

Integración biológica y radiológica de los aloinjertos óseos masivos

Biological and radiological integration of massive bone allografts

SAN JULIÁN ARANGUREN, M.; MORENO SOUSA, J. L.; FORRIOL CAMPOS, F., y CAÑADELL CARAFI, J.

Departamento de Cirugía Ortopédica y Traumatología. Clínica Universitaria. Facultad de Medicina. Universidad de Navarra. Pamplona.

RESUMEN: Se ha analizado la incorporación biológica y radiológica de 208 injertos consecutivos de hueso cortical congelado, utilizados desde 1986 en 173 pacientes afectos de patología tumoral ósea maligna. En todos los pacientes se realizaron controles radiológicos periódicos; en 36 se efectuó un estudio isotópico y en 24 casos, en los que fue retirado el injerto, se estudió histológicamente la revascularización del injerto y la unión injerto-hueso receptor así como la influencia, en 43 casos, de la histocompatibilidad en la integración de los aloinjertos. Radiológicamente, se observó la formación de un callo perióstico que une el injerto al hueso receptor en el 96% de los casos (78% sin necesidad de gestos quirúrgicos complementarios y 18% tras el aporte de injerto autólogo). El estudio isotópico mostró un aumento de la captación en la unión injerto-hueso receptor y en la superficie perióstica del injerto, que se incrementa con el tiempo. En el estudio histológico se apreciaron fenómenos de reabsorción-remodelación desde las superficies perióstica y endóstica del aloinjerto, así como una sustitución ósea aprovechando los canales óseos del injerto proximal y distalmente y la penetración de numerosos vasos desde las partes blandas hacia el aloinjerto. La histocompatibilidad no demostró tener ninguna influencia en la incorporación del injerto.

PALABRAS CLAVE: Injerto. Hueso cortical. Osteointegración.

SUMMARY: An analysis was made of the biological and radiological incorporation of 208 consecutive grafts of frozen cortical bone performed since 1986 in 173 patients with malignant neoplastic bone disease. Periodic radiological controls were carried out in all

patients, a radionuclide study was made in 36 patients, and the graft was removed in 24 patients. A histological study was made of graft revascularization, the graft-receptor bone junction, and the influence of histocompatibility on allograft integration in 43 cases. The formation of a periosteal callus joining the graft to the receptor bone was radiologically evident in 96% of cases (78% without complementary surgical measures and 18% after implanting autologous graft). The radionuclide study showed increased uptake at the junction between graft and receptor bone and on the periosteal surface of the graft; uptake increased with time. The histological study showed resorption-remodeling phenomena on the periosteal and endosteal surfaces of the allograft, as well as proximal and distal bone substitution using the osseous canals of the graft and the penetration of the allograft by numerous blood vessels from soft tissues. Histocompatibility did not influence graft incorporation.

KEY WORDS: Graft. Cortical bone. Osteointegration.

En los últimos años, el avance de la quimioterapia, las nuevas tecnologías de criopreservación de tejidos y el desarrollo de nuevos instrumentos y técnicas quirúrgicas en el tratamiento de los tumores, han cambiado los planteamientos de la cirugía oncológica ósea, lo que hace que la amputación sea cada vez menos frecuente^{19,20,23-25,27-29} y prosperen técnicas más conservadoras. En la cirugía tumoral se requieren resecciones extensas con una cirugía agresiva que puede causar problemas en su reconstrucción,^{5,6,8,32} para los que se pueden proponer diferentes alternativas, como las endoprótesis y el trasplante óseo, autólogo o alogénico.^{3,4,7,8,12,19}

Los injertos óseos tienen como función promover la osteoconducción y ofrecer un soporte mecánico. En cualquier caso, todo injerto óseo cortical debe restablecer la continuidad ósea como un material de sustitución capaz de resistir y de transmitir las sollicitaciones mecánicas del esqueleto.

Correspondencia:

Dr. MIKEL SAN JULIÁN.
Dpto. Cirugía Ortopédica y Traumatología.
Clínica Universitaria de Navarra.
Avda. Pío XII s/n.
31080 Pamplona.

Recibido: Octubre de 1999.

Aceptado: Mayo de 2000.

En el presente estudio se analizó la incorporación (desde el punto de vista radiológico, gammagráfico e histológico) de los aloinjertos masivos en pacientes tumorales y la posible influencia de la histocompatibilidad receptor/donante en dicha incorporación.

