

Materiales para la reparación y sustitución ósea. Factores de crecimiento y terapia genética en Cirugía Ortopédica y Traumatología

Materials for bone healing and substitution. Growth factors and gene therapy in Orthopaedic Surgery and Traumatology

¹ Servicio de Traumatología y Cirugía Ortopédica
Hospital Universitario Miguel Servet. Zaragoza

² Unidad Mixta de Investigación
Universidad de Zaragoza

³ Servicio de Cirugía Ortopédica y Traumatología
Hospital Clínico Universitario
Universidad de Valencia

Gil Albarova J. ¹
Garrido Lahiguera R. ²
Gil Albarova R. ³
Melgosa Gil M. ²

RESUMEN

La búsqueda y desarrollo de nuevos materiales y métodos de reparación y/o sustitución ósea representa una punta de lanza en el tratamiento actual de los defectos óseos. El objetivo del presente trabajo es la revisión del estado actual del conocimiento sobre los materiales actualmente disponibles para ser utilizados en la reparación y/o sustitución ósea, la aplicación en la Cirugía Ortopédica y Traumatología de los factores de crecimiento conocidos en la actualidad, y de la osteoinducción mediante tratamiento genético.

Palabras clave: Reparación ósea, sustitutos óseos, materiales degradables, terapia genética, factores de crecimiento, osteoinducción.

Gil Albarova J, Garrido Lahiguera R, Gil Albarova R, Melgosa Gil M
Materiales para la reparación y sustitución ósea. Factores de crecimiento y terapia genética en Cirugía Ortopédica y Traumatología
Mapfre Medicina, 2003; 14: 51-65

ABSTRACT

Research and development of new materials and methods for bone repair or substitution is today one priority in bone defects treatment. The purpose of this work was the update of actual knowledge about materials for bone repair and/or substitution, growth factors usefulness in orthopaedic surgery, and osteoinduction by means of gene therapy.

Key words: Bone healing, bone substitutes, degradable materials, gene therapy, growth factors, osteoinduction.

Gil Albarova J, Garrido Lahiguera R, Gil Albarova R, Melgosa Gil M
Materials for bone healing and substitution. Growth factors and gene therapy in Orthopaedic Surgery and Traumatology
Mapfre Medicina, 2003; 14: 51-65

Correspondencia:

J. Gil Albarova
C/ Fray Luis Amigó, 2
50006 Zaragoza
jgilalba@posta.unizar.es

Fecha de recepción: 25 de abril de 2001

INTRODUCCIÓN

La necesidad de tratar defectos óseos de diferente etiología, magnitud y localización ha estimulado enormemente la búsqueda y desarrollo de materiales capaces de sustituir al hueso. El autoinjerto, pese a ser el injerto ideal por su comportamiento en la mayoría de las situaciones, presenta una morbilidad intrínseca en su obtención, una limitación en cuanto a la cantidad y morfología del mismo, y un coste económico no desdeñable. Los bancos de huesos permiten resolver gran parte de las necesidades actuales, pero se acompañan de una problemática específica de tipo económico, de infraestructura y médico-legal entre otras. El sustituto óseo ideal debería ser osteogénico, biocompatible, bioabsorbible, capaz de proporcionar soporte estructural y de vehiculizar otras sustancias, fácilmente utilizable en clínica y con una adecuada proporción coste-beneficio. Por otra parte, sería deseable que en determinadas aplicaciones una o varias de dichas características predominasen sobre otras en función de la necesidad del caso a tratar.

GENERALIDADES

Un biomaterial es una sustancia biocompatible, natural o sintética, o combinación de sustancias que puestas en contacto con los tejidos vivos o los fluidos biológicos, no afectan de forma adversa a los constituyentes biológicos del conjunto del organismo. Otra definición de biomaterial considera que es aquel material diseñado para actuar interfacialmente con sistemas biológicos con el fin de evaluar, tratar, aumentar o sustituir algún tejido, órgano o función del cuerpo. La biocompatibilidad se define como la tolerancia biológica local de un determinado material, manifestada por la ausencia de respuesta inflamatoria aguda o crónica, o por su incorporación durante un período de tiempo tras su implantación, así como la ausencia de efectos deletéreos sobre tejidos distantes al lugar de implantación (1-3).

Se define como biodegradación la ruptura gradual de un material mediado en o por un sistema biológico, siendo o no éste último la causa del proceso de degradación (2, 3). Los fragmentos resultantes pueden ser desplazados de su lugar de implantación, pero no necesariamente fuera del organismo, en particular si pueden ser depositados en algún otro tejido del receptor (4).

Se reserva el término de biorreabsorbible para aquellos sistemas poliméricos capaces de de-

gradarse en componentes de menor peso molecular incluidos normalmente en vías metabólicas, o eliminados al menos a través de las vías naturales del organismo. El concepto de bioabsorbible hace referencia a la eliminación del lugar de implantación, sin degradación previa de macromoléculas, como el caso de la lenta disolución de implantes hidrosolubles en los fluidos corporales (3, 4).

1. Polímeros reabsorbibles

El uso de implantes fabricados con polímeros reabsorbibles se ha popularizado en los últimos años. Las razones de su empleo en Cirugía Ortopédica y Traumatología vienen determinadas por (2, 4-7):

- Evitar su extracción después de conseguir su objetivo.
- Permiten una transferencia gradual y progresiva de tensiones al hueso.
- Son eliminados completamente del organismo, promoviendo el restablecimiento de los tejidos originales.
- Reducen el riesgo de migración posterior y las complicaciones a largo plazo relacionadas con la presencia de materiales extraños.

Los polímeros reabsorbibles utilizados en la fabricación de estos implantes han de tener las siguientes características (1, 5, 8-10):

- Proporcionar resistencia y rigidez inicial, que se pierde a medida que avanza el proceso de reparación.
- Deben ser totalmente reabsorbibles, y los subproductos derivados de su degradación, preferentemente por hidrólisis, no deben ser tóxicos, teratogénicos, mutagénicos o carcinogénicos.
- Los monómeros deben ser hidrosolubles y su eliminación debe llevarse a cabo por vía renal y pulmonar.
- Deben permitir su esterilización sin pérdida de las propiedades anteriores.

Los polímeros reabsorbibles con los que se cuenta actualmente en el mercado son: ácido poliglicólico, ácido poliláctico, polidioxanona, poligliconato y co-polímeros de los dos primeros. La investigación bioquímica ha desarrollado el diseño de poliésteres y polímeros de elevado peso molecular a partir de monómeros cíclicos, que permiten la fabricación de un implante según la resistencia y rigidez deseadas (2-6, 10-12).

La esterilización de los implantes reabsorbibles se realiza mediante radiación, con riesgo de pér-

dida de sus propiedades biomecánicas en esterilizaciones repetidas, o mediante esterilización con óxido de etileno, que puede acompañarse de reacciones químicas entre el gas residual presente en el material esterilizado y las proteínas tisulares (3, 9, 11). Se ha demostrado en diferentes estudios experimentales, la pérdida total de la capacidad de osteoinducción de determinados implantes tras esterilización con óxido de etileno (13-15).

El medio del cuerpo humano es hostil y todos los polímeros inician su deterioro tan pronto como son implantados. La causa más probable de este deterioro es el ataque iónico (especialmente OH⁻) y el oxígeno disuelto, junto con la degradación enzimática en el caso de materiales poliméricos naturales como el colágeno reconstituido (3, 16). El proceso de reabsorción *in vivo* de este tipo de implantes sigue tres fases, cuya duración está en relación directa con la composición del polímero empleado, su morfología y pureza, lugar de implantación y sollicitación mecánica (1, 5, 16, 17):

— Fase I: pérdida progresiva de la resistencia del implante por reducción de su peso molecular. En esta fase tiene lugar una respuesta a cuerpo extraño por parte del organismo receptor, con fragmentación del implante y pérdida de su resistencia mecánica.

— Fase II: pérdida progresiva de masa del implante por su hidrólisis metabólica. Se mantiene la respuesta a cuerpo extraño, con pérdida progresiva de la morfología inicial del implante.

— Fase III: eliminación del implante y sustitución del mismo por tejido óseo y/o conjuntivo.

La reabsorción de los implantes se ha relacionado con efectos clínicos adversos derivados de la reacción a cuerpo extraño como enrojecimiento cutáneo en el lugar de implantación, dolor, hinchazón local y drenaje de fragmentos del implante a través de orificios cutáneos (5, 18-21). Estos fenómenos están relacionados con el acúmulo local de productos de degradación del implante y con la capacidad de los tejidos circundantes de eliminar dichos residuos (17, 21).

Se ha comprobado en la clínica humana que la población celular más numerosa en los exudados que drenan espontáneamente son linfocitos, con una menor proporción de monocitos, y ausencia de neutrófilos dada la esterilidad del drenaje de etiología no infecciosa (22). Para Santavirta y cols. (23), la escasez de elementos fagocíticos mononucleares hace sospechar una reacción inmunológica mediada por linfocitos contra el implante.

Otros autores, en el campo experimental, consideran que se trata de una respuesta inflamato-

ria no específica con invasión de macrófagos, células gigantes multinucleadas a cuerpo extraño, neutrófilos y leucocitos polimorfonucleares (21, 24, 25). Dicha respuesta inflamatoria tiene su traducción radiográfica en los fenómenos de osteolisis periférica a los implantes, observados tanto en el campo experimental (4, 21, 25) como en la clínica humana (18, 26, 27).

Estudios experimentales

García Novalvos y cols. (26) han estudiado los fenómenos de degradación de implantes biodegradables en el fémur de la rata, y la progresiva sustitución de los mismos por tejido óseo. Matsusue y cols. (28) estudiaron en conejos dicha degradación y sustitución por tejido óseo analizando la reacción tisular a largo plazo. Winet y cols. (29) estudiaron en conejos la incorporación de polímeros biodegradables en un defecto óseo cortical, observando los efectos de la degradación de los mismos sobre los procesos de neoangiogénesis y osteogénesis, así como su repercusión en el aporte sanguíneo. Ashammakhi y cols. (30) comprobaron en ratas que la implantación de láminas de ácido poliglicólico autoreforzado a nivel metafisario estimulaba la formación ósea, si se asociaba una desperiostización en dicha zona. López-Casero y cols. (31) comprobaron en cerdos que los polímeros de ácido láctico no ofrecen ventajas en el tratamiento de pequeños defectos óseos epifisarios respecto a los aloinjertos congelados. Von Schroeder y cols. (32) estudiaron en conejos los fenómenos de reparación de defectos de cartílago articular empleando una matriz de ácido poliláctico recubierta de periostio autógeno.

