

Aloinjerto de matriz ósea descalcificada versus injerto autólogo en la reparación de defectos óseos segmentarios masivos. Estudio experimental

J. DE PABLOS¹, G. MARTÍNEZ-LOTTI¹, C. ALFARO², J. GIL-ALBAROVA¹, O. NILSSON³ y C. BARRIOS³.

Departamento de Cirugía Ortopédica y Traumatología. Clínica Universitaria de Navarra. Pamplona (1).

Departamento de Radiodiagnóstico. Hospital Provincial de Navarra. Pamplona (2).

Departamento de Ortopedia. Hospital Karolinska. Estocolmo. Suecia (3).

Resumen.—Se compara la capacidad regenerativa del aloinjerto de matriz ósea descalcificada con el tradicional injerto óseo autólogo en el tratamiento de defectos osteoperiosticos de 4-5 cm, de longitud provocados experimentalmente a nivel diafisario en fémur ovino. Para este experimento, se emplearon 18 corderos de raza churra esqueléticamente maduros. En 8 animales, la reconstrucción del defecto diafisario se intentó mediante el aporte aloinjerto fragmentado de matriz ósea descalcificada. En otros 6 animales, el defecto se rellenó con injerto corticoesponjoso autólogo, también fragmentado. La estabilización ósea se realizó por medio de un fijador externo. Tras efectuar estudios radiológicos e histológicos, los resultados fueron comparados con un grupo control de 4 animales con el mismo defecto óseo femoral, en los que no se efectuó ningún tipo de reconstrucción ósea. El injerto autólogo se mostró más eficaz que el aloinjerto de matriz ósea descalcificada para la reparación de defectos óseos segmentarios masivos. Sólo en 1 de los animales tratados con aloinjertos de matriz ósea se observó una actividad osteogénica que condujo a la reparación y consolidación del defecto. Por el contrario, no se observó ningún fracaso en la incorporación y consolidación de los injertos autólogos en los animales que completaron los 4 meses de estudio.

Palabras Clave: Aloinjerto. Injerto autólogo. Matriz ósea descalcificada. Defectos óseos segmentarios masivos.

DECALCIFIED BONE MATRIX ALLOGRAFT VERSUS AUTOLOGOUS BONE GRAFT FOR REPAIR OF LARGE SEGMENTAL BONE DEFECTS. EXPERIMENTAL STUDY.

Summary.—The regenerative capacity of decalcified allogenic matrix was compared with that of autologous bone graft for treatment of osteoperiosteal defects, 4-5 cm in length, experimentally induced in the sheep femoral diaphysis. Eighteen skeletally mature sheep were used in this investigation. In 8 animals, the reconstruction of the diaphyseal defect was performed using small fragments of decalcified allogenic bone matrix. In other 6 animals, the defect was refilled with corticoesponjous autologous bone graft in chips. Bone stabilization was achieved by means of an external fixator. After radiologic and histologic assessments, the results were compared with a control group including 4 animals with the same diaphyseal defect but without any attempt of reconstruction. Autologous bone graft was found to be more efficient than decalcified allogenic bone matrix for treatment of large segmental bone defects. An osteogenic activity leading to the complete repair and consolidation of the defect was only detected in 1 of the animals treated with allogenic bone matrix. On the contrary, no failures in the incorporation and consolidation of grafts were observed in those animals treated with autologous bone chips.

Key Words: Allograft. Autologous bone grafts. Allogenic bone matrix. Large segmental bone defects.

INTRODUCCIÓN

La reconstrucción de defectos óseos segmentarios masivos (DOSM), secuela de grandes traumatismos o provocados por amplias resecciones óseas debidas a infecciones o cirugía tumoral, continua planteando un verdadero desafío al cirujano ortopédico. Clásicamente, estos defectos se han intentado reparar con hueso autólogo fresco de tipo esponjoso y/o cortical. A pesar de que el autoinjerto continua siendo un buen recurso biológico para la reconstrucción de DOSM, las molestias postoperatorias adicionales que supone para el paciente la obtención del injerto, su elevada morbilidad y, en ocasiones, las limitadas posibilidades anatómicas para su extracción hacen necesario buscar otras alternativas terapéuticas.

La puesta en marcha de bancos de hueso para la conservación de aloinjertos ha abierto nuevas perspectivas para la reconstrucción de DOSM (1,2,3,4). Algunos estudios clínicos y experimentales sugieren que la incorporación de los aloinjertos sigue un patrón histológico similar al de los injertos óseos autólogos, aunque de modo más lento e incompleto debido a factores de histocompatibilidad y otras reacciones inmunológicas (5,6,7). Los métodos más frecuentemente utilizados para el almacenaje y conservación a largo plazo de aloinjertos han sido criopreservación, liofilización, desmineralización o combinaciones de estos procedimientos (8). La descalcificación parece acelerar la incorporación de los aloinjertos en razón de un acortamiento de la fase de reabsorción ósea que precede a la incorporación (9).

En el terreno experimental, el aloinjerto de matriz ósea descalcificada se ha mostrado muy eficaz en la reparación de defectos óseos realizados en animales pequeños (10,11). Sin embargo, muy poco se conoce sobre el efecto de este tipo de injertos en la reconstrucción de defectos óseos segmentarios masivos en animales más grandes, es decir, en un modelo experimental que, al ser filogenéticamente superior, pudiera reflejar con más similitud las situaciones observadas en clínica humana.