Material y método

Desde el año 1986 hasta 1998 se han empleado: 72 aloinjertos para enfundar prótesis, 71 aloinjertos intercalares, 34 osteoarticulares y 21 aloinjertos de otro tipo (artrodesis con aloinjerto cortical, injertos pélvicos, esternales, etc.) con una longitud media de 19 cm (mínimo: 4 y máximo: 42 cm), en pacientes con una edad media de 19,6 años (mínimo 3 y máximo 69 años).²⁷ En 22 pacientes se emplearon dos aloinjertos y en seis casos tres (por fallo del primero, metástasis ósea o presentar varias localizaciones de su tumor primario). Todos los pacientes fueron sometidos a tratamiento quimio y/o radioterápico siguiendo el protocolo establecido para cada tipo de tumor.

En el presente estudio se analizó la consolidación radiológica de los 158 aloinjertos con más de dos años de evolución, colocados en 139 pacientes, que representan 135 uniones diafisarias injerto-hueso receptor y 58 uniones metafisarias. La osteotomía fue horizontal en todos los casos metafisarios, si bien el tipo de osteosíntesis fue muy diversa. Por el contrario, las osteotomías diafisarias, fueron en 81 casos horizontales y en 54 oblicuas. Para su fijación se utilizaron en 58 casos, placas y en 77, clavos intramedulares.

El tiempo medio de seguimiento fue de 54 meses (mínimo: 24 y máximo 133 meses). En el seguimiento de estos pacientes se han efectuado radiografías mensuales de control durante el primer año, posteriormente se hicieron controles cada tres meses y, después del segundo año, cada seis meses.

Para evaluar la consolidación se siguieron los criterios de la ISOLS (*International Symposium On Limb Salvage*), que clasifica la unión aloinjerto-hueso como: excelente (línea de osteotomía no visible), buena (unión > 75% con una línea de osteotomía todavía visible), aceptable (unión entre 25-75%) y pobre (no evidencia de callo o unión < 25%).

Se estudió la influencia sobre la consolidación mediante un análisis estadístico multivariante de los siguientes parámetros: a) edad del paciente y del donante, b) longitud del aloinjerto, c) localización, d) osteotomía, e) tipo de osteosíntesis, f) empleo de quimio y/o radioterapia en sus diversas modalidades.

Además, en 36 de estos pacientes se efectuó un estudio prospectivo de captación isotópica con Tc99-MDP para evaluar la revascularización del aloinjerto, efectuándose la lectura, tres horas después de la inyección, por dos observadores, para efectuar una interpretación cualitativa. La captación en el aloinjerto fue valorada como: similar a los tejidos blandos (0); captación en el aloinjerto menor que en el hueso contralateral (1); actividad en el aloinjerto similar al hueso normal (2) y captación mayor que el hueso contralateral (3). También se efectuó una medición semicuantitativa de la captación isotópica obteniendo los índices: $I1 = A1/A2$; $I2 = A1/A3$; y $I3 = A2/A4$. Para ello, se considera A1: sobre el aloinjerto; A2 justo por encima del aloinjerto; A3 y A4 en las mismas zonas que A1 y A2 pero en la extremidad contralateral. Se empleó el test de ANOVA para comparar cada índice entre los distintos grupos que habían sido clasificados visualmente. Cuando se encontraron diferencias significativas, se empleó el análisis de Scheffe *post hoc*.

En los 24 aloinjertos retirados por infección o fractura se hizo un estudio histológico con tinciones de hematoxilina-eosina y tricrómico de Masson. También se utilizó la tinción de Von Willebrand para evaluar la viabilidad de los vasos encontrados en el interior de los aloinjertos y, para constatar la validez de esta técnica, se realizó la misma tinción en aloinjertos desechados por contaminación para su uso clínico. En aquellos pacientes a los que se iba a retirar el aloinjerto se inyectó oxitetraciclina 500 mg, seis, cuatro y dos días antes de la intervención, para estudiar la incorporación del aloinjerto con fluorescencia.

Por último, en los 43 pacientes que recibieron aloinjertos de donantes multiorgánicos se estudió la compatibilidad HLA entre donante y receptor para comprobar su posible influencia en la aparición de complicaciones (pseudoartrosis, infección o fractura), mediante el test estadístico de la «U» de Mann Whitney.

