

Consejo Directivo  
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS  
Universidad Nacional de La Pampa

**RESOLUCIÓN Nº 334/2018**

**GENERAL PICO, 06 de Diciembre de 2018.-**

**VISTO:**

La evaluación positiva enviada por integrantes del Comité Científico de la Facultad de Ciencias Veterinarias, respecto del Proyecto de Investigación: "INMUNODETECCIÓN DE OSTERIX EN LA REPARACIÓN DE DEFECTOS ÓSEOS TRATADOS CON MATRIZ ÓSEA DESMINERALIZADA" y,

**CONSIDERANDO:**

Que su Director es el Dr. Santiago AUDISIO y su Co-Director el Esp. Pablo VAQUERO, contando con la participación en carácter de Investigadores del Esp. Edgardo VERNA y la Mg. Valeria BUEY, en carácter de Asistentes de Investigación el M.V. Leandro BLANCO SERENO y los estudiantes de la carrera Medicina Veterinaria Daniela ARRIAGADA, Gisela MILANTA, Ariadna FERNANDEZ GOMEZ, Marina PONCE, María Luz TALMON y Carla MUTIO SOTZ .

Que tendrá una duración de treinta y seis (36) meses, a partir del 01 de Enero de 2019 y hasta el 31 de Diciembre de 2021.

Que de acuerdo a la presentación el citado proyecto es de Investigación Básica.

Que participan en su desarrollo la Cátedra de Técnica y Patología Quirúrgica y la Cátedra de Histología I de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional de La Pampa.

Que el citado proyecto ha sido presentado de acuerdo con las normas vigentes y aprobado por el Comité Científico de la Facultad.

Que el Artículo 5º Anexo I de la Resolución Nº 100/99 y su modificatoria Nº 88/02 del Consejo Superior, estipula que: *"Todo Programa y todo Proyecto de Investigación que obtenga dos (2) evaluaciones externas favorables será acreditado mediante resolución del Consejo Directivo de cada Facultad a la que pertenezca"*.

Que cuenta con dos (2) evaluaciones externas satisfactorias, de acuerdo con lo previsto en la Resolución Nº 100/99 del Consejo Superior de la Universidad Nacional de La Pampa.

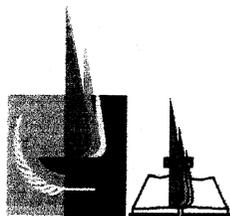
Que las evaluaciones fueron realizadas por la Dra. Cecilia I. MERKIS (UNRC) y la Esp. Patricia A. BERTONE (UNRC).

Que en Sesión Ordinaria del Consejo Directivo del día 06 de Diciembre de 2018, puesto el Proyecto de Investigación a consideración de los Sres. Consejeros, es aprobado por unanimidad.

**POR ELLO:**

**EL CONSEJO DIRECTIVO DE LA FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS**

**RESUELVE:**



Consejo Directivo  
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS  
Universidad Nacional de La Pampa

Corresponde a Resolución Nº **334/2018**

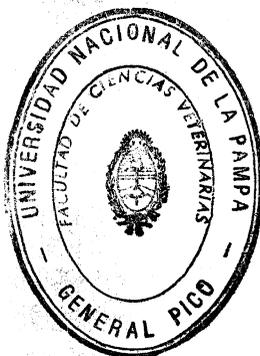
II2.-

**ARTICULO 1º:** Acreditar como Proyecto de Investigación de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional de La Pampa, el proyecto denominado: *"INMUNODETECCIÓN DE OSTERIX EN LA REPARACIÓN DE DEFECTOS ÓSEOS TRATADOS CON MATRIZ ÓSEA DESMINERALIZADA"* dirigido por el Dr. Santiago AUDISIO y Co-Director el Esp. Pablo VAQUERO, contando con la participación en carácter de Investigadores del Esp. Edgardo VERNA y la Mg. Valeria BUEY, en carácter de asistentes investigadores el M.V. Leandro BLANCO SERENO y los estudiantes de la carrera Medicina Veterinaria Daniela ARRIAGADA, Gisela MILANTA, Ariadna FERNANDEZ GOMEZ, Marina PONCE, María Luz TALMON y Carla MUTIO SOTZ, el cual tiene dieciséis (16) folios y que se adjunta como Anexo I de la presente Resolución.

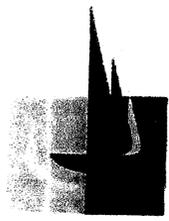
**ARTICULO 2º:** El Proyecto de Investigación tendrá una duración de treinta y seis (36) meses, a partir del 01 de Enero de 2019 y hasta el 31 de Diciembre de 2021.

**ARTICULO 3º:** Justificar los gastos que se produzcan de pasajes, viáticos, combustibles, aparatos, material de laboratorio, etc., del citado proyecto.

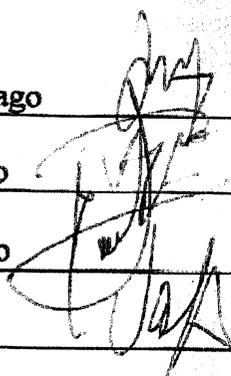
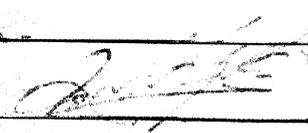
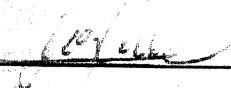
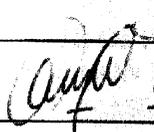
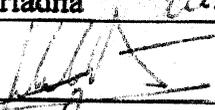
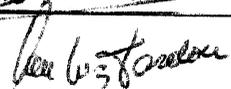
**ARTÍCULO 4º:** Regístrese, comuníquese, tomen conocimiento los interesados, Secretaría de Investigación, Posgrado y Extensión. Cumplido, archívese.



**Dr. Abejardo Mario FERRAN**  
PRESIDENTE CONSEJO DIRECTIVO  
Facultad de Ciencias Veterinarias  
**UNLPam**



**TÍTULO DEL PROYECTO:  
INMUNODETECCIÓN DE OSTERIX EN LA REPARACIÓN DE DEFECTOS  
ÓSEOS TRATADOS CON MATRIZ ÓSEA DESMINERALIZADA**

- Audisio, Santiago 
- Vaquero, Pablo
- Verna, Edgardo
- Buey, Valeria
- Leandro Martín Blanco Sereno 
- Arriagada, Daniela 
- Milanta, Gisela 
- Fernandez Gomez, Ariadna 
- Mutio Stoz, Carla 
- Treccani, Denia Luz 
- PONCE MARINA ALEJANDRA 



Número de Proyecto: .....

Año: .....

(No llenar)

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PAMPA**  
**Facultad de Ciencias Veterinarias**

**1. IDENTIFICACIÓN del PROYECTO**

**1.1. TÍTULO del PROYECTO: INMUNODETECCIÓN DE OSTERIX EN LA REPARACIÓN DE DEFECTOS ÓSEOS TRATADOS CON MATRIZ ÓSEA DESMINERALIZADA**

**1.2. TIPO de INVESTIGACIÓN: Básica - ~~Aplicada~~ - ~~Desarrollo Experimental~~**

**BÁSICA:** Consiste en trabajos experimentales o teóricos que se enprenden principalmente para obtener nuevos conocimientos acerca de los fundamentos de fenómenos y hechos observables, sin prever en darles ninguna aplicación o utilización determinada o específica.