Correspondencia:

DR. JULIO DE PABLOS FERNÁNDEZ.
San Juan de la Cadena, 4-5º D
31008 Pamplona.

El objetivo del presente trabajo es valorar la capacidad regenerativa del aloinjerto de matriz ósea descalcificada en comparación con el tradicional injerto óseo autólogo, ambos administrados en pequeños fragmentos o virutas. Para llevar a cabo éste estudio, se utilizó un modelo experimental de defecto óseo segmentario masivo en fémur ovino, previamente diseñado por nuestro grupo para otros experimentos de inducción ósea (12).

MATERIAL Y MÉTODOS

Un total de 18 corderos de raza churra, con un peso entre 35 y 45 Kg. y 12 meses de edad, es decir, esqueléticamente maduros, fueron empleados en este estudio. El objetivo experimental consistía en la reconstrucción de un defecto óseo segmentario de 5 cm. de longitud, previamente provocado en la diáfisis femoral de estos animales. En un grupo de 8 animales (Grupo A), la reconstrucción del defecto se realizó mediante el aporte aloinjerto fragmentado de matriz ósea descalcificada. Otro grupo de 6 animales (Grupo B) recibió, como material de relleno del defecto, injerto corticoesponjoso autólogo, también fragmentado. Los resultados fueron comparados con un grupo control de 4 animales en los que no se efectuó ningún tipo de reconstrucción ósea del defecto diafisario previamente provocado.

Todos los aloinjertos empleados en el experimento se extrajeron del 1/3 medio de la diáfisis de cadáveres frescos de corderos de raza churra y edades comprendidas entre los 6 y 12 meses. De cada fémur de un animal se extraía un cilindro óseo de 5 cm. de longitud que era inmediatamente desprovisto de médula y partes blandas, incluido el periostio, y conservado congelado a -80°C. Para la obtención de matriz ósea desmineralizada, los cilindros fueron sometidos a un proceso químico de descalcificación con ClH

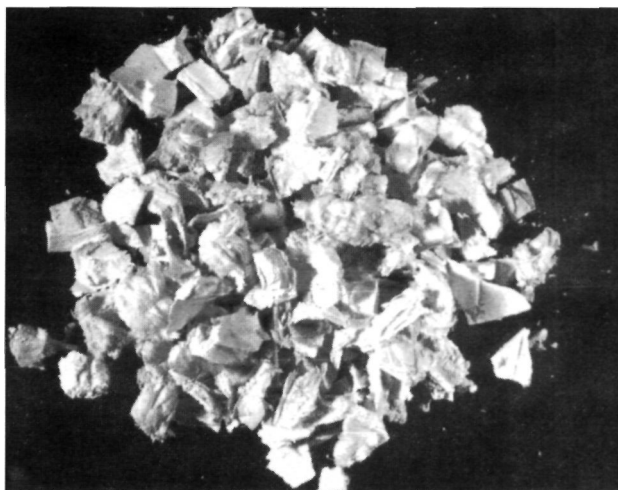


Figura 1. Aspecto macroscópico de los fragmentos liofilizados de aloinjerto de matriz ósea descalcificada.

0,6M (12). Seguidamente se procedía a su liofilización, conservándolos a temperatura ambiente en contenedores estériles (Fig. 1). Los autoinjertos fueron obtenidos en fragmentos de la cresta ilíaca del cordero y aplicados en fresco al mismo animal sin haber sido sometidos previamente a procesado alguno.

Tanto la técnica quirúrgica utilizada para la producción experimental de un defecto óseo segmentario en el fémur ovino, como el modelo de fijación ósea externa han sido descritos en un estudio previo (12). Brevemente, a través de un abordaje lateral se accedía a la diáfisis femoral del cordero, procediendo previa colocación de un fijador externo de tipo monolateral a la resección de un cilindro óseo de entre 4 y 5 cm. de longitud, incluyendo la totalidad del periostio circundante. El defecto se rellenaba con el injerto correspondiente en cada grupo. El fijador consistía en un diseño original realizado con piezas de los sistemas de fijación externa tubular A.O. roscado y liso (Strauman A.G., Waldenburg, Suiza). Se utilizaron tornillos de Schanz autorroscantes de 5 mm de diá-