Resultados

Estudio radiológico

La consolidación de las osteotomías metafisarias se obtuvo en un tiempo medio de 6,5 meses con medios de fijación mínimos y no se ha encontrado relación con los factores estudiados. Por el contrario, el tiempo medio de consolidación en las osteotomías diafisarias fue de 16 meses, encontrando una correlación negativa con la utilización de quimioterapia sistémica ($p < 0,05$) radioterapia externa ($p < 0,01$) y

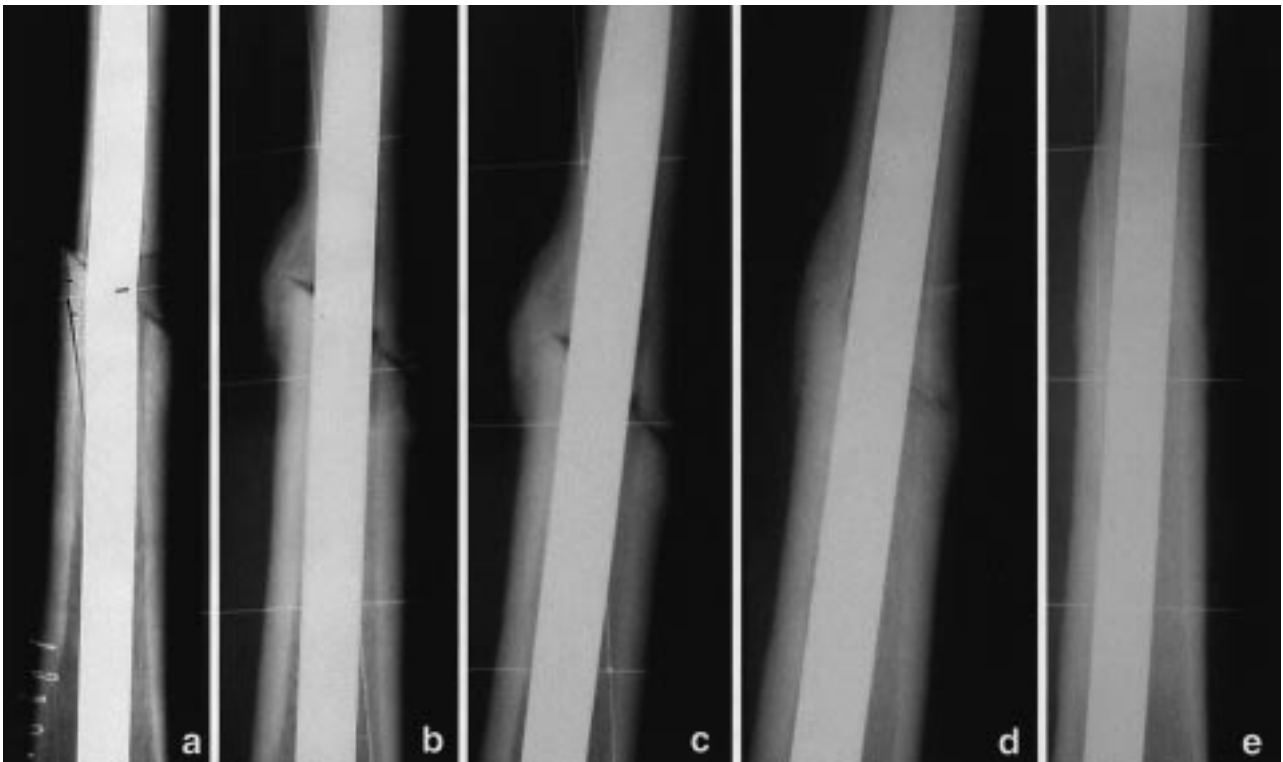


Figura 1. Evolución radiológica de la consolidación de la unión diafisaria de un aloinjerto con el hueso receptor.

con la edad del paciente ($p < 0,01$). No se observó relación con los otros parámetros estudiados (Fig. 1). En 35 casos (22%) se produjo una pseudoartrosis en la unión aloinjerto-hueso, que se resolvió con el aporte de autoinjerto en 30 casos (18%).

Se observaron 17 fracturas (11%), que se resolvieron: en ocho casos, con osteosíntesis y aporte de injerto autólogo (Fig. 2) y, en nueve casos, mediante el recambio del aloinjerto (conminución o infección).