Weiler y cols. (25) comprobaron la utilidad de los implantes de ácido poliglicólico en la fijación de fracturas osteocondrales en la rodilla del cordero, advirtiendo de los posibles efectos deletéreos intraarticulares de los productos de degradación. Mäkelä y cols. (33, 34), estudiaron los efectos de la perforación transfisaria del fémur distal en conejos mediante tallos de polidioxanona y de poliglactin, observando la regeneración de la fisis en la zona de la perforación.

Böstman y cols. (35, 36), utilizando tallos reforzados de ácido poliláctico, analizaron la influencia del calibre del mismo si se introduce por vía intraarticular, en relación con la reparación ósea del lecho de implantación así como su relación con el medio articular. Otsuka y cols. (37) estudiaron los efectos de la degradación de implantes de polidioxanona en forma de agujas a través de la fisis y en la proximidad de la misma, com-

probando que dicha degradación no alteraba el normal crecimiento fisario. Gil Albarova y cols. (38-40) observaron en conejos que los tornillos autorreforzados de ácido poliglicólico son incapaces de lograr una epifisiodesis del trocánter mayor, comportándose como un material de interposición que impide la formación de un puente fisario. Sin embargo, consiguieron la hemiepifisiodesis femoral distal en el conejo mediante un implante compuesto de un filamento de polidioxanona enlazado sobre tres tornillos en la cara lateral del fémur, con la misma eficacia que utilizando el mismo implante pero completamente metálico* (41).

Nordström y cols. (21) estudiaron en ratas la respuesta tisular del hueso esponjoso del tercio distal del fémur a los implantes autorreforzados de ácido poliglicólico y ácido poliláctico. Comprobaron en ambos casos la presencia de una respuesta osteoestimuladora a nivel de la intercara entre el implante y el tejido receptor de diferente presentación en ambos implantes. En los implantes autorreforzados de ácido poliláctico, la respuesta osteoide era máxima a la primera semana del postoperatorio decreciendo posteriormente de forma progresiva. Sin embargo, en los implantes autorreforzados de ácido poliglicólico, esta respuesta era significativamente mayor a la observada con los implantes autorreforzados de ácido poliláctico a las 6, 12 y 24 semanas del postoperatorio, coincidiendo con el mayor acúmulo local de macrófagos.

Paralelamente, los materiales reabsorbibles se han utilizado experimentalmente como espaciadores, aglutinadores de otros materiales, vehículos de liberación local progresiva de diferentes antibióticos o factores de crecimiento (5-7, 31, 42-52).

Aplicaciones clínicas

La aplicación clínica más común de implantes biodegradables es la fijación de fracturas, y en concreto las fracturas maleolares de tobillo (53-55). Las series publicadas recogen resultados satisfactorios en cuanto a la consolidación sin mayor incidencia de infecciones, aunque sí se ha observado una mayor incidencia de desplazamientos secundarios (56, 57). También se han utilizado con éxito en la fijación de fracturas de ró-

tula (53), fracturas osteocondrales en la rodilla (54), fracturas de la región del codo en niños (59), fracturas del astrágalo (58), la fijación de plastias de ligamento cruzado anterior de la rodilla (60) y la estabilización de osteotomías de los metatarsianos (58, 61). En la extremidad superior se han utilizado con éxito en la osteosíntesis de fracturas de la cabeza radial (58, 60), fracturas intraarticulares del codo (54, 58), fracturas de muñeca (18), fracturas de metacarpianos y falanges (20).

Su utilización permite obviar los artefactos de imagen que acompañan a otros implantes metálicos en los estudios de tomografía axial computarizada y de resonancia magnética (19, 58). Mención aparte merece el uso de este tipo de implantes en la osteosíntesis de fracturas fisarias. Así, su aplicación en forma de agujas para la osteosíntesis de fracturas supracondíleas del codo en niños ha obtenido resultados satisfactorios (27, 58, 61, 62).

2. Nuevos materiales capaces de sustituir al hueso

En los últimos años, la idea de contar con materiales capaces de sustituir al hueso se ha desarrollado progresivamente. Entre otras razones, se argumenta que la obtención de un autoinjerto no está exenta de morbilidad, existe una limitación en cuanto a la cantidad a obtener y a la morfología anatómica del mismo, pese a ser el injerto ideal por su comportamiento en la mayoría de las necesidades (7, 63-65). Por otra parte, se ha calculado que el coste económico de la obtención de un autoinjerto de cresta ilíaca y el tratamiento de su morbilidad puede exceder de los 5.000 \$ por caso (65).

El sustituto óseo ideal debería ser osteogénico, biocompatible, bioabsorbible, capaz de proporcionar soporte estructural y de vehicular otras sustancias, fácilmente utilizable en clínica y con una adecuada proporción coste-beneficio (7, 64, 65). En la práctica sería deseable que en determinadas aplicaciones una o varias de dichas características predominasen sobre otras en función de la necesidad del caso a tratar.

Los sustitutos óseos pueden emplearse en el relleno de pequeñas cavidades, o mezclados con el autoinjerto óseo con la finalidad de incrementar el volumen del mismo, permitiendo su aplicación en situaciones en las que se requiere un gran volumen de injerto, tales como el tratamiento quirúrgico de la escoliosis, la cirugía de revisión de prótesis articulares o la cirugía ortopédica oncológica (6, 22, 34, 45, 64-74).

* GIL ALBAROVA R. *Hemiepifisiodesis femoral distal mediante biomateriales reabsorbibles. Estudio experimental en el conejo*. Tesis Doctoral. Universidad de Valencia, 1999.

El hueso es una estructura compuesta de células, agua, matriz orgánica y sales inorgánicas. El componente inorgánico del hueso representa aproximadamente el 70% de su peso seco, es biocompatible, no es inmunogénico y está constituido por sales de calcio, fundamentalmente fosfato de calcio, junto con pequeñas cantidades de sodio y magnesio (65, 66). De estas sales, la hidroxiapatita, un fosfato de calcio pobremente cristalizado, es el mayor constituyente del componente inorgánico, mientras que otras sales de calcio, como el carbonato de calcio, están presentes en mucha menor proporción. Las sales de calcio, y en particular la hidroxiapatita y el carbonato de calcio, son bioactivas y osteoconductoras (65, 75). El mayor constituyente de la fase orgánica es el colágeno tipo I, con elementos celulares que integran el resto de la matriz orgánica (65).

El reto investigador se ha planteado a la hora de dar una adecuada forma tridimensional a las sales de calcio para que el crecimiento óseo se desarrolle en una determinada localización y dirección. Sobre la base del conocimiento de la incorporación de los injertos óseos se ha propuesto la porosidad del material como cualidad necesaria para el crecimiento del tejido blando y posterior regeneración ósea tras la implantación. Sin embargo, la porosidad por sí sola no es suficiente para el crecimiento óseo, y resulta indispensable que esté asociada a interconexión de los poros (65). Por otra parte, se acepta que el tamaño de los poros para el crecimiento óseo en los implantes porosos, debe oscilar entre 100 y 500 μm (3, 6, 62, 75-77). Además, el diámetro de la interconexión entre poros condiciona el tipo de tejido que crece en el implante, y se considera que debe ser mayor de 100 μm para que se regenere hueso mineralizado, entre 40 y 100 μm para el crecimiento de formas osteoides y entre 10 y 40 μm para el tejido fibrovascular (6, 65).

2.1. Sustitutos óseos coralinos

Algunos corales marinos presentan esqueletos con porosidad e interconexión entre los poros. Además, están compuestos fundamentalmente de carbonato de calcio en la forma cristalina de aragonita, que es relativamente inestable y que sometida a calor, tiende a convertirse en una forma termodinámicamente más estable como la calcita (65, 75). Este hecho dio paso a la utilización de estos esqueletos de coral como modelos de sustitutos de injertos óseos. Los materiales implantables utilizados no son el propio coral, pero derivan del componente mineral del mismo,

por lo que son llamados materiales coralinos (3, 65).

Existen dos procesos para manufacturar estos implantes coralinos. El primero de ellos consiste en utilizar el coral en su forma de carbonato de calcio y el segundo consiste en utilizar el coral tras convertir el carbonato de calcio a hidroxiapatita mediante una reacción de estado sólido que mantiene la porosidad y su interconexión (65, 75). Entre los corales duros existe un número limitado de ellos que cumplan los requerimientos de porosidad y diámetro de interconexión antes mencionados. En concreto, los géneros goniópora y porita cumplen dichos requerimientos (3, 65, 75). El procesamiento del coral conlleva su esterilización y la eliminación de material orgánico mediante métodos patentados industrialmente. Su manufacturación parece conllevar la eliminación de material orgánico mediante lavados con determinados detergentes, y la esterilización se realiza mediante radiación. No se recomienda su esterilización al vapor, ya que el calor transforma la aragonita en calcita (65).

Se han desarrollado productos coralinos híbridos, compuestos de carbonato de calcio y fosfato de calcio, testados en diferentes animales y comercializado como una cerámica coralina porosa reabsorbible. El grosor de la capa de hidroxiapatita puede ajustarse, por lo que se presentan una serie de implantes con diferentes proporciones de reabsorción (65, 76-78).

Las propiedades mecánicas de los implantes coralinos son más similares a las del hueso esponjoso que a las del hueso cortical, debido a su porosidad e interconexión entre poros. A menor porosidad del material coralino mayor resistencia mecánica del mismo, por lo que puede seleccionarse el material coralino más adecuado para determinadas aplicaciones clínicas. La fragilidad de la cerámica permite adecuar su forma con instrumentos convencionales de forma intraoperatoria, tallando la morfología más conveniente del implante al lecho receptor (65).

