifications for Blended Hydraulic Cements*. Annual Book of ASTM Standards, Part 13, ASTM, Philadelphia, PA p. 353.
41. S. L. Meyers. *Effect of Carbon Dioxide on Hydrated Cement and Concrete*. Rock Products 1949, pp. 96-98.
42. G. W. Whitman, R.P. Russell, W.J. Altieri. "Effect of Hydrogen Ion Concentration on the Submerged Corrosion of Steel". *Ind. Eng. Chem*. Vol. 16. 1924. pp. 665-670.
43. J. R. Mosley. "Osteoporosis and bone functional adaptation: mechanobiological regulation of bone architecture in growing and adult bone, a review". *J Rehabil Res Develop*. Vol. 37. 2000. pp. 189-99.
44. O. Akhouayri, M.H. Lafage-Proust, A. Rattner, N. Laroche, A Caillot- Augusseau, C. Alexandre, L. Vico. "Effects of static or dynamic mechanical stresses on osteoblast phenotype expression in threedimensional contractile collagen gels". *J Cell Biochem*. Vol. 76. 2000. pp. 217-230.

45. S. W. Suh, J. Y. Shin, J. Kim, C. H. Beak, D. I. Kim, H. Kim, S. S. Jeon, I.W. Choo. "Effect of different particles on cell proliferation in polymer scaffolds using a solvent-casting and particulate leaching technique". *ASAIO J.* Vol. 48. 2002. pp. 460-464.
46. S. H. Oh, S. G. Kang, E. S. Kim, S. H. Cho, J. H. Lee. "Fabrication and characterization of hydrophilic poly (lactic-co-glycolic acid)/poly (vinyl alcohol) blend cell scaffolds by melt-molding particulate-leaching method". *Biomaterials.* Vol. 24. 2003. pp. 4011-4021.