

Aplicación de médula ósea autóloga por vía percutánea como inductor de la osteogénesis. Modelo experimental en perros

Myr. M.C. Arturo Tirso Cepeda,* Myr. M.C. Gustavo Miguel Azcona Arteaga,* Tte. Cor. M.C. Oscar del Angel Guevara,** Tte. Cor. M.C. Alejandra Zárate Osorno,*** Gral. de Bgda. M.C. Alberto Gómez del Campo López

Escuela Militar de Graduados de Sanidad y Hospital Central Militar. Ciudad de México

RESUMEN. Se realizó un estudio experimental, comparativo, observacional y analítico de enero a mayo de 1997, fue realizado con la utilización de diez perros híbridos, formando dos grupos, control y estudio, se les realizó una osteotomía en la tibia y se les colocó un fijador externo AO/ASIF. Fueron valorados a las cuatro y diez semanas clínica, radiológicamente e histopatológicamente, aplicando al grupo de estudio a la sexta semana médula ósea autóloga por vía percutánea en el foco de la osteotomía, los resultados mostraron que en cinco (100%) del grupo de estudio hubo formación de hueso en el sitio de la osteotomía y sólo en un perro del grupo control (20%). Se sabe que la formación de tejido óseo en el sitio de aplicación de la médula ósea es debida a la capacidad de diferenciación de las células tronco-totipotenciales de la MO, gracias a la acción de las proteínas morfogenéticas que están en la matriz ósea del hueso, que al momento de sufrir el cambio en su microambiente, se presentan los estímulos que originan que estas proteínas sean liberadas e intervengan en la diferenciación de las células tronco totipotenciales del estroma de la médula ósea.

Palabras clave: médula ósea, fractura, consolidación, osteotomía.

SUMMARY. This is an experimental, comparative, observational and analytic study. This was made in Mexico city from January to May of 1997. Ten hybrid dogs were divided in two groups, study and control; an external fixator AO/ASIF was applied in the mid third of the tibia, and an osteotomy was carried out. Dogs were observed along the study, with clinical, radiological and histopathological controls, the analysis was made at fourth and tenth weeks. On the study group in the sixth week percutaneous autologous bone marrow was applied in the osteotomy focus. The results demonstrated bone formation in all dogs of the study group (100%) and only in one dog (20%), of the control group. It is known that the bone formation is related to the differentiation capacity of the bone marrow stem cells, due to the morphogenetic protein action and to the changes in the microenvironment originated by trauma, the released proteins and related stem cells differentiation for bone formation.

Key words: bone marrow, fracture, osteotomy, bone healing.

Una complicación importante en la evolución de las fracturas son los llamados trastornos de la consolidación; la *consolidación lenta, retardada, pseudoartrosis y consolidación viciosa*.

La consolidación de las fracturas se realiza habitualmente en plazos bien establecidos para cada tejido óseo, cuando este plazo se alarga de forma anormal se considera un retraso en la consolidación y cuando no se produce la consolidación se denomina pseudoartrosis.^{11,27,32,38}

Al momento de la solución de continuidad de un hueso se presenta una cascada de acontecimientos que se inicia con la presencia de un hematoma en el foco de fractura con la sangre proveniente de los vasos medulares, haversianos, de Volkman, del periostio y de los tejidos adyacentes, formando posteriormente un coágulo que se organiza sobre la base de un tejido conjuntivo en el periostio, así los osteocitos que están situados en su laguna, pierden la irrigación

* Cirujano Ortopedista adscrito a la Sala Ortopedia Sur Hospital Central Militar (HCM). México.

** Médico Hematólogo Jefe del Servicio de Hematología del HCM. México.

*** Médico Patólogo Jefe del Servicio de Histopatología del HCM. México.

**** Médico Radiólogo Jefe del Servicio de Radiodiagnóstico del HCM. México.

Correspondencia:

Myr. M.C. Arturo Tirso Cepeda
Escuela Militar de Graduados de Sanidad
Avenida Presidente Juárez No. 16 Edificio «A» No. 401.
Colonia Puente de Vigas Tlalnepanltla Estado de México C.P. 54090
Tel. 5557-31-00 Ext. 1266

sanguínea a una distancia de algunos milímetros del lugar de la fractura y posteriormente mueren; por consiguiente siempre existen poco después de la lesión un anillo de hueso avascular en cada superficie de la fractura. Los segmentos de ese hueso avascular pueden ser sustituidos por hueso vivo. Durante las primeras fases de curación de la fractura, la explosión masiva de células endoteliales vasculares y más tarde osteogénicas, determina un crecimiento acelerado de tejido óseo. Al final de la segunda semana el callo de fractura se compone de una gruesa masa de tejido osteogénico, en esta fase el callo no tiene hueso mineralizado y, por tanto es radiolúcido y no apreciable por radiografía. El callo de fractura se endurece progresivamente de acuerdo a la mineralización del hueso. Las células endoteliales se diferencian en osteoblastos con la consecuente formación de hueso. Hacia la cuarta semana se modela la cavidad medular hasta entonces ocupada por tejido conjuntivo de organización y es cuando el callo de la fractura ha adquirido la solidez necesaria no existiendo movimiento en el lugar de la fractura, la exploración radiográfica muestra un callo óseo incipiente y todavía se observa la línea de fractura. De las 6 a las 8 semanas el callo primario o temporal es sustituido gradualmente por tejido laminar maduro, el callo excesivo se reabsorbe progresivamente.^{32,38}