Las propiedades *in vivo* de los implantes coralinos permiten que tras su implantación, sean invadidos por tejido fibrovascular (65). La fase inicial es la formación de un coágulo que se resuelve dando lugar a un tejido proliferativo fibrovascular, que avanza a una media de 2 a 3 mm por semana. La presencia de macrófagos puede desempeñar un papel importante en estas primeras fases, aunque la presencia de células inflamatorias es rara o tan sólo ocasional. Una infección concomitante desencadenaría una típica respuesta inflamatoria, aunque no existen evidencias de que estos materiales faciliten la infección, sino que

se comportan como biocompatibles y resistentes al proceso infeccioso (65).

Los implantes coralinos se comportan como osteoconductivos si cumplen los criterios que Shors (65) llama la «triada de osteoconducción» que comprende los conceptos de proximidad, viabilidad y estabilidad. En cuanto a la proximidad del implante al hueso del lecho se admite que no debe ser mayor de 1 mm. Por otra parte, la superficie de contacto entre el implante y el hueso está en relación directa con el efecto osteoconductor, por lo que la viabilidad del tejido óseo circundante es un requisito necesario. Por último, la estabilidad del implante respecto al hueso circundante es otra condición necesaria para la osteoconducción, considerándose como beneficiosos los micromovimientos, y como perjudiciales los macromovimientos del implante (3, 65).

La formación ósea se inicia sobre la superficie de un implante coralino si es bioactivo. Si los fibroblastos proliferan en superficie, el implante es osteoconductor y posteriormente aparecerán los osteoblastos. Sin embargo, es rara la presencia de condroblastos en interior de la porosidad, por lo que parece darse un proceso de osificación intramembranosa en vez de un proceso de osificación endocondral, aunque este hecho todavía no está del todo aclarado (65). La formación ósea sobre aloinjertos mineralizados estables generalmente será de tipo intramembranosa, mientras que será de tipo endocondral si el injerto no es estable en el lecho (67).

Los implantes coralinos son anisotropos, es decir, que mantienen una microarquitectura direccional, que se traduce en sus propiedades mecánicas, diferentes de unos tipos de coral a otros, por lo que puede escogerse el material coralino más adecuado a la indicación clínica para la que se emplea (65). Se han realizado intentos de reforzar las cerámicas coralinas mediante la elaboración de compuestos con polímeros reabsorbibles como el ácido poliláctico. Sin embargo, se ha comprobado que el polímero reabsorbible ocluye la interconexión entre poros, con lo que la proliferación vascular es muy inferior, consiguiéndose una menor formación ósea. Sin embargo, las cerámicas coralinas disminuyen la acidez local durante la degradación de los polímeros reabsorbibles, amortiguando los efectos locales de la misma. La mezcla de hueso desmineralizado con las cerámicas coralinas consigue incrementar la capacidad de formación ósea, a diferencia de lo que ocurre con el aloinjerto liofilizado (65, 76, 78-80).

La reabsorción de los sustitutos óseos no es siempre una ventaja. Mientras que es convenien-

te para valorar la fusión ósea en determinadas indicaciones, ya que se facilita el estudio mediante radiografía simple, densitometría y tomografía computarizada, puede no serlo en implantaciones craneo-faciales donde la reabsorción puede acompañarse de cambios estéticos indeseables. Biomecánicamente, la reabsorción de este tipo de implantes tiene ventajas en la reconstrucción de defectos óseos diafisarios, ya que se persigue una regeneración cortical completa. Aunque la biodegradación del implante puede ser deseable, es recomendable que se inicie una vez que el implante haya cumplido su función como matriz estructural osteoconductor para la formación ósea (65).

El proceso de degradación de las sales de calcio puede darse por disolución o por reabsorción. La disolución vendrá condicionada por la solubilidad de la matriz del implante, proporción entre el volumen y área del implante, pH local, flujo de fluidos y temperatura. Como regla general, el porcentaje de disolución está inversamente relacionado con la proporción de fosfato de calcio, pureza y tamaño de los cristales, y directamente relacionado con la superficie y porosidad del implante (65). La reabsorción es un proceso biológico mediado por osteoclastos que consiguen disolver el fosfato de calcio mediante la secreción de una solución extracelular con alto contenido ácido. Los osteoclastos segregan la enzima anhidrasa carbónica, capaz de reabsorber el hueso y los implantes coralinos. En este proceso, fuertemente influenciado por variables biológicas y biomecánicas, existe una variabilidad entre las especies animales, e incluso dentro de la misma especie animal (65).

Estudios experimentales

La formación ósea sobre los implantes está en gran relación sobre las cargas mecánicas que soportan, como expresión de la Ley de Wolff (65, 67, 73, 81). Este hecho se ha podido comprobar en modelos experimentales animales, observándose que los defectos óseos en zonas metafisarias soportan menores cargas que en las zonas diafisarias. Este hecho puede conllevar diferencias en cuanto a la remodelación ósea sobre un mismo material en dependencia de su localización en el segmento óseo donde se implanta, aunque la respuesta inicial del tejido óseo receptor sea la misma (65, 82). La remodelación ósea ocurre tanto en el interior del implante poroso como en su periferia (65).

Se ha comprobado experimentalmente en animales grandes como babuinos, conejos, perros,

y humanos que los compuestos coralinos son capaces de inducir la formación ósea a los tres meses de la implantación, aún cuando se implanten en sitios ectópicos como a nivel subcutáneo o intramuscular. Esta observación no se ha constatado en pequeños animales como ratones y ratas (82-85). La adición de factores de crecimiento a los implantes coralinos ha mejorado su capacidad de osteoinducción en el campo experimental, tanto en monos como en perros, en fusiones de raquis y defectos óseos segmentarios (43, 65, 85-87). La interconexión entre poros de las cerámicas coralinas ha demostrado ser especialmente conductiva para el hueso inducido por la proteína ósea morfogenética (65). Este hecho es dosis-dependiente, pero presenta tanto un nivel mínimo de respuesta como un tope máximo de la misma a partir de cierta dosis.

Aplicaciones clínicas

La aplicación clínica de los implantes coralinos desde su desarrollo ha permitido su aplicación en forma de sustitutos óseos durante más de 20 años en diferentes indicaciones en el campo de la cirugía ortopédica y traumatología, craneo-facial, oral y periodontal (63, 65, 88-90).

2.2. Sustitutos óseos a partir de sulfato de calcio y fosfato de calcio

El interés por la forma sintética de la hidroxiapatita descendió tras comprobar su pobre bioreabsorción y escasas características de manejo en cuanto a su moldeabilidad. Esto dio paso a la búsqueda de una hidroxiapatita en forma de cemento (3, 65, 66). De esta manera surgió un material desarrollado en el Centro de Investigación Paffenburger de la Asociación Americana de la Salud Dental, que se aplica en forma de una pasta densa (6, 65, 91). Se trata de un fosfato tetracálcico y un fosfato dicálcico anhídrido que cuando se mezclan con agua, dan lugar a hidroxiapatita a un pH fisiológico de forma isotérmica tras 15 minutos *in vivo*. La hidroxiapatita se forma tras la colocación del cemento por precipitación durante las primeras cuatro a seis horas. Los estudios en animales indican que el implante permanece estable durante más de un año, y hasta el 77% es reemplazado por hueso vivo (65).

Otra forma maleable de hidroxiapatita está compuesta por fosfato tetracálcico y dihidrato dicálcico, que mezclados con agua dan lugar a un cemento tras una reacción isotérmica que se pro-

duce entre 10 y 15 minutos (6, 65, 91). El fosfato tricálcico también ha sido utilizado como relleno de cavidades óseas. Tiene similitudes con la hidroxiapatita en cuanto que es biocompatible y reabsorbible (65, 92). Se ha utilizado en combinación con hidroxiapatita, colágeno tipo I, médula ósea e injerto córtico-esponjoso autólogo. Este material presenta teóricas ventajas para el tratamiento de las fracturas de huesos largos, y ha resultado eficaz en modelos experimentales de fusión vertebral aunque con resultados dispares (65, 93).

La formación ósea requiere una estructura física a la que los osteoblastos puedan adherirse, por lo que se ha desarrollado la idea de diseñar implantes porosos compuestos de materiales biocompatibles (63, 65-67, 76, 77). Así, se ha trabajado con cerámicas como el óxido de aluminio y con metales inertes como el cromo-cobalto y aleaciones de titanio, que aunque presentan una estructura tridimensional favorable para la incorporación ósea, no han logrado un crecimiento satisfactorio del tejido sobre su superficie. Sólo algunas cerámicas han demostrado ser bioactivas y con capacidad osteoconductiva, sobre las que el hueso crece y se une químicamente a su superficie de forma tridimensional (6, 65, 75, 76). Las cerámicas pueden ser clasificadas en cuatro tipos fundamentales (3):

— Las tipo 1 son cerámicas densas no porosas, casi inertes, y su fijación al hueso deriva del crecimiento del mismo sobre las irregularidades de superficie, resultando una fijación morfológica. Un ejemplo es la alúmina.

— Las tipo 2 son implantes porosos e inertes cuya fijación al hueso deriva de la colonización de éste, permitiendo una fijación mecánica. Entre ellas tendríamos la alúmina porosa y los metales recubiertos de hidroxiapatita.

— Las tipo 3 son cerámicas, vidrios y vitrocerámicas de superficie reactiva, densos y no porosos cuya unión al hueso se lleva a cabo mediante enlaces químicos, formando una fijación bioactiva. Entre ellos están los vidrios y cerámicas bioactivos.

— Las tipo 4 son cerámicas reabsorbibles, densas y porosas o no porosas, diseñadas para ser sustituidas lentamente por hueso. Entre ellas están el sulfato de calcio, el fosfato tricálcico y las sales de fosfato de calcio.

