

Los sustitutos óseos y sus posibilidades actuales

FRANCISCO FORRIOL

Laboratorio de Ortopedia Experimental, Facultad de Medicina, Universidad de Navarra, España

Los sustitutos óseos por excelencia son los injertos de hueso cortical o esponjoso conservados en formas distintas, aunque también hay que considerar otros materiales, minerales o cerámicos, o la ingeniería de tejidos que permite la reparación de los defectos óseos con el aporte celular, de factores de crecimiento y de sustitutos óseos para conseguir la regeneración del tejido lesionado.

Los sustitutos óseos pueden ser activos, cuando inducen la formación de hueso; inertes, si no intervienen en la osteogénesis; e incompatibles, cuando desfavorecen o impiden el proceso. Una sustancia densa, sin orificios ni poros, impide que el hueso crezca en su interior, mientras que materiales muy porosos permiten el desarrollo de vasos y trabéculas aunque pueden ser muy frágiles y romperse.

El hueso es un tejido único por sus propiedades; una estructura material rígida y, sin embargo, con gran plasticidad morfológica. La mecánica del hueso es compleja y difícil de estudiar. Además, se remodela durante toda la vida, un mecanismo que evita su rápido envejecimiento con la muerte de los osteocitos y microlesiones por fatiga.⁴⁹ El hueso está en un proceso de remodelación continua y en un momento determinado, la resorción puede predominar sobre la formación y producir enfermedades involutivas, como la osteoporosis.

Otra característica de la reparación ósea es que el tejido óseo no produce tejido cicatricial, por el contrario, como pocos tejidos del organismo se repara con su propia estructura. El hueso forma hueso y este principio resulta

de mucha utilidad para la reparación de los defectos óseos pues cualquier sustituto óseo deberá ser sustituido, finalmente, por hueso del propio receptor.

A la hora de escoger o definir un biomaterial para reparar el hueso hay que considerar si tiene una o más de las siguientes propiedades:

- Osteogénesis: aunque todos los sustitutos óseos terminan siendo sustituidos por hueso, sólo el injerto autólogo de hueso se integra y desarrolla el proceso de formación ósea desde el primer momento.
- Osteoconducción o capacidad del sustituto para que crezca el hueso desde los márgenes del defecto, resorbiendo gradualmente la matriz implantada, como ocurre con los aloinjertos de hueso cortical y los biomateriales reabsorbibles.

Para que se dé un proceso de osteoconducción adecuado se precisa que el implante esté próximo al hueso vecino, que permita la viabilidad de las células osteogénicas que crecen aprovechando sus poros y que haya una estabilidad entre el propio implante y el hueso vecino (Fig. 1).

- Osteoinducción: es la capacidad de un material para promover la transformación fenotípica de células indiferenciadas en osteoblastos, como sucede con las proteínas morfogénicas, los péptidos o las matrices óseas desmineralizadas. Osteoinducción es un término que proviene de la embriología y ha sido definida como “la acción evocativa de una célula sobre otra”, idea tomada de Berrill,⁶ o “acción evocativa de un tejido sobre otro”. Un tipo de célula, la inductora, actúa sobre otra, para despertar el origen de una tercera, totalmente diferente. Las características de esta inducción dependen del inductor, de la respuesta celular o de la duración y el momento de la interacción (Fig. 2).

La osteoinducción²² es el reclutamiento de células pluripotenciales desde los tejidos del huésped, un proceso que requiere la migración, proliferación y diferenciación de las células que rodean el implante, y de las células os-

Recibido el 1-3-2005.

Correspondencia:

Dr. FERNANDO FORRIOL
Avda Pío XII s/n
31008 – Pamplona, España
Tel.: 34 948425600 (ext. 6403)
Fax: 34 948425649
fforriol@unav.es

teoprogenitoras derivadas de las células mesenquimáticas perivasculares bajo la influencia de las proteínas morfogénicas óseas (BMP)²⁶ (Fig. 3).

- Osteopromoción es la propiedad de las sustancias que mejoran o estimulan la cascada natural de la reparación ósea (plasma rico en plaquetas, médula ósea, periostio, estimulación magnética o factores bioactivos, como la FGF).

Sustitutos óseos

Los sustitutos óseos, materiales sintéticos o naturales, se caracterizan por ser materiales osteoconductores que sirven como estructuras sobre las que crece el hueso y lo sustituyen, aunque algunos sustitutos pueden tener también propiedades osteoinductivas por sí mismos o por la acción de otras sustancias añadidas.

Un sustituto óseo debe cumplir tres funciones: procurar la osteoinducción, el proceso que induce la formación local de hueso reclutando células formadoras de hueso; servir como osteoconductor, aportando un soporte para la deposición ósea y, por último, constituir la fuente de formación de células óseas. Todas las técnicas de implantes óseos se basan en utilizar, en mayor o menor grado, una o varias de estas funciones. Nos parece de gran interés combinar estas propiedades. Por ello, el aporte de factores de crecimiento a un injerto o a un sustituto óseo puede reportar ventajas.

La clasificación de los sustitutos óseos puede establecerse en aloinjertos, cerámicas y polímeros acompañados, a veces, por células y factores de crecimiento (Tabla 1), un buen número de ellos disponibles en el mercado (Tabla 2).

Injertos óseos: sustitutos óseos biológicos

Los aloinjertos se utilizan en varios cientos de miles, cada año, en todo el mundo y presentan un alto índice de éxitos clínicos en lesiones osteolíticas, artrodesis de columna, sustituciones diafisarias intercalares, reparación de tumores malignos, reconstrucción maxilofacial, técnicas de relleno para implantes dentales y en las no uniones o en las pseudoartrosis congénitas. Sin embargo, hay que comprender también sus fracasos, para lo cual es necesario conocer la biología de su incorporación.

La incorporación de un aloinjerto óseo es un proceso secuencial que comienza con la inflamación y atraviesa diferentes estadios de revascularización, osteogénesis y remodelación, hasta establecer una estructura mecánicamente adecuada.²² La colocación de un injerto implica una cirugía, a veces cruenta, que produce una respuesta inflamatoria con diferenciación celular en osteoblastos y capilares vasculares. La revascularización dependerá del estado del lugar donde se implante el injerto, de la pre-

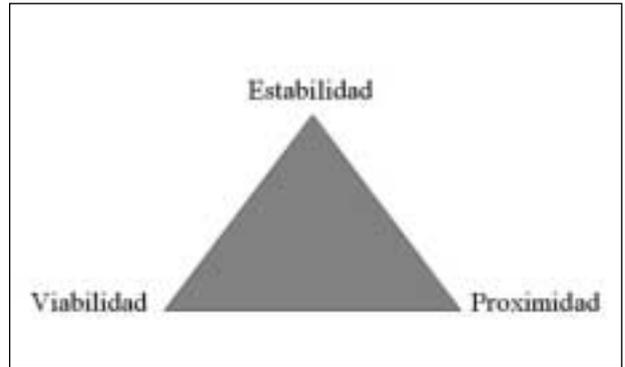


Figura 1. Osteoconducción.

