

Sustitutos de tejido óseo

Erwin Cab Chan*

RESUMEN

Se denomina biomaterial a los productos empleados para reproducir la función de tejidos vivos en los sistemas biológicos de forma segura, mecánicamente funcional y aceptable fisiológicamente, que son temporales o permanentemente implantados en el cuerpo y que tratan de restaurar el defecto existente y, en algún caso, conseguir la regeneración tisular. El biomaterial en contacto con tejidos vivos no debe producir en ellos ningún tipo de alteración, lo que limita las materias primas con las que se puede abordar su diseño. Sin embargo, los biomateriales constituyen un conjunto cuya principal característica es su gran diversidad. Entre ellos se incluyen metales, cerámicas, vidrios, acero y otras aleaciones metálicas, polímeros sintéticos de múltiples clases, polímeros naturales, tejidos biológicos modificados, etcétera. Junto a esta diversidad estructural existe otra funcional, ya que los biomateriales utilizados en cirugía cardiovascular son diferentes de los que se aplican en cirugía ortopédica, odontológica u oftalmológica y, a su vez, son distintos de los utilizados como suturas biodegradables o soportes para la liberación de medicamentos.

Palabras clave: Biomateriales, sustitutos de tejido óseo, biocompatibilidad.

SUMMARY

Biomaterial, description is called biomaterial to the products used to replicate the function of living tissues in mechanically functional and physiologically acceptable biological systems securely that are temporarily or permanently implanted in the body and trying to restore the existing defect and, in some cases get tissue regeneration biomaterial contact with living tissues should not cause them any alteration, limiting the raw materials with which they can address their design. However, biomaterials are a set whose main characteristic is its great diversity. Including metals, ceramics, glass, steel and other metal alloys, multiple classes of synthetic polymers, natural polymers, modified biological tissues, etc. Next to this there is another functional structural diversity include, since biomaterials are used in cardiovascular surgery different from those applied in orthopedic, dental or ophthalmic surgery and, in turn, are different from those used as biodegradable sutures or as carriers for drug delivery.

Key words: Biomaterials, bone substitutes, biocompatibility.

* Traumatólogo Ortopedista, Presidente del Colegio Médico de Especialistas en Ortopedia y Traumatología de Yucatán, Miembro de la Sociedad Mexicana de Cirugía de Cadera y AMECRA.

Dirección para correspondencia:

Dr. Erwin Cab Chan

Centro Médico de las Américas.

Calle 54 No. 365, Int. 9 Anexo X,

Av. Pérez Ponce,

Col. Centro, 97000, Mérida, Yucatán, México.

Tel: 99 9926 6348

Correo electrónico: eerwindoc@gmail.com

Este artículo puede ser consultado en versión completa en <http://www.medicgraphic.com/orthotips>

INTRODUCCIÓN

¿Qué es un biomaterial?

Se denomina biomaterial a los productos empleados para reproducir la función de tejidos vivos en los sistemas biológicos de forma segura, mecánicamente funcional y aceptable fisiológicamente, que son temporales o permanentemente implantados en el cuerpo y que tratan de restaurar el defecto existente y, en algún caso, conseguir la regeneración tisular.^{1,2} El biomaterial en contacto con tejidos vivos no debe producir en ellos ningún tipo de alteración, lo que limita las materias primas con las que se puede abordar su diseño. Sin embargo, los biomateriales constituyen un conjunto de elementos cuya principal característica es su gran diversidad. Entre ellos se incluyen metales, cerámicas, vidrios, acero y otras aleaciones metálicas, polímeros sintéticos de múltiples clases, polímeros naturales, tejidos biológicos modificados, etc.³ Junto a esta diversidad estructural existe otra funcional, ya que los biomateriales utilizados en cirugía cardiovascular son diferentes de los que se aplican en cirugía ortopédica, odontológica u oftalmológica y, a su vez, son distintos de los utilizados como suturas biodegradables o soportes para la liberación de medicamentos.