Los procedimientos para la corrección de los retrasos en la consolidación y la pseudoartrosis son recomendados una vez que se ha demostrado en forma clínica y radiológica la existencia de esta patología, cuando se ha identificado que de no haber estímulo en la consolidación ésta no se llevará a cabo.

En general el tratamiento de las pseudoartrosis se dificulta a medida que se agregan complicaciones como infección, deformidad, angulaciones, defectos óseos u otras patologías asociadas.

El manejo habitual se basa en realizar una cura adecuada obteniendo una reducción óptima de la fractura, legrado de los bordes, estabilización de la misma y aplicación de injertos óseos suficientes. Para la estabilización de los fragmentos se podrá usar de acuerdo con la situación, placas, tornillos interfragmentarios, fijadores externos y clavos centro-medulares con o sin bloqueo, estos métodos proporcionan estabilidad suficiente que permiten ejercicios activos y pasivos estimulando la consolidación ósea y la rehabilitación. Se han utilizado como métodos alternativos la estimulación eléctrica y electromagnética.^{11,27,30,32}

Se han utilizado nuevas alternativas para la corrección de defectos óseos entre los cuales se ha utilizado el aspirado de médula ósea (MO) en donde se ha descubierto la importancia fundamental que tienen las poblaciones celulares osteogénicas en la reparación ósea y en la incorporación de injertos.^{1,2,5,7,14,15,20,22,24}

Múltiples estudios han probado que la MO posee células capaces de diferenciarse para formar células osteogénicas, por lo que varios autores han realizado investigaciones usando modelos experimentales en los que se ha observado osteogénesis con la aplicación de médula ósea en forma aislada

o utilizando algún osteoconductor, como son: matriz ósea desmineralizada, cerámica, xenoinjertos, etc.^{1,2,5,14,15,20,22,24}

Gran parte de la actividad osteoblástica se debe a la acción de la llamada proteína morfogenética derivada de la proteína no colágena de la matriz ósea llamada osteogenina, que se cree que es la responsable de los mensajes químicos para la remodelación y la reparación del tejido óseo, se ha aislado por medios químicos de la matriz ósea de bovinos, fragmentando la osteogenina en varias proteínas con actividad independiente, siendo realmente un grupo de siete proteínas, denominadas BMP (bone morphogenetic proteins) de una uno a la siete (BMP-1, 2, 3 etc.), y recientemente ha sido sintetizada en laboratorio por medio de clonación, se ha encontrado además en otros tejidos como son: periostio, pericondrio y el cartílago. Estas proteínas estimulan la formación de tejido, además de la formación de tejido cartilaginoso. Su blanco de acción son la células tronco del estroma de la médula ósea y algunas otras células del tejido conjuntivo ya que se ha visto que estas proteínas estimulan la formación de hueso y cartílago en otros tejidos diferentes al hueso (heterotrópico), en este proceso intervienen múltiples factores entre los principales encontramos: 1) factor de crecimiento beta, 2) factor de crecimiento de los fibroblastos, 3) factor I de crecimiento semejante a la insulina y 4) factor de crecimiento derivado de las plaquetas,^{4,19,30,31,35,39} realizando su función por medio de quimiotaxis, mitosis y diferenciación hacia líneas celulares osteoblástica y cartilaginosa, como respuesta a los estímulos hormonales, físicos y al trauma.^{7,18,21,25,29,38}

Se ha observado que la capacidad de osteogénesis de la médula ósea depende de la presencia de células tronco totipotenciales capaces de diferenciarse en caso necesario para formar distintas líneas celulares, hematopoyéticas u osteoblásticas así como células del estroma.^{7,12,14,15}

Las células tronco se encuentran junto con el estroma, que proporciona un medio indispensable para la diferenciación celular cuando hay necesidad de reemplazar células que terminan su vida, migran o son destruidas. Además tienen la capacidad de regenerarse a sí mismas y como se ha dicho en otras líneas celulares (osteoblastos, fibroblastos, adipocitos y células hematopoyéticas), entre las cuales son los osteoclastos que son derivadas de las células tronco al igual que los macrófagos, estos últimos se diferencian gracias a la acción del factor estimulante de los macrófagos, participando en la remodelación del hueso con la intervención de la 1,25 dihidroxi vitamina D 3 y a estímulos por: 1) interleucina 1,6 y 11, 2) hormona paratiroidea, 3) prostaglandinas, 4) factor inhibidor de la leucemia.^{3,13,19}