**APLICADA:** Consiste también en trabajos originales realizados para adquirir nuevos conocimientos, pero fundamentalmente dirigidos hacia un objetivo práctico específico.

**DESARROLLO EXPERIMENTAL:** Consiste en trabajos sistemáticos basados en los conocimientos existentes, derivados de la investigación y/o la experiencia práctica, dirigidos a la producción de nuevos materiales, productos y dispositivos; al establecimiento de nuevos procesos, sistemas y servicios, o a la mejora substancial de los ya existentes, es decir, producir una tecnología.

**1.3. CAMPO de APLICACIÓN PRINCIPAL: (Ver Códigos en Planilla Adjunta)**

**1.4. CAMPOS de APLICACIÓN POSIBLES: (Ver Códigos en Planilla Adjunta)**

**2. INSTITUCIONES y PERSONAL que INTERVIENEN en el PROYECTO**

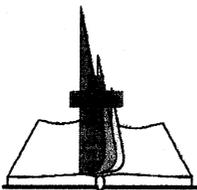
**2.1. AREAS, DEPARTAMENTOS y/o INSTITUTOS** Cátedra Técnica y Patología Quirúrgica – Cátedra de Histología

**2.2. OTRAS INSTITUCIONES:** -----

**2.3. EQUIPO de TRABAJO: (En el caso de tratarse de un Plan de Tesis Doctoral o Tesis de Maestría, complete solamente el cuadro 2.3.5.)**

**2.3.1. INTEGRANTES**

Apellido y Nombre	Título Académico	Cate g. Invest	Respo n- sabili- dad (1)	Cátedra o Institución	Cargo y Dedicación	Tiempo dedicac. Hs./Sem
Audisio, Santiago	Doctor	III	D	Téc y Pat Quirúrgica	Adj SE	6
Vaquero, Pablo	Especialista	IV	CD	Téc y Pat Quirúrgica	A1° SE	6
Verna, Edgardo	Especialista	IV	I	Téc y Pat Quirúrgica	A1° SE	6
Buey, Valeria	Magister	III	I	Histología	Adj e Ads	6



FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS  
Universidad Nacional de La Plata

Blanco Sereno Leandro	Med Vet	-	AI	Téc y Pat Quirúrgica	Adscripta	2
Arriagada, Daniela	Estudiante	-	AI	Téc y Pat Quirúrgica	Adscripta	2
Milanta, Gisela	Estudiante	-	AI	Téc y Pat Quirúrgica	Adscripta	2
Fernandez Gomez, Ariadna	Estudiante	-	AI	Téc y Pat Quirúrgica	Adscripta	2
Ponce, Marina A.	Estudiante	-	AI	Téc y Pat Quirúrgica	Adscripta	2
Talmon, María Luz	Estudiante	-	AI	Téc y Pat Quirúrgica	Adscripta	2
Mutio Stoz, Carla	Estudiante	-	AI	Téc y Pat Quirúrgica	Adscripta	2

(1) **D: Director, CD: Co-Director, A: Asesor, I: Investigador, AI: Asistente de Investigación.**

### 2.3.1. BECARIOS:

Apellido y Nombre	Organismo que Financia	Tipo de Beca	Director	Tiempo de Dedicac. Hs./Sem.

### 2.3.2. TESISISTAS:

Apellido y Nombre	Título Académico al que Aspira	Título Proyecto de Tesis	Organismo	Director	Tiempo de Dedicac. Hs./Sem.

### 2.3.3. PERSONAL de APOYO:

Apellido y Nombre	Categoría (Adm., Lab., Campo, etc.)	Tiempo de Dedicac. Hs./Sem.

### 2.3.4. INVESTIGADORES en PLAN de TESIS:

Apellido y Nombre	Función	Título Proyecto de Tesis	Tiempo de Dedicac. Hs./Sem.
	Director Co-Director Tesisista		

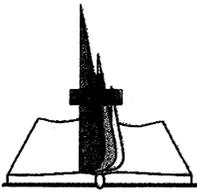
### 3. DURACIÓN ESTIMADA del PROYECTO: (de 1 a 5 años con una sola prórroga)

Se estima que el proyecto se ejecutará en el término de 3 años,

**3.1. FECHA de INICIO: 01/01/2019 FINALIZACIÓN: 31/12/2021**

### 4. RESUMEN del PROYECTO: (Máximo 200 palabras)

El rol de la proteína Osterix (Osx) se encuentra ampliamente estudiada en la esqueletogénesis embrionaria y en la homeostasis ósea y poco se conoce la participación que posee en la reparación de defectos óseos. La matriz ósea desmineralizada (MOD) posee propiedades osteoinductivas razón por la cual es aprovechada en las terapias de



FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS  
Universidad Nacional de La Pampa

sustitución de hueso con fines de reparación de defectos óseos. El objetivo del presente proyecto es inmunomarcarse a Osx durante la reparación de defectos óseos tratados con MOD. Se emplearán 12 conejos a los que se les creará un defecto circular en la diáfisis de uno de los fémures de 3mm de diámetro. Los defectos de 12 conejos serán rellenados con MOD. Los conejos se sacrificarán en grupos de 3 a los 7, 15, 21 y 30 días para recuperar la porción de hueso motivo de estudio. Al tejido de los defectos se les practicarán estudios inmunohistoquímicos para establecer la expresión de Osx según las densidades óptica (DO) y densidad óptica integrada (DOI) de 5 campos histológicos por muestra. Los resultados de cada período de estudio se analizarán con ANOVA y Test LSD de Fisher con  $p < 0,05$  como valor estadísticamente significativo.

#### 4.2 Abstract en Inglés: (Máximo 200 palabras)

The role of Osterix (Osx) protein in either the embryonic genesis of the skeleton and the bone homeostasis has been widely studied but less is known about its participation in the resolution of bone defects. The demineralized bone matrix has osteoinductive properties hence it is employed in the therapy of bone substitution with the purpose to repair bone defects. The objective of the present trial is to immuno-mark Osx during the reparation process of the demineralized bone matrix. A circular 3 mm bone defect is going to be made in the diaphysis of the femur of 12 rabbits. The lesions are going to be filled with demineralized bone matrix, and the rabbits will be euthanized in groups of three at 7, 15, 21 and 30 days in order to recover the lesion portion. Histopathologic studies are going to be made in order to determine the expression of Oxs according to both optical density (OD) and integrated optical density (IOD) in five histologic fields per sample. The results of each period are going to be analysed with ANOVA and Fisher LSD with  $p < 0,05$  as statistically significant value.