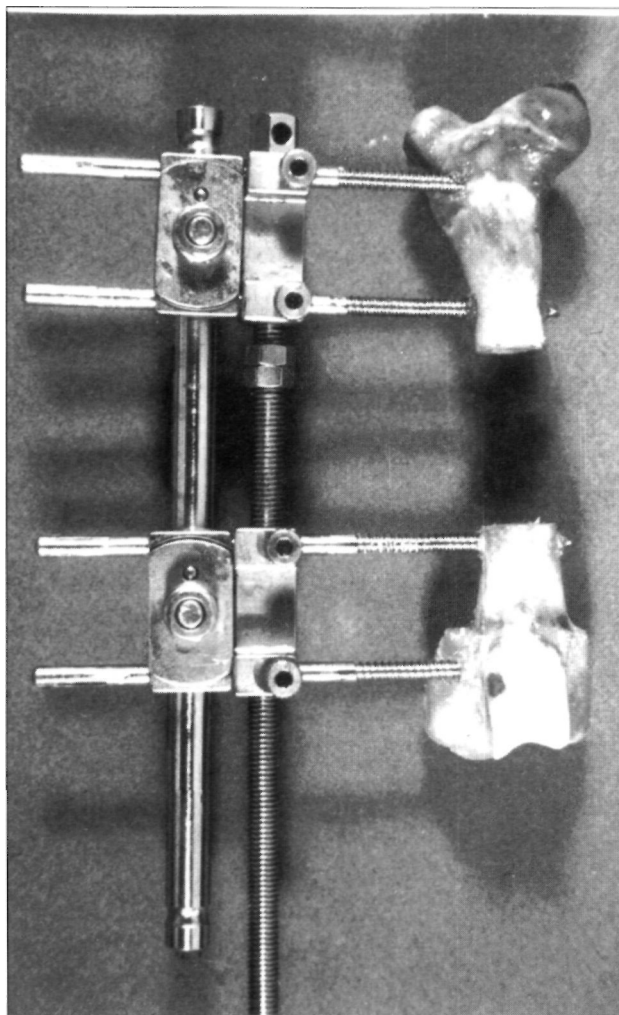


Figura 2. Imagen ilustrativa del sistema de fijación externa (montaje tubular) empleado en el experimento, una vez colocado en un espécimen de fémur de cordero.

metro y 12.5 cm de longitud (Fig. 2). En el grupo sometido a reconstrucción con injerto autólogo, la obtención del material corticoesponjoso se efectuaba previamente al abordaje del fémur, añadiendo, lógicamente, un tiempo quirúrgico adicional. La duración media aproximada de la intervención ha sido de 45 minutos en los casos de aloinjerto y 75 minutos en los casos de autoinjerto. Todos los animales recibieron una profilaxis antibiótica con cefamandol (Mandokel®), a dosis de 1g. diario durante 8 días en una sola inyección, administrada intramuscularmente.

La mitad de los animales de cada grupo (4 en el grupo A, 3 en el B y 2 en el grupo control) fueron sacrificados a los 2 meses de postoperatorio. El resto de los animales fueron sacrificados a los 4 meses de la intervención.

El seguimiento radiológico se realizó mediante radiografías convencionales del fémur intervenido en el postoperatorio inmediato, cada dos semanas durante los 2 primeros meses y, después, cada mes hasta el final del experimento. Además de estas radiografías en vivo se tomaron también radiografías de los especímenes "post-mortem" una vez extraídos y desprovistos de partes blandas. Esta última radiografía "post-mortem" fue valorada semi-cuantitativamente según la siguiente escala de 5 grados:

Grado I: sin formación de hueso en el defecto.

Grado II: pequeñas zonas de calcificación diseminadas en el defecto óseo.

Grado III: calcificación parcial de defecto con una imagen geográfica.

Grado IV: calcificación ponteando ambos extremos del defecto.

Grado V: similar a grado IV pero con estructura tubular de la zona calcificada.

Además del estudio convencional, se realizó un estudio tomográfico axial computarizado mediante cortes transversales de 2 mm de grosor en incrementos de 5 mm de la zona del defecto en los especímenes "post-mortem" del grupo B.

El proceso de reparación ósea observado en la zona del defecto fue evaluado histológicamente de acuerdo al sistema de graduación histomorfométrico de Heiple y cols (13), aunque ligeramente modificado (14). Los criterios para la graduación quedan detallados en la Tabla I. Esta valoración histológica de la zona de reconstrucción se realizó mediante tinciones de Hematoxilina-eosina y Tricrómico de Masson.

RESULTADOS

De los 18 corderos utilizados en este experimento, 4 animales fueron excluidos del estudio al ser sacrificados antes de lo previsto debido a fallo mecánico de la fijación externa y/o infec-

TABLA I. GRADUACIÓN HISTOMORFOMÉTRICA DE LA RECONSTRUCCIÓN DE DEFECTOS ÓSEOS FEMORALES SEGMENTARIOS MASIVOS.

		Graduación
Unión	No signos	0
	Fibrosa	
	Fibrocartilaginosa 2	
	Osea	3
	Completa, con hueso esponj. y cortical	4
Callo óseo	No	0
	Pequeña cantidad	1
	Cantidad moderada	2
	Profuso	3
	Ponteado	4
Cavidad medular	Nada en el defecto	0
	Indicios	1
	Presente en más del 50% del defecto	2
	Colonización completa de médula ósea	3
	Médula adiposa madura	4

ción durante el postoperatorio. Seis animales del grupo A (aloinjerto de matriz ósea descalcificada) y 4 del grupo B (injerto autólogo) completaron sin complicaciones el período del estudio. En cada uno de los grupos, 2 animales fueron sacrificados a los 2 meses de postoperatorio. No hubo complicaciones en los 4 animales de control.

Valoración radiológica

En el estudio radiológico efectuado a los 2 meses del postoperatorio, los dos corderos del

grupo A han respondido de un modo casi opuesto, observándose una calcificación más o menos importante del defecto en un caso (Fig. 3), mientras que en el otro no se detectó apenas ningún signo reparativo (Fig. 4). En el primer caso, la consolidación del defecto era dudosa. En el grupo B, por el contrario, los dos casos presentaban una respuesta osteogénica reparativa clara aunque no suficiente como para consolidar el defecto (grados radiológicos II y III).