Los biovidrios son cadenas silicofosfatadas que pueden enlazarse iónicamente con diferentes compuestos. A su vez, pueden intercambiar iones o grupos moleculares con el medio fisiológico donde se implantan, siendo así posible su osteo-

integración mediante unión química al hueso. Sus formas reabsorbibles se han empleado como vehículos de liberación de sustancias. Su capacidad de dar lugar a la formación de una capa de apatita hidroxycarbonatada activa idéntica a la fase mineral del hueso, los hace muy útiles en cuanto a su aplicación en la superficie de implantes óseos para facilitar su osteointegración (6, 94-99). Sus propiedades están directamente relacionadas con su composición, permitiendo así la creación de una gama de materiales con diferentes propiedades mecánicas y de disolución con intervalos que oscilan entre pocos días y varios meses (94-99).

Existe una relación entre la diferente composición de los vidrios bioactivos y su capacidad de enlace al hueso, propuesta por Hench, delimitando unas proporciones determinadas de sus componentes que condicionan su bioactividad, reabsorción y su comportamiento más o menos inerte (100).

En los últimos años, se han comercializado diferentes productos que imitan fielmente la fase mineral del hueso. Entre ellos, destacan el Osteoset®, el Norian SRS® y el Etex α -BSM® y el True Bone®.

El Osteoset® se produce mediante calentamiento del sulfato de calcio hidratado purificado, obteniendo un sulfato de calcio hemihidratado que resulta biocompatible (65, 66). Se ha comprobado que los osteoclastos son capaces de adherirse a él y activarse para su reabsorción, formando lagunas similares al hueso normal. Sin embargo, este fenómeno no se acompaña de un incremento de los niveles séricos de calcio (100).

El sulfato de calcio se presenta en forma de polvo, que tras mezclarse con agua inicia una reacción exotérmica que se acompaña de una recristalización del sulfato de calcio en la forma sólida. Sin embargo, esta cristalización no es homogénea y aparecen cristales de diferente forma y tamaño, con múltiples defectos en la estructura cristalina, que lógicamente provocan variaciones significativas en la solubilidad, propiedades mecánicas y porosidad (65). El sulfato de calcio se empleó experimentalmente por Albee para estimular la osteogénesis en conejos con resultados positivos (101, 102). Sin embargo, este material presentaba limitaciones por ausencia de integridad de su estructura hasta la aparición de las formas cerámicas. Desde entonces, la aplicación más común de estas cerámicas fue la hidroxiapatita y el fosfato tricálcico en forma de superficies de implantes o en el relleno de defectos (65).

El Osteoset® es una nueva forma de sulfato de calcio que cristaliza produciendo formas cristali-

nas de tamaño y morfología homogéneas, por lo que el material resultante presenta una reabsorción más lenta y predecible. El producto se presenta en forma de bolitas y funciona como un material de relleno de cavidades óseas proporcionando un sustrato osteoconductor para la sustitución ósea. Se esteriliza por radiación gamma. Su riguroso proceso de fabricación proporciona un material consistente que se disuelve *in vivo* entre los 30 y los 60 días de su implantación, en dependencia del volumen y localización (65, 66).

El Norian SRS® es un cemento de fosfato de calcio reabsorbible y biocompatible, que se aplica en el tratamiento de determinadas fracturas. Es una combinación de fosfato monocálcico, fosfato tricálcico, carbonato cálcico y una solución de fosfato de sodio que forman una pasta inyectable, que en condiciones fisiológicas da paso en pocos minutos a una forma sólida de dalita (hidroxiapatita carbonatada) mediante una reacción no exotérmica (6, 66). Este material resulta biocompatible y osteoconductor, y presenta una remodelación *in vivo* mediada por osteoclastos similar a la del hueso normal, dando paso a formación de tejido mineralizado para restablecer la morfología y resistencia originales. Se ha comprobado clínicamente el incremento de la fijación de los implantes de osteosíntesis asociados a este producto en el tratamiento de fracturas (66, 103).

El Etex α -BSM® se ha introducido como un fosfato de calcio apatita pobremente cristalizado con buenas propiedades de reabsorción y facilidad de manejo y moldeabilidad intraoperatoria. Se trata de un fosfato de calcio que debe ser hidratado con solución salina para formar mediante una reacción endotérmica y en un pH neutro, una pasta moldeable e inyectable a temperatura ambiente durante horas, pero que solidifica en 20 minutos a 37 °C, y que puede ser preparado con diferentes grados de resistencia. En sus aplicaciones experimentales ha demostrado en perros y conejos que proporciona un buen andamiaje para la reabsorción mediada por células y posterior remodelación por el lecho receptor, en la reparación de defectos óseos diafisarios. Hasta el momento su uso fundamental ha sido en aplicaciones dentales como relleno de cavidades óseas (65, 104).

El True Bone® es una hidroxiapatita que puede ser inyectada, es isotérmica y porosa, y solidifica en el interior del defecto óseo. Sus propiedades físicas y químicas pueden ser moduladas para programar su biodegradación (6).

Estos productos permiten la vehiculización de otras sustancias tales como antibióticos, o factores de crecimiento, manteniendo su bioactividad,

y añadiendo un ambiente protector o estimulador en el lecho de implantación durante el proceso de reabsorción (6, 65, 102, 104). A este respecto, se ha comprobado experimental y clínicamente que el propio hueso esponjoso puede actuar de forma exitosa como vehiculizador de antibióticos y factores de crecimiento, tanto *in vivo* como *in vitro* (105-107).

3. Factores de crecimiento

En los últimos años se han identificado una serie de sustancias promotoras del crecimiento que se localizan en las zonas donde el sistema esquelético haya sufrido una lesión, y que parecen tener un importante papel en la reparación ósea. Entre ellas se recogen el factor β transformador del crecimiento, las proteínas óseas morfogenéticas, los factores de crecimiento de fibroblastos, los factores de crecimiento tipo insulina y los factores de crecimiento derivados de plaquetas (7, 43, 67, 105, 106, 108-114). También son producidas por líneas celulares clónicas en sarcomas osteogénicos (43, 115).

Actualmente existen tres estrategias para la implantación de factores de crecimiento. La primera es la descrita por Urist (116), consistente en la extracción y purificación de una mezcla de proteínas que incluyen la proteína ósea morfogenética del hueso cortical de procedencia animal o humana. La segunda es la utilización de proteína ósea morfogenética recombinante tipo 2 mediante clonación y secuenciación genética (117). La tercera, y más reciente, es la transmisión del ácido desoxirribonucleico que codifica un factor de crecimiento en lugar de la implantación de la propia proteína codificada (117, 118).

3.1. Factores de crecimiento de fibroblastos

Están presentes en la reparación normal de una fractura, y tienen actividad promotora de mitogénesis, de angiogénesis y de diferenciación celular tanto *in vitro* como *in vivo* (105, 108, 110, 111, 117, 118). Están ligados a la proliferación y actividad sintética de osteoblastos y condrocitos, aunque su efecto sobre la síntesis de colágena todavía no está aclarado. Tampoco se ha demostrado experimentalmente que su aplicación exógena a un foco de fractura mejore o acelere su consolidación, ya que en dependencia de la dosis administrada pueden inducir o inhibir la reparación ósea (7, 104, 111, 112).

3.2. Factores de crecimiento derivados de plaquetas

Su principal actividad es mitogénica (108, 109, 112). La aplicación experimental en conejos mediante inyección ha demostrado un efecto estimulador en la reparación de osteotomías incrementando el volumen y la densidad del callo óseo en relación a los controles, aunque sin acompañarse de un incremento de las propiedades mecánicas (7, 105, 119). Por otra parte, se ha observado experimentalmente en ratones que su inyección provoca un aumento concomitante en la reabsorción ósea, lo que puede condicionar su utilidad como agente terapéutico (109, 110).

3.3. Factores de crecimiento tipo insulina (somatomedinas) y hormona de crecimiento

Sus principales actividades son la mitogénica, anabólica y mediadora de algunas acciones de la hormona de crecimiento (110, 112, 113). La tipo I desempeña un papel fundamental en la osificación de tipo endocondral característica del cartílago de crecimiento, por lo que se le supone alguna actividad en la osificación endocondral de la reparación de las fracturas (7, 112, 113). La tipo II es el factor de crecimiento más abundante en el hueso, y presenta acciones similares a la tipo I, aunque es menos potente en el estímulo celular. Circula a muy superiores concentraciones que la tipo I (105, 110, 112, 113). La hormona de crecimiento y el factor I de crecimiento tipo insulina desempeñan un importante papel en el crecimiento y desarrollo óseo, pero su importancia en la reparación ósea es menos clara (7, 105, 112, 113). El factor I de crecimiento tipo insulina parece estar regulado por hormonas sistémicas como la parathormona (109, 110). Por otra parte se han observado diferentes respuestas en cuanto a la respuesta formadora de hueso tras la administración de hormona de crecimiento, a diferentes dosis y en diferentes modelos experimentales de reparación ósea (105, 108, 109, 120-125).

3.4. Factor β transformador del crecimiento

Es quizá el factor de crecimiento más extensamente estudiado en el campo de la biología ósea. Su mayor función en el sistema músculo-esquelético es la de estimular a las células mesenquimales a dividirse (109, 125). Su administración exógena es capaz de estimular significativamente la reparación ósea, mejorando sus propiedades

mecánicas, y puede potenciar la capacidad osteoinductiva de las proteínas óseas morfogenéticas, actuando mediante un mecanismo sinérgico (7, 46, 50, 105, 109, 126, 127).

Este factor comprende una gran familia de moléculas, incluyendo las proteínas óseas morfogenéticas, y presenta una diversidad de acciones en dependencia del contexto que le rodea (7, 43, 46, 52, 73, 105, 108-110, 112, 113, 116, 124, 125, 128).