Desde el punto de vista de su función, algunos biomateriales que contienen drogas son considerados medicamentos; los que incluyen células vivas constituyen los denominados «biomateriales híbridos». También hay «biomateriales inteligentes» que incluyen compuestos capaces de responder a señales. Los biomateriales deben ser implantados o incorporados dentro del organismo; todos los sistemas que ayudan a la técnica quirúrgica (materiales para la salud), prótesis o dispositivos, como miembros artificiales en los que ningún componente se integra en el tejido, amplificadores de sonido para el oído y prótesis faciales externas, no son considerados implantes. Cualquier biomaterial, para poder ser implantado, debe cumplir ciertos requisitos generales que se engloban en el concepto de biocompatibilidad, en el que se considera la tolerancia de dicho material, su bioestabilidad tanto a corto como a largo plazo, o el mantenimiento de sus propiedades y estructura químico-física en el entorno biológico durante el tiempo que permanezca en el organismo.^{3,4} Además, deben poseer propiedades mecánicas y químicas específicas que aseguren la función para la cual fueron diseñados. Esta viabilidad funcional es crítica y está relacionada con la capacidad del material para desempeñar su papel en una aplicación concreta, quedando garantizada a largo plazo la función del órgano o tejido donde se implanta. Para asegurar el éxito de un nuevo biomaterial se requiere que éste supere una serie de ensayos que preceden a las pruebas clínicas: simulaciones biomecánicas, modelos *in vitro*, ensayos toxicológicos y de biocompatibilidad, e implantación en animales de experimentación.⁵ La evaluación de la biocompatibilidad para cada aplicación específica y sistema requiere la realización de una serie de ensayos de acuerdo con los protocolos preestablecidos y del posterior análisis estadístico de los resultados obtenidos. Los requisitos que debe cumplir un biomaterial se pueden resumir en: 1) ser biocompatible, aceptado por el

organismo receptor, y no provocar que éste desarrolle mecanismos de rechazo ante la presencia del biomaterial, 2) no ser tóxico, ni carcinógeno, 3) ser químicamente estable, o biodegradable en productos no tóxicos, al menos durante el tiempo programado, ya que hay biomateriales biodegradables y biomateriales permanentes, 4) que la resistencia y propiedades mecánicas, características superficiales, el tiempo de fatiga y el peso sean los adecuados, y 5) su diseño, el tamaño y la forma del implante deben ser los adecuados. A todo ello debe añadirse que el precio debe ser reducido, su fabricación reproducible y su procesamiento fácil para su producción en gran escala (*Figura 1*).

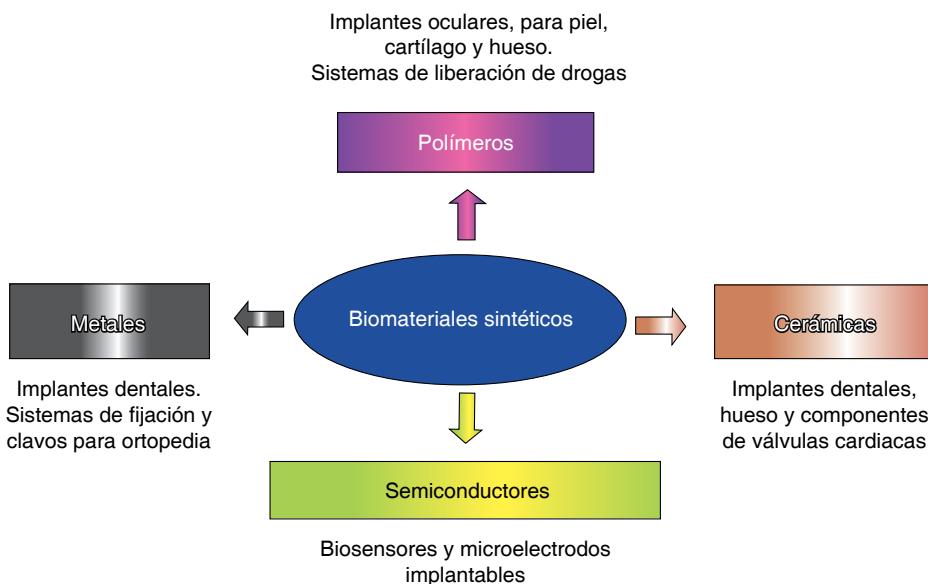


Figura 1. Clasificación de los biomateriales sintéticos en función de su naturaleza química.

