

Aspectos actualizados de la consolidación secundaria

Dr. Edgar Nieto Andueza*

Dr. Edgar Nieto Andueza. **Aspectos actualizados de la consolidación secundaria.** Revista Venezolana de Cirugía Ortopédica y Traumatología / Vol. 40 / Nº 2 / Junio 2008.

RESUMEN

La consolidación es un proceso fisiológico complejo, que incluye la participación de células hematopoyéticas e inmunes, asociadas a células precursoras y vasculares; incluye las llamadas Células Pluripotenciales Mesenquimales (MSCs), las cuales provienen del tejido circundante y la circulación. En esta revisión solo se ha enfocado la consolidación secundaria o endocondral y para efectos prácticos se ha dividido en 7 pasos, entendiendo, que ellos ocurren de manera simultánea y no uno a continuación del otro. Se busca resumir como una serie de eventos moleculares, afectan a las células formadoras y destructoras de hueso y cartílago, a través de diferentes procesos tales como migración, proliferación, quimiotaxis, diferenciación, inhibición y síntesis de proteínas extracelulares. Al entender de manera correcta esta participación molecular, se ha iniciado un paso importante en la búsqueda de elementos terapéuticos que permitan mejorar la consolidación y evitar sus complicaciones.

Palabras clave: Hueso, trauma, consolidación de las fracturas, molecular.

SUMMARY

The consolidation is a complex physiological process that includes the participation of hematopoietic and immune cells, associated to precursory cells includes the so-called Mesenchymal Stem Cells (MSCs), which come from the surrounding tissues and the circulation. In this review has focused only secondary or endochondral fracture healing and for all practical purpose has divide into 7 steps, meaning, that they occur simultaneously and not one after the other. Wanted summarize as a series of molecular events, involving forming cells and destroy bone and cartilage, through different processes such as migration, proliferation, chemotaxis, differentiation, inhibition and synthesis of extracellular proteins. By understanding of corrects way this molecular participation, has begun a mayor step in the search of therapeutic elements that allow to improve the consolidation and to avoid their complications.

Key words: Bone, trauma, fracture healing, molecular.

INTRODUCCIÓN

El siguiente trabajo es una revisión bibliográfica de los pasos relacionados con la consolidación secundaria y busca renovar conceptos publicados, de manera previa, en la extinta Revista del Hospital "San Juan de Dios" de Caracas¹.

Un hueso fracturado puede recuperar su forma y función original, porque la evolución ha proporcionado un

mecanismo natural de cicatrización, expresado por una serie de eventos biológicos que envuelven señales moleculares intra y extracelulares, que siguen una secuencia definida temporal y espacial. Se caracteriza por la formación de un callo externo, cuyo punto de partida es un tejido condroide, que a continuación se transforma en tejido óseo y al final, una vez estabilizado los extremos fracturados, se inicia la remodelación².

El concepto de la consolidación, tal y como se conoce el día de hoy, se basa por un lado en la estabilidad, parámetro, que no cubre todos los aspectos para entenderla a cabalidad, porque existen fracturas que consolidan sin ningún tipo de inmovilización (costillas

* Profesor Titular de Ortopedia y Traumatología. Coordinador del Grupo de Investigación del Metabolismo Oseo (GIMO)
e-mail: edgar.nieto@gmail.com

y clavículas), o con inmovilizaciones cortas (húmero y tibia) o graves fracturas del fémur sometidas en primer lugar a tracción y a continuación luego de la colocación de un yeso, llamado funcional (con rodilla y cadera libre), se ponen a deambular^{3,4}.

Es posible que el otro parámetro, la vascularización, aportada por los fragmentos y las partes blandas circundantes, sea de mayor importancia, porque se ha visto fallar la consolidación en huesos de muy pobre vascularización como el escafoide, astrágalo y cuello del fémur; o la pseudo artrósis, que se ve luego del daño severo a las partes blandas alrededor de las fracturas, sea por el trauma o por procedimientos quirúrgicos, lo cual permite concluir: que es una traducción inequívoca de la importancia del aporte vascular externo^{5,6,7}.

Día a día se incrementan las investigaciones relacionadas con las citoquinas, las prostaglandinas, los factores de crecimiento, péptidos de crecimiento osteogénico, la participación de células no osteogénicas en la osteogénesis, y es hacia la genética y la inmunología donde miran la mayoría de los estudios de este problema⁸.

Es importante aclarar, que la consolidación, a pesar de tener un mecanismo básico similar a la cicatrización, conduce a un "tejido reconstituido" y no a una "cicatriz"⁹.

El objetivo de esta revisión es tratar de resumir la bibliografía existente acerca de recientes avances en cada uno de los pasos de la consolidación secundaria o endocondral (reparación por callo óseo), no se analiza, la primaria (cortical luego de cirugía), ni la directa (reparación de defectos sin fase de cartílago) ni la secundaria a distracción. De la misma manera no se enfocará lo referente a los genes involucrados en cada uno de los pasos. La mayoría de los estudios consultados, concernientes a los pasos que sigue un proceso de reparación de la fractura, se han realizado en animales y no en seres humanos. La generalidad, luego de una osteotomía y no de una fractura, pero se piensa que ellos, son los que más se acercan a la realidad^{10,11}.

El fenómeno de la consolidación

Es un evento biológico complejo que involucra la coordinación de una variedad de diferentes procesos y desde el punto de vista histológico comprende:

1. La fractura por sí misma.
2. El tejido blando de granulación o consolidación temporal.
3. La sustitución de este callo por un hueso lamelar bien orientado, y
4. La formación de un hueso normal en su forma, por la remodelación.

Es un proceso de reparación con diferentes pasos que sigue una definida secuencia espacial, de algu-

na manera recapitula el proceso de desarrollo óseo, porque provoca migración, adhesión, proliferación y diferenciación de células mesenquimales pluripotenciales^{9,11,12,13,14}.

Para asegurar una consolidación eficiente es necesario tres pasos:

- a) Que sea posible el reclutamiento de células mesenquimales primitivas.
- b) Que ellas sean susceptibles de ser moduladas, es decir, que estas células al ser activadas pueden realizar una actividad fisiológica diferente, transformarse por ejemplo en osteoprogenitoras (preosteoblastos). Este proceso de modulación ocurre en presencia de osteoinductores, como, factores genéticos, bioquímicos, mecánicos y biofísicos, capaces de diferenciar células madres en maduras o actuar sobre las ya diferenciadas.
- c) Que exista un medio de transporte, hueso autogénico o alogénico, un biomaterial sintético reabsorbible, o no, o una gelatina. En un hidromedio modulado ocurre la osteoconducción, que es el evento mayor final, al suministrarle a las células osteoprogenitoras, productoras de hueso, la facilidad de rellenar grandes defectos, porque esta producción, se deposita con arreglo tridimensional. Los prototipos de las sustancias osteoconductoras son el colágeno y la hidroxiapatita, componentes predominantes de la materia ósea^{15,16}.