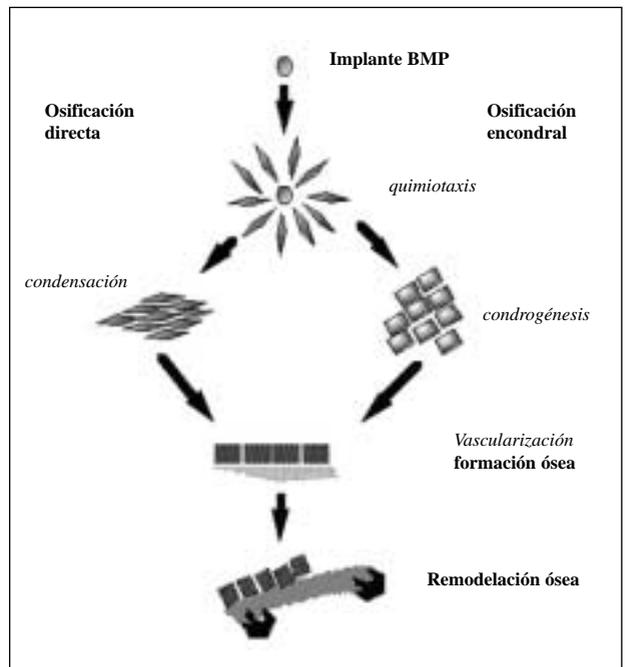


Figura 2.

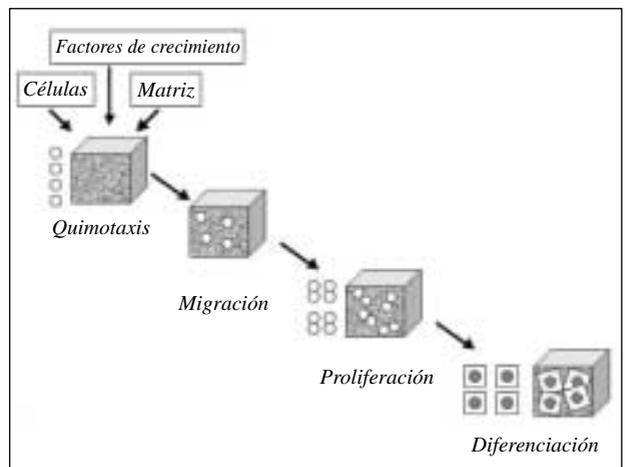


Figura 3.

Tabla 1. Sustitutos óseos

Aloinjertos	Injertos óseos conservados de sujetos de la misma especie. Se pueden utilizar solos o combinados
Cerámicas	Fosfatos cálcicos, sulfato cálcico, cristales bioactivos. Solos o combinados
Polímeros	Reabsorbibles o no reabsorbibles
Células	Precisan transportador y matriz
Factores de crecimiento	Proteínas morfogénicas (BMP). Precisan transportador

sencia de una interfaz estable entre el injerto y el lecho y de la secuencia ordenada de mediadores y respuesta celular.

La quimioterapia y la radioterapia influyen en el proceso de consolidación del aloinjerto.^{33,66,74} Se ha postulado que la irradiación daña las BMP, las células del tejido conectivo y las estructuras vasculares.

Urist⁷⁰ define la incorporación de un injerto o implante como “el proceso de recubrimiento e interdigitación del tejido óseo donante con el nuevo hueso depositado como el recipiente” y distingue cinco fases, 1) inflamación y proliferación de células en el lecho injertado (minutos a horas); 2) y 3), respuesta osteoinductiva de las células en el lecho del hueso injertado; 4) osteoconducción: neovascularización y neoformación ósea (de meses a años) y 5) función mecánica (de dos a 20 años).

La actividad biológica de los aloinjertos es inferior a la presentada por los autoinjertos, ya que se requiere más tiempo para su integración aunque siguen una secuencia histológica idéntica.

Según Urist⁷¹ la actividad biológica de la BMP está influida por las condiciones de conservación. Hay que resaltar la capacidad osteoinductora de los aloinjertos, como estimuladores de formación ósea, aunque reducida y variable según los casos. Cabe preguntarse qué proteína o proteínas del propio aloinjerto, un tejido muerto, son capaces de estimular la aparición de células osteoprogenitoras (Fig. 4).

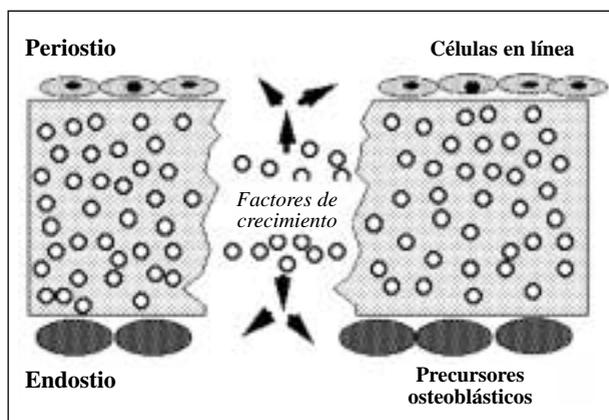
La teoría osteoblástica sostiene que las células osteogénicas son transportadas con el injerto, lo cual sólo es posible si se utilizan tejidos vivos. La teoría de la inducción defiende una transformación metaplásica del tejido conectivo y el hueso neoformado procede del hueso muerto o necrótico. Axhausen⁴ llegó a la conclusión de que ambos caminos son posibles, una explicación dualista que desarrolla el concepto de la regeneración bifásica. En una primera fase, la osteogénesis sería autóctona mientras que en la segunda fase sería inductiva. El proceso de reparación de un injerto empieza en la unión donante-receptor con la formación de un puente endcondral seguido por la unión intersticial cortical y la *creeping substitution*. El injerto actúa como un enrejado o andamiaje sobre el cual se produce un proceso de reabsorción sobre el que crece el nuevo hueso. La propia reabsorción libera proteí-

na de la matriz ósea del aloinjerto que induce a las células pluripotenciales del medio.⁶⁵

El injerto autólogo fresco posee todas las características del hueso vivo. Las células de la superficie del injerto son, al principio, alimentadas por difusión; luego el tejido se revasculariza,¹⁶ siendo el método más natural en la reconstrucción de los defectos esqueléticos.¹⁰ El hueso esponjoso tiene alta capacidad osteogénica^{9,10,36} pero lamentablemente sus zonas de obtención están limitadas, además, requiere una cirugía más prolongada, presenta mayor pérdida de sangre, un número mayor de cicatrices y mayor morbilidad. En los defectos óseos pequeños, el trasplante de hueso esponjoso autogénico se considera el sistema de injerto preferido debido a sus mejores condiciones osteoinductivas.

Friedlaender,²⁰ entre otros, considera que el hueso trabecular, al ser más poroso que el hueso cortical, se revasculariza más rápidamente y presenta una incorporación más temprana y completa. Por su parte, Hui²⁷ propone la llamada *blood clot theory* que sugiere que antes de que se produzca una revascularización, los poros óseos actúan como canales por los cuales discurre la sangre arterial.

Por su parte, los aloinjertos han ido ganando terreno en la reconstrucción de los grandes defectos. Con los aloinjertos de hueso cortical hay que tener en cuenta las reacciones inmunitarias, sus propiedades biológicas y las características mecánicas para conseguir una buena conso-

**Figura 4.**

lidación. La biomecánica del injerto está influida por factores primarios, su geometría, la edad del donante y, también, factores secundarios como su sistema de conservación y forma de esterilización.