En la valoración radiológica efectuada a los 4 meses del postoperatorio, de nuevo la res-

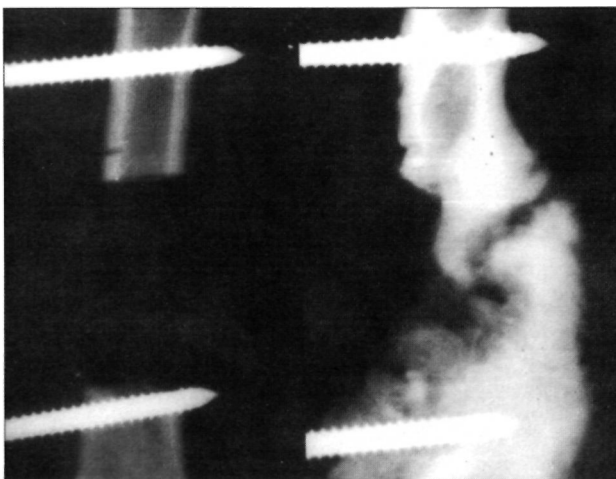


Figura 3. Radiografías seriadas (postop. inmediato y 2 meses postop.) de uno de los casos en que hubo una respuesta intensa al aloinjerto fragmentado de matriz ósea descalcificada. Obsérvese que no se ha producido el ponteado completo del defecto.

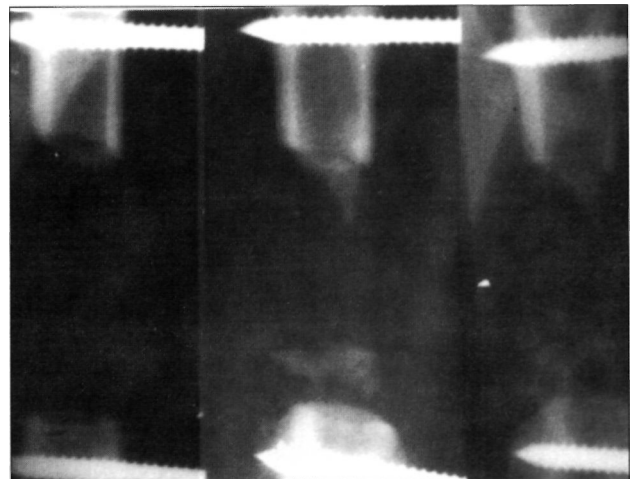


Figura 4. Radiografías seriadas (postop. inmediata, 1 mes y 2 meses postop.) mostrando un caso de respuesta nula al aloinjerto fragmentado descalcificado.

puesta ha sido dispar en los animales del grupo A. En 3 corderos no existía prácticamente respuesta (Fig. 5), mientras que en el cuarto se ha producido una calcificación intensa con consolidación del defecto (Fig. 6). En este caso, la buena respuesta era visible desde el punto de vista radiográfico desde el final del primer mes del postoperatorio, momento en que al contrario que en los demás animales de su grupo, ya podían observarse signos reparativos claros en el defecto. En el grupo B, la calcificación del defecto fue intensa en los dos corderos estudiados, consiguiéndose una consolidación completa en ambos (Fig. 7).

Con respecto al grupo control, sólo en un caso se objetivó una escasa osificación (grado II), mientras en los otros tres, la respuesta osteogénica en el defecto fué nula (grado I) (Fig. 8). En la Tabla II queda reflejada en forma individual la graduación de la reconstrucción y la consolidación de cada defecto desde el punto de vista radiológico.

Valoración histológica

En uno de los 2 animales del grupo A sacrificados a los 2 meses de evolución postoperatoria no existían signos de osteogénesis reparativa, quedando el defecto ocupado por los fragmentos de injerto de hueso descalcificado y tejido fibroso entre ellos. En el otro animal, sin embargo, se había producido una apreciable cantidad de hueso periférico a la zona injertada pero sin aparente relación con el injerto, el cual podía distinguirse macroscópicamente con facilidad.

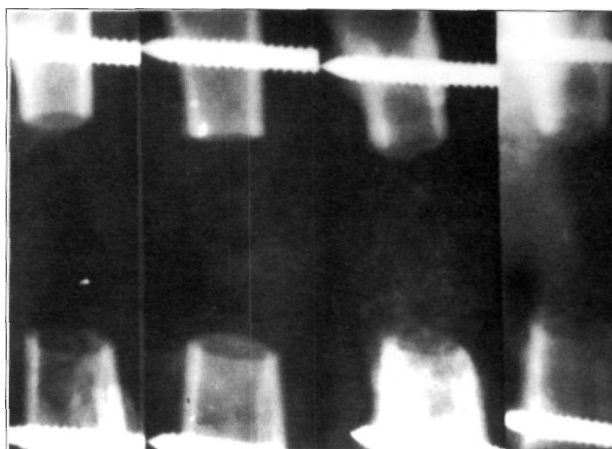


Figura 5. Serie radiográfica (postop. inmediato, 1,2 y 4 meses postop.) mostrando un caso de respuesta nula al aloinjerto fragmentado descalcificado.