En resumen para que en la consolidación se pueda crear, una masa ósea competente, se necesita una superficie osteoconductoras y células osteoproducidas moduladas.

Este complejo episodio, involucra la coordinación de una variedad de procesos diferentes; con el fin de lograr comprender los eventos que desarrollan, se han ordenado los pasos de la consolidación, de la siguiente manera:

1. Impacto.
2. Inducción.
3. Inflamación.
4. Tejido de granulación.
5. Callo blando.
6. Callo duro.
7. Remodelación.

Este esquema contará con la asociación a la histología de los cambios bioquímicos, metabólicos, inmunológicos, biofísicos y bioeléctricos. Desde el punto de vista metabólico se representa como la yuxtaposición de dos fuerzas distintas: el anabolismo o formación de tejido y el catabolismo, remodelación ósea, la destrucción de lo inútil. Este concepto es ventajoso porque permite entender la reparación, como un todo, sin dar la falsa impresión, de etapas, que operan de manera independiente^{9,17,18}.

1. **Impacto.** Es el momento de stress sobre el hueso y se lesiona el periostio, el endostio, los tejidos blandos adyacentes, incluyendo el suministro vascular y las terminaciones nerviosas, concluye cuando la energía traumática se ha disipado por completo. Marca el inicio de proceso de reparación porque al perturbar o destruir algunas células, se está en capacidad de responder mejor a los mensajeros bioquímicos locales y sistémicos; o al morir las células, ellas descargan mediadores activos que sensibilizan a las situadas a su alrededor¹⁹.

Todas las estructuras lesionadas producen factores de crecimiento, angiogénicos y quemoattractantes. Estos mediadores, son mitógenos, que guían a los precursores celulares locales a proliferar, a diferenciarse y organizar las células hijas. El grupo con participación más activa y un papel regulatorio crítico, corresponde a la súper familia de polipéptidos, conocida como Factores Transformadores del Crecimiento Beta (TGF-Beta)²⁰.

2. **Inducción.** Con la hemorragia inicial, se crea un medio ácido e hipóxico, el coágulo hemostático funciona como un depósito de señales moleculares que incluyen quemoattractantes para las células inflamatorias. En esta matriz extracelular rica en fibrina se hacen presentes las plaquetas, se agregan y descargan mediadores activos como el Factor de Crecimiento Derivados de las Plaquetas (PDGF), al igual que otras como Factor de Crecimiento Epidérmico (EGF), Factor Transformador del Crecimiento Beta (TGF-beta). Luego del impacto se forma el hematoma y se necrosan los extremos óseos²¹.

El PDGF parece estar implicado en la diferenciación osteogénica de las células mesenquimales, aunque este papel es polémico, porque hasta el momento no se ha aclarado la red de señalización y se presume sea por la vía genómica de los receptores que activan la ruta de tirosin-quinasa. Se presenta bajo dos formas: la alfa y la beta; es posible que los efectos de PDGFR alfa sobre la diferenciación osteogénica sean muy sutiles y que la PDGFR beta podría representar un estímulo importante para la regeneración o la ingeniería de la consolidación, en el sentido de promover la migración de células mesenquimales pluripotenciales. Es sintetizada por plaquetas, monocitos, macrófagos, células endoteliales y osteoblastos. Se relaciona de manera estrecha con el Factor de Crecimiento Vascular Endotelial (VEGF), ambas con similitudes estructurales, que indican una íntima analogía en su evolución, uno y otro son críticos en promover y reclutar células que permitan la proliferación vascular^{22, 23, 24}.

El Factor de Crecimiento Transformador beta y sobre todo el 3 (TGF-beta -3) y las metaloproteasas (MMP4 y MMP14) son moduladores de múltiples funciones en el desarrollo embrionario, como reparación del tejido y morfogénesis, inmunoregulación, fibrosis, angiogénesis y carcinogénesis. En los mamíferos la más emblemática es la tercera isoforma de la subfamilia TGF-beta²⁵.

La baja tensión de O₂ del hematoma de las fracturas se mantendrá hasta que el tejido cartilaginoso se transforme en hueso. El estado inductivo es corto, termina cuando las células inflamatorias aparecen en el sitio de la fractura²⁶.

3. **Inflamación.** Ella se inicia 48 horas luego del impacto y termina cuando el cartílago y el hueso aparecen. Esto se expresa, en la clínica, con el inicio y desarrollo del edema y del dolor. Las células inflamatorias forman parte de la respuesta en la consolidación desde los estados más precoces, pero su papel no ha sido muy bien estudiado, tal y como, ha sido realizado en la cicatrización. Aparecen de manera consecutiva neutrófilos, monocitos y linfocitos. Las más abundantes son polifomoronucleares, neutrófilos, macrófagos, monocitos, Linfocitos T y granulocitos los cuales migran en función inmunológica de vigilancia y los Linfocitos T y los Macrófagos/Monocitos, están presentes en la fase inicial y tardía de la consolidación, como fuente productora de factores de crecimiento²⁷.

Toda respuesta inmune, para un antígeno, requiere que el sea procesado por una célula introductora y en el caso particular de las fracturas, es el macrófago, quien presenta en su superficie antígeno HLA clase II. Este es reconocido por los Linfocitos T, quien los activa y así se continúa con la respuesta inmune. Si existe depleción de Linfocitos T, la consolidación es más lenta y débil que la normal. Los Linfocitos T son reclutados de manera selectiva en el hematoma y tejido de granulación, luego serán excluidos del área de formación del cartílago y hueso, pero están presente en el tejido fibroso de las fracturas que no consolidan y ponen sobre el tapete una pregunta ¿juegan los Linfocitos T un papel importante en las fallas de la consolidación?²⁷.

Las células inflamatorias y sobre todo las del sistema inmunitario, además de los macrófagos y las de origen mesenquimal presentes en el periostio, pueden controlar y coordinar la consolidación, por conducir a la quimiotaxis y al inicio de la respuesta proliferativa. Segregan moléculas que actúan como mensajeras entre las células, las citocinas o citoquinas. Las relacionadas con la respuesta al trauma incluyen TNF-alfa, IL-1, IL-2 y IL-6, metabolitos del ácido Araquidónico que requieren de la actividad de

la ciclooxigenasa 2 (COX2) y la síntesis de óxido nítrico (ON). Además, también se encuentran elevación de los niveles séricos de factor de agregación plaquetaria y de la actividad del complemento después del trauma agudo severo y la hemorragia¹⁹.