Los aloinjertos óseos no son materiales inmunológicamente inertes, si bien la congelación disminuye o elimina las reacciones inmunitarias.^{10,20} Según Poitout,⁵¹ temperaturas de hasta -20°C no destruyen las enzimas osteolíticas y el injerto dura poco tiempo. A -80°C, la actividad enzimática está netamente disminuida, pues esta temperatura inactiva la acción de la colagenasa y a -186°C desaparece toda la actividad enzimática que permite la conservación, sin límite, de los tejidos.

Un aloinjerto intercalar libera antígenos en forma lenta y continua durante cierto número de años, produciendo una reabsorción persistente que provoca, a su vez, una nueva liberación de antígenos.⁹ Urist⁷¹ reconoció que la función biológica de un aloinjerto dependía, en gran medida, de la respuesta inmune que generaba y que afecta negativamente al papel biológico del injerto en la curación.

Las células inmunogénicas de los aloinjertos residen en la médula ósea y esto se comprueba porque los aloinjertos óseos corticales lavados y limpios de médula presentan una menor respuesta^{10,43} y porque los aloinjertos de hueso procedente de donantes genéticamente compatibles mejoran su curación y disminuyen la inmunogenicidad humoral.¹⁸

En clínica, el rechazo óseo es poco frecuente cuando se utilizan aloinjertos masivos.⁵⁶ El aloinjerto rechazado muestra un tejido inflamatorio periférico que impide la unión entre el injerto y el receptor, la adherencia de los tejidos blandos y la remodelación.¹⁷

Inconvenientes y complicaciones de los injertos óseos

Las complicaciones más frecuentes de los aloinjertos óseos masivos, sin olvidar que en ocasiones se implantan en enfermos inmunodeprimidos, son la infección, la falta de unión, la reabsorción y las fracturas.

Cuando se utilizan grandes aloinjertos de hueso cortical para la reconstrucción de los defectos óseos diafisarios, no es infrecuente la aparición de fracturas por fatiga en la zona de osteotomía,¹⁷ debido a que la integración de un aloinjerto de hueso cortical requiere un período, en que persisten el hueso necrótico y el hueso neoformado con riesgo de fractura.

Los retrasos de consolidación y la pseudoartrosis son dos problemas frecuentes (entre el 9 y el 23%) y la incidencia de las fracturas de los aloinjertos varía según los autores entre un 10 y un 16%; el riesgo es bajo en los primeros seis meses después del implante y aumenta en forma considerable a los 2 o 3 años,¹ cuando se producen más del 70% de las fracturas. El riesgo de fractura también está relacionado con el sistema de osteosíntesis.⁵⁶

Las infecciones son otros de los aspectos que producen cierto rechazo de los aloinjertos por parte de los cirujanos. Se describió una incidencia de entre el 10 y el 15%.^{17,39,40} El aloinjerto es un material extraño y necrótico, no vascularizado, que sirve como medio de cultivo para las infecciones. Además, hay factores que predisponen a la infección como, frecuente en cirugía tumoral, un mal recubrimiento con las partes blandas o el cierre de las heridas, el número de intervenciones, el hematoma posoperatorio, el uso de quimioterapia adyuvante y la radioterapia. El tratamiento de la infección no es sencillo y requiere desbridamiento y terapia antibiótica.

La probabilidad de riesgo de infección con el HIV es muy baja, aproximadamente 1:1.700.000.⁸ Desde el comienzo de la epidemia de sida, en 1982, se calcula que hasta 1993 se colocaron, en quince años, 2.700.000 aloinjertos óseos y de tejidos blandos sólo en los Estados Unidos.¹¹ En ese período se recogieron cuatro casos de transmisión de sida por medio de un aloinjerto¹² y dos casos según la revisión efectuada por Tomford.⁶⁶ Por esto es aconsejable utilizar estructuras procedentes de bancos de tejido que sigan un protocolo seguro y bien establecido. De todas formas, muchas veces no está sólo en tener un protocolo adecuado sino en la seriedad y responsabilidad del equipo extractor, utilizando aloinjertos, única y exclusivamente, cuando sea necesario. Los medios de esterilización no deben alterar las propiedades biológicas y biomecánicas de los tejidos.

Sustitutos óseos manufacturados

Actualmente prodigan los llamados sustitutos óseos (Tabla 2), materiales artificiales sintéticos o biológicos, desnaturalizados que puedan sustituir al hueso fresco o congelado, en el relleno de cavidades. La idea era evitar los inconvenientes de los aloinjertos y la laboriosa extracción de los huesos de cadáver. Sin embargo, esto no ha sido posible. Muchas son estructuras naturales, que suelen obtenerse de animales o de vegetales (colágeno, hidroxapatita, calciofosfato, ácido hialurónico, fibrina), que se integran en los tejidos y, además, son compatibles con los tejidos orgánicos. Su ultraestructura permite una buena adhesión de las células sobre su superficie.⁵⁸

Son materiales osteoconductores y, en algunos casos, osteoinductores que exigen un proceso de elaboración y procesado que dividiremos en matrices óseas desmineralizadas (DBM), cerámicas y compuestos minerales y polímeros.

a. Matrices óseas desmineralizadas

Las denominadas matrices óseas desmineralizadas (DBM) son sustancias óseas naturales descalcificadas y desengrasadas. Urist,⁶⁷⁻⁷⁰ reconocido como el descubridor de las BMP, fue también el introductor de la capaci-

Tabla 2. Biomateriales y transportadores comercializados

Transportador	Descripción	Casa comercial	Liberación
Buffer	Buffer glicina pH 4,5	Wyeth	Inyectable
Synvisc Hylan G-F 20 (Hyal G)	Gel hialurónico inyectable	Genzyme Biosurgery	Inyectable
HYAFF11 p65 (Hyal 65%EP)	15% pasta hialurónico hidratada en buffer	Fidia Advanced Biopolymers	Inyectable
HYAFF11 p65 / TCP (Hyal 65%EP/TCP)	Pasta 70/30 ácido hialurónico y fosfato tricálcico	Fidia Advanced Biopolymers/ Medtronic Sofamor Danek	Inyectable
Gelfoam (Gel F)	Gelatina, pasta y esponja porcina, hemostática	Pharmacia&Upjohn	Inyectable
Gelfoam/TCP (Gel F/TCP)	Esponja de gelatina mineralizada	Pharmacia&Upjohn/ Medtronic Sofamor Danek	Inyectable
HYAFF11/PEG (Hyal 100%EP/TCP)	Ácido hialurónico solubilizado en N-metil-pirrolidinona (NMP) con glicol polietileno (PEG). Solidifica in vivo	Fidia Advanced Biopolymers/Polysciences	Inyectable
HYAFF11/TCP (Hyal 100%EP/TCP)	Ácido hialurónico solubilizado en NMP con gránulos TCP. Solidifica in vivo	Fidia Advanced Biopolymers/Polysciences	Inyectable
a-BSM (CPC)	Cemento fosfato cálcico	Etex, Depuy	Inyectable
Pro Osteon	95% HA coralina	Interpore Cross	Bloques o gránulos
Bone Plast	Sulfato cálcico pasta	Interpore Cross	Inyectable
Osteoset	Cemento sulfato cálcico con/sin torbamicina	Wright Medical	Bolitas
MIIG	Cemento sulfato cálcico	Wright Medical	Inyectable
Bone Stack	Sulfato cálcico	Stryker	Bolitas
Bone Save	Fosfato tricálcico/HA 80/20	Stryker	Gránulos
Osigraft	1 g colágeno tipo I bovino y 3,5 mg eptotermina alfa	-	Pasta
Bone Source BVF	Fosfato tetracálcico y dicálcico	Stryker	Polvo
Jax	Sulfato cálcico (98%)	Smith &Nephew	Gránulos y gel (CMC)
MasterGraft	HA(60-85%)/FTC (40-15%)	Sofamor Danek	Gránulos
Vitoss	Fosfato b tricálcico	Orthovita	Bloques, 1-4 mm Gránulos
Conduit	Fosfato tricálcico bifásico	DePuy	Gránulos 1-3 mm
OsteoStim	Fosfato cálcico	EBI	Gránulos
a-BSM	Cemento de fosfato cálcico	DePuy	Inyectable, endurece con temperatura corporal
SRS	Cemento de apatita fosfato cálcico	Norian Stratec	Polvo y solución, inyectable
Collagraft	Colágeno bovino y fosfato cálcico bifásico (65% HA, 35% TCP)	Zimmer	Tiras secas bañadas en solución salina