Una sustancia se denomina proteína ósea morfogenética cuando es capaz de inducir formación ectópica de hueso en un sistema de ensayo estandarizado *in vivo* en roedores (125). Las proteínas óseas morfogenéticas son capaces de inducir la transformación de células mesenquimales indiferenciadas en osteoblastos y condroblastos durante la embriogénesis, el crecimiento, la edad adulta y en los procesos de reparación ósea (7, 45-47, 109, 113, 116, 117, 124, 129). La cadena de acontecimientos que inducen ha sido establecida por Reddi (130): quimiotaxis de células progenitoras, proliferación de células mesenquimales, diferenciación de condrocitos, calcificación de la matriz cartilaginosa, angiogénesis e invasión vascular, diferenciación ósea y mineralización, remodelación ósea y diferenciación medular. Sin embargo, el término de proteína ósea morfogenética es impreciso puesto que muchas proteínas así denominadas pueden encontrarse en tejidos extraesqueléticos, y desempeñar funciones reguladoras del desarrollo de otros sistemas tisulares (109, 110).

La aparición de formas recombinantes de proteínas óseas morfogenéticas, en particular los tipos 1, 2 y 7, ha dado lugar a su aplicación experimental mediante diferentes materiales vehiculizadores de las mismas, mediante inyección directa en diferentes modelos animales de reparación ósea y mediante recubrimiento de superficies en la osteointegración de implantes (7, 42, 43, 45-47, 86, 105, 108, 112, 113, 116, 124, 128, 129, 131-134). Más recientemente se ha utilizado con éxito en clínica humana en la reconstrucción de defectos óseos femorales y en retardos de consolidación, mediante su vehiculización en aloinjerto óseo liofilizado, consiguiéndose la consolidación y posterior remodelación del injerto aportado (67, 106).

A pesar de que dichos factores han demostrado su capacidad de mejorar en mayor o menor medida la reparación de diferentes tipos de defectos óseos en diferentes modelos animales, su aplicación terapéutica en clínica humana presenta todavía algunas lagunas. En primer lugar, los resultados experimentales no son homogéneos al no derivarse de idénticos modelos metodológicos. Por otra parte no utilizan idénticas formas de ad-

ministración de los factores de crecimiento, y tampoco está establecido un protocolo de dosificación de los mismos. También se ha argumentado que las características de la sustancia vehiculizadora pueden condicionar la farmacocinética del factor de crecimiento vehiculizado. Finalmente, no existen estudios clínicos prospectivos sobre la relación coste-beneficio para los pacientes subsidiarios de dicho tratamiento (7, 52, 67, 105, 109, 112, 135, 136). En cualquier caso, se considera que su aplicación clínica en diferentes indicaciones, puede ser posible en un futuro no muy lejano.

4. Osteoinducción por tratamiento genético

Este procedimiento consiste en la transferencia de información genética a determinadas células diana, que inician la síntesis de la proteína codificada por los genes transferidos. La duración de la síntesis proteica depende de las técnicas utilizadas para transferir el material genético a la célula, de forma que es posible conseguir una expresión más o menos prolongada del gen transferido, en dependencia de las necesidades del caso a tratar (67, 111, 137, 138).

El tratamiento genético es una atractiva posibilidad para estimular o mejorar la formación y reparación ósea puesto que los genes pueden ser implantados dentro de su vehículo en una localización anatómica precisa. Por otra parte, la duración de su efecto puede modularse mediante la selección del material que les sirve de vehículo para alcanzar el lecho receptor, aunque sin poder precisarse con exactitud (67, 111, 133).

Existen diferentes opciones terapéuticas. En primer lugar, el tratamiento genético puede ser sistémico o regional. El tratamiento sistémico se indicaría fundamentalmente en situaciones en las que todas las células del receptor presentan el gen defectuoso, mientras que el tratamiento regional tendría su indicación preferente en la reparación de un defecto óseo segmentario o de una fractura. Además, el gen puede ser introducido directamente en un lugar anatómico *in vivo*, o bien puede hacerse una manipulación genética *ex vivo* de células extraídas del propio individuo que son reimplantadas posteriormente. Los métodos *ex vivo* ofrecen la ventaja respecto a los *in vivo* de evitar la transferencia de partículas virales o de complejos de ácido desoxirribonucleico, son más seguros y eficaces, y por otra parte permiten la reimplantación selectiva de las células productoras de la proteína de interés a altos niveles. Sin embargo, son procedimientos laboriosos, prolon-

gados en el tiempo y más invasivos (111, 133, 137, 138).

Finalmente, el vehículo del gen transferido puede ser viral, no viral, o celular y las células diana pueden ser específicas o no. Los virus son vehículos eficaces puesto que su ciclo vital incluye la transmisión y expresión de sus genes. Debido a esto, cuando se utilizan virus se eliminan porciones de su genoma para crear espacio donde insertar los genes terapéuticos y para evitar la expresión simultánea innecesaria de los genes virales (111, 137, 138). Sin embargo, la recombinación de virus defectuosos con secuencias genéticas virales presentes en las células del huésped puede acompañarse de replicación viral con la facultad de propagarse dentro del organismo receptor. Por razones obvias de seguridad, esto ha llevado a buscar otros vehículos no virales (137, 138).

Los vehículos virales más comúnmente empleados son los retrovirus y los adenovirus, estando en estudio otros como el herpes virus simple y los virus adeno-asociados. Los vehículos no virales son los liposomas, los complejos de ácido desoxirribonucleico, y el oro coloidal (137, 138). Por otra parte, la inserción del material genético mediante virus se produce en localizaciones aleatorias, por lo que existen la posibilidad de darse fenómenos de mutagénesis si la inserción del material genético se localiza en lugares sensibles al respecto del genoma del huésped. En el peor de los casos, esto podría conllevar la activación del algún oncogén, o la delección funcional de un gen supresor de tumores, dando lugar a la aparición de un tumor maligno (137, 138).

La implantación *in vivo* de células mesenquimales purificadas ha demostrado ser efectiva experimentalmente en la reparación de defectos óseos en perros y ratas (7, 76, 111, 133, 139, 140). Teóricamente, la manipulación genética *ex vivo* de dichas células debería potenciar la expresión de su capacidad osteoinductiva o angiogénica, mejorando la formación ósea en el lecho.

El tratamiento genético puede usarse en clínica con dos objetivos. El primero puede ser el tratamiento de un desorden causado por una mutación genética simple, y el segundo para estimular o mejorar la producción de una determinada proteína en determinadas enfermedades adquiridas (111, 137, 138). Sin embargo, los resultados del tratamiento genético regional presentan todavía cuestiones sin resolver, ya que no se conoce la duración de la producción de la proteína codificada y la cantidad producida de la misma, así como el vehículo ideal a elegir (117, 133, 138). En cualquier caso, son técnicas que ofrecen amplias expectativas de futuro en cuanto a sus aplicaciones clínicas.

BIBLIOGRAFÍA

1. PERREN S M, GOGOLEVSKI S. Clinical Requirements for Bioresorbable implants in Internal Fixation. En: L Kwok-sui, H Leung-kim, L Ping-chung (eds), *Biodegradable Implants in Fracture Fixation. ISFR Symposium. Singapur*. The Chinese University of Hong Kong and World Scientific Publishing Co, 1994; 35-44.
2. PIZZOFRERATO A, CIAPETTI G, SAVARINO L, STEA S, DONATI M E, VISENTIN M. Kinetics of biodegradable implant resorption. En: L Kwok-sui, H Leung-kim, L Ping-chung (eds), *Biodegradable Implants in Fracture Fixation. ISFR Symposium. Singapur*. The Chinese University of Hong Kong and World Scientific Publishing Co, 1994; 153-163.
3. PROUBASTA Y, GIL MUR J, PLANELL J A (eds). *Fundamentos de Biomecánica y Biomateriales*. Ergon SA, 1997.
4. VERT M, GUERIN P H. Biodegradable aliphatic polyesters of the poly (hydroxy acid) type for temporary therapeutic applications. En: M A Barbosa (ed), *Biomaterials degradation. Fundamental aspects and related clinical phenomena*. Amsterdam: Elsevier Science Publishing Co, 1991; 35-51.
5. BEHRAVESH E, YASKO A W, ENGEL P S, MIKOS A G. Synthetic biodegradable polymers for orthopaedic applications. *Clin Orthop*. 1999; 367S: 118-125.
6. HOLLINGER J O, BREKKE J, GRUSKIN E, LEE D. Role of bone substitutes. *Clin Orthop*. 1996; 324: 55-65.
7. LANE J M, TOMIN E, BOSTROM M P G. Biosynthetic bone grafting. *Clin Orthop*. 1999; 367S: 107-117.
8. GIARDINO R, GIANNINI S, FINI M, GIAVARESI G, MARTINI L, ORIENTI L, GRIMALDI M, CAVARRA G L. Experimental In vivo Model to Evaluate Resorbable Implants into bone. En: L Kwok-sui, H Leung-kim, L Ping-chung (eds), *Biodegradable Implants in Fracture Fixation. ISFR Symposium*. Singapur: The Chinese University of Hong Kong and World Scientific Publishing Co, 1994; 143-151.
9. GOGOLEWSKI S. Bioresorbable Internal fixation devices-Mechanical Properties and future trends in Production Technologies. En: L Kwok-sui, H Leung-kim, L Ping-chung (eds), *Biodegradable Implants in Fracture Fixation. ISFR Symposium*. Singapur: The Chinese University of Hong Kong and World Scientific Publishing Co, 1998; 249-258.
10. HASTINGS G W. Is there an ideal biomaterial for use as an implant for fracture fixation? En: L Kwok-sui, H Leung-kim, L Ping-chung (eds), *Biodegradable Implants in Fracture Fixation. ISFR Symposium*. Singapur: The Chinese University of Hong Kong and World Scientific Publishing Co, 1994; 19-33.
11. KWOK-SUI L. Discussion & Provocative Issues. En: L Kwok-sui, H Leung-kim, L Ping-chung (eds), *Biodegradable Implants in Fracture Fixation. ISFR Symposium*. Singapur: The Chinese University of Hong Kong and World Scientific Publishing Co, 1994; 269-272.
12. LEONG K W. Chemical and mechanical considerations of biodegradable polymers for orthopaedic applications. En: L Kwok-sui, H Leung-kim, L Ping-chung (eds), *Biodegradable Implants in Fracture Fixation. ISFR Symposium*. Singapur: The Chinese University