CARTÍLAGO ARTICULAR

El **cartílago articular** es una fina capa de tejido firme, resistente y deslizante que cubre el final de los huesos en las articulaciones, y que no está irrigado por vasos sanguíneos. El líquido sinovial baña el cartílago articular, absorbe los impactos y lubrica las articulaciones, permitiendo su movilidad sin fricción ni roce. Está rodeado por la membrana sinovial, la cápsula articular y los ligamentos. Las células del cartílago, llamadas condrocitos, están embebidas en una matriz extracelular, de tipo gelatinoso-esponjoso, compuesta por colágeno de tipo II, ácido hialurónico, condroitín sulfato y agrecano, entre otros componentes. Todas estas moléculas se organizan formando una malla esponjosa con capacidad

elástica que lubrica la articulación, disminuye el roce y nutre a los condrocitos. Procesos inflamatorios, degenerativos, traumáticos, factores genéticos, junto con la edad y el aumento de peso, son algunas de las causas que rompen el equilibrio del cartílago produciendo su desgaste y la aparición de la artrosis. Y, debido a que no recibe aporte sanguíneo, el cartílago tiene una capacidad de regeneración limitada. Existen diversos procedimientos terapéuticos aplicables, dependiendo del estado de la lesión, entre ellos la inyección de proteoglicanos, la condroabrasión, la condroplastia, el autoinjerto osteocondral y el aloinjerto de bloques de cartílago.⁶ Algunas lesiones traumáticas o degenerativas requieren la sustitución de las zonas dañadas por prótesis articulares parciales

o totales (*Figura 2A*), pero si la lesión no es muy extensa, se puede recurrir a un implante de condrocitos autólogos. Todo ello está encaminado a obtener resultados satisfactorios y devolver al paciente a su vida activa. En esta área de la medicina regenerativa los métodos de la ingeniería de tejidos constituyen también una forma de terapia real y prometedora.⁷ El Carticel, de *Genzyme Tissue Repair* constituye un sistema para regenerar el cartílago, cuya utilización fue aprobada en 1997. Como se observa en la *figura 2B* de una zona sana, se toma cartílago y se obtienen condrocitos que crecen en una matriz comercial especialmente diseñada. Para que se produzca la regeneración, se limpia la zona dañada, se recubre y sella con

A

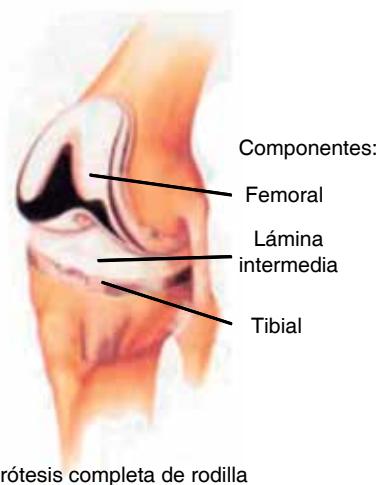


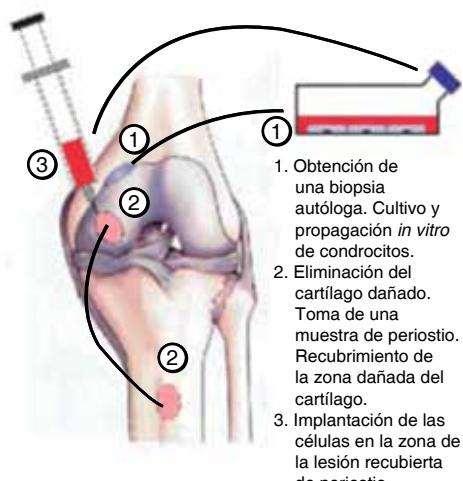
Figura 2. A) Ejemplo de material protésico.

periostio y, en esa localización, se transfieren o inyectan las células que se encargarán de que se produzca la regeneración en la zona dañada.