Estas células inflamatorias tienen efecto sobre el hígado, incrementan la velocidad de sedimentación, producen fiebre vía cerebro medio; y su efecto local consiste en: efecto quemotáctico sobre otras células inflamatorias, estimula la síntesis de matriz extracelular, la angiogénesis, reclutar células fibrogenicas endogenicas, estimular la resorción ósea y atraer más linfocitos al sitio de la lesión. También inducen la atrofia muscular e incrementan la producción de Prostaglandinas E2 (PGE2) desde el músculo. Su pico de expresión se logra a las 24 horas, se reducen durante el período de formación del cartílago y se incrementa durante la fase de remodelación^{2, 18, 19, 28, 29}.

La Interleucina-1 (antes conocida como pirógeno endógeno) es una sustancia liberada por monocitos y macrófagos y por células del sistema reticuloendotelial. Su activación deriva de la fagocitosis de desechos celulares e histiósicos, contacto con complejos inmunitarios o interacción con sustancias químicas, como las endotoxinas. Una vez liberada, circula hasta los diversos tejidos y tiene efectos intensos en el metabolismo del sistema reticuloendotelial, hígado, cerebro y músculos estriados. Es la responsable de los siguientes resultados experimentales:

- a) El incremento de las mitosis en la médula ósea y el timo, luego de fracturas de tibia y fémur. Pero este incremento no ocurre si existe otro trauma en un intervalo menor de 10 días, porque pareciera existir un período refractario. Este hallazgo ha estimulado a los cirujanos a tratar de resolver los multitrauma en una sola sesión.
- b) Incremento de los osteoclastos en la metafisis no dañada luego de la fractura.
- c) Sus efectos descienden luego de limpiar y desbridar las partes blandas del sitio lesionado y fijar las fracturas²⁸.

El factor de necrosis tumoral (TNF-alfa) (cachectina) es producida por los macrófagos. Induce la secreción de IL-1, promueve el reclutamiento de células mesenquimales, induce la apoptosis de condrocitos hipertróficos, durante la osificación endocondral y estimula la función de los osteoclastos. Su ausencia provoca retraso de la resorción del cartílago mineralizado y de esta manera no se forma hueso nuevo. El nombre de factor de necrosis tumoral se debe al hecho de que esta linfocina provoca necrosis hemorrági-

ca tumoral. Además, de que podría ser la causa principal de la emaciación que acompaña a enfermedades crónicas y cánceres^{30, 31}.

Los Factores de Crecimiento dependiente de los Fibroblastos (FGFs), es una familia, que consiste de nueve polipéptidos relacionados de manera estructural, los más abundantes son el ácido y el básico. Su acción es ejercida vía la tirocin-quinasa. Sintetizadas por monocitos, macrófagos, células mesenquimales, osteoblastos y condrocitos. Juega un papel de importancia en la angiogénesis y mitogénesis de células mesenquimales. El FGF-beta es expresado por los osteoblastos y es más potente que el FGF-alfa³².

En resumen estas citoquinas tienen efecto quemotáctico sobre otras células inflamatorias, estimulan la síntesis de matriz extracelular, estimulan la angiogénesis y reclutan células fibrogenicas al sitio de la fractura. Regulan la formación endocondral de hueso y la remodelación².

Del Ácido Araquidónico se derivan los cuatro grupos principales de eicosanoides: prostaglandinas, prostaciclina, tromboxano y leucotrienos. Las prostaglandinas han sido objeto de estudios *in Vitro* o *in vivo* para determinar su papel en el metabolismo y en la reparación ósea. Ellas son ácidos grasos, formados a partir de precursores fosfolípidicos de la membrana celular. Tienen efecto sobre los cambios vasculares y la proliferación de células osteogénicas jugando un papel muy importante en la respuesta fisiológica y patológica del esqueleto. Son potentes agonistas y pueden estimular o inhibir la resorción y la formación ósea, tal como ocurre con la Prostaglandina E2. Este efecto es por replicación y diferenciación de precursores de osteoblastos y osteoclastos y es mediado, por lo menos en parte, por el monofosfato de adenosina 3'5'^{33, 34}.

Los eicosanoides tienen especificidad histórica. Por ejemplo, el endotelio vascular convierte al ácido Araquidónico de forma principal en prostaciclina (PG2), mientras las plaquetas lo transforman sobre todo en tromboxano (TxA2). La producción de prostaglandinas es regulada por las fuerzas mecánicas, citoquinas, factores de crecimiento y hormonas sistémicas. Ellas pueden amplificar su propia producción. Su regulación está asociada con marcados cambios en la Prostaglandina G/H sintetasa inductible³³.

La producción de prostaglandinas es controlada por las ciclooxigenasas COX-1 y COX-2. Ambas son codadas por dos genes. La COX-1 es una enzima constitutiva y mantiene la homeostásis de las prostaglandinas para el cuerpo total y de manera específica para el estóma-

go, mientras que la COX2 actúa desde el punto de vista genético como respuesta al estrés (es inductiva) y responsable de la elevada producción de prostaglandinas durante la inflamación. El papel de estas enzimas en la remodelación ósea ha sido expuesto en estudios recientes, en ratas con deficiencia genética de ambas isoformas. También se ha demostrado que se requieren, en los detritos de la fractura, para inducir la osteoclastogénesis. Al inhibirlas a ambas, se reduce la producción de prostaglandinas, porque previene la conversión de ácido Araquidónico en PGG2 el precursor de la PGH2. La COX-2 es una señal crítica en el periostio, porque actúa sobre células progenitoras periósticas para la iniciación eficiente de la consolidación endocondral e intra membranosa^{35, 36}.

El óxido nítrico, es un radical libre, con efecto vasodilatador, producido en condiciones fisiológicas normales por el endotelio de todos los vasos sanguíneos, sintetizado de la L-Arginina, por la sintetasa del óxido nítrico (NOSs). Existen tres formas de sintetasa que se expresan de manera constitutiva: neural (nNOS), la endotelial (eNOS) y la inductible (iNOS). El estímulo primario para la producción de óxido nítrico, es con frecuencia el stress generado por la fuerza de fricción secundaria al flujo de sangre a través de los vasos sanguíneos. Por un mecanismo establecido, se producen de manera regular pequeñas concentraciones de óxido nítrico por las células endoteliales, neutrofilos y neuronas, lo cual parece desempeñar un importante papel en el control local del flujo sanguíneo y de la presión arterial. De la misma manera el óxido nítrico (NO) es producida por los osteoblastos y osteocitos, en respuesta al estrés mecánico sobre el hueso, que origina incremento del flujo de líquido intracanalicular y por efecto paracrino estimula la osteoblasto génesis y esta sería una de las razones por la cual se pierde hueso en el reposo o la ingravidez^{19, 37}.

Los macrófagos producen factores de crecimiento, y de manera especial, el transformador beta (TGF-b) y el derivado de las plaquetas (PDGF), ellos son importantes reguladores de la proliferación y diferenciación celular así como la síntesis de matriz extracelular, durante la consolidación. El TGF-beta, descargado por las plaquetas, es una superfamilia que incluye la proteína Morfogenética del hueso (BMP), el factor de crecimiento transformado beta (TGF-beta), factores diferenciadores del crecimiento (GDFs), activinas, inhibinas e inhibidores de la sustancia Mulleriana, por lo menos 34 miembros han sido identificados en el genoma humano².