- of Hong Kong and World Scientific Publishing Co, 1994; 45-56.
13. ASPENBERG P, LOHMANDER S, THORNGREN K G. Failure of bone induction by bone matrix in adults monkeys. *J Bone Joint Surg.* 1998; 70B: 625-627.
 14. ASPENBERG P, LINDQVIST S B. Ethene oxide and bone induction. Controversy remains. *Acta Orthop Scand.* 1998; 69: 173-176.
 15. ASPENBERG P, JOHNSON E, THORNGREN K G. Dose-dependent reduction of bone inductive properties by ethylene oxide. *J Bone Joint Surg.* 1990; 72B: 1036-1037.
 16. ATHANASIOU K A, SINGHAL A R, AGRAWAL C M, BOYAN B D. In vitro degradation and release characteristics of biodegradable implants containing trypsin inhibitor. *Clin Orthop.* 1995; 315: 272-281.
 17. TÖRMÄLÄ P, POHJONEN T, ROKKANEN P. Future Trends in the Development of Bioabsorbable Implants for fracture fixation. En: L Kwok-sui, H Leung-kim, L Ping-chung (eds), *Biodegradable Implants in Fracture Fixation. ISFR Symposium.* Singapur: The Chinese University of Hong Kong and World Scientific Publishing Co, 1994; 259-265.
 18. CASTELEYN P P, HANDELBERG F, HAENTJENS P. Biodegradable rods versus kirschner wire fixation of wrist fractures. A randomised trial. *J Bone Joint Surg.* 1992; 74B: 858-861.
 19. COLL BOSCH M D, DÍAZ F. Tratamiento de fracturas en la infancia con tornillos reabsorbibles. *Rev Ortop Traumatol.* 1996; 40 (Supl 1): 22-25.
 20. KUMTA S M, SPINNER R, LEUNG P C. Absorbable intramedullary implants for hand fractures. Animal experiments and clinical trial. *J Bone Joint Surg.* 1992; 74B: 563-566.
 21. NORDSTRÖM P, PIHLAJAMÄKI H, TOIVONEN T, TÖRMÄLÄ P, ROKKANEN P. Tissue response to polyglycole and polylactide pins in cancellous bone. *Arch Orthop Traum Surg.* 1998; 117: 197-204.
 22. MALININ T I, COUCEIRO J, MNAYMNEH W, HORNICEK F J. Cirugía de preservación de la extremidad en cirugía ortopédica oncológica. *Rev Ortop Traumatol.* 1998; 42: 324-329.
 23. SANTAVIRTA S, KONTTINEN YT, SAITO T, GRÖNBLAD M, PARTIO E, KEMPPINEN P, ROKKANEN P. Immune response to polyglycolic acid implants. *J Bone Joint Surg.* 1990; 72B: 597-600.
 24. BOS R R, ROZEMA F R, BOERING G, NIJEHUIST A J, PENNING A J, VERWEY A B, NIEUWENHUIST P, JANSEN H W B. Degradation of an tissue reaction to biodegradable poly (L-Lactide) for use as internal fixation of fractures: a study in rats. *Biomaterials.* 1991; 12: 32-36.
 25. WEILER A, HELLING H J, KIRCH U, ZIRBES T K, REHM K. Foreign-body reaction and the course of osteolysis after polyglycolide implants for fracture fixation. Experimental study in sheep. *J Bone Joint Surg.* 1996; 78B: 369-376.
 26. GARCÍA NOVALVOS A, CLAVEL-SAINZ M, MESEGUER J, GABARDO A, SANTOJA F. Poliésteres (PLA/PGA) biodegradables en Cirugía Ortopédica: Estudio de su degradación y sustitución por tejido óseo. *Rev Ortop Traumatol.* 1996; 40: 500-510.
 27. FRASER R K, COLE W G. Osteolysis after biodegradable pin fixation of fractures in children. *J Bone Joint Surg.* 1992; 74B: 929-930.
 28. MATSUSUE Y, HANAFUSA S, YAMAMURO T, SHIKINAMI Y, IKADA Y. Tissue reaction of bioabsorbable ultra high strength poly (L-lactide) rod. A long-term study in rabbits. *Clin Orthop.* 1995; 317: 246-253.
 29. WINET H, HOLLINGER JO, STEVANOVIC M. Incorporation of polylactide-polyglycolide in a cortical defect: Neoangiogenesis and blood supply in a bone chamber. *J Orthop Res.* 1995; 13: 679-689.
 30. ASHAMMAKHI N, MÄKELÄ EA, VIHTONEN K, ROKKANEN P, TÖRMÄLÄ P. The effect of absorbable self-reinforced polyglycolide membrane on metaphyseal bone. An experimental study on rats. *Ann Chir Gyn.* 1994; 83: 328-334.
 31. LÓPEZ-CASERO R, DE PEDRO J A, PÉREZ-CABALLER A J, LÓPEZ-VALERO I, SAN ROMÁN J, LÓPEZ BRAVO J. Reparación de un defecto óseo crónico experimental mediante aloinjerto y polímeros biodegradables. *Rev Ortop Traumatol.* 1995; 39: 350-361.
 32. VON SCHROEDER H P, KWAN M, AMIEL D, COUTTS R D. The use of polylactic acid matrix and periosteal grafts for the reconstruction of rabbit knee articular defects. *J Biomed Mat Res.* 1991; 25: 329-339.
 33. MÄKELÄ E A, VAINIONPÄÄ S, VIHTONEN K, MERO M, LIC J L, TÖRMÄLÄ P, ROKKANEN P. The effect of a penetrating biodegradable implant on the epiphyseal plate: An experimental study on growing rabbits with special regard to poliglactin 910. *J Pediatr Orthop.* 1987; 7: 415-420.
 34. MÄKELÄ EA, VAINIONPÄÄ S, VIHTONEN K, MERO M, HELEVIRTA P, TÖRMÄLÄ P, ROKKANEN P. The effect of a penetrating biodegradable implant on the growth plate: An experimental study on growing rabbits with special reference to polidioxanone. *Clin Orthop.* 1989; 241: 300-308.
 35. BÖSTMAN O M, PÄIVÄRINTA U, MANNINEN M, ROKKANEN P. Polymeric debris from absorbable polyglycolide screws and pins. Intraosseous migration studied in rabbits. *Acta Orthop Scand.* 1992; 63: 555-559.
 36. BÖSTMAN O M, PÄIVÄRINTA U. Restoration of tissue components after insertion of absorbable fracture fixation devices of polyglycolide through the articular surface: an experimental study in the distal rabbit femur. *J Orthop Res.* 1994; 12: 403-411.
 37. OTSUKA N, MAH J, ORR W, MARTIN R. Biodegradation of polydioxanone in bone tissue: effect on the epiphyseal plate in immature rabbits. *J Pediatr Orthop.* 1992; 12: 177-180.
 38. GIL ALBAROVA J, FINI M, GIL ALBAROVA R, MELGOSA M, ALDINI-NICOLO N, GIARDINO R, SERAL F. Absorbable screws through the greater trochanter do not disturb physeal growth. Rabbits experiments. *Acta Orthop Scand.* 1998; 69: 273-276.
 39. GIL ALBAROVA J, MELGOSA M, GIL ALBAROVA R, FINI M, ALDINI-NICOLO N, GIARDINO R, SERAL F. Trochanteric epiphyseodesis by means of absorbable screws. An experimental attempt in rabbits. En: J De Pablos (ed), *Surgery of the growth plate.* Ediciones Ergón SA, 1998; 64-69.