DEFECTOS ÓSEOS

La curación de los defectos óseos reviste una gran importancia en el mundo actual, dado el número de daños en las articulaciones y fracturas óseas que se producen por accidentes, en la práctica deportiva, o como consecuencia de la osteoporosis o por tumores. En función del tipo de lesión, en los tratamientos se pueden utilizar autoinjertos, aloinjertos (cuyo éxito dependerá de la forma de almacenamiento del material del donador, de los problemas de infección y de la reacción inmune) y los xenotrasplantes, a los que además se pueden sumar los problemas derivados

B



Regeneración de cartílago articular

Figura 2. B) Método de obtención y cultivo de condrocitos.

del rechazo inmune a un tejido de otra especie. El hueso está compuesto por una fase mineral (69%, hidroxiapatita, fosfato cálcico, carbonato, etcétera), una fase orgánica (22%, de la cual 90% es colágeno y el resto componentes celulares) y 9% de agua. Aunque el mejor sustitutivo óseo es el hueso mismo, también se puede recurrir a la reparación de la zona dañada con dispositivos fabricados con biomateriales metálicos, poliméricos o combinaciones de ellos; todo depende del alcance de la lesión. Por ejemplo, las prótesis de rodilla tienen dos componentes metálicos, uno en la parte inferior del fémur y otro en la parte superior de la tibia y, entre ellos, una lámina de naturaleza polimérica que hace las veces de cartílago. La primera prótesis total de rodilla se diseñó en 1947 por Shiers. Las prótesis actuales se basan en los diseños de McKee (1951) y de Charnley (1961) y en el modelo de «rodilla móvil» Rotaglide (1988).

También, a pesar de sus reconocidas limitaciones, para algunas aplicaciones se han desarrollado, y continúan en estudio, algunos biomateriales cerámicos potencialmente útiles para la sustitución ósea, como los cementos fosfocálcicos. Para facilitar la reparación del tejido óseo se utiliza el Collagraft, constituido por hidroxiapatita (60%), fosfato tricálcico (40%), colágeno fibrilar bovino y médula ósea del propio paciente.⁸ Una terapia atractiva alternativa al reemplazamiento prostético la constituye la regeneración biológica con restauración de la mineralización. En este caso se utilizan osteoblastos que crecen sobre hidrogeles de polisacáridos que pueden incluir factores de crecimiento y diferenciación.^{9,10}

OSTEOGÉNESIS

El término osteogénesis hace referencia a la formación de nuevo hueso sin indicación del origen celular.^{11,12} El injerto osteogénico de referencia es el autoinjerto de cresta ilíaca no tratado. Cuando se forma hueso sobre el injerto o a su alrededor, éste puede tener su origen en el propio injerto (células que sobreviven al tratamiento del injerto) o en células del huésped.¹³ Se ha demostrado que con un adecuado manejo pueden sobrevivir células en la superficie de los injertos corticales y esponjosos,¹⁴⁻¹⁶ siendo éstas clave para la formación de callo óseo en las primeras cuatro a ocho semanas tras la implantación.¹⁷ Lógicamente, el

hueso esponjoso, gracias a su mayor superficie, puede albergar más células aquiescentes y, por tanto, tiene una mayor capacidad para formar hueso desde el propio injerto que el injerto de cortical.¹⁸ La osteogenicidad de un injerto puede alterarse y mejorarse gracias a diversos compuestos y biomateriales como el fosfato octacálcico.¹⁹ Recientemente se ha demostrado la capacidad de células mesenquimales pluripotenciales de adquirir capacidad osteogénica mediante la variación de sustratos sintéticos y de su ambiente,^{20,21} lo cual abre la puerta a la capacidad de dotar de capacidad osteogénica a diversos biomateriales.