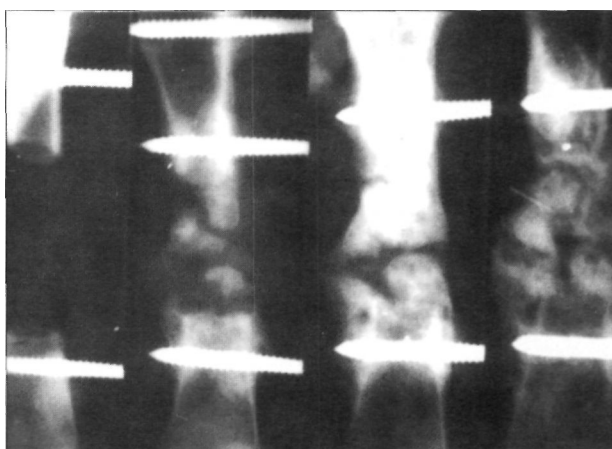


Figura 6. Reconstrucción satisfactoria de un DOSM tratado con aloinjerto fragmentado descalcificado. Serie radiográfica (postop. inmediato, 1,2,3 meses postop.). Nótese que la respuesta es ya evidente en el control radiológico tomado 1 mes postop.

TABLA II. RESULTADOS RADIOLÓGICOS E HISTOMORFOMÉTRICOS.

	Animal nº	Sacrificio	Radiología	Graduación histomorfométrica		
				Unión	Callo óseo	Cavidad medular
Grupo A	3	4m	I	0	0	0
	4	4m	IV	3	4	2
	9	4m	I	0	0	0
	11	4m	I	0	0	0
	29	2m	I	0	0	0
	30	2m	III	0	2	0
Grupo B	45	4m	IV-V	3	4	3
	44	4m	IV-V	?	4	3
	36	2m	II	0	1	0
	37	2m	III	0	2	0
Control	13	4m	I	0	0	0
	14	4m	I	0	0	0
	27	2m	I	0	0	0
	28	2m	II	0	0	0

m: meses Postoperatorio.

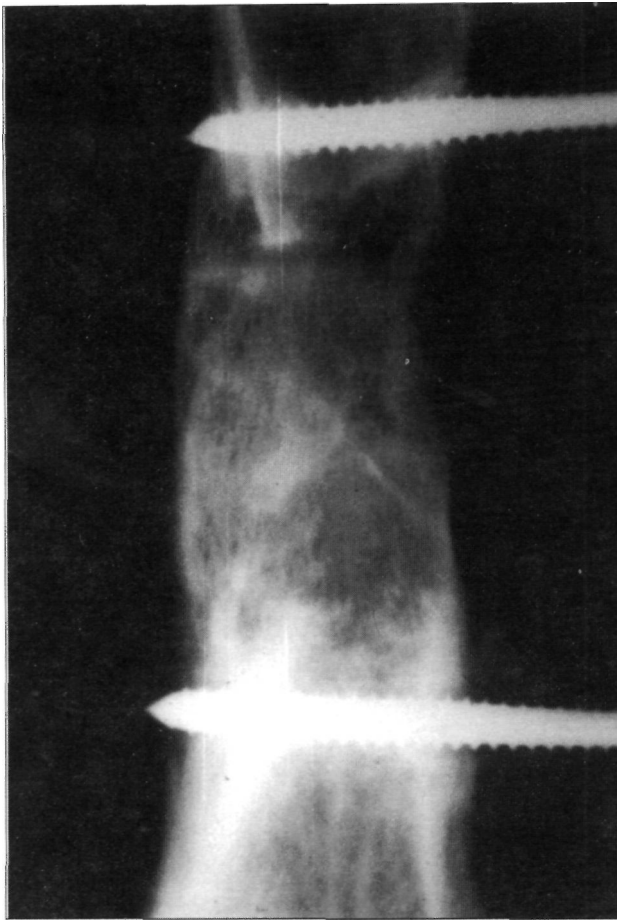


Figura 7. Imagen radiográfica de DOSM tratado con injerto autólogo fresco fragmentado. Reconstrucción satisfactoria a los 4 meses del postoperatorio.

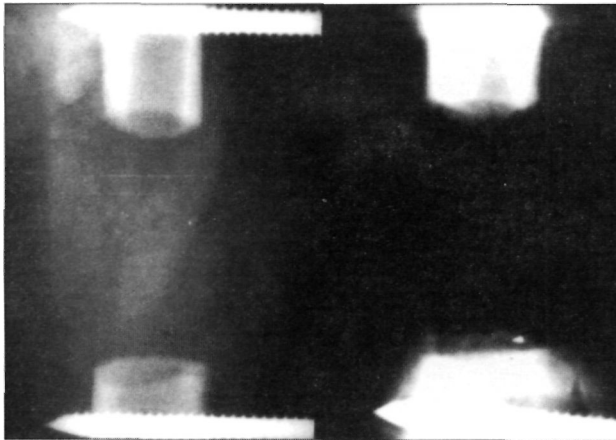


Figura 8. Caso control -defecto no tratado- en el que puede observarse que a los 4 meses del postop (derecha), no existen signos osteogénicos reparativos a nivel del defecto.