Con base en los estudios realizados, Conolly, Green, e Iyoda, que realizaron modelos experimentales en animales creando defectos óseos y colocando MO sola o combinada con algunos osteoconductores como la cerámica, matriz ósea desmineralizada, hidroxiapatita etc., en los que obtuvieron tejido óseo en todos los estudios reportados, Conolly, Kumar y Wintroub en los EUA, Sharma en la India y algunos otros en Europa del Este, se ha utilizado este proce-

dimiento en el tratamiento de los retrasos en la consolidación, así como en el manejo de la pseudoartrosis congénita de la tibia y en el tratamiento de quistes óseos. Connolly con una experiencia de más de diez años la ha utilizado fundamentalmente en los retrasos de la consolidación de las fracturas de la tibia y en fracturas expuestas y en sus más recientes estudios ha utilizado material centrifugado de médula ósea aplicándola directamente sobre pseudoartrosis del escafoides, reportando resultados preliminares alentadores.^{8-10,17,40,41}

Material y métodos

El estudio se realizó en el Departamento de Ortopedia y Traumatología, en el Laboratorio de Cirugía Experimental y en el Laboratorio de Histopatología del Hospital Central Militar de enero a mayo de 1997, realizándose procedimientos quirúrgicos a 10 perros híbridos de más de 20 kg seleccionados al azar, los cuales se formaron en dos grupos de cinco cada uno, el grupo control y el grupo de experimentación. El procedimiento se llevó a cabo mediante anestesia general con pentotal sódico a dosis de 30 mg/kg de peso por vía intravenosa con el animal ointubado, canalizado y monitorizado por un veterinario; con método estéril, se realizó una osteotomía en el tercio medio de la tibia derecha de los perros con osteótomos y martillo, resecando los bordes o aristas con gubia fina en caso de ser necesario para poder realizar posteriormente en la colocación del fijador externo una diastasis. A continuación en el mismo acto quirúrgico se colocó un fijador externo AO/ASIF a todos los animales con la técnica recomendada por la AO. Dejando de manera intencional una diastasis de los bordes del hueso de aproximadamente 0.5 mm e interposición de tejido celular subcutáneo tomado del mismo perro durante el procedimiento.

Posteriormente a las cuatro semanas se realizó una biopsia a cielo abierto del foco de la osteotomía a todos los animales de ambos grupos tomando una muestra representativa del foco de la osteotomía de aproximadamente 0.5 x 0.5 cm que se incluyó en un frasco estéril con formol al 10% y se envió ese mismo día la muestra al laboratorio de Histopatología para su estudio, se utilizó la técnica de tinción de hematoxilina y eosina (HyE). En ese mismo tiempo fue tomada una radiografía antero-posterior y lateral a todos los animales de experimentación; además se realizaron pruebas de movilidad del foco de la osteotomía, realizando maniobras de valgo, varo, antecurvatum y recurvatum forzados. Después de 2 semanas, al grupo de estudio mediante técnica estéril y con asesoría de un hematólogo le fue tomada médula ósea de la cresta ilíaca derecha con una aguja de Vim-Silverman y jeringa de plástico de 10 cc una cantidad de 3 a 4 cc de médula ósea, la cual en ese mismo tiempo fue colocada en el foco de la osteotomía con ayuda de un catéter venoso No. 16, localizando este último mediante control fluoroscópico.

El último paso fue a las 10 semanas con la toma de con-

trol radiológico y toma de biopsia a los perros de ambos grupos con la misma técnica mencionada con anterioridad (4 posteriores a la aplicación de MO al grupo de estudio), dicho estudio fue enviado y conservado como se describe en los párrafos anteriores, asimismo se valoró la presencia de movilidad en la extremidad operada.

Resultados

Los resultados obtenidos en el estudio radiológico fueron valorados de acuerdo con la formación o no de callo óseo, el estudio histopatológico se enfocó a la presencia de tejido óseo, tejido fibroso y otras células presentes en las muestras, reportándose de manera cuantitativa (*Cuadros 1 y 2*) y la última variante considerada fue la movilidad del foco de la osteotomía al realizar movimientos forzados de varo, valgo ante y recurvatum.

El estudio radiológico mostró en todos los perros de ambos grupos (10 en total) en la cuarta (4a.) semana, la ausencia de imagen de callo óseo, en la décima (10a.) semana en el grupo control se encontró la ausencia de consolidación de la osteotomía en cuatro casos con formación en tres casos de un callo hipertrófico, un caso con formación de callo tipo hipotrófico y el último de este grupo con consolidación de la osteotomía con un callo

Cuadro 1. Se muestran los diferentes tejidos encontrados en el estudio histopatológico realizado, de la primera biopsia tomada a ambos grupos (GE grupo de estudio, GC grupo control).