OSTEOINDUCCIÓN

La osteoinducción consiste en el reclutamiento de células de tipo mesenquimal que pueden diferenciarse en células formadoras de cartílago o formadoras de hueso. La osteoinducción está mediada por factores provenientes del injerto y es escasa en los injertos mineralizados (cuya máxima capacidad osteoinductora proviene de las células vivas que portan) y muy importante en los no mineralizados.²² La matriz ósea contiene diversas proteínas morfogenéticas, factor transformante B, factores similares a insulina I y II, factores de crecimiento fibroblástico ácido y básico, factor de crecimiento derivado de plaquetas, interleucinas, factores estimuladores de colonias de granulocitos y de granulocitos-macrófagos, etc.,^{23,24} los cuales inducen la diferenciación de las células mesenquimales en células formadoras de hueso. Un buen estado del lecho sobre el que asienta el injerto osteoinductor es clave para su éxito, ya que éste depende del reclutamiento de células del huésped. Por ejemplo, en un lecho muy fibrótico y previamente irradiado la formación de hueso alrededor del injerto dependerá casi exclusivamente de la capacidad osteogénica del mismo y no de su capacidad osteoinductora.²⁴ Sin embargo, la osteoinducción no es una propiedad exclusiva de la matriz ósea y sus proteínas, puesto que recientemente ha sido descrita para los aloinjertos óseos esterilizados y conservados²⁵ y para diversos biomateriales como el titanio.²⁶

OSTEOCONDUCCIÓN

La osteoconducción es el proceso tridimensional de crecimiento de brotes vasculares, tejido perivascular y células osteoprogenitoras desde el lecho del receptor al interior del injerto. La osteoconducción puede ocurrir por una neformación ósea activa por osteoinducción o puede suceder pasivamente sin la participación del propio injerto, como sucede en la mayoría de aloinjertos corticales. La osteoconducción no es un proceso aleatorio y sigue un patrón espacial ordenado y predecible determinado por la estructura del injerto, el aporte vascular desde los tejidos colindantes, el ambiente mecánico y la presencia de otros biomateriales.^{17,19,26}

Propiedades finales y objetivas

Propiedades osteoconductivas: proveen una matriz en la cual las células óseas pueden proliferar.^{27,28} Osteoinductivas: inducen la proliferación de célu-

las indiferenciadas y su diferenciación a osteoblastos (es decir, el cambio de fenotipo de un estado primitivo a otro tipo de células que cumplan funciones especializadas); además, proveen factores osteoconductivos esenciales para la regeneración ósea.²⁹⁻³¹ Propiedades osteogénicas: son un depósito de células que tienen la capacidad de formar nuevo hueso.³² Aunque los autoinjertos presentan buenos porcentajes de éxito y evitan problemas inmunológicos,^{33,34} en muchos casos no es posible su uso, debido ante todo a la cantidad limitada de tejido que puede ser tomada y a la morbilidad en el sitio de extracción.

AUTOINJERTOS

En la actualidad, el patrón de oro para los sustitutos óseos continúa siendo el autoinjerto de hueso esponjoso, habitualmente obtenido de la cresta ilíaca (*Figura 3*).³⁵ Las principales ventajas de este autoinjerto de esponjosa son que es fuertemente osteogénico, que es fácilmente revascularizado y que se integra rápidamente en el huésped;^{17,26} sin embargo, tiene varias limitaciones: en primer lugar, debemos tener en cuenta la morbilidad del sitio donante, que incluye la aparición de dolor postoperatorio, en ocasiones muy intenso, la posibilidad de infección y, más raramente, la anestesia en el muslo, la herniación muscular, la meralgia parestésica, la subluxación de la cadera y la consiguiente prolongación de la estancia hospitalaria;^{30,27} en segundo lugar, su principal factor limitante es la escasez de volumen de injerto disponible, especialmente en niños;² y por último, el autoinjerto de cresta ilíaca (*Figura 3*) proporciona un escaso soporte mecánico, lo cual limita su empleo en situaciones en las que se precisa un injerto estructural.³⁵ Por todo esto, parece generalmente aceptado que las indicaciones ideales de este autoinjerto quedan limitadas a defectos menores de 6 cm sobre un lecho bien vascularizado y no infectado.^{10,31,36} Con el fin de ampliar las indicaciones de los autoinjertos de esponjosa se han desarrollado diversas técnicas de autoinjertos óseos vascularizados, ya sean pediculados procedentes del peroné,^{37,38} de la cresta ilíaca,^{38,39} de tercio distal de radio,⁴⁰ etcétera. Ya sean libres, de los cuales el de peroné es el más frecuentemente usado.^{10,41} Sin embargo, aunque aportan algunas ventajas evidentes, también presentan limitaciones, especialmente derivadas de la cantidad de injerto disponible, la dificultad técnica (técnica demandante microquirúrgica) y la morbilidad del sitio donante.⁴²