En experimento se han encontrado los siguientes hallazgos:

- a) La TGF-beta se localiza durante las tres fases celulares críticas de la consolidación: iniciación de la reparación, condrogénesis y formación ósea.
- b) Estimula la expresión celular fenotípica y la proliferación del callo de fractura in Vitro.
- c) Estimula in vivo la proliferación de células mesenquimales y se diferenciación tanto en osteoblastos como en condroblastos, con la síntesis subsiguiente de cartílago y matriz ósea.
- d) Aparte de estimular la proliferación celular estimula la síntesis de BMP.
- e) Estimula a los osteoblastos y sus precursores a sintetizar colágeno tipo I, proteínas no colágenas como osteopontinas, osteonectina, proteoglicanos y fosfatasa alcalina. Se necesitan más estudios para elucidar el mecanismo de regulación y estabilización de la TGF-beta en condiciones fisiológicas y de consolidación, con el objetivo de proporcionar productos terapéuticos para solucionar las condiciones patológicas^{2, 38}.

En los estudios experimentales, realizados desde 1965 por M. Urist, se encontró que cuando se colocaba hueso liofilizado en contacto con 0.6 N-Acido Hidroclorídico, las células mesenquimales perivasculares eran inducidas a diferenciarse en cartílago y hueso. El mismo autor en 1979 reportó el aislamiento de una proteína de bajo peso molecular, osteoinductiva, hidrofóbica y la denominó Proteína Morfogenética del Hueso (BMP). Ella tiene actividad mitogénica, de diferenciación, quimotáctica y osteolítica. Las células osteoprogenitoras, mesenquimales, osteoblastos y condrocito la producen para un efecto paracrino sobre vecinas o un efecto autocrino³⁹.

Se han identificado más de 20 BMP, las cuales han sido divididas en por lo menos 4 grupos, todas han sido incluidas en la superfamilia TGF-B menos la BMP-1. Ellas inducen una secuencia de eventos para la condro-osteogenesis, que incluye la quimotaxis, proliferación y diferenciación de células osteoprogenitoras, angiogénesis y síntesis controlada de la matriz extracelular. Su efecto regulatorio depende del tipo de célula blanco, su estado de diferenciación, la concentración local de los ligandos peri celulares y la interacción con otros factores. El hallazgo de que el hueso es un almacén para los factores de crecimiento y que las células óseas lo producen y responden a los mismos, sugieren que ellos son un potencial determinante en la formación local del hueso^{2, 40, 41}.

Los Factores de Crecimiento Insulino Dependientes (IGFs) tienen dos formas el IGF-I (o

somatomedina-C) y el IGF-II (factor de crecimiento esquelético). Son elaboradas por la matriz ósea, células endoteliales, osteoblastos y condrocitos. Su acción biológica es modulada por una proteína ligadora (IGFBP). La IGF-I promueve la formación de matriz ósea (colágeno I y proteínas no colágenas) por los osteoblastos, es más potente que la IGF-II⁴².

En el hematoma se hacen presentes células mesenquimales embrionarias y pluripotentes, que tienen la capacidad de transformarse tanto en osteoblasto como en fibroblastos, de acuerdo al inductor que esté presente. En la serie de estudios histológicos usando anticuerpos monoclonales, se ve como las células mesenquimales migran entre las miofibrillas hacia la región fracturada. Ellas junto con las células inflamatorias forman el tejido de granulación. Durante este período aparecen los osteoclastos que comienzan a remover el hueso necrótico en la denominada etapa catabólica⁴³.

- 4. Tejido de granulación.** Las células que migran para el sitio de la lesión son pluripotenciales y se les conoce como "células madres" y tienen la capacidad de auto renovarse por un proceso de división celular asimétrica. Ellas producen un exudado que promueven la migración, mitosis y diferenciación de otras, se conocen como mesenquimales progenitoras (MCSs) y es el punto de partida para la diferenciación condro-osteogénica. Las progenitoras tienen límite finito en su capacidad para auto renovarse y de manera general pueden originar un fenotipo más diferenciado. No se tiene conocimiento acerca de todos los constituyentes de este exudado, se sabe que es rico en hialuronidato, el cual se activa cuando se agregan y promueven la migración y proliferación de las mesenquimales y endoteliales. Existe fibronectina que persiste hasta el período de inducción del tejido óseo. Una malla de fibrina resultado de la coagulación del plasma. Este tejido de granulación es el auténtico blastema de la consolidación¹⁸.

Vale la pena hacer un aparte e indicar que el término Progenitor de Tejido Conectivo, reconoce que las células que de él se derivan, no es una población pura y uniforme porque incluyen células madres pluripotentes que se pueden activar y tiene capacidad de auto renovarse. Se pueden diferenciar en hueso, tejido fibroso, grasa, músculos, cartílago y pericitos. Incluso algunos estudios con respecto a la capacidad osteogénica de los adipocitos derivados de la médula ósea son contradictorios en el sentido que la puede incrementar, la puede disminuir y no se han demostrado los marcadores de superficie característicos de las células progenitoras osteoblásticas⁴⁴.

Típico del exudado es la nueva formación de vasos por brotes. Pero se requiere que existan células muertas, mastocitos, glóbulos rojos y plaquetas, que de alguna manera, son señales orgánicas específicas que estimulan el endotelio vascular, para que proyecte su citoplasma y se inicie el proceso de reduplicación y migración. Estos nuevos vasos, con cualidades específicas, tienen la habilidad de: adherir a diferentes tipos de células recién nacidas; llevarlas a través de la membrana basal de endotelio, al sitio necesario, en la zona de reparación. En las preparaciones histológicas se pueden ver como corren paralelos uno a otros y perpendiculares a la fractura⁴⁵.

La llegada de células inmunológicas al tejido de granulación, reparador de las fracturas, ha sido estudiada con técnicas inmunohistoquímicas. Aparte de los diferentes Linfocitos T se encuentran células antigénicas como las transportadoras de molécula LA (HLA-DR, en humanos) sobre todo la de la Clase II que es el mayor complejo de histocompatibilidad. De manera normal la molécula es presentada por Linfocitos B y Células Dendríticas, pero luego de ser activadas por un antígeno foráneo y por los Linfocitos T²⁷.

Las Células Dendríticas, derivadas de la médula ósea, son poderosos mediadores de la respuesta inmune y pueden regular la inmunidad innata y la adquirida. Internalizan antígenos y los procesan, los presentan como péptidos derivados en un complejo histocompatible, para ser reconocidos por las Células T. Están relacionadas con los macrófagos provenientes de la médula y el Leucocito Pasajero que es la principal presentadora de antígeno (la de mayor significancia en los trasplantes)⁴⁶.