Caso	Hueso	Médula ósea	Cartílago	Tejido inflamatorio	Fibroblastos
1	GC +	++	-	-	++
2	GC -	-	-	+	+
3	GC -	-	-	-	+
4	GC -	-	-	-	+
5	GC +	-	+	-	+
6	GE -	+	+	+	+
7	GE -	-	+	+	+
8	GE +	-	-	++	++
9	GE -	-	-	+	++
10	GE -	+	-	-	+

Cuadro 2. Se muestran los diferentes tejidos encontrados en el estudio histopatológico realizado, de la segunda biopsia realizada a ambos grupos (GE grupo de estudio, GC grupo control).

Caso	Hueso	Médula ósea	Cartílago	Tejido inflamatorio	Fibroblastos
1	GC +++	++	+	-	++
2	GC -	-	+	+	+
3	GC -	-	-	-	+
4	GC +	-	+	+	+
5	GC +	-	+	-	+
6	GE ++	+	-	-	+
7	GE +++	-	-	-	-
8	GE +++	-	-	+++	+
9	GE ++	-	-	-	+
10	GE +++	+	-	-	+

hipertrófico. En el grupo de estudio se observó en los cinco casos a los que se les colocó la médula ósea, la formación de un calo óseo con consolidación de la osteotomía (*Cuadro 3, Figura 1*).

En cuanto al estudio histopatológico, éste una vez tomado fue conservado en formol al 10% y posteriormente se utilizó la técnica de hematoxilina y eosina (HE) para su tinción, se valoró principalmente la presencia de tejido óseo, tejido fibroso y la presencia de células de la médula ósea y tejido inflamatorio, reportándose durante la primera biopsia en la cuarta semana (4a.) la presencia de tejido fibroso en ambos grupos (*Figura 2*) y la formación de tejido óseo en dos casos del grupo control (*Figura 3*) y en un caso del gru-

Cuadro 3. Se muestra la presencia de calo en el foco de la osteotomía, durante la cuarta y décima semanas en el grupo control y el grupo de estudio.

	4a. semana		10a. semana	
	sí	no	sí	no
Grupo estudio	0	5	5	0
Grupo control	0	5	1	4

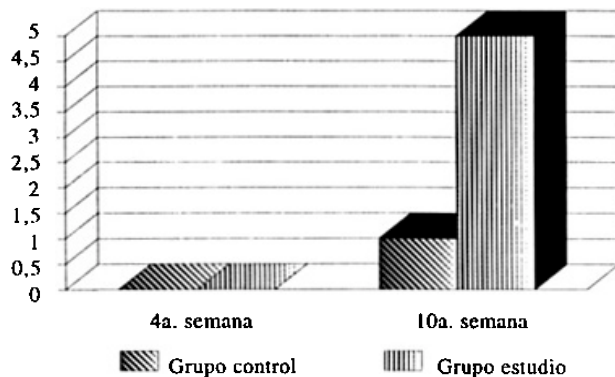


Figura 1. Se muestra la presencia o no de calo óseo durante el estudio radiológico tomados durante la cuarta y décima semanas a ambos grupos.

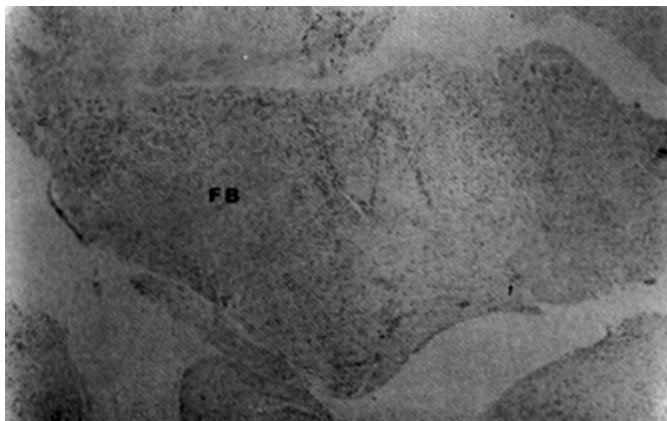


Figura 2. Se muestra la presencia de fibroblastos sin células óseas (FB fibroblastos).

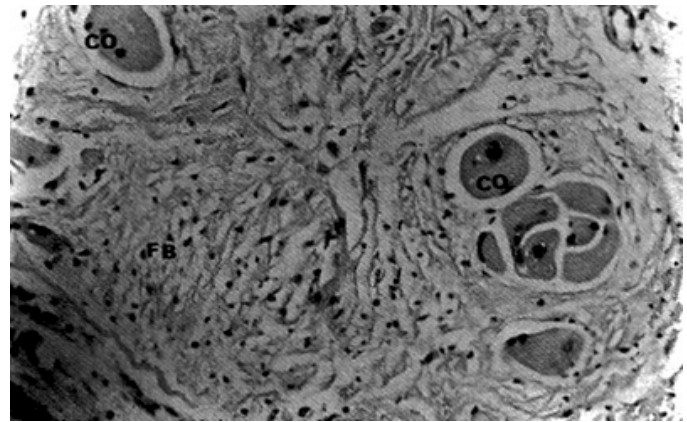


Figura 3. Se muestra la presencia de fibroblastos con escasa cantidad de tejido óseo. (FB fibroblastos, CO células óseas).