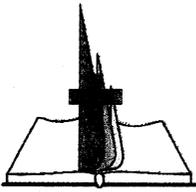
## 5. INTRODUCCIÓN y ANTECEDENTES

### 5.1. INTRODUCCIÓN, MANEJO DE FUENTES BIBLIOGRÁFICAS y DESCRIPCIÓN de la SITUACIÓN ACTUAL del PROBLEMA

La esqueletogénesis embrionaria al igual que la homeostasis ósea post natal se halla controlada por varias vías de señalización genética (Lin y Hankenson, 2011). Las principales vías incluyen a los miembros del factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), la familia de la proteína morfogénica del hueso (BMP) y la vía de señalización de Wingless int (Wnt) (Javed *et al.*, 2010; Lin y Hankenson, 2011). En correspondencia con esas vías intervienen los factores de transcripción Runx2 y osterix (Osx) (Nakashima *et al.*, 2002; Yagi *et al.*, 2003; Zhou *et al.*, 2010).

El rol de Osx en la esqueletogénesis quedó demostrado cuando se bloqueó su expresión en ratones recién nacidos. Los mismos no registraron diferenciación osteoblástica y consecuente formación de hueso nuevo (Day *et al.*, 2005; Zhou *et al.*, 2010). Así se estableció que Osx diferencia a los preosteoblastos en osteoblastos para que los mismos continúen con su función en la formación y mineralización ósea (Baek *et al.*, 2009; Baek *et al.*, 2010).

En la columna vertebral la deficiencia de Osx provoca deformaciones severas de las vértebras entre las que se mencionan vértebras en cuña, estenosis espinal y escoliosis congénita. La desactivación de Osx también genera vértebras acortadas con volumen



FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS  
Universidad Nacional de La Pampa

óseo excesivo y actividad osteoclástica disminuida (Chen *et al.*, 2014). Para que se lleve a cabo la esqueletogénesis embrionaria se requiere que las células mesenquimáticas (CM) se diferencien en distintas líneas celulares a través del accionar coordinado de un conjunto de moléculas. Este proceso posee características similares a la regeneración ósea que acontece durante la reparación de las fracturas (Smok *et al.*, 2016). Por ese motivo resulta de interés conocer esos acontecimientos bioquímicos y celulares que tienen como resultado la curación de las fracturas y defectos óseos.

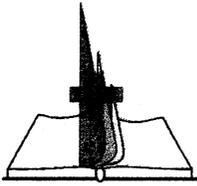
La proteína morfogénica del hueso -2 (BMP-2) es una poderosa citoquina que induce la formación de hueso. Actúa reclutando CM estimulándolas a que proliferen y diferencien para generar hueso. BMP-2 regula la expresión de varios transcritores específicos sin los cuales no se llevaría a cabo la osteogénesis, entre los que se encuentran *Osx* y *Runx2*.

*Osterix* es un factor de transcripción que pertenece a la familia de las proteínas de especificidad (Sp) y dentro de esta familia también se la conoce como Sp7. Contiene dedos de zinc que le confieren la función esencial de diferenciar osteoblastos y así intervenir en el desarrollo esquelético embrionario. Los ratones deficientes en *Osx* acumulan preosteoblastos detenidos en su diferenciación incapaces de expresar genes osteoblásticos como osteocalcina (OC), sialoproteína ósea (BSP) y osteopontina (OP) (Nakashima *et al.*, 2002). En ausencia de *Osx* el esqueleto cartilaginoso prenatal de ratones en los que se realizaron los estudios no mostraron evidencias de mineralización y murieron al nacer (Nakashima *et al.*, 2002).

En la osificación *Osx* se expresa en osteoblastos y osteocitos y en menor grado en condrocitos hiper y prehipertróficos Zhou *et al.*, 2010). Considerando que *Osx* es un marcador osteoblástico esencial para la formación de hueso la presente revisión tiene como objetivo examinar el rol que desempeña en el desarrollo del esqueleto de los animales pues constituye una vía atractiva en la reparación de fracturas y lesiones óseas. La proteína *Osx* pertenece a la familia de las proteínas transcriptoras tipo Krupel que se caracterizan por poseer dedos de zinc para unirse al ADN celular y ejercer su efecto (Black *et al.*, 2001). De esta forma *Osx* media la expresión de los genes osteoblásticos como osteocalcina (OC), osteonectina, osteopontina (OP), sialoproteína ósea (BSP) y la metilación del colágeno tipo I (Zhang *et al.*, 2010). Durante la diferenciación de los osteoblastos la región promotora de *Osx* se hipometila, lo que altera directamente la expresión de los genes de los osteoblastos, que luego ejercen efecto sobre la diferenciación celular (Hagh *et al.*, 2012).

*Osx* posee una activa participación en la osteogénesis junto a los transcritores *Runx2* y *Sox9*. *Runx2* es necesario para la diferenciación de las CM en osteoblastos e inhibe su diferenciación en adipocitos y condrocitos. Es el primer transcriptor que interviene en la diferenciación de las CM. Así lo demostraron estudios realizados en ratones *Runx2* -/- en los que no se registró osificación intramembranosa como así tampoco endocondral debido a la ausencia de la diferenciación de las CM en osteoblastos (Komori *et al.*, 1997; Otto *et al.*, 1997).

En estudios *in vitro* realizados en CM procedentes de los huesos parietales de ratones *Runx2* -/- éstas se diferenciaron espontáneamente en adipocitos y en condrocitos en presencia de BMP-2 pero no en osteoblastos. Por ese motivo las CM de animales *Runx2* -/- tienen el potencial de diferenciarse en adipocitos y condrocitos (Kobayashi *et al.*, 2000). Los ratones *osterix* -/- también muestran ausencia completa de osificación



FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS  
Universidad Nacional de La Plata

intramembranosa y endocondral debido a que no se lleva a cabo la diferenciación de osteoblastos. Runx2 se expresa en las células mesenquimales de ratones *Osx*<sup>-/-</sup>, aunque *Osx* no se expresa en ratones *Runx2*<sup>-/-</sup>. Por lo tanto, *Osx* es un gen que interviene en el proceso de diferenciación con posterioridad a *Runx2*. En ratones *Osx*<sup>-/-</sup> las CM pericondrales se condensan y diferencian en condrocitos, ello indica que las CM *Osx*<sup>-/-</sup> mantienen el potencial para diferenciarse en condrocitos (Nakashima *et al.*, 2002).

*Runx2* intervendría en los primeros estadios de diferenciación de las CM hasta la aparición de células osteocondroprogenitoras, mientras que *Osx* tendría un papel en la segregación de las células osteoprogenitoras (Nakashima y deCrombrugge, 2003). Estas vías diferenciales reguladoras sugieren que *Osx* promueve la proliferación de células progenitoras, mientras que *Runx2* tiene un efecto antiproliferativo pues actuaría a nivel del ciclo celular en la fase de transición a G1 relacionada al crecimiento celular de los osteoblastos (Galindo *et al.*, 2005).

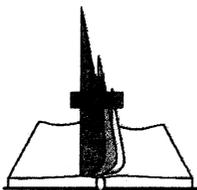
*Osx* posee actividad condrogénica y de osificación post natal de la mandíbula de ratones para lo cual induce la síntesis de metaloproteinasa-13 (MMP13) durante la osificación endocondral para degradar matrices condrogénicas (Jing *et al.*, 2014).

Estudios de migración de osteoblastos en el desarrollo del hueso establecieron que interviene una población de células precursoras de osteoblastos que se localizan en el pericondrio y que son *Osx* positivas. Esas células migran al sitio de osificación primaria junto con los vasos sanguíneos pues esas células precursoras que expresan *Osx* están íntimamente asociados con células endoteliales de los vasos sanguíneos (Maes *et al.*, 2010).