El tejido de granulación por su bajo pH, baja tensión de O₂ y su riqueza en enzimas proteolíticas es un medio ideal para activar TGF-beta, el cual a su vez estimulará los osteoblastos. En el tratamiento conservador, existe un estímulo permanente para que ocurra la migración celular y la formación de nuevos vasos. Los pequeños movimientos entre los huesos, genera estímulos bioeléctricos y la descarga de Prostaglandinas E₂ y Factores de Crecimiento. En un medio ambiente con todas las características señaladas con anterioridad un estado cartilaginoso comienza.

- 5. Callo blando.** Existen respuestas diferentes a nivel del tejido blando externo, el periostio, la cortical y la médula ósea y cada una de ellas participará de manera significativa en la consolidación de acuerdo a la velocidad, capacidad de llenar espacios y tolerancia a los movimientos. En este estadio el defecto a nivel de la frac-

tura esta muy vascularizado y con un incremento de células precursoras⁴⁷.

Las células mesenquimales precursoras pluripotentes (MCSs) se pueden diferenciar en cartílago, hueso y en tejido fibroso. Ellas proceden de la capa más interna del periostio (cambium), de los vasos del sistema haversiano, de las células endosteales, de las indiferenciadas de la médula ósea y las del tejido blando adyacente a la fractura. Debajo del periostio aparece nuevo hueso contiguo al defecto; y los condroblastos, reemplazan el estroma fibrovascular por condroide; en la clínica el estado de callo blando es marcado por una reducción significativa del dolor, del edema y cesa la movilidad en los extremos óseos⁴⁸.

En estudios experimentales se ha observado como, en el día tercero, se comienza a formar el callo perióstico. En este momento las células mesenquimales detienen su migración, obtienen inhibición por contacto, se condensan en los extremos óseos desprovistos de periostio o en la cápsula fibrosa del callo perióstico y en el día quinto ocurre la primera formación de cartílago. La diferenciación, tiene procedencia externa, pero ella comienza en el centro de la pérdida de sustancia. El callo periosteal y su membrana fibrosa crece solo un periodo limitado (8 o 9 días) y se detiene esperando por la maduración del cartílago, es decir hasta que esté mineralizado^{14, 48, 49, 50}.

Entre los días 9 y 11 un lecho capilar crece a través de la membrana fibrosa del periostio hasta el cartílago y se inicia la osificación endocondral. Es la osificación endocondral quien inicia el puente sobre la fractura, y no el callo perióstico, bajo dos formas un callo externo (sobre las corticales) y uno interno (en las corticales). La condrogénesis ocurre con nuevos condrocitos diferenciados, los cuales maduran en una matriz alargada y así el callo blando, es reemplazado por cartílago que une la pérdida de sustancia⁴⁹.

La opinión general en la literatura acerca de la ocurrencia de cartílago en el callo, es por el bajo PO₂, y a un suministro sanguíneo que se torna deficiente, porque el tejido de granulación crece muy rápido. Una vez que se ha diferenciado produce una sustancia que repele los vasos y por otro lado, por la alta presión hidrostática que posee, comprime los existentes. Este cartílago, si existe movimiento entre los extremos fracturados, es necesario desde el punto de vista mecánico⁵⁰.

Se discuten diferentes factores como mecánicos, eléctricos y humorales que pueden ser los que inducen a las células mesenquimales

pluripotentes para diferenciarse en cartílago y al final en hueso. Es cierto que el hueso es influenciado por los factores físicos, pero ello solo ocurre en los límites del potencial genético de las células, en el sitio de reparación y que para que ocurra la inducción y decisión de formación de nuevo tejido, la interacción molecular es decisiva. En este sentido las Proteínas Morfogenéticas del Hueso (BMP) son potentes factores de diferenciación osteocondrogénicos y ello ha sido demostrado en ratones transgénicos (BMP-2+/- y BMP6-/-) en los cuales la osificación endocondral, pero no la intramembranosa, fue detenida luego de fractura femoral^{51, 52}.

El movimiento entre los fragmentos es el punto de partida para que las células mesenquimales migren desde los músculos vecinos y vasos, al igual que las inflamatorias con antígenos presentes. La formación de cartílago comienza en los puntos estables y en los extremos óseos y se ensancha hacia afuera. Este ensanchamiento le confiere al hueso una propiedad mecánica que le incrementa la fortaleza por arriba de los niveles previos a la fractura. La viscoelasticidad del callo (debido a su contenido del cartílago) hace la consolidación posible, aun soportando peso⁵³.

En resumen, el callo primario de respuesta, no es más que la proliferación de un comité celular, tanto en endostio como en el periostio, que produce hueso membranoso en el periostio, de corta duración. Por otro lado el callo inductivo o externo, se deriva del tejido circundante formado por células mesenquimales pluripotentes con potencial condrogénico, que en su momento serán estimuladas para que formen hueso en onda endocondral. Es conocido que la cantidad de cartílago es mayor en animales pequeños que en los grandes. El colágeno tipo III que está presente en el área de células mesenquimales es cambiado a tipo II en el cartílago diferenciado. Hasta ahora se conocen las respuestas celulares en periostio y en el canal medular, pero poco a nivel cortical^{12, 13, 53}.

6. **Callo duro.** Los osteoblastos sintetizan una nueva matriz ósea, ellos están localizando adyacentes al sitio de la fractura y debajo del periostio proliferado. El hueso formado, en onda, lo hace sin la intermediación de cartílago, en un proceso que culmina en la formación de hueso lamelar, que de alguna manera recapitula la osificación intramembranosa. El área subperióstica de formación determina el origen del callo duro. Sin embargo, en fracturas inestables con defectos, la formación de vasos óseos es detenida o limitada y las células progenitoras mesenquimales toman la ruta endocondral^{54, 55}.

Por otro lado ocurre la osificación endocondral, en una transición de diferentes tipos de tejidos. Los condrocitos hipertrofiados son invadidos por vasos sanguíneos y células multinucleadas, especializadas en la resorción celular, como los osteoclastos y condroclastos. El callo blando o cartilaginoso es convertido por osificación endocondral, en hueso ondulado, cuando finaliza este proceso se considera que la fractura esta consolidada, pero, es la cantidad de cartilago y la duración de la fase cartilaginosa, quienes determinan en cuanto tiempo ocurrirá la consolidación de los huesos largos. La formación de hueso endocondral ocurre vía capilares que se originan del tejido circundante y del periostio, es muy similar a lo que ocurre a nivel de la zona de crecimiento de los huesos longitudinales. La arquitectura del hueso trabecular en onda refleja la nueva orientación de los capilares creado durante el proceso. Por ser una secuencia bien programada algunos autores han sugerido que la remoción de los condrocitos, en esta etapa, obedece una secuencia de muerte celular programada^{18, 49, 56, 57}.