En el grupo B, los dos animales estudiados tras 2 meses de postoperatorio presentaban hallazgos homogéneos. El defecto se hallaba ocupado en su mayor parte por hueso neoformado envolviendo fragmentos de hueso necrótico incorporado. De todos modos, este tejido óseo no llegaba a pontear el defecto estando el resto

ocupado por tejido fibroso sin zonas cartilaginosas visibles en su interior. Tanto en el grupo A como B, los hallazgos histológicos se correspondían estrechamente con las imágenes radiológicas.

A los 4 meses de evolución, los tres corderos tratados con aloinjerto de matriz ósea descalcificada presentaban un cuadro histológico caracterizado por una osteogénesis casi inapreciable en ambos extremos del defecto, con los fragmentos del aloinjerto prácticamente intactos y envueltos por tejido fibroso (Fig. 9). En el cordero restante, el defecto estaba ocupado por un hueso esclerótico donde no se distinguía cortical y medular, y que ponteara completamente el defecto. Esporádicamente podían observarse fragmentos del injerto incluidos en el tejido óseo descrito (Fig. 10).

El aspecto histológico de los 2 animales del grupo B tratados con injerto autólogo, que sobrevivieron hasta los 4 meses de evolución postoperatoria, era similar en ambos. El defecto se hallaba ocupado por una estructura cilíndrica discretamente abombada dando un aspecto de "barril". Su zona periférica correspondía a un finísimo hueso cortical y su interior estaba constituido por un tejido esponjoso maduro entre cuyas trabéculas existía un tejido medular inmaduro de características normales. La consolidación era clara en ambos desde el punto de vista histológico (Fig. 11).

En lo que se refiere al grupo control, el defecto permanecía en todos los animales en una situación de no-consolidación, ocupado por un tejido fibroso que en su mayoría estaba salpicado por microscópicos islotes cartilaginosos en su interior.

Los extremos óseos del defecto estaban redondeados y sin signos osteogénicos reparativos (Fig. 12).

La Tabla II recoge los resultados de la graduación histomorfométrica, que combinados, dan una idea más objetiva del grado de reparación de los defectos óseos en cada uno de los grupos.

DISCUSIÓN

En un trabajo previo, nuestro grupo comparó el efecto de la desmineralización de aloinjertos en su capacidad regenerativa ósea, cuando éstos son utilizados para la reconstrucción de defectos

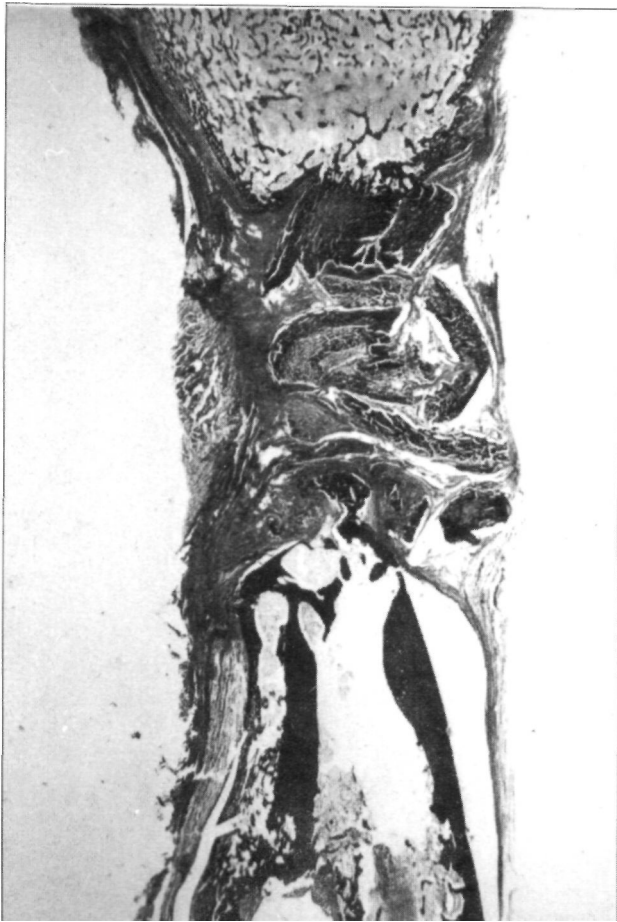


Figura 9. Imagen histológica panorámica de un caso tratado con aloinjerto descalcificado sin respuesta osteogénica. Nótese como los fragmentos de aloinjerto permanecen intactos en el defecto a los 4 meses del postop. (Tricrómico de Masson).