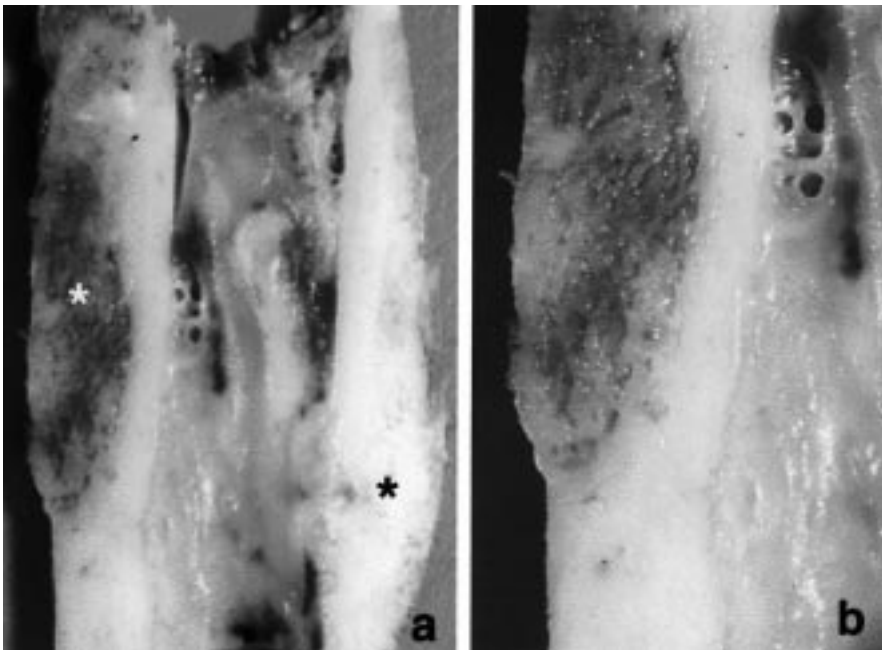


Figura 2. Consolidación de la fractura de un aloinjerto tras la osteosíntesis y el aporte de injerto autólogo. A: neoformación ósea en ambas corticales (*). B: detalle.

Tabla 1. Análisis semicuantitativo de la captación isotópica en las distintas áreas

	Media			Desviación estándar			Mínimo			Máximo		
	I ₁	I ₂	I ₃	I ₁	I ₂	I ₃	I ₁	I ₂	I ₃	I ₁	I ₂	I ₃
1+	0,27	0,68	2,31	0,13	0,37	1,41	0,09	0,2	0,42	0,54	1,38	6
2+	0,47	0,98	2,84	0,24	0,45	1,7	0,12	0,2	1,13	0,89	1,9	7,8
3+	0,91	1,96	4,62	0,59	1,63	2,25	0,41	0,27	2,37	1,94	4,8	8,59

Estudio isotópico

La tabla 1 muestra los resultados del análisis semicuantitativo. No hubo ningún aloinjerto en el que la captación fuera valorada como similar a las partes blandas. Los valores obtenidos en el análisis semicuantitativo fueron diferentes en las distintas áreas del aloinjerto. La captación epifisaria y metafisaria fue, como en el hueso normal, mayor que la diafisaria. Las zonas de unión entre el aloinjerto y el hueso receptor presentaron mayor captación que el interior del aloinjerto. Se observó una mayor captación en el interior de los aloinjertos con mayor tiempo de evolución (Fig. 3). La captación en la cortical de los aloinjertos fue semejante a la de la extremidad contralateral, excepto en los casos de corta evolución. Tras el estudio estadístico, se encontraron diferencias altamente significativas entre los índices I1 e I2 en los tres grupos, con diferencias entre el grupo con captación 1- y los grupos con captación 2- y 3-, significativas también después del análisis Scheffe *post hoc*. Así mismo, para el índice I3 las diferencias entre los tres grupos fueron altamente significativas, aunque tras el estudio Scheffe *post hoc* sólo se encontraron diferencias significativas entre los grupos 3- y 1-.

Estudio histológico

En la unión del hueso receptor y el aloinjerto se observó una neoformación ósea perióstica y, en menor grado, también endóstica (Fig. 4). El aloinjerto presentó numerosas zonas de hueso necrótico rodeadas por zonas de hueso en formación, con un proceso de sustitución ósea aprovechando los canales óseos del aloinjerto. La superficie externa del aloinjerto presentó la llegada de numerosos vasos desde las partes blandas. Los vasos encontrados en el interior de los aloinjertos mostraron positividad en la tinción de Von Willebrand, a diferencia de los aloinjertos no implantados, que se utilizaron como grupo control (Fig. 5). Los marcajes de fluorescencia confirmaron la aposición de hueso nuevo en el interior del aloinjerto. La unión metafisaria se produjo por una formación de trabéculas óseas desde el hueso receptor hacia el aloinjerto.

Compatibilidad HLA

La tabla 2 muestra los casos que sufrieron alguna complicación en relación con la compatibilidad o no compatibilidad de los antígenos HLA tipo I y II entre el donante y el receptor. Aunque el número de complicaciones es mayor en el grupo de los no compati-