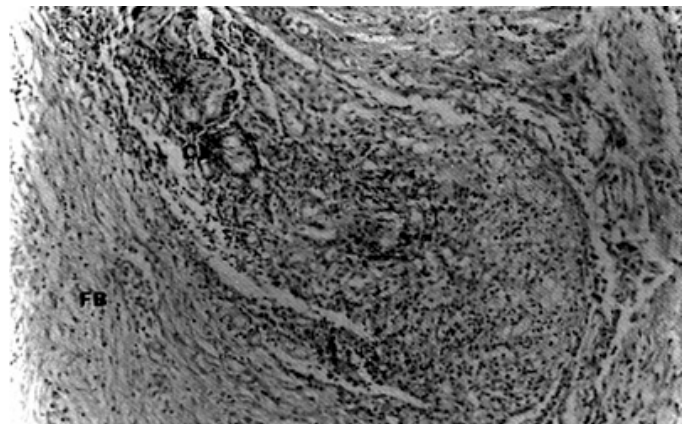


Figura 4. Se observa la presencia de células de la médula ósea, células inflamatorias y fibroblastos (FB fibroblastos, MO médula ósea y CI células inflamatorias).

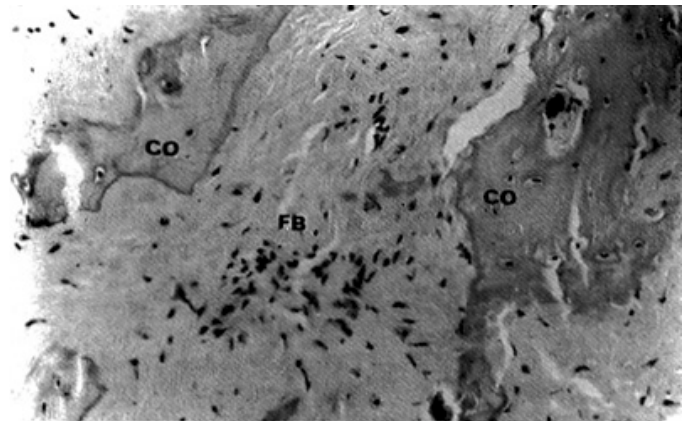


Figura 5. Se muestra la presencia de tejido óseo en escasa cantidad con fibroblastos (FB fibroblastos, CO células óseas).

po de estudio, así como escasa cantidad de tejido inflamatorio y células de la MO (*Figura 4*). En el segundo estudio histopatológico tomado en la décima semana (10a.) se encontró que tres casos del grupo control habían formado hueso en escasa cantidad (*Figura 5*) mientras que en el grupo de estudio al que se le aplicó la MO se encontró tejido

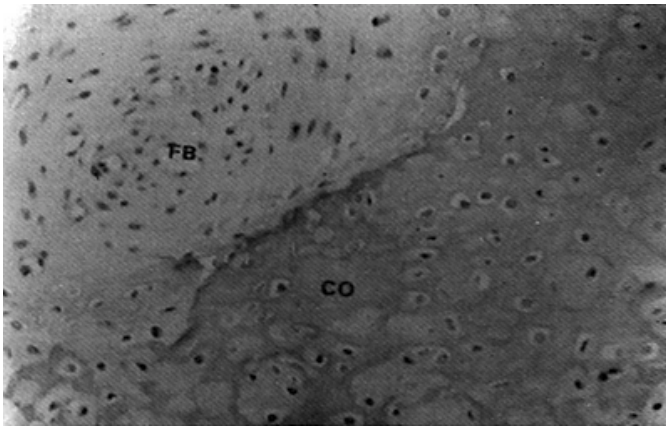


Figura 6. Se muestra la presencia de células óseas, con formación de matriz ósea y fibroblastos (FB fibroblastos, CO células óseas).

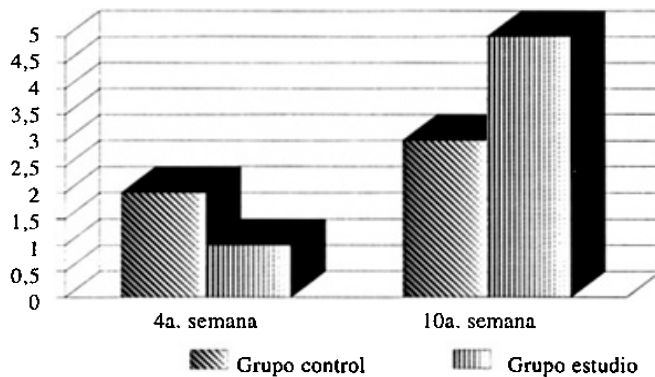


Figura 7. Se muestra la presencia de tejido óseo durante el estudio histopatológico tomado a ambos grupos durante la cuarta y décima semanas.