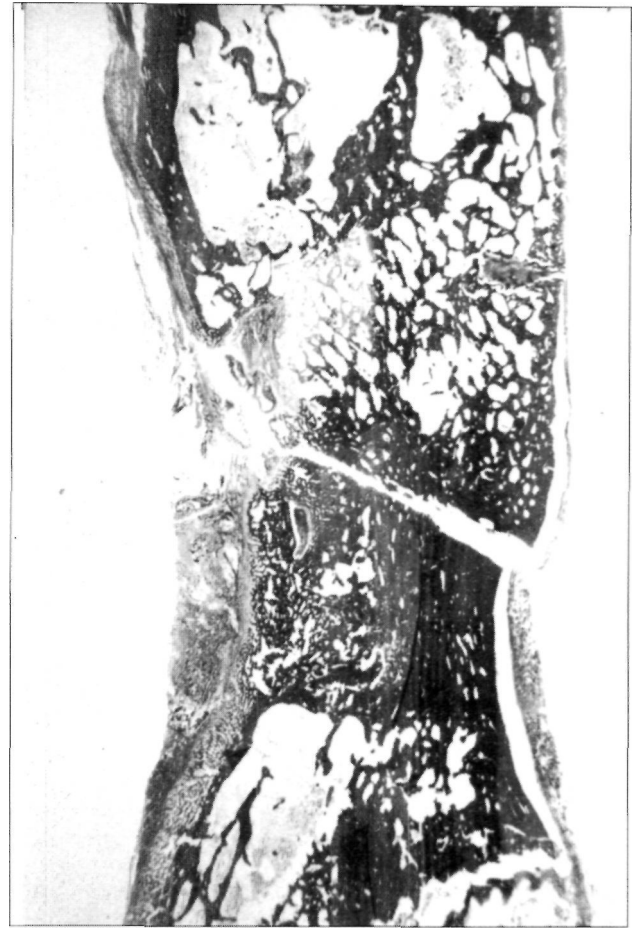


Figura 10. Imagen histológica panorámica del único caso en que se ha observado respuesta al aloinjerto descalcificado fragmentado con consolidación clara del defecto (Tricrómico de Masson).

óseos segmentarios masivos inducidos experimentalmente en el fémur ovino (12). En este estudio, los aloinjertos cilindricos de matriz ósea liofilizada indujeron una osteogénesis reparativa impredecible y generalmente pobre, siendo ésta independiente del contenido mineral del injerto.

En el presente trabajo, hemos utilizado aloinjertos de matriz ósea desmineralizada colocado en forma de pequeños fragmentos, en un intento de aumentar la superficie de exposición de la matriz ósea al medio circundante y así favorecer la osteoinducción preconizada por Urist y cols. (15). Además, esto nos permitía comparar la capacidad osteoinductora de este tipo de aloinjerto con respecto al injerto autólogo corticoesponjoso aplicado también en forma fragmentada o de virutas, tal y como tradicionalmente se emplea en muchas técnicas de cirugía ortopédica que requieren aporte de injerto.

Una dificultad inicial de nuestro modelo experimental era la reparación de un defecto óseo de gran magnitud. En este sentido se ha constatado que, sea cual sea el tipo de injerto o el procedimiento utilizado para el tratamiento de un defecto óseo, la reconstrucción es más fácil cuando se trata de una cavidad ósea que cuando se trata de un defecto segmentario, sobre todo si este es masivo (16). Por esto es por lo que hemos elegido el defecto óseo diafisario como modelo experimental que, además, como se ha objetivado en el grupo control, no se reconstruye en absoluto de una manera espontánea.

Valorando los resultados tanto a los 2 como a los 4 meses de evolución postoperatoria, el injerto autólogo se mostró más eficaz que el aloinjerto de matriz ósea descalcificada en la reparación de grandes defectos óseos. Sólo en 1 de los animales tratados con aloinjerto de matriz ósea se observó una actividad osteogénica que condujo a la reparación y consolidación del



Figura 11. Imagen histológica panorámica de un defecto tratado con autoinjerto fresco fragmentado. La consolidación es completa (Tricrómico de Masson).

defecto. Por el contrario, no se observó ningún fracaso en la incorporación y consolidación de los injertos autólogos en los animales que completaron los 4 meses de estudio. Pensamos, por tanto, que éste tipo de aloinjertos descalcificados no constituye en el momento actual una alternativa ventajosa frente a los autoinjertos convencionales. Estos últimos, si bien presentan algunas desventajas derivadas de su obtención y limitada disponibilidad, se han mostrado claramente más eficaces en la reconstrucción de DOSM en el fémur ovino.

Dada la prácticamente nula eficacia reparadora mostrada por los aloinjertos descalcificados fragmentados, podemos suponer que el gesto de fragmentarlos no ha llevado consigo un aumento de la capacidad osteoinductora del aloinjerto.

Al igual que en nuestro estudio anterior utilizando aloinjertos cilindricos (12), la respuesta inmune del organismo receptor al aloinjerto de matriz ósea parece jugar un papel importante.



Figura 12. Imagen histológica panorámica de un caso control (defecto no tratado) en el cual, la ausencia de respuesta osteogénica reparativa a nivel de defecto es patente.

Hemos llegado a esta conclusión a la vista de la respuesta "todo o nada" que hemos observado con los aloinjertos descalcificados. Así, pensamos que sería razonable suponer que mientras en la mayoría de los casos se daría respuesta inmune del organismo receptor que anularía la eficacia osteoinductora del aloinjerto, excepcionalmente esta respuesta no se produciría, dando lugar a la completa reconstrucción del defecto óseo inducida por el aloinjerto. La falta de respuestas que podríamos llamar "intermedias" observada en nuestra experiencia supone un dato más a favor de esa teoría.