dad osteoconductora de la matriz ósea desmineralizada, elaborada de aloinjertos óseos descalcificados para dejar la matriz orgánica, con sus numerosas señales estimuladoras, que mantienen su propiedad osteoinductiva.

Según la literatura especializada, los injertos liofilizados preparados comercialmente conservan ciertas proteínas y tienen por lo tanto capacidad de influir en la diferenciación celular y en la regeneración de los tejidos in vivo. Sin embargo, no es menos cierto que también pierden su capacidad, pues el proceso de liofilización desnaturaliza las proteínas, lo que hace que el hueso receptor lo reconozca como un cuerpo extraño, lo cual explica la reabsorción y el elevado número de osteoclastos que aparecen en este tipo de injertos.³⁶ No se conoce cómo la DBM mantiene su capacidad osteoinductiva mientras que los aloinjertos congelados no lo hacen, cuando el tratamiento de la primera es mucho más agresivo; tampoco sabemos si todas las matrices desmineralizadas poseen la misma capacidad inductiva, dado que es difícil conseguir una muestra homogénea. La edad del hueso donante también influye. Efectuando cultivos celulares a partir de hueso trabecular obtenido de cresta ilíaca de pacientes, Shigeno y Ashton⁶⁴ concluyeron que el número de células proliferativas precursoras de hueso trabecular era mayor en los jóvenes. Había una disminución importante en la segunda y la tercera década de la vida con un nivel que se mantenía durante el resto de la vida.

Urist⁶⁷⁻⁶⁹ y otros autores^{5,52,73} describieron que la utilización de hueso desmineralizado con HCl induce la formación ósea heterotópica. Este fenómeno lo atribuyeron a una sustancia osteoinductiva, propia de la matriz ósea, que puede transformar células no osteogénicas en osteoblastos. Sin embargo, un agente osteoinductor sin un transportador nunca produce hueso, ya que se difunde con rapidez sin producir ningún efecto.²⁶

Sin embargo, la capacidad osteogénica de las DBM ha sido, en ocasiones, exagerada por los datos experimentales obtenidos en roedores.⁶⁰ En estos animales la matriz ósea podía inducir rápidamente la formación de hueso en tejidos no óseos⁶⁹ lo que no ocurría en otros animales superiores, fallando la inducción ósea en músculos de ovejas y perros^{38,57} y así, mientras Hosny y Sharawy²⁵ consiguieron inducir hueso con matriz en polvo en monos, Aspenberg³ no lo pudo demostrar. Según Schwarz,⁶⁰ con un modelo experimental en perros sólo los injertos autógenos llevaron a la neoformación ósea en forma constante. También Kakiuchi³¹ vio que los aloinjertos desmineralizados y tratados con óxido de etileno se reabsorben completamente sin formar nuevo hueso cuando se implantan en tejidos blandos.

Fue Nicolás Senn, un médico estadounidense, quien los introdujo en 1860, al utilizar hueso de cadáver "esterilizado" con ácido muriático en el tratamiento de la osteomielitis de pacientes con necesidad de injertos, durante la guerra civil norteamericana. Pero no sería hasta muchos

años después cuando la fabricación de la matriz ósea desmineralizada en forma de gel (Grafton® gel) abrió las puertas a la comercialización y utilización de estos productos pues las DBM, en fibra o en polvo, necesitan un transportador para obtener las propiedades de la matriz. El primero fue el glicerol o la gelatina.

Las características de la DBM dependen del transportador, que a excepción del colágeno y la gelatina, suelen ser geles sólidos y pastas, glicerol, sulfato cálcico, ácido hialurónico, polímeros, etc., diseñados para reabsorberse durante los primeros días de implantación. Un carrier que se reabsorbe lentamente en la fase inicial interfiere en la acción de la DBM con los tejidos blandos y afecta al crecimiento del hueso y de los vasos.

Las DBM deben considerarse más un injerto que un implante y se pueden combinar con médula ósea, sangre, osteopromotores, osteoinductores o células cultivadas.

b. Cerámicas y compuestos minerales

La sustitución de hueso o la estimulación regenerativa con sustancias minerales (fosfatos cálcicos e hidroxiapatita) ha sido uno de los aspectos que más se han desarrollado en los últimos años, si bien, no han sido eficaces en las grandes sustituciones y en los miembros sometidos a carga.

El fosfato tricálcico (TCP) fue el primer sustituto óseo utilizado en 1920. La hidroxiapatita (HA) tiene un índice molar Ca:P de 1,67 y el TCP es de 1,5. El TCP es menos cristalino que la HA y por lo tanto más soluble. Los implantes de TCP son más biocompatibles y osteoconductivos pero por su solubilidad se utilizan en defectos no sometidos a cargas importantes. El TCP α y β son TCP de alta temperatura con una composición química similar al fosfato cálcico amorfo pero con mayor cristalinidad.

Bhaskar⁷ observó que las cerámicas biodegradables de fosfato tricálcico eran bien toleradas en la tibia de rata y vio que la curación ósea es más rápida con los fosfatos cálcicos que con el aporte sanguíneo,²¹ demostrando Clarke^{13,14} una respuesta inflamatoria muy pequeña y aparición de hueso hacia las 7 u 8 semanas.

Köster y cols.³⁴ trabajaron con perros y compararon implantes cilíndricos de siete tipos diferentes de cerámicas de fosfato cálcico. Los implantes con porosidad del 75% no soportaban las sollicitaciones, pero con una porosidad del 45% tenían características mecánicas aceptables. Ferraro y cols.¹⁹ analizaron la cantidad de reabsorción de la cerámica de fosfato tricálcico en perros y vieron que el implante se reabsorbe en un 15% de sus dimensiones originales a los 18 meses.