Cuadro 4. Se muestra la presencia o no de tejido óseo en el estudio histopatológico, durante la cuarta y décima semanas en el grupo control y grupo de estudio.

	4a. semana		10a. semana	
	sí	no	sí	no
Grupo estudio	1	4	5	0
Grupo control	2	3	3	2

óseo en todos los casos y en mayor cantidad (Figura 6), de igual forma que en el primer estudio se encontraron cantidades variables de tejido inflamatorio, fibroblastos y células de la MO (Cuadro 4, Figura 7).

El estudio clínico mostró en la cuarta semana (4a.) en ambos grupos y en todos los casos la presencia de movilidad del foco de la osteotomía, a las 10 semanas se observó que hubo movilidad en la osteotomía en cuatro de los perros del grupo control y en uno hubo estabilidad, mientras que en el grupo de estudio (aplicación de MO) se observó estabilidad en movilidad en todos los casos sin haber movilidad en el foco de la osteotomía al realizar los movimientos forzados de valgo, varo ante y recurvatum, (Cuadro 5 Figura 8).

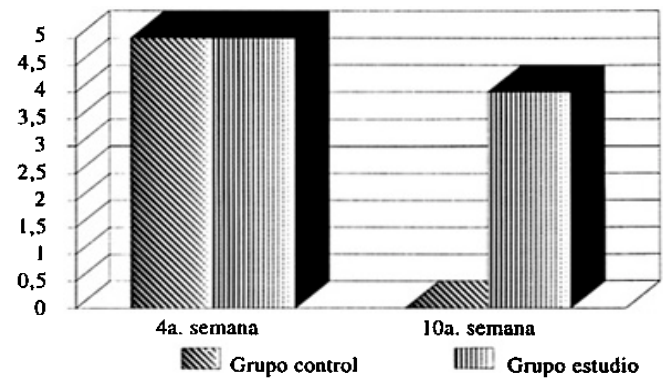


Figura 8. Se muestra la presencia de movilidad en el foco de la osteotomía al realizar movimientos forzados de varo, valgo, ante y recurvatum forzados, en la cuarta y décima semanas a ambos grupos.

Cuadro 5. Se muestra la presencia o no de movimiento en el foco de la osteotomía, durante la cuarta y décima semanas en el grupo control y el grupo de estudio.

	4a. semana		10a. semana	
	sí	no	sí	no
Grupo estudio	5	0	0	5
Grupo control	5	0	4	1

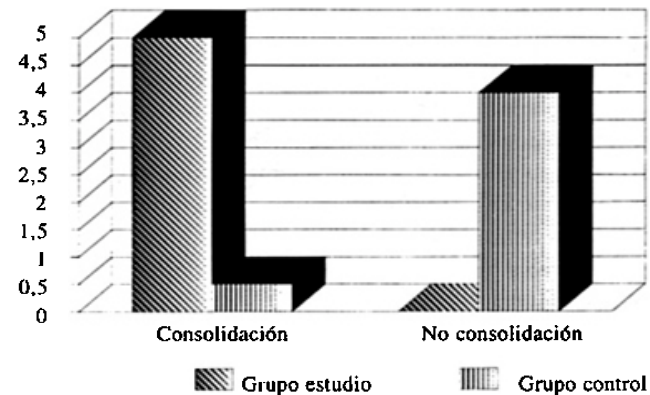


Figura 9. Se observan los casos con consolidación de la osteotomía en el grupo control y el grupo de estudio al final del estudio.

Por último, al final del estudio se observó que en seis de los casos hubo estabilidad con datos de consolidación de la osteotomía y en cuatro hubo inestabilidad, consecuentemente sin consolidación (Figura 9).

Discusión

El presente estudio se diseñó para crear un modelo experimental de un retardo en la consolidación precisamente tratando de reproducir algunos de los factores que intervienen en la fisiopatología de esta entidad, como son la interposición de tejido, la ausencia de coaptación de los bordes que

junto con la inestabilidad de la fractura (no valorada en este estudio) son las causas principales que intervienen para la falta de consolidación de una fractura u osteotomía.

En el estudio se observó que con la aplicación de MO hubo más respuesta osteogénica ya que el 100% de los casos a los que se les aplicó consolidaron, mientras que en el grupo control sólo hubo un 20% de consolidación (grupo que no recibió MO) esto es similar a lo reportado en estudios previos. Creemos que es una buena alternativa para el manejo de pacientes con retardos en la consolidación y pseudoartrosis, ya que se observó que en todos los casos del grupo de estudio hubo la formación de hueso nuevo en el foco de la osteotomía y que de haber seguido su evolución natural era difícil que se hubiera logrado la consolidación de la misma de no ser claro con los procedimientos de cura en los trastornos en la consolidación ya mencionados (limpieza del foco de pseudoartrosis, estabilización de la fractura y la colocación de injerto óseo).^{4,29,31,35}