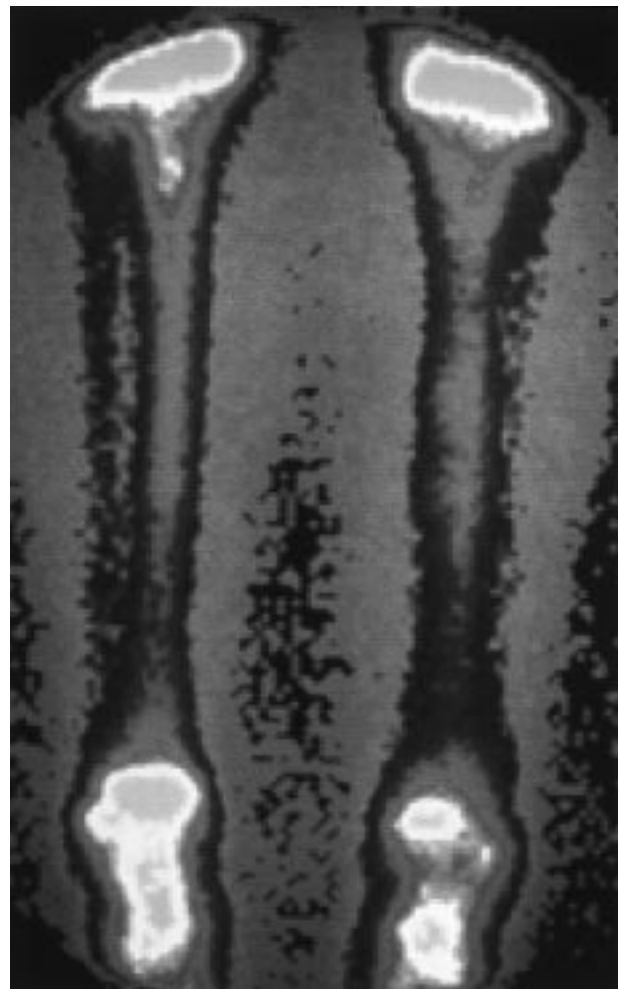


Figura 3. Aloinjerto intercalar distal de tibia tras la resección de un osteosarcoma. Cinco años después de su implantación la captación isotópica del aloinjerto es similar a la del hueso sano, indistinguible de la tibia contralateral.

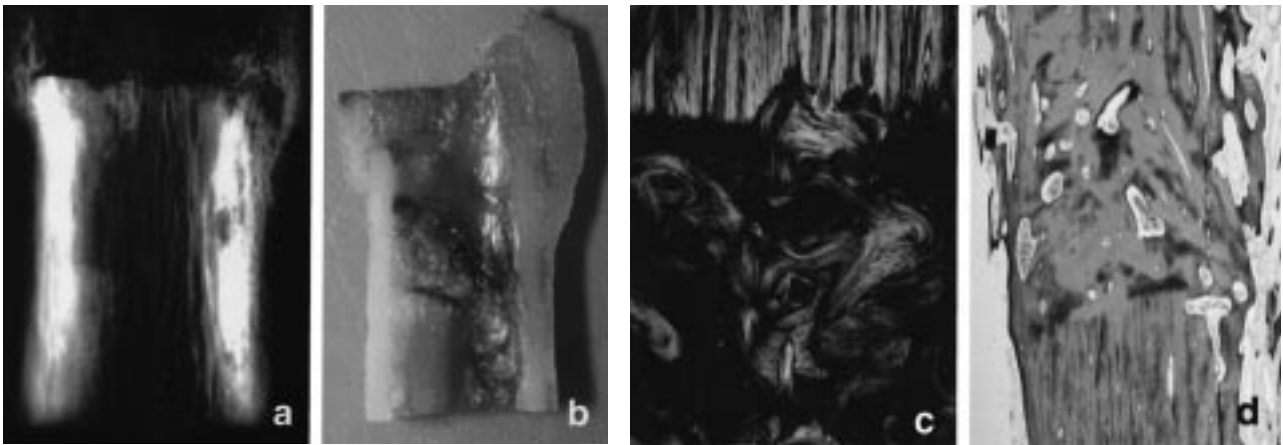


Figura 4. Unión perióstica diafisaria aloinjerto-hueso receptor. A: imagen radiológica. B: imagen macroscópica. C: imagen con luz polarizada de la unión injerto-hueso receptor (x100), d) unión aloinjerto-hueso receptor (Tricrómico de Masson x40).

bles, no se encontró relación estadísticamente significativa entre la compatibilidad o incompatibilidad HLA y la aparición de complicaciones (pseudoartrosis, fractura o infección del aloinjerto).