Debido a las limitaciones referidas en el empleo de autoinjertos se han desarrollado dos tipos de estrategias diferentes cuando se precisa un in-



Figura 3. Injerto de cresta ilíaca.

jerto óseo: por un lado, el empleo de aloinjertos, y por otro, el de sustitutos óseos sintéticos.

SUSTITUTOS ÓSEOS SINTÉTICOS

Se calcula que de los 500,000 a 600,000 injertos óseos empleados anualmente en los Estados Unidos, 10% aproximadamente corresponden a sustitutos óseos sintéticos, y esta cifra está aumentando de manera significativa en los últimos años.^{44,45} Estos sustitutos óseos sintéticos pueden estar compuestos por hidroxapatita, fosfato trícálcico, sulfato cálcico o una combinación de estos minerales. La técnica de fabricación, la cristalinidad, las dimensiones del poro, las propiedades mecánicas y la tasa de reabsorción pueden variar.⁴³ En la actualidad se está publicando una gran cantidad de estudios sobre el empleo clínico de diversos compuestos de este tipo, y las indicaciones no están aún claramente establecidas, pero en muchas ocasiones parecen superponerse a las de los auto- y aloinjertos.^{25,28,43} Sin entrar a analizar las diferencias entre los diversos compuestos disponibles en el mercado, los sustitutos óseos sintéticos comparten diversas ventajas sobre los auto- y aloinjertos, incluyendo la ilimitada disponibilidad, la facilidad para su esterilización y su almacenaje.⁴³ Sin embargo, presentan diversas limitaciones, como la variabilidad en su carácter osteoconductor, las diferencias entre la reposición celular de las diferentes matrices, los efectos potencialmente adversos sobre el remodelado óseo normal, los aspectos comerciales relacionados con su utilización; pero la principal limitación práctica que presentan de forma conjunta es la escasa capacidad de proporcionar soporte mecánico, lo que contraindica su uso como injertos estructurales.^{8,43-46} Por todas estas razones, el empleo clínico de los aloinjertos en cirugía ortopédica y traumatología continúa siendo mayoritario, de modo que en Estados Unidos se calcula que se emplean entre 150,000 y 200,000 aloinjertos musculoesqueléticos al año, constituyendo el tejido más frecuentemente injertado en la práctica médica y quirúrgica.^{8,47}

ALOINJERTOS ÓSEOS

En ocasiones, la terminología empleada en los trasplantes de tejidos resulta confusa, por ello es conveniente iniciar este apartado aclarando determinados conceptos y definiciones. Un aloinjerto es un tejido transferido entre dos individuos genéticamente diferentes de la misma especie; es un concepto que debe ser claramente diferenciado del



Figura 4. Ejemplo de aloinjerto en osteosíntesis de meseta tibial externa.

xenoinjerto, que es el tejido transferido desde un individuo de otra especie. Además hay otros dos aspectos que conviene aclarar cuando se habla de trasplantes, en este caso óseos, como son el de injerto ortotópico, que es aquel que se coloca en una localización anatómicamente apropiada; mientras que el injerto heterotópico es aquel que se coloca en un lugar anatómicamente inapropiado (*Figura 4*).¹⁷