Es importante recordar que la MO ha sido utilizada como osteoinductor pero también se ha utilizado con algunos osteoconductores (injerto óseo, coralina HAP 200, cerámica, hidroxiapatita etc.) lo cual amerita más estudios para valorar su eficacia combinada de la MO y algún osteoinductor.^{7,12,14,15}

La formación de hueso en el sitio de aplicación de la médula ósea es debida a la capacidad de diferenciación de las células tronco totipotenciales de la MO, gracias a la acción de las proteínas morfogenéticas que están en la matriz ósea del hueso, que al momento de sufrir el cambio en su microambiente (cambios físicos o químicos, trauma) se presentan los estímulos que originan que estas proteínas sean liberadas e intervengan en la diferenciación de las células tronco totipotenciales del estroma de la MO, siendo éste, un mecanismo de acción totalmente diferente al de los injertos habituales que funcionan como osteoconductores; los osteoinductores como la proteína morfogenética serían osteoformadores aunque algunos autores como Reddi y Bab han reportado la formación de otras líneas celulares como condrocitos, células periósticas, etc.^{8-10,17,40,41}

Es importante recalcar que este estudio no pretende de ninguna manera substituir el manejo habitual de esta patología ya que está plenamente comprobada su eficacia, sin embargo su baja morbilidad es una buena opción terapéutica ya que incluso se puede realizar el procedimiento con anestesia local, sin tener que someter al paciente a otro procedimiento quirúrgico y en algunos casos en que los procedimientos quirúrgicos habituales no logran la consolidación de la fractura a pesar de los diferentes tratamientos del cirujano, esto último es por la falta del estímulo osteogénico ocasionado por trastornos locales (proceso infeccioso agregado, la pérdida ósea extensa, la insuficiencia arterial crónica) o por causas sistémicas (desnutrición, diabetes etc.) que impiden la curación.^{27,32,38}

La utilización de médula ósea es una opción prácticamente al alcance de cualquier cirujano que con el debido adiestramiento para la toma de la médula ósea puede aplicarla de manera sencilla en casos seleccionados y de mane-

ra juiciosa, con escasa morbilidad, de bajo costo y en algunos pacientes en los que el procedimiento quirúrgico habitual no puede ser posible por sus condiciones generales.

Referencias

1. Actualización en ortopedia y traumatología. American Orthopaedics Surgeons, Sociedad Española de Ortopedia y Traumatología. Editorial Garsi, Madrid España; 233-243.
2. Aspenberg P, Andolf E. Bone induction by fetal and human bone matrix in athymic rats. *Acta Orthop Scand* 1989; 60(2): 195-99.
3. Atanasou A, Path FR. Current concepts cellular biology of bone-resorbing cells. *J Bone Joint Surg* 1996 78-A: 1096-111.
4. Bab I. Regulatory role of osteogenic growth peptide in proliferation, osteogenesis, and hemopoiesis. *Clin Orthop* 1995 (313): 64-68.
5. Bolander M, Balian G. The use of desmineralized bone matrix in the repair of segmental defects. *J Bone Joint Surg* 1986; 68-A: 264-74.
6. Burwell RG. The function of bone marrow. Incorporation of a bone graft. *Clin Orthop* 1995 (313): 125-141.
7. Connolly J, Gusse R, Lipiello L, Dehne R. Development of an osteogenic bone marrow preparation. *J Bone Joint Surg* 1989; 71-A(5).
8. Connolly J, Tiedman J, Dehne R. Autologous marrow injection for delayed unions of the tibia. A preliminary report. *J Orthop Trauma* 1989; 3(4): 276-282.
9. Connolly J, Guse R, Tiedman J, Dehne R. Autologous marrow injection as a substitute for operative grafting of tibial nonunions. *Clin Orthop* 1991; (266) 259-270.
10. Connolly JF. Injectable bone marrow preparations to stimulate osteogenic repair. *Clin Orthop* 1995; (313): 8-18.
11. Crenshaw AH. Campbell Cirugía Ortopédica. Tomo II: 1211-1266.
12. Diduch D, Coe M, Owen M, Joyner C, Balian G. Two cell lines from bone marrow that differ in terms of collagen synthesis osteogenesis characteristics and matrix mineralization. *J Bone Joint Surg* 75-A; 92-105.
13. Gavril A, Ilizarov AM. The tension stress effect on the genesis and growth of tissues. *Clin Orthop* 1989; (239): 263-85.
14. Green E, Hinton C, Triffit J. The effect of descalcified bone matrix on the osteogenic potential of bone marrow. *Clin Orthop and Rel Res* 1986; (205): 292-298.
15. Hamanishi Ch, Yoshi T, Tatoni Y, Tanaka S. Bone mineral density of lengthened rabbit tibia is enhanced by transplantation of fresh autologous bone marrow cells, an experimental study using dual X-ray absorptiometry. *Clin Orthop* 1994 (303): 250-255.
16. Iyoda MT, Nagamias H. Repair of bone defect with cultures chondrocytes bound hydroxyapatite. *Clin Orthop* 1993; (288): 287-293.
17. Kumar N, Gaur S, Sharma S. Percutaneous autogenous bone marrow grafting in 20 cases of ununited fracture. *Acta Orthop Scand* 1993; 64(6): 671-672.
18. Luyten F, Vukicevic S, Paralkar V, Ripamonti V, Reddi H. Advances in osteogenin and related bone morphogenetic proteins in bone induction and repair. *Acta Orthop Belg* 1992; (58): 263-267.
19. Middleton J, Arnott N, Beresford J. Osteoblasts and osteoclast in adult human osteophyte tissue express the mRNAs for insulin growth factors I and II and the type I IGF receptor. *Bone* (16) 3: 287-293.
20. Mizumoto S, Inada Y, Worland A. Fabrication of vascularized bone grafts using ceramic chambers. *J Reconst Microsurg* 1993; 9(6): 441-449.
21. Nade S. Stimulating osteogenesis. *Injury* 1994; 25(9): 577-583.
22. Ohgushi H, Goldberg V, Caplan A. Heterotopic osteogenesis in porous ceramic induced by marrow cells. *J Orthop Res* 1989; (7): 586-578.
23. Ohgushi H, Goldberg V, Caplan A. Repair of bone defects with marrow cells and porous ceramic. Experiment in rats. *Acta Orthop Scand* 1989; 60(3): 334-339.
24. Ohgushi H, Okumura M. Osteogenic capacity of rat and human marrow cells in porous ceramic. Experiment in athymic mice. *Acta Orthop Scand* 199; 61(5): 431-434.
25. Owen M. Bone morphogenetic proteins, bone marrow stromal cells and mesenchymal stem cells. *Clin Orthop Rel R* 1993; (313): 115-119.
26. Peltonen J. Bone formation and remodeling after symmetric pyseal distraction. *J Pediat Orthop* 1989; 9: 191-96.