Discusión

El estudio radiológico muestra la influencia de factores como la quimioterapia, la radioterapia y la edad del paciente en la consolidación de los aloinjertos empleados en patología tumoral. Algunos autores aconsejan el empleo sistemático de injerto autólogo para disminuir las tasas de pseudoartrosis de los aloinjertos^{1,34}. Nosotros somos partidarios de hacerlo únicamente en los casos de pseudoartrosis, evitando la morbilidad en el foco donante y el aumento del tiempo quirúrgico. Además, la quimioterapia retrasa la consolidación de estos injertos y puede hacer ineficaz el gesto quirúrgico del aporte de injerto autólogo. La radioterapia, por su parte, es otro factor que

retrasa la consolidación del aloinjerto, por el daño que provoca sobre la vascularización.³³⁻³⁵ La edad del receptor del aloinjerto es otro factor que influye en las posibilidades de consolidación pues cuanto más joven es un paciente, mayor capacidad osteogénica presenta. Sin embargo, ni la localización, ni la edad del donante, ni la longitud del aloinjerto, ni el tipo de osteotomía o de osteosíntesis parecen influir en el tiempo de consolidación.

El estudio isotópico mostró una captación en los aloinjertos de mayor tiempo de seguimiento similar a la del mismo hueso de la extremidad contralateral. Únicamente observamos una captación disminuida en aquellos aloinjertos con un tiempo de evolución corto, lo que puede estar relacionado con una inhibición de la revascularización atribuible a la quimioterapia y a la reorganización de los tejidos periféricos. La captación en la periferia del aloinjerto es una demostración de la penetración del mismo por los vasos desde las partes blandas adyacentes. La mayoría

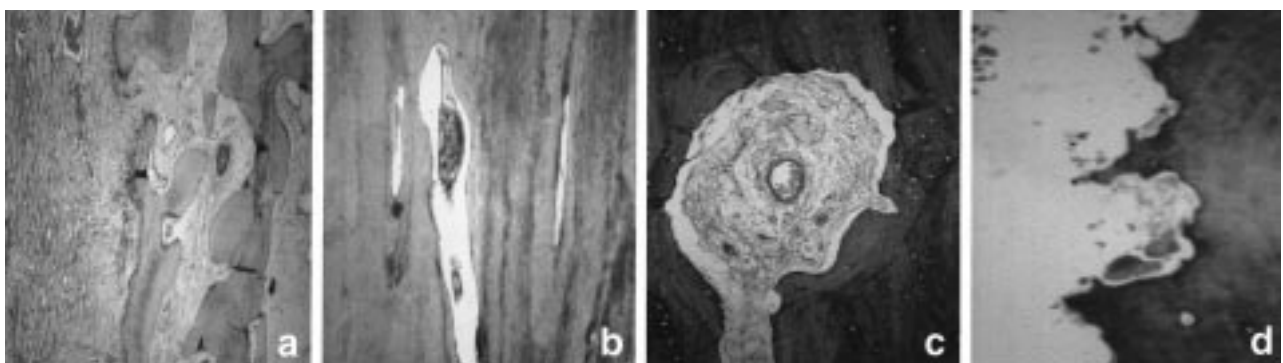


Figura 5. Penetración vascular en el aloinjerto cortical. A: unión injerto-hueso receptor, con vasos en su interior (Tricrómico de Masson x40). B y C: detalle de un vaso en el interior del aloinjerto (Tricrómico de Masson x100). D: osteoclastos efectuando la reabsorción en la superficie perióstica del aloinjerto (Tricrómico de Masson x200).

Tabla 2. Complicaciones (infección, pseudoartrosis o fractura) en función de la compatibilidad o incompatibilidad (HLA I y II) entre donante y receptor

	Compatibilidad			HLA
	Sí	I	II	I y II
Infección				
Sí	6	1	1	0
No	12	8	3	8
Fractura				
Sí	4	1	1	1
No	14	8	3	7
Pseudoartrosis				
Sí	3	2	1	1
No	15	7	3	7

de los aloinjertos mostraron hipercaptación en la zona de unión aloinjerto-hueso, incluso una vez conseguida la consolidación, por lo que, a nuestro entender, este fenómeno no guarda relación con el proceso de consolidación sino con una mayor penetración de vasos por los extremos que por la periferia del aloinjerto. El patrón gammagráfico característico de los aloinjertos pone de manifiesto el proceso de revascularización.² El análisis semicuantitativo manifiesta de forma objetiva que esta captación es real, con diferencias significativas entre los distintos grupos y áreas de interés, y por tanto no puede atribuirse a la subjetividad del observador.

Básicamente en la incorporación de los injertos óseos confluyen tres mecanismos: a) la osteoinducción,³⁰ b) la osteoconducción y c) el propio injerto, como fuente de formación de células óseas.

La incorporación se produce por un mecanismo denominado por los anglosajones *creeping substitution*, una reabsorción gradual del injerto y un reemplazo simultáneo de hueso nuevo que penetra «rep-tando» en la estructura muerta.¹⁵ Es un proceso lento en el que el hueso neoformado aprovecha los canales de Havers y de Volkman del hueso cortical y el espacio intertrabecular del hueso esponjoso.^{13-14,26,29-31} En las zonas de unión diafiso-diafisaria se produce un puente perióstico desde el hueso receptor que tiende a englobar y estabilizar el extremo del aloinjerto.