Si bien la familia de BMP es la única capaz de inducir la generación de hueso, ésta requiere la intervención cooperativa de Wnt (Tsuji *et al.*, 2006; Nelson 2008). La inactivación de la  $\beta$ -catenina citosólica en las CM, vía canónica de activación de Wnt, bloquea por completo la diferenciación de los osteoblastos y CM mesenquimales del pericondrio y se diferencian en condrocitos (Day *et al.*, 2005; Hill *et al.*, 2005; Tan *et al.*, 2014). Por lo tanto,  $\beta$ -catenina es esencial para la diferenciación de los osteoblastos donde las CM  $\beta$ -catenina<sup>-/-</sup> mantienen su potencial para diferenciarse en condrocitos. Como *Runx2*, pero no *Osterix*, se expresa en las CM  $\beta$ -catenina<sup>-/-</sup> (Hu *et al.*, 2005; Hill *et al.*, 2005)  $\beta$ -catenina parece ser necesaria para la diferenciación de osteoblastos en la etapa de preosteoblastos. Por lo tanto, *Runx2* dirige a las CM progenitoras a preosteoblastos, inhibiendo su diferenciación en adipocitos y condrocitos, y  $\beta$ -catenina y *Osx* dirigen aún más a los preosteoblastos a osteoblastos inmaduros, eliminando por completo el potencial de los preosteoblastos para diferenciar los condrocitos. Las células que expresan *Osx* co-expresan sus propias Wnts, que a su vez inducen la respuesta de señalización de Wnt, regulando así su proliferación y diferenciación celular (Tan *et al.*, 2014).

Existe variada evidencia que *Osx* contribuye a mantener la homeostasis de los huesos en animales adultos. Cuando *Osx* es anulada en ratones adultos éstos registran microfracturas, disminución de la población de osteoblastos e interfiere en la maduración y función de osteocitos Baek *et al.*, 2009; Zhou *et al.*, 2010).

Estudios realizados en animales a los que se les impidió que cargaran peso sobre uno de los fémures, mostraron que los osteocitos del hueso disminuyeron la expresión de *Osx* y a su vez en húmero, mostraron incremento de los niveles de *Osx*. La experiencia sugiere que la sobrecarga de peso compensatoria aumentó los niveles de *Osx* en osteoblastos en



FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS  
Universidad Nacional de La Pampa

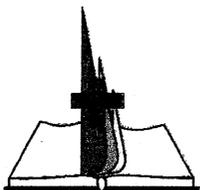
respuesta a la adaptación mecánica<sup>(26)</sup>. La paratohormona (PTH), que es tanto catabólica como anabólica en el tejido óseo, tiene receptores en los osteoblastos para regular tanto la actividad metabólica de los osteoblastos como la diferenciación. La estimulación prolongada con PTH inhibe la expresión de ARNm de la proteína *Osx* en células osteoblásticas *in vitro* que provoca una represión transcripcional (Metzger *et al.*, 2017). El gen que expresa al receptor de la vitamina D (RVD) en la membrana de los osteoblastos es un objetivo de *Osx*. Estudios en ratas mutantes que no expresan osterix (*Osx -/-*) mostraron expresión defectuosa de RVD cuando se los comparó con animales tipo salvaje. En cultivos primarios de osteoblastos tipo salvaje también tuvieron una expresión del gen RVD marcadamente alterada cuando se anuló la expresión de *Osx*. La utilidad terapéutica de estos resultados se puede sumar a una lista creciente de factores y vías osteoblastogénicas regulados por *Osx* en el osteoblasto no solo en el mantenimiento de la homeostasis del hueso, sino también para tratar enfermedades del mismo (Zhang *et al.*, 2017).

La reparación de las fracturas es un proceso complejo que incluye la expresión e interacción espacial y temporal de múltiples moléculas que intervienen en la formación de hueso nuevo durante la curación. Los estudios realizados en lesiones óseas controladas seguidas de curación demostraron que *Osx* se expresa durante la regeneración de células óseas. La implantación de células de la médula ósea que expresan *Osx* en defectos óseos de huesos temporales en ratas aceleró la cicatrización de las lesiones respecto a los controles<sup>(34)</sup>. En ratones con fracturas controladas el callo de fractura y el cartílago comenzaron a formarse hacia el séptimo día post fractura y continuó hacia el día 10 de la curación. *Osx* se expresó en los osteoblastos del callo óseo en el día 10, pero no lo hizo en el hueso cortical, condrocitos hipertróficos y vasos sanguíneos. Hacia el día 14 posterior a la fractura *Osx* se expresó principalmente en los osteoblastos que rodeaban los sitios de curación mientras que el cartílago del callo se osificó (Kaback *et al.*, 2008). En el mismo estudio la sobre expresión de *Osx* en las células progenitoras disminuyó el nivel de *Sox9*, lo que sugiere que *Osx* podría inhibir la diferenciación de los condrocitos mientras promueve la diferenciación de los osteoblastos. El rastreo de las células precursoras de osteoblastos que eran *Osx* positivas estaban presentes en el periostio del hueso cortical, lo que permitió establecer que cuando se produce la fractura éstas se encontraban masivamente en el callo óseo (Maes *et al.*, 2011).

La matriz ósea desmineralizada (MOD) es utilizada en cirugía veterinaria debido a su propiedad osteoinductiva (Urist, 1965) con el fin de reparar fracturas, resolver no uniones, osteomielitis y defectos provocados por el tratamiento quirúrgico de neoplasias (Ganesh *et al.*, 1992; Kumar y Ramakrishna, 2001; McKee 2006; Hoffer *et al.*, 2008; da Silva *et al.*, 2012; Brown *et al.*, 2016).

La MOD se halla constituida por los elementos orgánicos que conforman la matriz ósea, entre los que se numeran al colágeno Tipo I, la proteína morfogénica del hueso (BMP), osteocalcina (OC), osteopontina (OPN), sialoproteína ósea y osteonectina (Colnot *et al.*, 2005; Eppley *et al.*, 2005).