BIBLIOGRAFÍA

1. Williams DF. Biomaterials and biocompatibility. *Med Prog Technol*. 1976; 4: 31-42.
2. Williams DF. *The Williams dictionary of biomaterials*. Liverpool, UK. University Press. 1999, p. 343.
3. Hench LL, Ethridge ECE. *Biomaterials. An interfacial approach*. Biophysics and Bioengineering Series Chapters 14, Vol 4. Academic Press, New York. 1982, p. 384.
4. Chang Y, Tsai CC, Liang HC, Sung HW. *In vivo evaluation of cellular and acellular bovine pericardia fixed with a naturally occurring crosslinking agent (genipin)*. *Biomaterials*. 2002; 23: 2447-2457.
5. Murray PE, Garcia GC, Garcia GF. How is the biocompatibility of dental biomaterials evaluated? *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2007; 12: E258-266.
6. Raghunath J, Rollo J, Sales KM, Butler PE, Seifalian AM. Biomaterials and scaffold design: key to tissue-engineering cartilage. *Biotechnol Appl Biochem*. 2007; 46 (Pt 2): 73-84.
7. Schulz RM, Bader A. Cartilage tissue engineering and bioreactor systems for the cultivation and stimulation of chondrocytes. *Eur Biophys J*. 2007; 36: 539-568.
8. Cornell CN, Lane JM, Chapman M, Merkow R, Seligson D, Henry S, et al. Multicenter trial of Collagraft as bone graft substitute. *J Orthop Trauma*. 1991; 5: 1-8.
9. De Bari C, Pitzalis C, Dell'Accio F. Reparative medicine: from tissue engineering to joint surface regeneration. *Regen Med*. 2006; 1: 59-69.
10. Kretlow JD, Mikos AG. Review: mineralization of synthetic polymer scaffolds for bone tissue engineering. *Tissue Eng*. 2007; 13: 927-938.
11. Bolander ME, Balian C. The use of demineralized bone matrix in the repair of segmental defects. *J Bone Joint Surg Am*. 1986; 68-A: 1264-1274.
12. Lin KY, Bartlett SP, Yaremchuk MJ, Fallon M, Grossman RF, Whitaker LA. The effect of rigid fixation on the survival of onlay bone grafts: an experimental study. *Plast Reconstr Surg*. 1990; 86 (3): 449-456.
13. Burchardt H. The biology of bone graft repair. *Clin Orthop Relat Res*. 1983; 108 (174): 28-42.
14. Bassett CA. Clinical implications of cell function in bone grafting. *Clin Orthop*. 1972; 87: 49-59.
15. Gray JC, Elves MW. Early osteogenesis in compact bone isografts: A quantitative study of the contributions of the different graft cells. *Calcif Tissue Int*. 1979; 29: 225-237.
16. Stevenson S. Biology of bone grafts. *Orthop Clin North Am*. 1999; 30 (4): 543-552.
17. Friedlander GE. Current concepts review: Bone grafts. *Bone Joint Surg Am*. 1987; 69-A: 786-790.
18. Barrère F, van der Valk CM, Dalmeijer RA, Meijer G, Van Blitterswijk CA, de Groot K, et al. Osteogenicity of octacalcium phosphate coatings applied on porous metal implants. *J Biomed Mater Res*. 2003; 66: 779-788.
19. Meinel L, Karageorgiou V, Fajardo R, Snyder B, Shinde-Patil V, Zichner L, et al. Bone tissue engineering using human mesenchymal stem cells: effects of scaffold material and medium flow. *Ann Biomed Eng*. 2004; 32: 112-122.
20. Harris CT, Cooper LF. Comparison of bone graft matrices for human mesenchymal stem cell-directed osteogenesis. *J Biomed Mater Res*. 2004; 68: 747-755.
21. Kale AA, Di Cesare PE. Osteoinductive agents: basic science and clinical applications. *Am J Orthop*. 1995; 24: 752-761.
22. Mohan S, Baylink DJ. Bone growth factors. *Clin Orthop Relat Res*. 1991; 263: 30-48.
23. Vicario EC. El efecto osteoinductor de la matriz de los aloinjertos: estudio experimental en cultivos de osteoblastos humanos (tesis doctoral). Tesis de la Universidad Complutense de Madrid, Facultad de Medicina, Madrid, 2003.
24. Fujibayashi S, Neo M, Kim H M, Kokubo T, Nakamura T. Osteoinduction of porous bioactive titanium metal. *Biomaterials*. 2004; 25: 443-450.
25. Stevenson S, Li XQ, Davy DT, Klein L, Goldberg VM. Critical biological determinants of incorporation of non-vascularized cortical bone grafts. Quantification of a complex process and structure. *J Bone Joint Surg Am*. 1997; 79 (1): 1-16.