La rotura y coagulación de los vasos sanguíneos de los sistemas de Havers próximos a la osteotomía induce necrosis ósea, dejando un área desprovista de irrigación que desempeña un papel pasivo en la con-

solidación. En la unión metafisaria, en cambio, se produce un crecimiento de trabéculas desde el hueso receptor que penetran en el aloinjerto de una manera más rápida que la formación del puente perióstico en la unión diafisaria. Junto con los puentes perióstico y endóstico, desde las partes blandas que rodean el aloinjerto llegan los vasos en el hueso transplantado, como demuestra el estudio isotópico.

En los aloinjertos intercalares se produce una doble invasión vascular desde las uniones injerto-hueso y, en menor grado, desde los tejidos blandos, lo que reafirma la importancia de que todo injerto óseo quede bien cubierto por partes blandas.

Coincidimos con otros trabajos^{9-10,18} en afirmar que la integración de un aloinjerto intercalar de hueso cortical se puede producir por dos mecanismos complementarios: una erosión progresiva de la superficie del aloinjerto y un reemplazo del hueso cortical muerto por penetración a lo largo de los sistemas haversianos preexistentes.

El lento proceso de incorporación del aloinjerto explica las dificultades de tratamiento de las complicaciones más frecuentes (infección, pseudoartrosis y fractura).²⁷⁻²⁹ Una infección de un aloinjerto exige en muchas ocasiones la retirada del mismo para obtener la curación, ya que la lenta penetración de los vasos en el aloinjerto hace difícil obtener una concentración de antibióticos adecuada. Así mismo, se pueden producir fracturas en un hueso que durante un período largo de tiempo permanece parcialmente muerto, con el consiguiente riesgo de que se rompa con pequeños traumatismos. Sin embargo, las fracturas de los aloinjertos pueden ser tratadas mediante osteosíntesis, como si de un hueso normal se tratara, ya que una buena estabilización permitirá el puenteo perióstico y endóstico, ayudando a la curación del foco de fractura.²⁸

Como ya han publicado otros autores²¹ no existe relación entre la compatibilidad HLA y la aparición de complicaciones, que pudiera sugerir una diferencia de integración entre los aloinjertos que son compatibles con el hueso receptor y los que no lo son.

Agradecimientos

A la Dra. Ana Villas, del Departamento de Medicina Nuclear de la Clínica Universitaria de Navarra, por el estudio gammagráfico y a D.^a Purificación Ripalda, del Laboratorio de Ortopedia Experimental, por la realización del estudio histológico.

Bibliografía

1. Aro, HT, y Aho, AJ: Clinical use of bone allografts *Ann Med*, 25: 403-12, 1993.
2. Bar-Sever, Z; Connolly, LP; Gebhardt, MC, y Treves, ST: Scintigraphy of lower extremity cadaveric bone allografts in osteosarcoma patients. *Clinical Nuclear Medicine*, 22: 532-5, 1997.