El cartilago se forma en un medio avascular y el hueso en un medio vascularizado, pero los vasos juegan un papel mucho mas importante que la de suministradores de sangre en el sitio de la reparación. En un estudio con microscopio electrónico, se evidenció en las etapas precoces del callo duro, que células endoteliales, reticulares y mesenquimales polimórficas, pudieran estar interrelacionadas con algunas osteoprogenitoras y transformarse en osteoblastos⁵⁸.

La proliferación de osteoblastos periostales ocurre de manera muy rápida luego de la fractura, con la presencia de vasos que crecen desde la musculatura hacia el periostio, porque cuando estos vasos son cortados, la proliferación perióstica no aparece o es mínima. Cuando se han cultivado paredes de arteria aorta se ha encontrado que endotelio contiene un factor de crecimiento, Factor de Crecimiento Vascular Derivado de las Células Endoteliales (VEGF), que evidencia una vez la relación que existe entre vascularización y consolidación. Dos vías regulan de manera separada la angiogénesis: la del VEGF y la de la angiopoyetina. El VEGF es esencial para la neo angiogénesis y los mitógenos específicos para las células endoteliales, mientras que la angiopoyetina 1 y 2 se relaciona con la formación de grandes vasos y sus ramas^{59, 60}.

Los factores beta y derivados del crecimiento estimulan a los osteoblastos a sintetizar colágeno tipo I y osteopontina, una proteína que aumenta la fijación de células que reabsorben hueso. Además existe un tipo de osteoblasto

que produce hueso en onda y otro hueso lamelar, con una matriz osteoide completamente diferente. Estudios histomórficos han revelado que si solo los osteoblastos preexistentes tuvieran que actuar para consolidar un fractura del fémur, el proceso tomaría entre 200 y 1000 años. Esto se debe al hecho de lo corto de su vida funcional (2 o 3 meses) y para que pueda existir una exitosa y pronta consolidación se necesita que se incremente, esto hace obligatorio la presencia de mecanismos mediadores, que puedan estimular el reemplazo de los exhaustos osteoblastos, por nuevos, durante el proceso de consolidación^{61, 62}.

Luego de sintetizada la matriz comienza la mineralización. En este momento la Interleucina I estimula a las células cartilaginosas para que segreguen proteasas y fosfatasas. Las proteasas degradan el colágeno y así preparar la matriz para la calcificación; mientras que las fosfatasas proporcionan el Ion fosfato, que precipita el calcio entregado por las mitocondrias del condrocito hipertrófico y origina el cartilago calcificado. No puede existir el depósito de calcio, si el colágeno no es modificado de manera bioquímica. Concluye unas semanas después con la formación del callo de fractura, es posible diagnosticarlo en las radiografías por su contenido en calcio, tiene una duración entre 4 y 16 semanas. Su ocurrencia es más lenta en adulto que en niños y en hueso cortical que en esponjoso; y su orientación de forma usual ignora la dirección del peso y fuerzas mecánicas locales¹⁴.

Fallas de la consolidación, puede que sean debidas a anomalías en el proceso activación-organización-diferenciación, más que por tratamientos inadecuados o fallas en los osteoblastos existentes. Los mediadores son importantes para decir, cuantos osteoblastos (más que osteoclastos), se deben presentar en el sitio de la fractura, es decir, si falla este mecanismo fallará la consolidación. En otras palabras una fractura que consolida con cuatro veces más callo, que otra similar, es porque ha producido más capilares, osteoblastos y células de soporte, que trabajan mas rápido en el evento final⁶².

7. **Remodelación.** Cuando se termina la formación del callo duro, la resorción ósea y la remodelación vagan en la superficie cortico-endosteal y perióstica, será muy completa en niños y adolescentes pero nunca en adulto. Se cambia el hueso en onda en hueso lamelar, al reemplazarlo se transforma en un elemento que desde el punto de vista mecánico es capaz de soportar las cargas y finaliza removiendo el callo dentro de la cavidad medular para permeabilizarla. En la resorción intervienen las proteínas no colágenas osteocalcina y osteopontina; la Interleucina

l y el factor estimulador de colonias de macrófagos (M-CSF). En el proceso de consolidación, la remodelación ocurre en dos etapas, una para remover el callo blando cartilaginoso y la otra el callo óseo duro^{61, 63}.

Este proceso es factible realizarlo gracias a la llamada Unidad Básica Multicelular de Remodelación (BMU) que consiste en un mecanismo mediador particular que contiene células, material intercelular y capilares, todos organizados en tiempo espacio y comunicados entre sí⁶¹.

La BMU produce en primer lugar osteoclastos y condrocitos que se encargan de remover el tejido duro preexistente, a continuación se hacen presente los osteoblastos que se encargan de producir nuevo hueso, en una secuencia estereotipada, resorción-formación, que consume 3 o 4 meses por BMU. Hoy en día no se sabe, con exactitud cual es la señal que en un momento determina que el cartílago mineralizado se transforma en hueso en onda y éste en lamelar. Pareciera que los osteoclastos que reabsorben hueso en onda, dejan una señal bioquímica, que le suministra instrucciones a un determinado tipo de osteoblasto para que produzcan hueso lamelar 43.

El proceso de remodelamiento a nivel esponjoso conduce a la orientación de las trabéculas, para que sean capaces de soportar cargas mecánicas. El estímulo proviene de los músculos, al recuperar la actividad física^{17, 62}.

Cuando se ha tratado de adaptar el conocimiento de los pasos del proceso de consolidación a los procedimientos terapéuticos, se ha generado una controversia entre tratamiento incruento y la experiencia con nuevos métodos quirúrgicos. Las escuelas que defienden el tratamiento incruento señalan que el objetivo es mantener la configuración externa del miembro, prevenir que los fragmentos óseos se muevan de manera exagerada y por el contrario mantengan discreta movilidad, se froten entre ellos y generen estímulos bioeléctricos, repitan el daño inicial y mantengan el exudado hasta que las señales moleculares de las partes blandas cesen^{64, 65}.

Los defensores del tratamiento incruento señalan que cuando se usan procedimientos invasivos, se pierde el suministro vascular y que para ganar estabilidad, han pasado muchos años para conseguir un implante que llene las altas demandas de seguridad y que garanticen la inmovilidad absoluta en el foco de fractura. Terminan señalando que la fijación interna altera la consolidación natural de manera significativa, con poco callo y proliferación de osteoblastos y una exagerada remodelación⁶⁶. Hoy en día se ha iniciado una corriente intermedia, es decir, intervenir de manera quirúrgica la fractura pero respetando la consolidación natural y ello es posible

con el enclavamiento endomedular. Con la destrucción del canal medular y parte de la cortical, con el fresado, se estimula el medioambiente para la penetración vascular y la osteogénesis periosteal, se descartan factores de crecimiento desde el hueso y si a esto se suma el apoyo precoz los resultados han mostrado ser superiores⁶⁷.