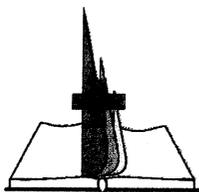
**5.2. RESULTADOS ALCANZADOS POR el (los) INTEGRANTE(S) del PROYECTO DENTRO del ÁREA de CONOCIMIENTO del MISMO: (Publicados, enviados o aceptados para publicar, o inéditos)**



FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS  
Universidad Nacional de La Pampa

### Presentación en reuniones científicas

- Audisio SA, Vaquero PG, Sosa A, Torres P, Verna EC, Ocampo L, Cristofolini AL, Merkis CI. Restitución de la base ósea con matriz ósea desmineralizada. IV Congreso Nacional de Anatomistas – III Congreso Internacional de Enseñanza e Investigación de Ciencias Morfológicas – I Jornadas Nacional e Internacional de Morfología para Estudiantes de Ciencias de la Salud 5-7 de Setiembre de 2013. Córdoba, Argentina. *EXPOSITOR MODALIDAD POSTER.*
- Audisio SA, Vaquero P, Torres P, Verna E, Ocampo L, Cristofolini A, Merkis C. Evaluación ultrasonográfica de la reparación de defectos óseos segmentales con matriz ósea desmineralizada. XIII Congreso Nacional de AVEACA. 19 y 20 de Setiembre de 2013. CABA. *EXPOSITOR MODALIDAD POSTER.*
- Audisio SA, Vaquero P, Torres P, Verna E, Ocampo L, Merkis C, Cristofolini A. Restitución de la base ósea con hueso desmineralizado. VIII Jornada de Ciencia y Técnica – I Jornada Interinstitucional Facultad de Ciencias Veterinarias – Facultad de Ingeniería de la UNLPam. Organizado por las Facultades de Ciencias Veterinarias e Ingeniería de la UNLPam. (Res. CD N° 334/13 y 140/13). General Pico, La Pampa, 12 de diciembre de 2013. *EXPOSITOR MODALIDAD POSTER.*
- Audisio SA, Vaquero P, Torres P, Verna E, Ocampo L, Merkis C, Cristofolini A VIII Jornada de Ciencia y Técnica – I Jornada Interinstitucional Facultad de Ciencias Veterinarias – Facultad de Ingeniería de la UNLPam. Restitución de la Base Ósea con Hueso Desmineralizado Organizado por las Facultades de Ciencias Veterinarias e Ingeniería de la UNLPam. (Res. CD N° 334/13 y 140/13). General Pico, La Pampa, 12 de diciembre de 2013. *DISERTANTE.*
- Audisio SA, Vaquero P, Torres P, Verna E, Ocampo L, Merkis C, Cristofolini A 8vas Jornadas Internacionales de Veterinaria Práctica. Audisio SA, Vaquero PG, Torres P, Ocampo L, Merkis CI, Cristofolini AL. Organizado por el Colegio Veterinario de la Pcia de Buenos Aires, 9 y 10 de agosto de 2013. *EXPOSITOR MODALIDAD POSTER.*
- Audisio SA, Vaquero P, Ocampo L, Verna E, Domene J, Cancina, M, Seiffert P, Gonzalez C, Cuadrelli Andreoli F, Torres Arriola ML, Cristofolini A, Merkis C. Tratamiento de una pseudoartrosis en un perro con matriz ósea desmineralizada. II Congreso Argentino de Cirugía de Pequeños Animales Facultad de Ciencias Veterinarias – UBA. (Res. CD N° 2863/13). Ciudad Autónoma de Buenos Aires. 9 de agosto de 2014 *EXPOSITOR MODALIDAD POSTER.*
- Audisio SA, Vaquero P, Ocampo L, Verna E, Torres P, Cristofolini A, Merkis C. Unión retardada de fémur en un canino tratada con matriz ósea desmineralizada. Latin American Veterinary Conference. Lima, Perú. 21-24 de abril de 2015. *EXPOSITOR MODALIDAD POSTER.*
- Audisio SA, Vaquero P, Ocampo L, Verna E, Torres P, Cristofolini A, Merkis C. Análisis histológico de la osteogénesis en defectos óseos segmentales tratados con matriz ósea desmineralizada en un modelo animal. Latin American Veterinary Conference Lima, Perú. 21-24 de abril de 2015. *EXPOSITOR MODALIDAD POSTER.*
- Audisio SA, Vaquero PG, Verna E, Cristofolini A, Merkis C. Inmunodetección temporal y espacial de osteopontina (OPN) en la reparación de defectos óseos ortopédicos tratados con matriz ósea desmineralizada. XV Congreso Internacional de AVEACA Ciudad Autónoma de Buenos Aires, 6 y 7 de octubre de 2015. *EXPOSITOR MODALIDAD POSTER.*



FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS  
Universidad Nacional de La Plata

- Audisio SA, Vaquero PG, Verna E, Ocampo L, Cristofolini A, Merkis C. Inmunodetección temporal y espacial de wingless int (WNT) en la reparación de defectos óseos ortopédicos tratados con matriz ósea desmineralizada. XVI° Congreso Internacional de AVEACA. Ciudad Autónoma de Buenos Aires, 6 y 7 de octubre de 2016. *EXPOSITOR MODALIDAD POSTER*.
- Audisio SA, Vaquero PG, Verna E, Ocampo L, Cristofolini A, Merkis C. Inmunodetección temporal y espacial de bone morphogenetic protein (BMP) en la reparación de defectos óseos ortopédicos tratados con matriz ósea desmineralizada. XVI° Congreso Internacional de AVEACA. Ciudad Autónoma de Buenos Aires, 6 y 7 de octubre de 2016. *EXPOSITOR MODALIDAD POSTER*.
- Audisio SA, Vaquero PG, Verna E, Ocampo L, Cristofolini A, Merkis C. Inmunodetección temporal y espacial de wingless int en la reparación de defectos óseos ortopédicos tratados con matriz ósea desmineralizada. XVI° Congreso Internacional de AVEACA. Ciudad Autónoma de Buenos Aires, 6 y 7 de octubre de 2016. *EXPOSITOR MODALIDAD POSTER*.

#### **Publicaciones**

- Audisio SA, Vaquero PG, Torres PA, Verna EC, Ocampo LN, Ratusnu V, Cristofolini AL, Merkis CI. 2014. Obtención – caracterización y almacenamiento de matriz ósea desmineralizada. *Revista de Medicina Veterinaria*. 95(2):24-34.
- Audisio SA, Vaquero P, Torres P, Verna EC, Ocampo LN, Cristofolini AL, Merkis CI. 2015. Radiological evaluation of radial bone defects treated with demineralized bone defects in an experimental rabbit model. *Bulgarian Journal of Veterinary Medicine*. 18(2):132-139.

#### **Trabajos aceptados para su publicación**

- Audisio SA, Vaquero P, Torres P, Verna EC, Ocampo LN, Cristofolini AL, Merkis CI. Inmunodetección de WNT en la reparación de defectos óseos tratados con matriz ósea desmineralizada. *Ciencia Veterinaria*, revista científica de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la UNLPam.
- Audisio SA, Vaquero P, Verna EC. Inmunodetección de WNT3a en la reparación de defectos óseos tratados con matriz ósea desmineralizada. *Ciencia Veterinaria*, revista científica de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la UNLPam.