3. **Böhm, P, y Kinner, B:** The effect of electromagnetic fields on the healing pattern of autoclaved autogenous bone transplants. *Int Orthop*, 4: 43-58, 1996.
4. **Burwell, GR; Friedlander, GE, y Mankin, HJ:** Current perspectives and future directions: the 1983 international conference on osteochondral allografts. *Clin Orthop*, 197: 141-157, 1985.
5. **Cañadell, J, y San Julian, M:** Radiological, isotopic and histological study about incorporation of allografts. *Rev Mapfre Medicina*, 8 (supl. I): 267-71, 1997.
6. **Cotta, H, y Rohe, K:** Extremitätenerhaltende Resektionsverfahren bei Primären Malignen Knochentumoren. *Z Orthop*, 122: 2-15, 1984.
7. **Chalmer, J:** Bone transplantation. Symposium Tissue Org Transplant. *J Clin Path*, 20: 540-550, 1967.
8. **Chao, EY, y Ivins, JC (eds):** Tumor prosthesis for bone and joint reconstruction. Stuttgart-Nueva York, *G Thieme Verlag*, 1983.
9. **De Luca, JV; Cianelli, C; Friedlaender, GE, y Baron, R:** A comparative histomorphometric study of bone remodeling in human paired cancellous allografts and autografts. *Trans Orthop Res Soc*, 12: 356, 1987.
10. **Delloye, Ch; Verhelpen, M; D'Hemricourt, J; Govaerts, B, y Bourgois, R:** Morphometric and physical investigations of segmental cortical bone autografts and allografts in canine ulnar defects. *Clin Orthop*, 282: 273-292, 1992.
11. **Engel, D:** An experimental study of the action of radium in developing bones. *Br J Radiol*, 11: 779, 1938.
12. **Friedlaender, GE:** Current concepts review bone banking. *J Bone Joint Surg*, 64A: 307-311, 1982.
13. **Frost, HM:** Intermediary organization of the skeleton. Boca Raton: *CRC Press*, 1986.
14. **Frost, HM:** Vital biomechanics: proposed general concepts for skeletal adaptations to mechanical usage. *Calcif Tissue Int* 42: 145-156, 1988.
15. **Goldberg, VM, y Stevenson, S:** Natural history of autografts and allografts. *Clin Orthop*, 225: 7-16, 1987.
16. **Goldwein, JW:** Effects of radiation therapy on skeletal growth in children *Clin Orthop*, 262: 93-107, 1991.
17. **Guyuron, B; Dagys, AP; Munro, IR, y Ross, RB:** Effect of irradiation on facial growth: A 7 to 25 year follow-up. *Ann Plast Surg*, 11: 423, 1983.
18. **Kakiuchi, M, y Ono, K:** Preparation of bank bone using defatting; freeze-drying and sterilisation with ethylene oxide gas. Part II. Clinical evaluation of its efficacy and safety. *Int Orthop*, 20: 147-152, 1996.
19. **Marcove, RC:** En bloc resections for osteogenic sarcoma. *Can J Surg*, 20: 521-528, 1977.
20. **Monticelli, G; Santori, FS; Ghera, S, y Folliero, A:** Resection and reconstruction of the distal end of the femur or proximal end of the tibia after radical excision of diaphyseal and epiphyseal segments. *Ital J Orthop Traum IX:* 427-437, 1983.
21. **Muscolo, DL; Ayerza, MA; Calabrese, ME; Redal, MA, y Santini, E:** Human leukocyte antigen matching, radiographic score, and histologic findings in massive frozen bone allografts. *Clin Orthop*, 326: 115-26, 1996.
22. **Neuhauser, ED; Wittenborg, MH; Berman, LZ, y Cohen, J:** Irradiation effects of roentgen therapy on the growing spine. *Radiology*, 59: 637, 1952.
23. **Nilsson, V:** Homologous joint transplantation in man. *Acta Orthop Scand*, 40: 429-447, 1969.
24. **Ottolenghi, CE:** Massive osteo and osteo-articular bone grafts. *Clin Orthop*, 87: 156-164, 1972.
25. **Parrish, FF:** Treatment of bone tumors by total excision and replacement with massive autologous and homologous grafts. *J Bone Joint Surg*, 48A: 968-990, 1966.
26. **Robey, PG:** Bone remodeling: formation En: Brighton CT; Friedlaender G y Lane GM; (eds). Bone formation and repair. Rosemont, *American Academy of Orthopaedic Surgeons (AAOS):* 253-260, 1994.
27. **San-Julian, M; Amillo, S, y Cañadell, J:** Allografts in malignant bone tumors. In: Czitrom and Winkler (eds.): «*Orthopaedic Allograft Surgery*». Springer Verlag, New York-Wien, pp: 157-163, 1996.
28. **San-Julian, M, y Cañadell, J:** Fractures in massive bone allografts for limb preserving operations. *Int Orthop*, 22: 32-36, 1998.
29. **San-Julian, M; Leyes, M; Mora, G, y Cañadell, J:** Consolidation of massive bone allografts in limb-preserving operations for bone tumours. *Int Orthop*, 19: 377-382, 1995.
30. **Urist, M:** Bone formation by autoinduction. *Science*, 150: 893-899, 1965.
31. **Urist, M:** Practical applications of basic research on bone graft physiology. *American Academy of Orthopaedic Surgeons (AAOS)*, 25:1-26, 1976.
32. **Wilson, PD:** A clinical study of the biomechanical behavior of massive bone transplants used to reconstruct large bone defects. *Clin Orthop* 87: 81-109, 1972.
33. **Whitehouse, WM, y Lampe, Y:** Osseous damage in irradiation of renal tumours in infancy and childhood. *Am J Radiol*, 70: 721, 1953.
34. **Wong, JW, y Shih, C:** Allograft transplantation in aggressive or malignant bone tumors. *Clin Orthop*, 297: 203-209, 1993.
35. **Zart, DJ; Miya, L; Wolff, DA; Mackley, JT, y Stevenson, S:** The effects of cisplatin on the incorporation of fresh syngenic and frozen allogenic cortical bone grafts. *J Orthop Res*, 11: 240-249, 1993.