40. GIL ALBAROVA J, MELGOSA M, GIL ALBAROVA R, FINI M, ALDINI-NICOLO N, GIARDINO R, SERAL F. Bloqueo fisario mediante implantes reabsorbibles. Estudio experimental en conejos. *Rev Ortop Traumatol.* 1998; 42: 318-323.
41. GIL ALBAROVA R, GIL ALBAROVA J, GARRIDO LAHIGUERA R, MELGOSA M, LOSTALÉ F, MORANDEIRA J R. Hemiepifisiodesis femoral distal mediante biomateriales reabsorbibles. Estudio experimental en el conejo. *Rev Esp Cir Osteoart.* 2000; 35: 297-306.
42. BOSTROM M P G, LANE J M, TOMIN E, BROWNE M, BERBERIAN W, TUREK T, SMITH J, WOZNEY J, SCHILDHAUER T. Use of bone morphogenetic protein-2 in the rabbit ulnar non-union model. *Clin Orthop.* 1996; 327, 272-282.
43. COOK S D, RUEGER D C. Osteogenic protein-1. Biology and applications. *Clin Orthop.* 1996; 324: 29-38.
44. CORNELL C N. Osteoconductive materials and their role as substitutes for autogenous bone grafts. *Orthop Clin North Am.* 1999; 30: 591-598.
45. GARCÍA DE LUCAS F, DE PEDRO J A, LÓPEZ BRAVO A, SAN ROMÁN J, CUADRADO M A, PÉREZ CABALLER A J, LÓPEZ-DURÁN L. Osteorregeneración inducida por biomateriales y BMP en defectos diafisarios. *Rev Ortop Traumatol.* 1995; 39: 443-456.
46. HECKMAN J D, EHLER W, BROOKS B P, AUFDE-MORTE T B, LOHMAN C H, MORGAN T, BOYAN B D. Bone morphogenetic protein but not transforming growth factor- β enhances bone formation in canine diaphyseal nonunions implanted with a biodegradable composite polymer. *J Bone Joint Surg.* 1999; 81A: 1717-1729.
47. KIRKER-HEAD C A, GERHART T N, ARMSTRONG R, SCHELLING S H, CARMEL L A. Healing bone using recombinant human morphogenetic protein 2 and copolymer. *Clin Orthop.* 1998; 349: 205-217.
48. NIE L, NICOLAU D P, TESSIER P R, KOUREA H P, BROWNER B D, NIGHTINGALE C H. Use of bioabsorbable polymer for the delivery of ofloxacin during experimental osteomyelitis treatment. *J Orthop Res.* 1998; 16: 76-79.
49. RIEGELS-NIELSEN P, ESPERSEN F, HOLMICH L R, FRIDMODT-MOLLER N. Collagen with gentamicin for prophylaxis of postoperative infection: staphylococcus aureus osteomyelitis studied in rabbits. *Acta Orthop Scand.* 1995, 66: 69-72.
50. TIELINEN L, MANNINEN M, PUOLAKKAINEN P, PIHLAJAMÄKI H, POHJONEN T, RAUTAVUORI J, TÖRMÄLÄ P. Polylactide pin with transforming growth factor β 1 in delayed osteotomy fixation. *Clin Orthop.* 1998; 355: 312-322.
51. WEI G, KOTOURA Y, OKA M, YAMAMURO T, WADA R, HYON S-H, IKADA Y. A bioabsorbable delivery system for antibiotic treatment of osteomyelitis: the use of lactic acid oligomer as a carrier. *J Bone Joint Surg.* 1991; 73B: 246-252.
52. WINN S R, UDULAG H, HOLLINGER J O. Carrier systems for bone morphogenetic proteins. *Clin Orthop.* 1999; 367S: 95-106.
53. CHEN A, HOU C, BAO J, GUO S. Comparison of biodegradable and metallic tension-band fixation for patella fractures. 38 patients followed for 2 years. *Acta Orthop Scand.* 1998; 69: 39-42.
54. BÖSTMAN O M. Absorbable implants for the fixation of the fractures. *J Bone Joint Surg.* 1991, 73A: 148-153.
55. BÖSTMAN O M, PIHLAJAMÄKI H K, PARTIO E K, ROKKANEN P U. Clinical biocompatibility and degradation of polylevolute screws in the ankle. *Clin Orthop.* 1995; 320: 101-109.
56. SINISAARI I, PÄTIÄLÄ H, BÖSTMAN O, MÄKELÄ E A, HIRVENSAALO E, PARTIO E K, TÖRMÄLÄ P, ROKKANEN P. Metallic or absorbable for ankle fractures. A comparative study of infection in 3111 cases. *Acta Orthop Scand.* 1996; 67: 16-18.
57. PELTO-VASENIUS K, HIRVENSAALO E, VASENIUS J, PARTIO E K, BÖSTMAN O, ROKKANEN P. Redisplacement after ankle osteosynthesis with absorbable implants. *Arch Orthop Trauma Surg.* 1998; 117: 159-162.
58. SVENSSON P J, JANARV P M, HIRSCH G. Internal fixation with biodegradable rods in pediatric fractures. One-year follow-up of fifty patients. *J Pediatr Orthop.* 1994; 14: 220-224.
59. KANKARE J, ROKKANEN P. Dislocated fractures of the talus treated with biodegradable internal fixation. *Arch Orthop Traumatol.* 1998; 117: 62-64.
60. BARBER F A, ELROD B F, MCGUIRE D A, PAULOS L E. Preliminary results of an absorbable interference screw. *Arthroscopy.* 1995; 11: 537-548.
61. PIHLAJAMÄKI H, BÖSTMAN O, HIRVENSAALO E, TÖRMÄLÄ P, ROKKANEN P. Absorbable pins of self-reinforced poly-L-lactic acid for fixation of fractures and osteotomies. *J Bone Joint Surg.* 1992, 74B: 853-857.
62. HOPE P G, WILLIAMSON D M, COATES C J, COLE W G. Biodegradable pin fixation of elbow fractures in children. *J Bone Joint Surg.* 1991; 73B: 965-968.
63. CANOSA SEVILLANO R, PÉREZ BLANCO R. Diferentes alternativas de reconstrucción, biológicas y con biomateriales, de los defectos óseos. *Rev Ortop Traumatol.* 1992; 36B: 128-34.
64. CHAPMAN M W. Bone grafting. En: M W Chapman, M Madison (eds), *Operative Orthopaedics*. Philadelphia: J B Lippincott. 1993; 139-149.
65. SHORS E C. Coraline Bone Graft substitutes. *Orthop Clin North Am.* 1999; 30: 599-613.
66. TAY B K B, PATEL V V, BRADFORD D S. Calcium sulfate and calcium fosfate based bone substitutes. Mimicry of the mineral phase of bone. *Orthop Clin North Am.* 1999; 30: 615-623.
67. BAUER T W, MUSCHLER G F. Bone graft materials. An overview of the basic science. *Clin Orthop.* 2000; 371: 10-27.
68. BEHAIRY Y, JASTY M. Bone grafts and bone substitutes in hip and knee surgery. *Orthop Clin North Am.* 1999; 30: 661-671.
69. HADDAD F S, SPANGHEHL M J, MASRI B A, GARBUZ D S, DUNCAN C P. Circunferential allograft replacement of the proximal femur. A critical analysis. *Clin Orthop.* 2000; 371: 98-197.
70. LEOPOLD S S, JACOBS J J, ROSENBERG A G. Cancellous allograft in revision total hip arthroplasty. A clinical review. *Clin Orthop.* 2000; 371: 86-97.
71. ORTIZ CRUZ E J, CAMPO LOARTE J, MARTÍNEZ MARÍN J, CANOSA SEVILLANO R. Estructura y or-

- ganización de un banco de huesos y tejidos. *Rev Ortop Traumatol.* 2000; 44: 127-38.
72. SAN JULIÁN M. Recambios protésicos de cadera y rodilla en cirugía tumoral ósea. *Rev Ortop Traumatol.* 2000; 44: 237-249.
73. TÄGIL M. The morselized and impacted bone graft. Animal experiments on proteins, impaction and load (Thesis). *Acta Orthop Scand.* 2000; 71 (Suppl 290): 1-40.
74. VALENTÍ NIN J R, NOAIN SANZ E, LEYES VENCE M. Aloinjerto óseo y cirugía de revisión de la prótesis total de cadera. *Rev Ortop Traumatol.* 2000; 44, 159-167.
75. WHITE E, SHORS E C. Biomaterial aspects of inter-pore-200 porous hydroxiapatite. *Dent Clin North Am.* 1986; 30: 49-67.
76. GOSHIMA J, GOLDBERG V M, CAPLAN A I. The osteogenic potential of culture-expanded rat marrow mesenchymal cells assayed in vivo in calcium phosphate ceramic blocks. *Clin Orthop.* 1991; 262: 298-311.
77. MESEGUER OLMO L R, VICENTE ORTEGA V, ALCA-RAZ BAÑOS M, RODRÍGUEZ VICENTE J, GALIAN CANOVAS A, CLAVEL-SAINZ NOLLA M. Osteointegración de la cerámica porosa de β -Whitlockite. *Rev Ortop Traumatol.* 1995, 39: 528-533.
78. OGUSHI H, OKUMURA M, YOSHIKAWA T. Osteogenic capacity of hydroxyapatite coated porous calcium carbonate implants. En: W Bonfield, G W Hastings, K E Tanner (eds), *Bioceramics*. Boston: Butterworth-Heinemann, 1991; 213-219.
79. BUTTS T E, PETERSON L J, ALLEN C M. Early soft tissue ingrowth into porous block hydroxyapatite. *J Oral Maxillofac Surg.* 1989; 47: 475-479.
80. LI S, VERT M. Hydrolytic degradation of the coral/poly (DL-lactic acid) bioresorbable material. *J Biomater Sci Polym.* 1996; 7: 817-827.
81. EL DEEB M, HOSNY M, SHARAWY M. Osteogenesis in composite grafts of allogenic demineralized bone powder and porous hydroxyapatite. *J Oral Maxillofac Surg.* 1989; 47: 50-56.
82. KUSHNER A. Evaluation of Wolff's law of bone formation. *J Bone Joint Surg.* 1940; 22: 589-596.
83. HOLMES R E, BUCHOLZ R W, MOONEY V. Porous hydroxyapatite as a bone-graft substitute in metaphyseal defects: A histometric study. *J Bone Joint Surg.* 1986; 68A: 904-911.
84. MAGAN A, RIPAMONTI U. Geometry of porous hydroxiapatite implants influences osteogenesis in baboons (Papio Ursinus). *J Craniofac Surg.* 1996; 7: 71-78.
85. RIPAMONTI U, VAN DER HEEVER B, VAN WYK, J. Expression of the osteogenic phenotype in porous hydroxyapatite implanted extraskeletally in baboons. *Matrix.* 1993; 13: 491-503.
86. RIPAMONTI U. Osteoinduction in porous hydroxyapatite implanted in heterotopic sites of different animal models. *Biomaterials.* 1996; 17: 31-35.
87. SCIADINI M F, DAWSON J M, JOHNSON K D. Evaluation of bovine-derived bone protein with a natural coral carrier as a bone-graft substitute in a canine segmental defect model. *J Orthop Res.* 1997; 15: 844-857.
88. BUCHOLZ R W, CARLTON A, HOLMES R. Interporous hydroxiapatite as a bone graft substitute in tibial plateau fractures. *Clin Orthop.* 1989; 240: 53-62.
89. COTTRELL D A, WOLFORD L M. Long term evaluation of use of coralline hydroxyapatite in orthognathic surgery. *J Oral Maxillofac Surg.* 1998; 56: 935-941.
90. MORA F, OUHAYOUN J P. Clinical evaluation of natural coral and porous hydroxyapatite implants in periodontal bone lesions. Results of a 1-year follow-up. *J Clin Periodontol.* 1995; 22: 877-884.
91. BROWN P. A new calcium phosphate water setting cement. En: *Cements Research Progress*. Westerville, OH: American Ceramic Society, 1986.
92. FERRARO J W. Experimental evaluation of ceramic calcium phosphate as a substitute for bone grafts. *Plast Reconstr Surg.* 1979; 63: 634-640.
93. WALSH W R, HARRISON J, LOEFLER A, MARTIN T, VAN SICKLE D, BROWN M K C, SONNABEND D H. Mechanical and histological evaluation of Collagraft® in a ovine lumbar fusion model. *Clin Orthop.* 2000; 375: 258-266.
94. CLÉMENT J, EKEBERG L, MARTÍNEZ S, GINEBRA M P, PLANELL J A. Influence of the chemical composition on the mechanical properties and in vitro solubility of Phosphate glasses in the system P2O5-CaO-Na2O. *Bioceramics.* 1998; 11: 141-144.
95. CLÉMENT J, MANEO J M, PLANELL J A, ÁVILA G, MARTÍNEZ S. Analysis of structural changes of a phosphate glass during its dissolution in simulated bone fluid. *J Mat Sci.* 1999; 10: 729-732.
96. CLÉMENT J, TORRES P, GIL FJ, PLANELL JA, TERRADAS R, MARTÍNEZ S. Evaluation by Vickers indentation of fracture toughness of a phosphate biodegradable glass. *J Mat Sci.* 1999; 10: 437-441.
97. CLÉMENT J, BJELKEMYR A, MARTÍNEZ S, FERNÁNDEZ E, GINEBRA M P, PLANELL J A. Analysis of the kinetics of dissolution and the evolution of the mechanical properties of a phosphate glass stored in simulated body fluid. *Bioceramics.* 1999; 12: 375-378.
98. LÓPEZ-SASTRE NÚÑEZ A, VAL BERNAL J F, GONZALO ORDEN J M, GORROCHATEGUI SÁNCHEZ I, BUELTA CARRILLO L, LÓPEZ-SASTRE A. La influencia del revestimiento de hidroxiapatita y de biovidrio en la osteointegración de implantes de titanio. *Rev Ortop Traumatol.* 1997, 41: 173-181.
99. SALINAS A J, ROMÁN J, VALLET-REGÍ M, OLIVEIRA J M, CORREIA R N, FERNANDES M H. In vitro bioactivity of glass and glass-ceramics of the 3CaO P2O5-CaO SiO2-CaO MgO 2SiO2 system. *Biomaterials.* 2000; 21: 251-257.
100. HENCH L L. Bioceramics: From concept to clinic. *J Am Cer Soc.* 1991; 74: 1487-1510.
101. PELTIER L. The use of plaster of Paris to fill large defects in bone. *Am J Surg.* 1959; 97: 311-315.
102. ALBEE F H. Studies in bone growth triple calcium phosphate as a stimulus to osteogenesis. *Ann Surg.* 1920; 71: 32-38.
103. GOODMAN S B, BAUER T W, CARTER D, CASTLELYN P P, GOLDSTEIN S A, KYLE R F, LARSSON S, STANKEWICH C J, SWIONTOWSKI M F, TENCER A F, YETKINLER D N, POSER R D. Norian SRS cement augmentation in hip fracture treatment. Laboratory a initial clinical results. *Clin Orthop.* 1998; 348: 42-50.
104. LEE D D, TOFIGHI A, AIOLOVA M, CHAKRAVARTHY P, CATALANO A, MAJAHAD A, KNAACK D. BSM®: A biomimetic bone substitute and drug delivery vehicle. *Clin Orthop.* 1999; 367S: 396-405.