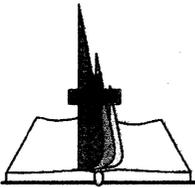
### **5.3. TRABAJOS de INVESTIGACIÓN de los INTEGRANTES del EQUIPO, EN ESTA U OTRA INSTITUCIÓN, RELACIONADOS al PROYECTO.**

## **6. DESCRIPCIÓN del PROYECTO**

### **6.1. PROBLEMA CIENTÍFICO, OBJETIVOS, HIPÓTESIS y RESULTADOS ESPERADOS del PROYECTO**

#### ***Problema científico***

La reparación de defectos óseos resulta de una compleja interacción y sincronización de citoquinas que actúan sobre células mesenquimáticas indiferenciadas y la estirpe del linaje osteogénico. Conocer el sitio y momento de intervención de osterix contribuirá a



FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS  
Universidad Nacional de La Pampa

comprender el rol que ésta cumple en el proceso de reparación de defectos óseos tratados con MOD

### **Objetivo**

Inmunodetectar a la proteína Osterix durante el proceso de reparación de defectos óseos tratados con matriz osea desmineralizada (MOD)

### **Objetivos particulares**

Cuantificar a Osx mediante las DO y DOI

Establecer en que periodo de tiempo en la reparación de los defectos se inmunodetecta Osx

### **Hipótesis**

La proteína Osterix (Osx) se expresa durante la reparación de defectos óseos tratados con MOD

### **Resultados esperados**

Se espera que Osx se exprese en los distintos estadios de reparación de los defectos óseos promoviendo la diferenciación de las células mesenquimáticas en las células del linaje osteogénico

## **6.2. METODOLOGÍA, MODELOS y TÉCNICAS.**

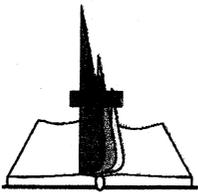
### **Obtención de matriz ósea desmineralizada**

Para la obtención, preparación y conservación de la MOD se empleará el protocolo informado por los miembros del equipo de investigación<sup>(30)</sup>. Se emplearán diáfisis de huesos de conejos procedentes de frigorífico. Al conjunto de las diáfisis les serán removidos los tejidos blandos y se lavarán con abundante agua destilada. Las diáfisis se seccionarán en piezas de 5 a 10 mm y luego se fragmentarán en un molino de cuchillas a 20.000 r.p.m. (Yellowline A10, IKA, Alemania) hasta obtener partículas de 100 a 750  $\mu\text{m}$ . Al hueso triturado se le extraerán los lípidos por inmersión en una solución de cloroformo:metanol en proporción 1:1 durante 12 horas manteniendo una relación 1:30 de hueso:solución. El hueso se desengrasado será desmineralizado por acción de una solución de ácido clorhídrico (HCl) 0,6N a razón de 25 meq/gr de hueso durante 48 horas con agitación permanente a 4°C. La MOD obtenida se lavará con agua destilada hasta estabilizar el pH en 7,0 y se procederá a conservarla en alcohol etílico 95° a 4°C en proporción de 30 partes de alcohol por cada parte de matriz hasta su uso.

### **Modelo animal**

Se emplearán 12 conejos (n=12) neocelandeces, machos y hembras, sexualmente maduros que serán mantenidos en jaulas individuales alimentados con 120 gr de una fórmula comercial de alimento balanceado y agua *ad libitum* durante el tiempo que dure el experimento.

A cada animal se le realizará tricotomía y embrocación del miembro posterior derecho para ser intervenido en condiciones de asepsia. Los animales serán sedados con 1,5 mg/kg IM de xilacina y anestesiados con 40 mg/kg de ketamina IM. Se realizará una incisión en la cara lateral del tercio distal del muslo para exponer el tercio distal del



FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS  
Universidad Nacional de La Pampa

fémur, donde se realizará un defecto óseo circular de 3 mm de diámetro en la corteza de la diáfisis con un perforador eléctrico a baja velocidad y una mecha de carbono. Los defectos se rellenarán con MOD. Los músculos, fascias, tejido subcutáneo y piel se suturarán según técnicas de rutina con poligalactina.

Luego de las intervenciones los animales recibirán terapia antiinflamatoria (ketoprofeno 0,1 mg/Kg IM; Calmavet, Lab. Zoovet) y antibioticoterapia de amplio espectro durante 3-5 días. Los conejos serán sacrificados en grupos de 3 a los 7,15,21 y 30 días post-operatorio. De los cadáveres se recuperarán la sección del hueso conteniendo los defectos tratados y serán fijados en formalina al 10% tamponada a pH 7,0 con buffer de fosfatos por 48-72 horas y posteriormente se procesarán histológicamente. Se obtendrán cortes de 5 µm de espesor que se montarán en portaobjetos para realizar estudio inmunohistoquímico de Osx.

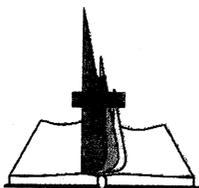
### ***Técnica inmunohistoquímica***

Una vez que los cortes se desparafinen y rehidraten se tratarán con peróxido de hidrógeno al 3% (v/v), se lavarán con PBS y posteriormente se incubarán con el anticuerpo para Osx (OSX (F-3) mouse monoclonal IgG1, Santa Cruz Biotechnology, Inc, USA) durante 1 hora a temperatura ambiente en cámara húmeda. Posteriormente serán lavados con solución tampón fosfato salino (PBS pH 7,2) e incubados durante 20 minutos con el segundo anticuerpo biotilado (compuesto por inmunoglobulinas biotilada anti-conejo, anti-ratón y anti-cabra). Luego de ser nuevamente lavados con PBS serán tratados con el complejo de streptavidina conjugada con peroxidasa (LSAB®+Systems HRP, Dako Cytomation). Luego del período de incubación se lavarán y tratarán con solución de sustrato cromógeno 3,3'-diaminobenzidina (DAB). Con posteridad los cortes serán contrastados con hematoxilina de Mayer, lavados con solución de hidróxido de amonio, deshidratados en batería de alcoholes de concentración creciente y montados con Entellan (Merck, Alemania). Se obtendrá un corte por cada individuo que no será procesado con el anticuerpo para Osx y que será contrastado con hematoxilina a los fines de ser empleados como control.

### ***Análisis de densitometría óptica (DO) y densitometría óptica integrada (DOI)***

Los cortes histológicos inmunomarcados se observarán bajo microscopio óptico Axiophot (Carl Zeiss, Alemania) acoplado a una cámara digital Powershot (G6, 7.1 megapíxeles, Canon INC, Japón) que emplea el software AxioVision 4.6.3 (Carl Zeiss, Alemania). Se capturarán 5 imágenes histológicas procedentes de cada animal con aumento 20X (Vasconcellos *et al.*, 2014). La inmunomarcación de Osx se considerará positiva cuando se tiña de color marrón a las células mesenquimáticas, pre osteoblastos, osteoblastos, osteocitos y condrocitos.

Las imágenes capturadas de los cortes histológicos se procesarán en formato TIFF, se introducirán en el software ImageJ 1.49b (Media Cybernetics, USA) que convertirá el color marrón de las inmunomarcaciones en imágenes binarias expresadas en color rojo y/o negro. El análisis digital establecerá la media de grises o intensidad incidente de una escala de grises de 0 (negro) a 255 (blanco). La intensidad incidente se aplicará a la fórmula para calcular la densidad óptica (DO), la cual se expresa como  $DO = \text{Log}_{10}(\text{intensidad transmitida}/\text{intensidad incidente})$  siendo la intensidad transmitida igual a 255. Como resultado, se obtendrá un valor abstracto que se empleará para determinar la



FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS  
Universidad Nacional de La Plata

densidad óptica integrada (DOI), donde  $DOI = DO \times \text{ÁREA}(\mu^2)$ . El resultado se expresará como unidades arbitrarias (UA). Las DO y DOI se presentarán como promedio de los datos obtenidos por cada individuo.