26. Leunig M, Yuan F, Berk DA. Angiogenesis and growth of isografted bone: quantitative *in vivo* assay in nude mice. *Lab Invest*. 1994; 71: 300-307.
27. Younger EM, Chapman MW. Morbidity at bone graft donor sites. *J Orthop Trauma*. 1989; 3: 192-195.
28. Cockin J. Autologous bone grafting: complications at the donor site. *J Bone Joint Surg Br*. 1971; 53: 153.
29. Weikel AM, Habal MB. Meralgia paraesthesia: a complication of iliac bone procurement. *Plast Reconstr Surg*. 1977; 60: 572-574.
30. Boone DW. Complications of iliac crest graft and bone grafting alternatives in foot and ankle surgery. *Foot Ankle Clin*. 2003; 8: 1-14.
31. Aro HT, Aho AJ. Clinical use of bone allografts. *Ann Med*. 1993; 25 (4): 403-412.
32. Nicoll EA. The treatment of gaps in long bones by cancellous insert grafts. *J Bone Joint Surg Br*. 1956; 38-B: 70-82.
33. Weber BG, Cech O. Pseudoarthrosis pathophysiology, biomechanics and therapy, results. New York: Grune & Stratton, 1980; 1-60.
34. Davis AG. Fibular substitution for tibial defects. *J Bone Joint Surg Am*. 1944; 25-A: 229-237.
35. Nolan PC. Living bone grafts. *BMJ*. 1992; 304: 1520-1521.
36. Chacha PB. Vascularized pedicular bone grafts. *Int Orthop*. 1984; 8: 117-138.
37. Davis JB. The muscle-pedicle bone graft in hip fusion. *J Bone Joint Surg Am*. 1954; 36-A: 790-799.
38. Kuhlmann JN, Mimoun M, Boabighi A, Baux S. Vascularized bone graft pedicled on the volar carpal artery for non-union of the scaphoid. *J Hand Surg [Br]*. 1987; 12 (2): 203-210.
39. Taylor GI, Miller GD, Ham FJ. The free vascularized bone graft. A clinical extension of microvascular techniques. *Plast Reconstr Surg*. 1975; 55 (5): 533-544.
40. Youdas JW, Wood MB, Cahalan TD, Chao EY. A quantitative analysis of donor site morbidity after vascularized fibula transfer. *J Orthop Res*. 1988; 6: 621-629.
41. Bucholz RW. Nonallograft osteoconductive bone graft substitutes. *Clin Orthop Relat Res*. 2002; 395: 44-52.
42. Kelly CM, Wilkins RM, Gitelis S, Hartjen C, Watson JT, Kim PT. The use of a surgical grade calcium sulfate as a bone graft substitute: results of a multicenter trial. *Clin Orthop Relat Res*. 2001; 382: 42-50.
43. Shors E. Bone graft substitutes: clinical studies using coralline hydroxiapatite biomaterials in surgery. In: Bakker FC (ed), Walenkamp GHIM. Stuttgart: George Thieme Verlag, 1998; pp. 83-89.
44. Chapman MW, Bucholz R, Cornell C. Treatment of acute fractures with a collagen-calcium phosphate graft material: a randomized clinical trial. *J Bone Joint Surg Am*. 1997; 79: 495-502.
45. Holmes RE, Bucholz RW, Mooney V. Porous hydroxiapatite as a bone-graft substitute in metaphyseal defects. A histometric study. *J Bone Joint Surg Am*. 1986; 68: 904-911.
46. Bauer TW, Muschler GF. Bone graft materials. An overview of the basic science. *Clin Orthop Relat Res*. 2000; (371): 10-27.
47. Goldberg VM, Stevenson S. Natural history of autografts and allografts. *Clin Orthop Relat Res*. 1987; 225: 7-16.