En algunos estudios clínicos sobre aloinjertos óseos se han podido detectar reacciones inmunológicas capaces de inhibir la neoformación ósea y la curación de fracturas (13,17). Otros, han mostrado que la inmunosupresión mejora la incorporación de aloinjertos (18). Estos datos, junto con nuestras observaciones experimentales, nos han conducido a comenzar un nuevo proyecto de investigación con el fin de estudiar

más en concreto la respuesta a aloinjertos descalcificados en animales inmunosuprimidos farmacológicamente. Si estos nuevos estudios confirmasen esta "teoría inmunológica", pensamos que el manejo rutinario de aloinjertos en clínica humana pudiera sufrir grandes cambios, ya que sin inmunosupresión, su efecto sería impredecible o nulo en la mayoría de los casos. Actualmente, el uso de inmunosupresores en clínica humana presenta una gran morbilidad "per se", como para que su utilización se considere todavía difícilmente justificada en pacientes que requieren grandes injertos óseos.

Finalmente, con respecto a la macroestructura de la osificación observada en la zona del defec-

to, no hemos observado fenómenos de remodelación o tubulización del hueso neoformado que dieran lugar al restablecimiento de la morfología tubular diafisaria. El hueso inducido por los auto o aloinjertos presenta siempre un patrón difuso y desorganizado que contrasta grandemente con el hueso tubular que se desarrolla cuando los DOSM son tratados mediante técnicas de transporte óseo preconizadas por Ilizarov (19). Esta remodelación tubular rápida junto con otras ventajas tales como su menor agresividad desde un punto de vista técnico y la no necesidad de injerto ni de fijación interna, nos hacen pensar que el transporte óseo -siempre que sea viable- es quizás la técnica con más futuro para el tratamiento de grandes defectos óseos diafisarios.

Bibliografía

1. **Gross A, McKee J, Pritzker K, Langer F.** Reconstruction of skeletal deficits at the knee. A comprehensive osteochondral transplant program. *Clin Orthop* 1983; 174: 96-106.
2. **Hernigou PH, Delepine G, Goutallier D.** Allogreffes massives cryoconservées et stérilisées par irradiation. *Rev Chir Orthop* 1986; 72: 403-13.
3. **Mankin H, Doppelt S, Tomford W.** Clinical experience with allograft implantation. The first ten years. *Clin Orthop* 1983; 174: 69-88.
4. **Wilson PD, Lance EM.** Surgical reconstruction of the skeleton following segmental resection of Bone Tumors. *J Bone Joint Surg* 1965; 47A: 1629-56.
5. **Burchardt H, Busbeem GA III, Enneking WJ.** Repair of experimental autologous grafts of cortical bone. *J. Bone Joint Surg* 1975; 57A: 814-9.
6. **Friedlaender GH, Strong DM, Sell KW.** Studies on the antigenicity of bone. I. Freeze-dried and deep-frozen bone allograft in rabbits. *J Bone Joint Surg* 1976; 58A: 854-8.
7. **Heiple KG, Herndon CH, Chase SW, Wattleworth A.** Osteogenic induction by osteosarcome and normal bone in mice. *J Bone Joint Surg* 1968; 50A: 311-25.
8. **Friedlaender GH, Mankin HJ, Sell KW.** Osteochondral allografts. Biology, banking and clinical applications, Boston: Little Brown, 1983.
9. **Harakas NK.** Demineralized bone matrix-induced osteogenesis. *Clin Orthop* 1984; 188: 239-51.
10. **Mulliken B, Glowacki J.** Induced osteogenesis for repair and reconstruction in the craniofacial region. *Plas Reconst Surg* 1980; 65: 553-60.
11. **Takagi K, Urist MR.** The reaction of the dura to bone morphogenetic protein (BMP) in repair of skull defects. *Ann Surg* 1982; 196: 100-9.
12. **De Pablos J, Alfaro C, Martinez-Lott G, Nilsson O, Barrios C.** Valor de la desmineralización de aloinjertos en el tratamiento de grandes defectos óseos. Estudio experimental en el fémur ovino. *Rev Ortop Trauma* 1992, en prensa.
13. **Heiple KG, Chase SW, Herndon CH.** A comparative study of the healing process following different types of bone transplantation. *J Bone Joint Surg* 1963; 45A: 1593-616.
14. **Nilsson OS, Urist MR, Dawson EG, Schamalzreid TP, Finerman GAM.** Bone repair induced by bone morphogenetic protein in ulnar defects in dogs. *J Bone Joint Surg* 1986; 68B: 635-42.
15. **Urist AMR.** Bone morphogenetic protein, bone regeneration, heterotopic ossification and the bone-bone marrow consortium. *J Bone Mineral Res* 1989; 6: 57-63.
16. **Kakiuchi M, Hosoya T, Takaoka K, Amitaik K, Ono K.** Human bone matrix gelatin as a clinical alloimplant. A retrospective review of 160 cases. *Int Orthop* 1985; 9: 181-8.
17. **Burwell RG.** The fate of bone grafts. En *Apley, AG: Recent advances in ortopaedics.* London: J & JA Churchill 1969; p. 115.
18. **Golberg VW, Bos GD, Heiple KG, Zika M, Powell AE.** Improved acceptance of frozen bone allografts in genetically mismatched dogs by immunosuppression. *J Bone Joint Surg* 1984; 66A: 937-50.
19. **De Pablos J, Cañadell J, MacEwen GD, Bowen JR.** Bone Lengthening methods in the treatment of large segmental bone defects. En *Bone Transplantation.* Aebi M, Regazzoni P, Editores. Springer Verlag, Berlin-Heidelberg, 1989; p. 346.