105. BOSTROM M P G, SALEH K J, EINHORM T A. Osteoinductive growth factors in preclinical fracture and long bone defects models. *Orthop Clin North Am.* 1999; 30: 647-658.
106. JOHNSON E E, URIST M R. Human bone morphogenetic protein allografting for reconstruction of femoral nonunion. *Clin Orthop.* 2000; 371: 61-74.
107. WITSØ E, PERSEN L, LØSETH K, BENUM P, BERGH K. Cancellous bone as an antibiotic carrier. *Acta Orthop Scand.* 2000; 71: 80-84.
108. GOLDRING S R, GOLDRING M B. Cytokines and skeletal physiology. *Clin Orthop.* 1996; 324: 13-23.
109. LIND M. Growth factors: possible new clinical tools. A review. *Acta Orthop Scand.* 1996; 67: 407-417.
110. MUNDY G R. Regulation of bone formation by bone morphogenetic proteins and other growth factors. *Clin Orthop.* 1996; 323: 24-28.
111. SCADUTO A A, LIEBERMAN J R. Gene therapy for osteoinduction. *Orthop Clin North Am.* 1999; 30, 625-635.
112. TRIPPEL S B, COUTS R D, EINHORM T A, MUNDY G R, ROSENFELD R G. Growth factors as therapeutic agents. *J Bone Joint Surg.* 1996; 78A: 1272-1286.
113. TRIPPEL S B. Potential role of insulinlike growth factors in fracture healing. *Clin Orthop.* 1998; 355 S: 301-309.
114. WOZNEY J M, ROSEN V R. Bone morphogenetic protein and bone morphogenetic protein gene family in bone formation and repair. *Clin Orthop.* 1998; 346: 26-37.
115. TSUDA T, MASUHARA K, YOSHIWAZA H, SHIMIZU N, TAKAOKA K. Establishment of an osteoinductive murine osteosarcoma clonal cell line showing osteoblast phenotypic traits. *Bone.* 1989; 10: 195-200.
116. URIST M R. Bone: Formation by autoinduction. *Science.* 1965; 150: 893-899.
117. BODEN S D. Bioactive factors for bone tissue Engineering. *Clin Orthop.* 1999; 376S: 84-94.
118. WANG J S, ASPENBERG P. Basic fibroblast growth factor and bone induction in rats. *Acta Orthop Scand.* 1993; 64: 557-561.
119. NASH T J, HOWLETT C R, MARTIN C, STEELE J, JOHNSON K A, HICKLIN D J. Effect of platelet-derived growth factor on tibial osteotomies in rabbits. *Bone.* 1994; 15: 203-208.
120. BAK B, JORGENSEN P H, ANDREASSEN T T. Dose response of growth hormone on fracture healing in the rat. *Acta Orthop Scand.* 1990; 61: 54-58.
121. CARPENTER J E, HIPP J A, GERHART T N, RUDMAN C G, HAYES W C, TRIPPEL S B. Failure of growth hormone to alter the biomechanics of fracture-healing in a rabbit model. *J Bone Joint Surg.* 1992; 74A: 359-367.
122. EHRNBERG A, BROSJÖ O, LÅFTMAN P, NILSSON O, STRÖMBERG L. Enhancement of bone formation in rabbits by recombinant human growth hormone. *Acta Orthop Scand.* 1993; 64: 562-566.
123. KOSKINEN E V S, LINDHOLM R V, NIEMINEN RA, PURANEN J P, ATTILA U. Human growth hormone in delayed union and non-union of fractures. *Int. Orthop.* 1978; 1: 317-322.
124. NORTHMORE-BALL M D, WOOD M R, MEGGIT B F. A biomechanical study of the effects of growth hormone in experimental fracture healing. *J Bone Joint Surg.* 1980; 62B: 391-396.
125. RILEY E H, LANE J M, URIST M R, LYONS K M, LIEBERMAN J R. Bone morphogenetic protein-2. Biology and applications. *Clin Orthop.* 1996; 324: 39-46.
126. LIND M, SCHUMACKER B, SØBALLE K, KELLER J, MELSEN F, BÜNGER C. Transforming growth factor-beta enhances fracture healing in rabbit tibiae. *Acta Orthop Scand.* 1993; 64: 553-556.
127. NIELSEN H M, ANDREASSEN T T, LEDET T, OXLUND H. Local injection of TGF-beta increases the strength of tibial fracture in the rat. *Acta Orthop Scand.* 1994; 65: 37-41.
128. CUADRADO M A, DE PEDRO J A, GARCÍA DE LUCAS F G, CEBRIÁN J L, FURIO V, ASENJO J A, VALOR R, LÓPEZ-DURÁN L. Reparación experimental de grandes defectos óseos mediante el implante de un extracto parcialmente purificado de BMP. *Rev Ortop Traumatol.* 1992; 361B: 488-494.
129. TEIXEIRA J O C, URIST M R. Bone morphogenetic protein induced repair of compartmentalized segmental diaphyseal defects. *Arch Orthop Trauma Surg.* 1998; 117: 27-34.
130. REDDI A H. Bone and cartilage differentiation. *Curr Opin Genet Dev.* 1994; 4: 737-744.
131. COOK S D, BAFFES G C, WOLFE M W, SAMPATH T K, RUEGER D C, WHITECLOUD T S. The effect of recombinant human osteogenic protein-1 on healing on large segmental bone defects. *J Bone Joint Surg.* 1994; 76A: 827-838.
132. COOK S D, WOLFE M W, SALKED S L, RUEGER D C. Effect of recombinant human osteogenic protein-1 on healing on segmental defects in non-human primates. *J Bone Joint Surg.* 1995; 77A: 734-750.
133. LIEBERMAN J R, DALUISISKI A, STEVENSON S, MCALLISTER P, LEE Y P, KABO J M, FINERMAN G A M, BERK A J, WITTE O N. The effect of regional gene therapy with bone morphogenetic protein-2-producing bone-marrow cells on the repair of segmental femoral defects in rats. *J Bone Joint Surg.* 1999; 81A: 905-917.
134. TÄGIL M, JEPPESON C, ASPENBERG P. Bone graft incorporation. Effects of osteogenic protein-1 and impaction. *Clin Orthop.* 2000; 371: 240-245.
135. BRUDER S P. Current and emerging technologies in Orthopaedic tissue engineering. *Clin Orthop.* 1999; 367S: 406-409.
136. LUDWIG S C, BODEN S C. Osteoinductive bone graft substitutes for spinal fusion. A basic science summary. *Orthop Clin North Am.* 1999; 30: 635-45.
137. EVANS C H, ROBBINS P D. Possible orthopaedic applications of gene therapy. *J Bone Joint Surg.* 1995; 77A: 1103-1114.
138. EVANS C H, ROBBINS P D. Genetically augmented tissue engineering of the musculoskeletal system. *Clin Orthop.* 1999; 367S: 410-418.
139. BRUDER S P, KRAUS K H, GOLDBER V M, KADILAYA S. The effect of implants loaded with autologous mesenchymal stem cells on the healing of canine segmental bone defects. *J Bone Joint Surg.* 1998; 80A: 985-994.
140. BRUDER S P, FOX B S. Tissue Engineering of bone. Cell based strategies. *Clin Orthop.* 1999; 367S: 68-83.