El fosfato cálcico bifásico es un compuesto de HA y TCP- β que se degrada más rápido que la HA sola, mientras que el cemento de fosfato cálcico es una mezcla de fosfato cálcico con agua, utilizado como carrier para factores de crecimiento, antibióticos y BMP. Es un compues-

to resistente a la compresión pero muy frágil a la tensión, por lo que tampoco puede utilizarse en defectos sometidos a carga.

Los cementos de fosfato cálcico pueden ser de tipo apatita que terminan formando HA y, en algunos casos, contienen carbonatos, constituyendo las carbonoapatitas o de tipo brusita que degradan a formas DCPD (dihidra-to-fosfato-dicálcico) que son más degradables que los cementos de apatita.

El sulfato cálcico es el compuesto más antiguo y conocido, pues es el yeso utilizado para las inmovilizaciones. Es una sustancia cristalina, osteoconductiva, de reabsorción muy rápida; un carrier adecuado para los factores de crecimiento y las BMP.

El fosfato cálcico se ha utilizado mucho como sustituto óseo en ortopedia y cirugía maxilofacial. La fabricación de las cerámicas de fosfato cálcico requiere temperaturas muy elevadas y se implantan como gránulos o bloques prefabricados. Lamentablemente, los gránulos migran con mucha facilidad a los tejidos vecinos y los bloques prefabricados son difíciles de acoplar a las necesidades del organismo, por lo que no siempre se adaptan al defecto. Por ello, la alternativa a estos problemas debe ser encontrar un fosfato cálcico inyectable que sea biocompatible y osteoconductor, que permita el crecimiento óseo en su interior y la reabsorción controlada del implante. Sin embargo, se crea un sustituto óseo muy poroso con el grave inconveniente mecánico que esto conlleva.⁵⁵

Seeherman y cols.⁶¹⁻⁶³ consideran que una de las mayores necesidades actuales es disponer de transportadores inyectables que permitan la introducción de factores de crecimiento y mantenerlos en el lugar donde se precisan, con la concentración adecuada y el tiempo necesario. De esta manera, pueden actuar sobre las células para que migren, proliferen y se diferencien. Los transportadores no deben interferir el proceso de reparación, por lo que deben ser biocompatibles para evitar, en lo posible, el efecto inflamatorio; porosos, para permitir la invasión vascular y celular, y rápidamente biodegradados, para no disminuir las propiedades mecánicas del tejido por reparar. Además, deben inyectarse con agujas de pequeño calibre para evitar el riesgo de infección.

Cuando se implantan biocerámicas se produce una reabsorción parcial de los implantes, pero también se ha visto que poseen propiedades mecánicas semejantes a las del hueso y una buena tolerancia. Sin embargo, estas sustancias se implantan en formas más o menos porosas, nunca compactas, por lo que Mittlmeier y cols.⁴² desarrollaron la idea de la regeneración ósea multicéntrica alrededor de múltiples partículas de hidroxiapatita de diámetros muy pequeños, ya que la influencia positiva e inductiva de la hidroxiapatita no debe obstaculizar la formación vascular que se sigue con la regeneración ósea. Para unir dichas partículas este autor utilizó el colágeno

desnaturalizado, despolimerizado y liofilizado obtenido de la piel del cerdo.

La hidroxiapatita es un material biocompatible con propiedades osteoconductivas. La presencia de partículas de hidroxiapatita estimula la formación ósea temprana. Sin embargo, los gránulos son muy frágiles y las partículas pueden migrar a otros lugares donde no son necesarias. Nilsson y cols.⁴⁴ acompañaron la hidroxiapatita con sulfato cálcico y vitamina E para mejorar la reparación de las fracturas y estimular el crecimiento óseo.

Para Osborn,^{47,48} el comportamiento osteotrópico de la hidroxiapatita se debe a su similitud con el mineral óseo que requiere materiales de alta cristalinidad y gran densidad para resistir la disolución y estabilidad en un medio fisiológico. Niwa y cols.,⁴⁵ por su parte, inyectaron hidroxiapatita, fosfato tricálcico con aluminio y cemento en la cavidad medular del fémur en conejos y observaron una formación ósea rápida en el grupo de las hidroxiapatitas, por lo que consideran la hidroxiapatita el material ideal para los injertos óseos por su buena histocompatibilidad, alta capacidad osteogénica y fácil aplicación.

c. Polímeros

Disponemos de polímeros naturales como el colágeno, el ácido hialurónico, la fibrina, el chitosán, el alginato y otros derivados de polisacáridos animales o vegetales. Sin embargo, los polímeros se pueden dividir en reabsorbibles y no reabsorbibles. Entre estos últimos están los polietilenos de alto peso molecular y el PMMA (polimetilmetacrilato) utilizados en la cirugía de las artroplastias.

De mayor interés, como sustitutos óseos, son los polímeros reabsorbibles o biodegradables, que se han utili-

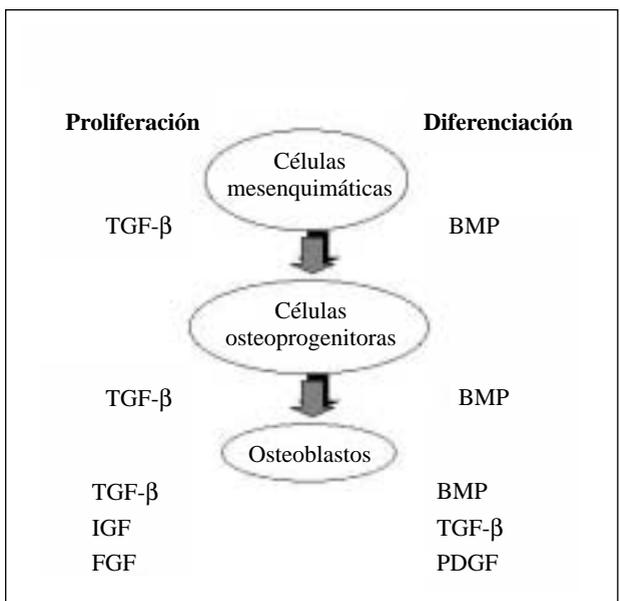


Figura 5. Acción de los factores de crecimiento.

zado como material de sutura (polidioxanona) pero la mayoría de los polímeros utilizados en ingeniería tisular son de la familia del ácido polihidroxi. Los ácidos α -hidroxi son el ácido poliláctico (PLA), poliglicólico (PGLA) y sus copolímeros. Otros materiales dentro de este grupo son el PPF (polipropileno fumarato), la policaprolactona, los polímeros derivados de la tirosina y los polianhidridos.

Los polímeros reabsorbibles se degradan por hidrólisis, liberando ácidos que alteran el pH local y producen inflamación local y quistes, aunque los líquidos corporales eliminan estos ácidos sin problemas. Para contrarrestar el efecto del ácido, los polímeros se pueden combinar con sales básicas o componentes cálcicos (HA, TCP).