En los casos de fracturas muy complejas se ha preconizado la asociación del tratamiento quirúrgico, con "reducción indirecta" o la llamada "placa biológica" o "cirugía invasiva mínima", que no es más que la cirugía diferida para luego de 10 días de haber ocurrido la fractura, en el momento en que el tejido de granulación se está preparando para transformarse en callo blando. El cirujano al colocar el implante respeta las partes blandas y el foco de fractura, al distraerlo y restaurar la longitud, de esta forma estimula de manera secundaria el tejido blando circundante, se reinicia la descarga de mediadores bioquímicos y este ha proporcionado resultados clínico radiológicos muy alentadores⁶⁸.

La transformación del conocimiento de los pasos de la consolidación ha sido base para identificar una serie de factores, que en un tiempo muy corto permitirá encontrar alternativas terapéuticas para problemas de patología del esqueleto relacionados o no con las fracturas.

BIBLIOGRAFÍA

1. Nieto E. Aspectos actualizados de la consolidación de las fracturas. Revista de la Sociedad Médica del Hospital San Juan de Dios. 1997;18: 28-34.
2. Tsiroidis E., Upadhyay N., Giannoudis P. Molecular aspect of fracture healing: Which are the important molecule? INJURY.2007;3851:S11-S25.
3. Conolly J. Common avoidable causes of nonunion. Clin Orthop. 1985. 194:226-35.
4. Sarmiento A. Latta LL. Functional fracture bracing. Heidelberg. Springer. 1995.
5. Kanezler J.M., Oreffo ROC. Osteogenesis and angiogenesis: The Potential for engineering bone. European Cell and Minerals.2008;15:110-14.
6. Kasper G., Dankert N., Tuischer J., Hoeff M., et al. Mesenchymal Stem cells Regulate Angiogenesis According to Their Mechanical Environment Stem Cells. 2007. 25(4): 903 –10.
7. Kelly P.J., Bronk J.T. Circulation, blood flow, and interstitial fluid flow in fracture healing. Bone formation and Repair. American Academy of Orthopedic Surgeon.1994.197-209.
8. Ball S.G., C. Shuttleworth A., Kielty C.A. Vascular endothelial growth factor can signal through platelet-derived growth factor receptors. J. Cell Biol. 2007. 177(3): 489–500.
9. McKibbin B. The biology of fracture healing in long bones. J. Bone Joint Surg. 1978. 60B:150-62.
10. Shapiro F. Bone development and its relation to fracture repair. The role of Mesenchymal osteoblast and surface osteoblast. European Cells and Material. 2008. 15:53-76.
11. Tsiroidis E., Giannoudis P.V. Transcriptomic and proteomics: Advancing the understanding of genetic basis of fracture healing. INJURY. 2006. 375:S13-S19.
12. Schenk R., Willenegger H. Zur histologies der primären knochenheilung. Langebecks Arch Klin Chir.1964;308:440-52.
13. Frost H.M. The biology of fracture healing. An overview for clinician. Clin. Orthop. 1989. 248:294-309.
14. Einhorn T.H. The cell and molecular biology of fracture healing. Clin. Orthop.1998;355S:S7-S21
15. Wrotniak M., Bielecki T., Gazdzik T.S. Current opinion about using the platelet-rich gel in orthopedics and trauma surgery. Ortop. Traumatol Rehabil. 2007 May-Jun. 9(3):227-38.