27. Ramos VJR. Traumatología y Ortopedia. Editorial Ergo. BsAs. Arg 1983; 334-42.
28. Reckling F, Waters Ch. Treatment of non-unions of fractures of the tibial diaphysis by posterolateral cortical cancellous bone grafting. *J Bone Joint Surg* 1980; 62-A(6): 936-941.
29. Reddi A, Wientroub S, Muthufumaran V. Biologic principles of bone induction. *Orthop Clin North Am* 1987 18(2): 207-212.
30. Reddi A. Bone morphogenetic proteins, bone marrow cells, and mesenchymal stem cells. *Clin Orthop* 1995 (313): 115-19.
31. Ripamonti U, Ma S, Cunningham MS, Yeates L, Reddi H. Reconstruction of the bone marrow organ by osteogenina, a bone morphogenetic protein, and desmineralized bone matrix in calvarial defects of adult primates. *Plast Reconstr Surg* 1993; (91) 1: 27-36.
32. Salter RB. Trastornos y Lesiones del Sistema Musculoesquelético. Editorial Salvat 2a. Edición 1993. 377-396.
33. Sharma S, Kumar N, Veliath A, Subramanian S, Srivastava K. Percutaneous bone marrow grafting of osteotomies and bony defects in rabbits. *Acta Orthop Scand* 1992; 63(2): 166-169.
34. Strates B, Connolly J. Osteogenesis in cranial defects and diffusion chambers. Comparison in rabbits of bone matrix, marrow and collagen implants. *Acta Orthop Scand* 1989; 60 (2); 200-203.
35. Kato T, Sato K, Kawamura M, Iwata I, Miura T. Osteogenesis in sintered bone combined with bovine morphogenetic protein. *Clin Orthop* 1993 (287): 266-75.
36. Tiedeman J, Connolly J, Strates B, Lipiello L. Treatment of non union by percutaneous injection of bone marrow and desmineralized bone matrix. And experimental study in dogs. *Clin Orthop* 1991; (268); 294-302.
37. Triffit J. Initiation and enhancement of bone formation. *Acta Orthop Scand* 1987 (58); 673-684.
38. Valls JE, Perruello N, Aiello C, Tebner KA. Ortopedia y Traumatología. 5a. Edición Editorial el Ateneo. Argentina 1990; 109-111.
39. Van vlasselaer P, Falla N, Van den heuvel R, Dasch J, Malem R. Interleukin-10 stimulates hematopoiesis in murine osteogenic stroma. *Clin Orthop* 1995; (313): 103-14.
40. Wintroub S, Groodwin D, Kherrash O, Salama R. The clinical use of autologous marrow to improve osteogenesis potential of bone grafts in paediatric. *Orthopaedics* 1989; (9): 186-196.
41. Wolf D, Goldberg VM, Stevenson S. Histomorphometric analysis of the repair of a segmental diaphyseal defect with ceramic and titanium fibermetal implants: effects of bone marrow. *J Orthop Res* 1994; (12) 3: 439-45.