El PLGA puede procesarse en micropartículas esféricas para liberar moléculas bioactivas y se ha probado con los factores de crecimiento transformantes y proteínas humanas morfogénicas. Los materiales sintéticos como el PGLA o PLA pueden ser útiles en muchos procesos, a pesar de las reacciones orgánicas durante su degradación. Se ha combinado el fosfato cálcico con PLGA para liberar la BMP-2.⁵⁵

d. Sustitutos óseos coralinos

La conversión de los corales óseos en sustitutos fue un proceso casual, por eso que en investigación se conoce como *serendipity*. Un estudiante reconoció la similitud de los corales con algunas cerámicas y metales utilizados para la integración ósea. Los implantes coralinos se reabsorben muy lentamente por la acción de los osteoclastos y se los considera los mejores carriers tanto para los factores de crecimiento como para terapia celular.

Ingeniería del tejido óseo

El principio general de la ingeniería tisular comprende la combinación de células vivas, dentro de un molde estructural natural o sintético, para producir una estructura tridimensional tisular viva que sea funcional, estructural y mecánicamente semejante o mejor que el tejido que debe reemplazar. Se han utilizado diferentes estrategias en ingeniería tisular combinando matrices biocompatibles, factores de crecimiento, trasplantes celulares y terapias de liberación génica,⁵⁹ cuyo objetivo final es recapitular la estructura y la función del tejido original.

Los pasos que se debe seguir en la ingeniería de los tejidos y órganos son la toma de células del donante, su colocación en un molde, la estimulación de su proliferación, mantenimiento o estimulación de la especialización celular o diferenciación y, finalmente, el trasplante de esta estructura al paciente que lo precisa.⁷²

Los criterios que se deben seguir en la ingeniería tisular son:

- la producción de un número suficiente de células y tejido para conseguir la reparación completa
- la diferenciación celular hacia el fenotipo correcto y su mantenimiento
- asegurar que tanto las células como los tejidos adopten la organización tridimensional necesaria y produzcan matriz extracelular. Por esto, a veces, se requieren moldes biorreabsorbibles hasta que las células son capaces de producir su propio medio
- las células y los tejidos deben adaptarse e integrarse a las demandas del tejido que van a reparar
- conseguir una integración completa y una vascularización adecuada con el tejido local
- valorar el riesgo de un rechazo inmunitario

Para Nolan,⁴⁶ el cultivo de osteoblastos humanos puede ofrecer un medio de injerto en la cirugía ortopédica. Un pequeño fragmento de hueso trabecular puede obtenerse con anestesia local aproximadamente cuatro semanas antes de la intervención. Los osteoblastos serían cultivados en hueso humano desmineralizado y utilizado como un injerto en la cirugía definitiva. Algunos trabajos^{24,29,50} sugieren que la médula ósea representa un injerto lógico y que debe recomendarse en los retardos de consolidación. Plenck y cols.⁵⁰ vieron el fuerte potencial de curación de la médula ósea combinada con hueso de Kiel y también utilizada sola. Burwell¹⁰ colocó médula ósea en un músculo paravertebral y observó la formación heterotópica de hueso.

En el tratamiento de los factores de crecimiento es fundamental colocarlos sobre materiales adecuados, los conocidos como "carriers". Las BMP son proteínas solubles en agua de bajo peso molecular que se difunden muy fácilmente en los líquidos orgánicos (Fig. 5). Cuando se aplican en una articulación, en el foco de una fractura o en un defecto óseo desaparecen en poco tiempo, por su fácil difusión o por el efecto de los drenajes.⁵³ Esto hace que precisen un vehículo como sistema de liberación lento.⁶²

Se recomiendan sustancias porosas y biodegradables que puedan mantener la concentración de los factores de crecimiento en el lugar de la lesión.^{62,63} La combinación de un material que retenga el factor de crecimiento y que simultáneamente se degrade para permitir la revascularización es difícil de conseguir. El índice de degradación tiene que ser compatible con el índice de neoformación ósea, de tal manera que la integridad mecánica de la reparación no se vea comprometida con la eliminación del material en el tratamiento de los defectos óseos.

Por ello, un transportador de factores de crecimiento³⁷ debe tener capacidad para liberar los factores en el tiempo y con la dosis adecuada; presencia de un sustrato que estimule el reclutamiento y la adhesión celular y potencie la quimiotaxis con un espacio que permita la migración celular y la angiogénesis y, además, ser biodegradable sin provocar reacciones inmunitarias, inflamatorias o tóxicas que inhiban el proceso de reparación.

Los transportadores utilizados en las reparaciones de los defectos óseos deben estar el tiempo necesario para prevenir el colapso de la zona si la formación ósea no es lo suficientemente rápida.

Se describieron cuatro tipos de transportadores para los factores de crecimiento: 1) materiales inorgánicos; 2) polímeros sintéticos, 3) polímeros naturales y 4) composites o compuestos de los materiales citados anteriormente. Entre los materiales más utilizados están el colágeno tipo I, los geles de ácido hialurónico, diferentes sustitutos óseos, como el hueso desmineralizado, la hidroxiapatita y el coral, además de los ácidos poliláctico, poliglicólico o hialurónico. Los aloinjertos óseos también se han utilizado para la liberación de factores osteogénicos.

El colágeno tipo I es un transportador atractivo por su estructura fibrilar y por ser la proteína más abundante en la matriz extracelular ósea. Además, estimula la deposición de mineral óseo y se puede unir a las proteínas no colagénicas de la matriz que también actúan en la mineralización.³⁷

La BMP-2 recombinante se libera en una esponja de colágeno reabsorbible y la BMP-7 recombinante u OP-1[®] en colágeno bovino tipo I. Entre los colágenos, el más utilizado es el tipo I. Los colágenos derivados del hueso parecen tener la ventaja sobre los colágenos derivados de los tendones y ligamentos por su fuerte unión con las BMP.⁵³ El desarrollo de transportadores inyectables para los factores osteogénicos^{62,63} es un medio indispensable para no tener que convertir una fractura cerrada en otra abierta.

Los polímeros sintéticos tienen la ventaja de ser abundantes, de baja antigenicidad, absorción predecible y no tienen riesgo de transmisión de enfermedades. Sin embar-

go, los derivados del ácido poliglicólico y poliláctico pueden producir una reacción de células gigantes y la unión con las BMP no es tan buena como con el colágeno.

La selección de un biomaterial adecuado para implantar células pluripotenciales en la reparación de los defectos óseos es un reto que permanece abierto cuando se combina con cerámicas de fosfato cálcico, en sus distintas variedades químicas y estructurales, en el que se ha visto un mayor poder osteogénico comparado con otro tipo de matrices inertes.^{23,35} Las cerámicas recomendadas tienen una relación 20:80, entre hidroxiapatita y fosfato tricálcico. Sin embargo, las cerámicas no tienen las propiedades mecánicas adecuadas para todos los defectos y se reabsorben con demasiada rapidez.²

Con la utilización de aloinjerto óseo con BMP-7 (OP-1[®]) o BMP-2 se ha demostrado que se forma nuevo hueso precedido de una reabsorción transitoria,^{15,30,54} coherente con la acción demostrada de la BMP-2 in vitro para estimular la diferenciación y supervivencia de los osteoclastos.^{28,32} Para McGee,⁴¹ la incorporación de OP-1[®] al aloinjerto mejora la incorporación del injerto y su remodelación, incluido un proceso de reabsorción acelerado, evidente durante 6 semanas.