16. Muschler G.F., Midura R.J. Connective tissue progenitors: practical concepts for clinical applications. *Clin. Orthop. Relat. Res.* 2002. 395:66-80.
17. Schindeler A., McDonald M.M., Bokko P., Little D.G. Bone remodeling during fracture repair: The cellular picture. *Semin Cell Dev Biol.* 2008. Jul 25.
18. Gruber R., Koch H., Doll B.A., Tegmeier F., Einhorn T.A., Hollinger J.O. Fracture healing in the elderly patient. *Experimental Gerontology.* 2006;41:1080-93.
19. Hukkanen M., Hughes F.J., Buttery L.D., Gross S.S., et al. Cytokine-stimulated expression of inducible nitric oxide synthase by mouse, rat, and human osteoblast-like cells and its functional role in osteoblast metabolic activity. *Endocrinology.* 1995 Dec. 136(12):5445-53.
20. Mathias P.G., Bostrom M.D., Asni B.A. Transforming Growth Factor Beta in fracture repair. *Clin. Orthop. Rel. Res.* 1998. 355S: S124-S131.
21. Barnes G.L., Kostenuik P.J., Gerstenfeld L.C., Einhorn T.A. Growth factor regulation of fracture repair. *J Bone Miner. Res.* 1999. 14:1805-15.
22. Tokunaga A., Oya T., Ishii Y., et al. PDGF receptor beta is a potent regulator of Mesenchymal stromal cell function. *J Bone Miner Res.* 2008 Sep. 23(9):1519-28.
23. Ball S.G., Shuttleworth C.A., Kielty C.M. Vascular endothelial growth factor can signal through platelet-derived growth factor receptors. *J Cell Biol.* 2007 May 7. 177(3): 489-500.
24. Andrew J.G., Hoyland J.A., Freemont A.J. Platelet-derived growth factor expression in normally healing human fractures. *BONE.* 1995;16:455-60.
25. Ripamonti U., Ramoshebi L.N., Teare J., Renton L., Ferretti C. The induction of endochondral bone formation by transforming growth factor-beta(3): experimental studies in the non-human primate *Papio ursinus*. *J Cell Mol Med.* 2008 Jun. 12(3):1029-48.
26. Bab I.A. Regulatory role of osteogenic growth peptide in proliferation, osteogenesis, and hemopoiesis. *Clin Orthop Relat Res.* 1995. 313:64-8.
27. Andrew J.G., Andrew S.M., Freemont A.J., Marsh D.R. Inflammatory cells in normal human fracture healing. *Acta Orthop Scand.* 1994 Aug. 65(4):462-6
28. Einhorn T.A., Majeska R.J., Rush E.B., et al. The expression of cytokine activity by fracture callus. *J Bone Miner Res.* 1995. 10:1272-81.
29. Kant T., Cho T., Aizawa T., et al. Expression of Osteoprotegerin Receptor Activator of NF-B Ligand (Osteoprotegerin Ligand) and related Proinflammatory Cytokines during fracture healing. *J Bone Miner. Res.* 2001. 16:1004-14.
30. Gerstenfeld L.C., Cho T.J., Kon T., et al. Impaired fracture healing in absence of TNF-alpha signalling: the role of TNF-alpha in endochondral cartilage resorption. *J Bone Miner. Res.* 2003. 18:1584-92.
31. Lehmann W., Edgar C.M., Wang K., Cho T.-J., Barnes G.L., Kakar S., Graves D.T., Rueger J.M., Gerstenfeld L.C., Einhorn T.A. Tumor necrosis factor alpha (TNF- α) coordinately regulates the expression of specific matrix metalloproteinases (MMPs) and angiogenic factors during fracture healing. *Bone*, 2005; 36:300-310
32. Wang J.S. Basic fibroblast growth factor for stimulation of bone formation in osteoinductive or osteoconductive implants. *Acta Orthop. Scand.* 1996. 269:1-33.
33. Kawaguchi H., Pilbeam C.C., Gronowicz G., Abreu C., Fletcher B.S., Herschman H.R., Raisz L.G., Hurley M.M. Transcriptional induction of prostaglandin G/H synthase-2 by basic fibroblast growth factor. *J Clin Invest.* 1995 Aug;96(2):923-30.
34. Zhang X., Schwarz E.M., Young D.A., J. Puzas J.E., et al. Cyclooxygenase-2 regulates Mesenchymal cell differentiation into the osteoblast lineage and is critically involved in bone repair. *J Clin Invest.* 2002. 109(11): 1405-15.
35. Simon A.M., Manigrasso M.B., O'Connor J.P. Cyclo-Oxygenase 2 function is essential for bone fracture healing. *J Bone Miner Res.* 2002. 17:963-76.
36. Xie C.H., Ming X., Wang Q., Schwarz E.M., et al. COX-2 from the injury milieu is critical for the initiation of periosteal progenitor cell mediated bone healing. *BONE.* 2008.
37. Watanuki M., Sakai A., Sakata T., Tsurukami H. et al. Role of inducible Nitric Oxide Synthase in skeletal adaptation to acute increase in mechanical loading. *J Bone. Miner. Res.* 2002. 17:1015-25.
38. Bostrom M.P.G., Asni P. Transforming growth factor beta in fracture repair. *Clin. Orthop. Relat. res.* 1998. 355S:S124-S131.
39. Reddi A.H. Initiation of fracture repair by bone morphogenetic proteins. *Clin. Orthop. Rel. Res.* 1998. 355:S66-S72.
40. Groeneveld E.H.J., Burger E.H. Bone morphogenetic proteins in human bone regeneration. *European Journal of Endocrinology.* 2000. 142:9-21.
41. Dimitrius R., Tsidis E., Giannoudis P.V. Current concepts of molecular aspects of bone healing. *Injury.* 2005. 36:1392-1404.
42. Solheim E. Growth factors in bone. *Int. Orthop.* 1998. 22:410-16.
43. Schindeler A., McDonald M.M., Bokko P., Little D.G. Bone remodeling during fracture repair: The cellular picture. *Semin. Cell Dev Biol.* 2008.
44. Petterson T.E., Kumagai K., Griffith L., Muschler G.F. Cellular strategies for enhancement of fracture repair. *J Bone Joint Surg.* 2008. 90:111-19.
45. Schor A.M., Canfield A.E., Sutton A.B., Arciniegas E., Allen T.D. Pericyte differentiation. *Clin Orthop Relat Res.* 1995. (313):81-91.
46. Chen J., Namiki S., Toma-Hirano M., Miyatake S., et al. The role of CD11b in phagocytosis and dendritic cell development. *Immunology Letters.* 2008. 120: 42-48.
47. Carter D.R., Beaupré G.S., Giri N.J., Helms J.A. Mechanobiology of skeletal regeneration. *Clin Orthop Relat Res.* 1998. 355S:S41-S55.
48. Shapiro F. Bone development and its relation to fracture repair. The role of Mesenchymal osteoblast and surface osteoblast. *European Cells and Material.* 2008. 15:53-76.
49. Einhorn T.A. The science of fracture healing. *J Orthop Trauma.* 2005. 19:S4-S6.
50. Lee F.Y., Choy Y.W., Behrens F.F., et al. Programmed removal of chondrocytes during endochondral fracture healing. *J Orthop Res.* 1998. 16:144-50.
51. Cho T.J., Gerstenfeld L.C., Einhorn T.A. Differential temporal expression of members of transforming growth factor beta super family during murine fracture healing. *J Bone Miner. Res.* 2002. 17:513-21.
52. Kugimiya F., Kawaguchi H., Kamekura S., Chikuda H. et al. Involvement of endogenous bone morphogenetic protein (BMP)2 and BMP6 in bone formation. *J Bio. Chem.* 2005. 280:35704-12.
53. Perren S.M., Rahn B.A. Biomechanics of fracture healing. *Can J Surg.* 1980 May. 23(3):228-32.
54. Urist M.R., Adams T. Cartilage or bone induction by articular cartilage. Observations with radioisotope labeling techniques. *J Bone Joint Surg Br.* 1968 Feb. 50(1):198-215.
55. Gruber R. Cornell C.N., Lane J.M. Newest factors in fracture healing. *Clin Orthop Relat Res.* 1992 Apr. (277):297-311.
56. Hulth A. Fracture healing—more biology than mechanics. *Clin Orthop Relat Res.* 1981 May. (156):259-61.
57. Choi C., Ogilvie Z. Thompson T. Miclau and J.A. Helms. Cellular and molecular characterization of a murine non-union model. *J. Orthop. Res.* 22 (2004), pp. 1100–1107.
58. Brighton C.T., Hunt R.M. Early histological and ultra structural changes in medullary fracture callus. *J Bone Joint Surg.* 1991. 73A:832-47.
59. Trueta J., Cavadias A.X. Vascular changes caused by the Küntscher type of nailing; an experimental study in the rabbit. *J Bone Joint Surg Br.* 1955 Aug. 37-B(3):492-505.
60. Ferrara N., Davis-Smyth T. The biology of vascular endothelial growth factor. *Endocrin. Rev.* 1997;18:4-25.
61. Kanczler J.M., Oreffo R.O.C. Osteogenesis and angiogenesis: The potential for engineering bone. *European Cell and Material.* 2008. 15:1000-14.
62. Frost H.M. Bone remodeling dynamics. Springfield Il, Charles Thomas. 1963.
63. Frost H.M. The mechanostat: A proposed pathogenic mechanism of osteoporoses and the bone mass effects of mechanical and no mechanical agent. *Bone Miner.* 1987;2: 73-85.
- 64.
- 65.
- 66.
- 67.
68. Baron R. The cellular basis of bone resorption: Cell biology of the osteoclast. *Bone Formation and Repair.* 1994. American Academy of Orthopedic Surgeon. 247-52.
69. Sarmiento A. Latta LL. Functional fracture bracing. Heidelberg. Springer. 1995.
70. Karlstrom G., Olerud S. Fractures of the tibial shaft: A critical evaluation of treatment alternatives. *Clin Orthop.* 1974; 105:82-88
71. Mast J., Jacob R.O., Ganz R. Planning and reduction technique in fracture surgery. Berlin. Springer Verlag. 1989 Kessler et al 1986,
72. Kinast C., Bolhofner B.R., Mast J.W., Ganz R. Subtrochanteric fractures of the femur. *Clin Orthop.* 1989. 238: 122-30.