Los sustitutos óseos son muchos y de composiciones muy variadas que se pueden utilizar con facilidad para rellenar cavidades o en combinación con otros materiales, como los autoinjertos. Pueden acelerar su proceso de integración al añadirles factores de crecimiento, sustancias osteopromotoras, médula ósea o células cultivadas. Sin embargo, no hay disponible ningún sustituto óseo capaz de sustituir al hueso cortical y de soportar sollicitaciones a compresión y tensión, para soportar el peso del cuerpo.

Referencias bibliográficas

1. Andersen JR, Detlie T, Griffiths HJ. The radiology of bone allografts. *Radiol Clin North Am*; 33(2):391-400;1995.
2. Arinzeh TL, Peter SJ, Archambault MP, et al. Allogeneic mesenchymal stem cells regenerate bone in a critical-sized canine segmental defect. *J Bone Joint Surg Am*;85-A(10):1927-1935;2003.
3. Aspenberg P, Lohmander LS, Thorngren KG. Failure of bone induction by bone matrix in adult monkeys. *J Bone Joint Surg Br*;70(4):625-627;1988.
4. Axhausen W. The osteogenetic phases of regeneration of bone. A historical and experimental study. *J Bone Joint Surg Am*; 38-A(3):593-600;1956.
5. Bauer FC, Nilsson OS, Tornkvist H. Formation and resorption of bone induced by demineralized bone matrix implants in rats. *Clin Orthop*;(191):139-143;1984.
6. Berrill NJ. *Development biology*. New York: McGraw-Hill; 1971.
7. Bhaskar SN, Brady JM, Getter L, et al. Biodegradable ceramic implants in bone. Electron and light microscopic analysis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*;32(2):336-346;1971.
8. Buck BE, Malinin TI, Brown MD. Bone transplantation and human immunodeficiency virus. An estimate of risk of acquired immunodeficiency syndrome (AIDS). *Clin Orthop*;(240):129-136;1989.
9. Burchardt H. The biology of bone graft repair. *Clin Orthop*;(174):28-42;1983.

10. **Burwell RG, Friedlaender GE, Mankin HJ.** Current perspectives and future directions: the 1983 international conference on osteochondral allografts. *Clin Orthop*;(197):141-157;1985.
11. **Carlson ER, Marx RE, Buck BE.** The potential for HIV transmission through allogeneic bone. A review of risks and safety. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*;80(1):17-23;1995.
12. **Centers for Disease Control.** Transmission of HIV through bone transplantation: case report and public health recommendations. *Morb Mortal Wkly Rep*;37(39):597-599;1988.
13. **Clarke SA, Brooks RA, Lee PT, et al.** Bone growth into a ceramic-filled defect around an implant. The response to transforming growth factor beta1. *J Bone Joint Surg Br*;86(1):126-134;2004.
14. **Clarke SA, Brooks RA, Lee PT, et al.** The effect of osteogenic growth factors on bone growth into a ceramic filled defect around an implant. *J Orthop Res*;22(5):1016-1024;2004.
15. **Cullinane DM, Lietman SA, Inoue N, et al.** The effect of recombinant human osteogenic protein-1 (bone morphogenetic protein-7) impregnation on allografts in a canine intercalary bone defect. *J Orthop Res*;20(6):1240-1245;2002.
16. **Eggers C, Meeder PJ.** Biological principles of autogenous bone grafting. *Injury*;25Suppl 1:A17-20;1994.
17. **Enneking WF, Mindell ER.** Observations on massive retrieved human allografts. *J Bone Joint Surg Am*;73(8):1123-1142;1991.
18. **Esses SI, Halloran PF.** Donor marrow-derived cells as immunogens and targets for the immune response to bone and skin allografts. *Transplantation*;35(2):169-174;1983.
19. **Ferraro J, App G, Foreman D.** Analysis of Ca3(PO4)2 bone implant in ilium canis to assess resorption. 67th IADR General Meeting, New Orleans; 1978.
20. **Friedlaender GE.** Bone allografts: the biological consequences of immunological events. *J Bone Joint Surg Am*;73(8):1119-1121;1991.
21. **Getter L, Bhaskar SN, Cutright DE, et al.** Three biodegradable calcium phosphate slurry implants in bone. *J Oral Surg*; 30(4):263-268;1972.
22. **Goldberg VM, Stevenson S.** Natural history of autografts and allografts. *Clin Orthop*;(225):7-16;1987.
23. **Gosain AK, Song L, Riordan P, et al.** A 1-year study of osteoinduction in hydroxyapatite-derived biomaterials in an adult sheep model: part I. *Plast Reconstr Surg*;109(2):619-630;2002.
24. **Healey JH, Zimmerman PA, McDonnell JM, et al.** Percutaneous bone marrow grafting of delayed union and nonunion in cancer patients. *Clin Orthop*;(256):280-285;1990.
25. **Hosny M, Sharawy M.** Osteoinduction in rhesus monkeys using demineralized bone powder allografts. *J Oral Maxillofac Surg*;43(11):837-844;1985.
26. **Hotz G, Herr G.** Bone substitute with osteoinductive biomaterials. Current and future clinical applications. *Int J Oral Maxillofac Surg*;23(6Pt2):413-417;1994.
27. **Hui PW, Leung PC, Sher A.** Fluid conductance of cancellous bone graft as a predictor for graft-host interface healing. *J Biomech*;29(1):123-132;1996.
28. **Itoh K, Udagawa N, Katagiri T, et al.** Bone morphogenetic protein 2 stimulates osteoclast differentiation and survival supported by receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand. *Endocrinology*;142(8):3656-3662;2001.
29. **Jackson IT, Schekler LR, Vandervord JG, et al.** Bone marrow grafting in the secondary closure of alveolar-palatal defects in children. *Br J Plast Surg*;34(4):422-425;1981.
30. **Jensen TB, Overgaard S, Lind M, et al.** Osteogenic protein 1 device increases bone formation and bone graft resorption around cementless implants. *Acta Orthop Scand*;73(1):31-39;2002.
31. **Kakiuchi M, Ono K.** Preparation of bank bone using defatting, freeze-drying and sterilisation with ethylene oxide gas. Part II. Clinical evaluation of its efficacy and safety. *Int Orthop*;20(3):147-152;1996.
32. **Kaneko H, Arakawa T, Mano H, et al.** Direct stimulation of osteoclastic bone resorption by bone morphogenetic protein (BMP)-2 and expression of BMP receptors in mature osteoclasts. *Bone*;27(4):479-486;2000.
33. **Khoo DB.** The effect of chemotherapy on soft tissue and bone healing in the rabbit model. *Ann Acad Med Singapore*;21(2): 217-221;1992.
34. **Köster K, Heide H, König R.** Resorbierbare Calciumphosphat-keramik im Tierexperiment unter Belastung. *Langenbecks Arch Chir*;343(3):173-181;1977.
35. **Krebsbach PH, Kuznetsov SA, Satomura K, et al.** Bone formation in vivo: comparison of osteogenesis by transplanted mouse and human marrow stromal fibroblasts. *Transplantation*;63(8):1059-1069;1997.
36. **Leniz P, Ripalda P, Forriol F.** The incorporation of different sorts of cancellous bone graft and the reaction of the host bone. A histomorphometric study in sheep. *Int Orthop*;28(1):2-6;2004.

37. Lieberman JR, Daluiski A, Einhorn TA. The role of growth factors in the repair of bone. Biology and clinical applications. *J Bone Joint Surg Am*;84-A(6):1032-1044;2002.
38. Lindholm TS, Urist MR. A quantitative analysis of new bone formation by induction in composite grafts of bone marrow and bone matrix. *Clin Orthop*;(150):288-300;1980.
39. Lord CF, Gebhardt MC, Tomford WW, et al. Infection in bone allografts. Incidence, nature, and treatment. *J Bone Joint Surg Am*;70(3):369-376;1988.
40. Mankin HJ, Springfield DS, Gebhardt M, et al. Current status of allografting for bone tumors. *Orthopedics*;15(10):1147-1154;1992.
41. McGee MA, Findlay DM, Howie DW, et al. The use of OP-1 in femoral impactation grafting in a sheep model. *J Orthop Res*;22(5):1008-1015;2004.
42. Mittelmeier H, Hanser U, Harms J. Zur Lösung des Zementproblems mittels Apatit-Carbonfaser-Knochenzement. *Z Orthop*; 118:658;1980.
43. Muscolo DL, Kawai S, Ray RD. Cellular and humoral immune response analysis of bone-allografted rats. *J Bone Joint Surg Am*;58(6):826-832;1976.
44. Nilsson M, Wang JS, Wielanek L, et al. Biodegradation and biocompatibility of a calcium sulphate-hydroxyapatite bone substitute. *J Bone Joint Surg Br*;86(1):120-125;2004.
45. Niwa S, Sawai K, Takahashi S, et al. *Experimental studies on the implantation of hydroxylapatite in the medullary canal of rabbits*. 1st World Biomaterials Congress, Viena; 1980.
46. Nolan PC, Nicholas RM, Mulholland BJ, et al. Culture of human osteoblasts on demineralised human bone. Possible means of graft enhancement. *J Bone Joint Surg Br*;74(2):284-286;1992.
47. Osborn JF, Newesely H. The material science of calcium phosphate ceramics. *Biomaterials*;1(2):108-111;1980.
48. Osborn JF, Weiss T. Hydroxylapatitkeramik. Ein Knochenähnlicher Biwerkstoff. *SSO Schweiz Monatsschr Zahnheilkd*;88(10):1166-1172;1978.
49. Parfitt AM, Qui S, Rao DS. The mineralization index. A new approach to the histomorphometric appraisal of osteomalacia. *Bone*;35(1):320-325;2004.
50. Plenck HJr, Hollmann K, Wilfert KH. Experimental bridging of osseous defects in rats by the implantation of Kiel bone containing fresh autologous marrow. *J Bone Joint Surg Br*;54(4):735-743;1972.
51. Poitout DG. L'os biomateriau. *Bull Acad Natle Med*;179(3):517-531;1995.
52. Reddi AH, Weintraub S, Muthukumaran N. Biologic principles of bone induction. *Orthop Clin North Am*;18(2):207-212; 1987.
53. Rengachary SS. Bone morphogenetic proteins: basic concepts. *Neurosurg Focus*;13(6):34-61;2002.
54. Ripamonti U, Van Den Heever B, Sampath TK, et al. Complete regeneration of bone in the baboon by recombinant human osteogenic protein-1 (hOP-1, bone morphogenetic protein-7). *Growth Factors*;13(3-4):273-289;1996.
55. Ruhe PQ, Hedberg EL, Padron NT, et al. RhBMP-2 release from injectable poly(DL-Lactic-co-glycolic acid)/calcium phosphate cement composites. *J Bone Joint Surg Am*;85-A(Suppl 3):75-81;2003.
56. San-Julian M, Dolz R, Garcia-Barrecheguren E, et al. Limb salvage in bone sarcomas in patients younger than age 10: a 20-year experience. *J Pediatr Orthop*;23(6):753-762;2003.
57. Sato K, Urist MR. Induced regeneration of calvaria by bone morphogenetic protein (BMP) in dogs. *Clin Orthop*;(197):301-311;1985.
58. Schaefer DJ, Klem C, Zhang XH, et al. Tissue engineering mit mesenchymalen Stammzellen zur Knorpel- und Knochenneubildung. *Chirurg*;71(9):1001-1008;2000.
59. Schneider A, Taboas JM, McCauley LK, et al. Skeletal homeostasis in tissue-engineered bone. *J Orthop Res*;21(5):859-864;2003.
60. Schwarz N, Schlag G, Thurnher M, et al. Fresh autogeneic, frozen allogeneic and decalcified allogeneic bone grafts in dogs. *J Bone Joint Surg Br*;73(5):787-790;1991.
61. Seeherman H, Li R, Wozney J. A review of preclinical program development for evaluating injectable carriers for osteogenic factors. *J Bone Joint Surg Am*;85-A(Suppl 3):96-108;2003.
62. Seeherman H, Wozney J, Li R. Bone morphogenetic protein delivery systems. *Spine*;27(16Suppl 1):S16-23;2002.
63. Seeherman HJ, Boussein M, Kim H, et al. Recombinant human bone morphogenetic protein-2 delivered in an injectable calcium phosphate paste accelerates osteotomy-site healing in a nonhuman primate model. *J Bone Joint Surg Am*;86-A(9): 1961-1972;2004.

64. **Shigeno Y, Ashton BA.** Human bone-cell proliferation in vitro decreases with human donor age. *J Bone Joint Surg Br*; 77(1):139-142;1995.
65. **Taira H, Moreno J, Ripalda P, et al.** Radiological and histological analysis of cortical allografts: an experimental study in sheep femora. *Arch Orthop Trauma Surg*;124(5):320-325;2004.
66. **Tomford WW.** Transmission of disease through transplantation of musculoskeletal allografts. *J Bone Joint Surg Am*; 77(11):1742-1754;1995.
67. **Urist MR, Dawson E.** Intertransverse process fusion with the aid of chemosterilized autolyzed antigen-extracted allogeneic (AAA) bone. *Clin Orthop*;(154):97-113;1981.
68. **Urist MR, McLean FC.** Osteogenetic potency and new-bone formation by induction in transplants to the anterior chamber of the eye. *J Bone Joint Surg Am*;34-A(2): 443-476;1952.
69. **Urist MR.** Bone: formation by autoinduction. *Science*;150(698):893-899;1965.
70. **Urist MR.** Introduction to update on osteochondral allograft surgery. In: Aebi M, Regazzoni P. *Bone transplantation*. Berlin: Springer-Verlag; 1989.pp.1-6.
71. **Urist MR.** Practical applications of basic research on bone graft physiology. *Instr Course Lect*;25:1-26;1976.
72. **Vats A, Tolley NS, Buttery LDK, et al.** The stem cell in orthopaedic surgery. *J Bone Joint Surg Br*;86(2):159-164;2004.
73. **Voggenreiter G, Ascherl R, Blümel G, et al.** Effects of preservation and sterilization on cortical bone grafts. A scanning electron microscopic study. *Arch Orthop Trauma Surg*;113(5):294-296;1994.
74. **Zart DJ, Miya L, Wolff DA, et al.** The effects of cisplatin on the incorporation of fresh syngenic and frozen allogenic cortical bone grafts. *J Orthop Res*;11(2):240-249;1993.