### **Análisis estadístico**

Los datos obtenidos de las DO y DOI de cada período de estudio se introducirán en el software Infostat (Di Rienzo *et al.*, 2010) para ser analizados con un test de ANOVA y LSD de Fisher para comparar múltiples grupos. La significación estadística se definirá como  $p < 0,05$ .

### **6.3. CONTRIBUCIÓN al CONOCIMIENTO CIENTÍFICO y/o TECNOLÓGICO y a la RESOLUCIÓN de los PROBLEMAS**

La experiencia permitirá establecer la presencia/ausencia de Osx en los distintos estadios de la reparación de defectos óseos tratados con MOD. A la vez, a través de la DO y DOI se cuantificará el grado de intervención en la reparación de los defectos óseos.

Por otra parte se estará haciendo aportes al conocimiento que se posee sobre Osx esperando contribuir a la comprensión del rol que posee sobre la osteogénesis en los procesos de reparación.

### **6.4. CRONOGRAMA ANUAL de ACTIVIDADES**

Año	Actividad	E	F	M	A	M	J	J	A	S	O	N	D
2018	Revisión bibliográfica												
	Obtención de MOD												
	Tratamiento												
2019	Revisión bibliográfica												
	Inmunohistoquímicas												
2020	Revisión bibliográfica												
	Análisis estadístico												
	Redacción informe final												

## **7. INFRAESTRUCTURA y PRESUPUESTO**

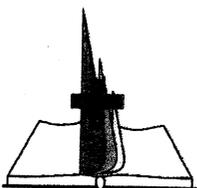
### **7.1. INFRAESTRUCTURA, EQUIPAMIENTO, SERVICIOS y OTROS BIENES REQUERIDOS por el PROYECTO YA EXISTENTES en esta INSTITUCIÓN:**

**La Facultad de Ciencias Veterinarias posee:**

- Bioterio
- Quirófanos
- Laboratorio donde realizar los estudios inmunohistoquímicos

**La Cátedra Técnica y Patología Quirúrgica posee:**

- CPU ubicado en el gabinete de la cátedra
- Los programas de análisis de imágenes y de análisis estadísticos de distribución gratuita instalados en el CPU del gabinete de la cátedra.
- Instrumental quirúrgico



FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS  
Universidad Nacional de La Plata

**7.2. INFRAESTRUCTURA, EQUIPAMIENTO, SERVICIOS y OTROS BIENES NECESARIOS para el PROYECTO y NO DISPONIBLES en esta FACULTAD**

**7.3. JUSTIFICACIÓN de la ADQUISICIÓN o FACTIBILIDAD de ACCESO en CONDICIONES de PRESTAMO o USO de los BIENES NO EXISTENTES en esta INSTITUCIÓN**

**7.4. ESPECIFICAR otras FUENTES de FINANCIACIÓN:**

Secretaría de Ciencia y Técnica, Facultad de Ciencias Veterinarias, UNLPam

**7.5. PRESUPUESTO ESTIMADO para el PROYECTO PRESENTADO (Total y Anual) \***

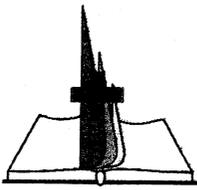
<b>BIENES DE CONSUMO</b>				
Concepto	Cantidad	Precio unitario		
Alimento balanceado	120 gr/día x 15 conejos = 2 bolsas de 25 kg	\$ 280,00		560,00
Ketamina	2 fcos x 50 mL	\$ 250,00		500,00
Xilacina – Kensol	1 fco x 10 mL	\$ 190,00		190,00
Poligalactina	15 hebras de 70 cm			
Descartables	Gasa, antiséptico, soluciones, jeringas 3 mL, agujas hipodérmicas, parenterales,			2.000,00
Dipenisol	1 fco x 10 mL	\$ 354,00		354,00
Oxitetraciclina polvo	1 sobre 100 gr; Lab Proagro	\$ 76,00		76,00
Anticuerpo OSX (F-3), mouse monoclonal IgG1, 200 µg/ml. Cód:sc-393325. Marca: Santa Cruz	1 kit	\$ 20.240,00		20.240,00
<b>Subtotal 1</b>				<b>\$ 23.920,00</b>
<b>BIENES DE SERVICIOS</b>				
Concepto	Cantidad	Precio unitario		
Viajes presentación de trabajo en eventos científicos	Viajes a la ciudad de Buenos Aires	\$1.300,00		\$2.600,00
Confección de posters				\$1.500,00
Inscripción eventos científicos				\$2.000,00
<b>Subtotal 2</b>				<b>6.100,00</b>
<b>TOTAL</b>				<b>30.020,00</b>

\* El Consejo Directivo adjudicará presupuesto a cada Proyecto de acuerdo a su Presupuesto de Ciencia y Técnica anual, tomando en cuenta normas y criterios que el mismo determine.



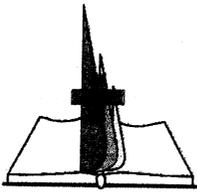
## **8. BIBLIOGRAFÍA**

1. Audisio SA, Vaquero PG, Torres PA, Verna EC, Ocampo LN, Ratusnu V, Cristofolini AL, Merkis CI. 2014. Obtención – caracterización y almacenamiento de matriz ósea desmineralizada. *Revista de Medicina Veterinaria*. 95:24-34.
2. Baek, W.Y.; Lee, M.A.; Jung, J.W.; Kim, S.Y.; Akiyama, H.; Crombrughe, B.; Kim, J.E. 2009. Positive regulation of adult bone formation by osteoblast-specific transcription factor osterix. *J Bone Min Res*. 24:1055-1065.
3. Baek, W.Y.; de Crombrughe, B.; Kim, J.E. 2010. Postnatally induced inactivation of Osterix in osteoblasts results in the reduction of bone formation and maintenance. *Bone*. 46:920–928
4. Barbutto, R.; Mitchell, J. 2013. Regulation of the osterix (Osx, Sp7) promoter by osterix and its inhibition by parathyroid hormone. *J Mol Endocrinol*. 51:99–108
5. Black, A.R.; Black, J.D.; Azizkhan-Clifford, J. 2001. Sp1 and krüppel-like factor family of transcription factors in cell growth regulation and cancer. *J Cell Physiol*. 188:143-160.
6. Brown, G.; Kalff, S.; Gemmill, T.J.; Pink, J.; Oxley, B.; McKee, W.M.; Clarke, S.P. 2016. Highly comminuted, articular fractures of the distal antebrachium managed by pancarpal arthrodesis in 8 dogs. *Vet Surg*. 45:44–51.
7. Chen, S.X.; Feng, J.Q.; Zhang, H.; Jia, M.; Shen, Y.; Zong, Z.W. 2014. Key role for the transcriptional factor, osterix, in spine development. *Spine J*. 14:683-694
8. da Silva, S.W.G., de Castro, R.P.; de Viana, G.A.; dos Santos, F.R.; de Moraes, R.S.; do Oriente, V.N. 2012. Estenose de pelve em felino tratado com anel de matriz ósea desmineralizada (MOD) - relato de caso. *Clínica Vet*. 17:46-50.
9. Colnot, C.; Romero, D.M.; Huang, S.; Helms, J.A. 2005. Mechanism of action of demineralized bone matrix in the repair of cortical bone defects. *Clin Orthop Rel Res*. 435:69-78.
10. Day, T.F.; Guo, X.; Garrett-Beal, L.; Yang, Y. 2005. Wnt/b-catenin signaling in mesenchymal progenitors controls osteoblast and chondrocyte differentiation during vertebrate skeletogenesis. *Dev Cell*. 8:739–750.
11. Di Rienzo, J.A.; Casanoves, F.; Balzarini, M.G.; Gonzalez, L.; Tablada, M.; Robledo, C.W. InfoStat versión 2010. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina
12. Eppley, B.L.; Pietrzak, W.S.; Blanton, M.W. 2005. Allograft and alloplastic bone substitutes: a review of science and technology for the craniomaxillofacial surgeon. *J of Craniofac Surg*. 16:981-989.
13. Galindo, M.; Pratap, J.; Young, D.W.; Hovhannisyan, H.; Im, H.J.; Choi, J.Y.; Lian, J.B.; Stein, J.L.; Stein, G.S.; vanWijnen, A.J. The bone-specific expression of Runx2 oscillates during the cell cycle to support a G1-related antiproliferative function in osteoblasts. *J Biol Chem*. 2005; 280:20274–20285
14. Ganesh, T.N. 1992. Comparative studies on bone grafting for radial fracture using autogeneic cancellous bone, allogeneic demineralized bone matrix and xenogeneic demineralized bone matrix for better osteogenesis in canines. *Indian J Vet Surg*. 14:1-48.



FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS  
Universidad Nacional de La Pampa

15. Hagh, M.F.; Noruzinia, M.; Mortazavi, Y.; Soleimani, M.; Kaviani, S.; Maymand, M.M. Zoledronic acid induces osteoblastic differentiation of mesenchymal stem cells without change in hypomethylation status of osterix promoter. *Cell J.* 2012; 14:90-97
16. Hill, T.P.; Spater, D.; Taketo, M.M.; Birchmeier, W.; Hartmann, C. Canonical Wnt/b-catenin signaling prevents osteoblasts from differentiating into chondrocytes. *Dev Cell.* 2005; 8:727-738.
17. Hoffer MJ, Griffon DJ, Schaeffer DJ, Johnson AL, Thomas MW. 2008. Clinical applications of demineralized bone matrix: a retrospective and case-matched study of seventy-five dogs. *Veterinary Surgery*, 37,639-647
18. Hu, H.; Hilton, M.J.; Tu, X.; Yu, K.; Ornitz, D.M.; Long, F. Sequential roles of Hedgehog and Wnt signaling in osteoblast development. *Development* 2005; 132:49-60.
19. Javed, A.; Chen, H.; Ghori, F.Y. Genetic and transcriptional control of bone formation. *Oral Max Surg Clinics North Am.* 2010; 22:283-293.
20. Jing J, Hinton RJ, Jing Y, Liu Y, Zhou X, Feng JQ. Osterix couples chondrogenesis and osteogenesis in post-natal condylar growth. *J Dental Res.* 2014; 93:1014-1021.
21. Kaback, L.A.; Soung do, Y.; Naik, A.; Smith, N.; Schwarz, E.M.; O'Keefe, R.J.; Drissi, H. Osterix/Sp7 regulates mesenchymal stem cell mediated endochondral ossification. *J Cell Physiol.* 2008; 214:173-182
22. Kobayashi H, Gao Y, Ueta C, Yamaguchi A, Komori T. Multilineage differentiation of Cbfa1-deficient calvarial cells in vitro. *Biochem Biophys Res Commun* 2000; 273:630-636.
23. Komori, T.; Yagi, H.; Nomura, S.; Yamaguchi, A.; Sasaki, K.; Deguchi, K.; Shimizu, Y.; Bronson, R.T.; Gao, Y.H.; Inada, M.; Sato, M.; Okamoto, R.; Kitamura, Y.; Yoshiki, S.; Kishimoto, T. Targeted disruption of Cbfa1 results in a complete lack of bone formation owing to maturational arrest of osteoblasts. *Cell* 1997; 89: 755-764.
24. Kumar RVS, Ramakrishna O. (2001). Femoral fracture repair by demineralized bone matrix combinations in canines. *Indian Journal of Animal Sciences*, 71,749-751.
25. Lin, G.L.; Hankenson, K.D. Integration of BMP, Wnt, and notch signaling pathways in osteoblast differentiation. *J Cel Biochem.* 2011; 112:3491-501
26. Maes, C.; Kobayashi, T.; Selig, M.K.; Torrekens, S.; Roth, S.I.; Mackem, S.; Carmeliet, G.; Kronenberg, H.M. Osteoblast precursors, but not mature osteoblasts, move into developing and fractured bones along with invading blood vessels. *Developmental cell.* 2010; 19:329-344.
27. McKee MD, Farach CM, Butler WT, Hauschka PV, Nanci A. (1993). Ultrastructural immunolocalization of noncollagenous (osteopontin and osteocalcin) and plasma (albumin and alpha 2HSglycoprotein) proteins in rat bone. *Journal of Bone Mineral Research.* 8(4):485-496
28. Metzger, C.E.; Brezicha, J.E.; Elizondo, J.P.; Narayanan, S.A.; Hogan, H.A.; Bloomfield, S.A. Differential responses of mechanosensitive osteocyte proteins in fore- and hindlimbs of hindlimb-unloaded rats. *Bone.* 2017; 105:26-34.
29. Nakashima, K.; Zhou, X.; Kunkel, G.; Zhang, Z.; Deng, J.M.; Behringer, R.R.; de Crombrughe, B. 2002. The novel zinc finger-containing transcription factor osterix is required for osteoblast differentiation and bone formation. *Cell.* 108:17-29
30. Nakashima, K.; deCrombrughe, B. 2003. Transcriptional mechanisms in osteoblast differentiation and bone formation. *Trends Genetics.* 19:458-66.



FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS  
Universidad Nacional de La Plata

31. Nelson, W.J. Regulation of cell-cell adhesion by the cadherin-catenin complex. *Biochem Soc Trans.* 2008; 36:149-155.
32. Otto, F., Thornell, A.P.; Crompton, T.; Denzel, A.; Gilmour, K.C.; Rosewell, I.R.; Stamp, G.W.; Beddington, R.S.; Mundlos, S.; Olsen, B.R.; Selby, P.B.; Owen, M.J. *Cbfa1*, a candidate gene for cleidocranial dysplasia syndrome, is essential for osteoblast differentiation and bone development. *Cell* 1997; 89:765-771.
33. Smok, C.; Rojas, M. Similitudes entre ontogenia y regeneración ósea post-fractura. *Int. J Morphol.* 2016 34(4):1293-129
34. Tan, S.H.; Senarath-Yapac, K.; Chungc, M.T.; Longakerc, M.T.; Wud, J.Y.; Nusseb, R. Wnts produced by Osterix-expressing osteolineage cells regulate their proliferation and differentiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2014; 5262-5271. DOI: 10.1073/pnas.1420463111
35. Tsuji, K.; Bandyopadhyay, A.; Harfe, B.D.; Cox, K.; Kakar, S.; Gerstenfeld, L.; Einhorn, T.; Tabin, C.J.; Rosen, V. BMP2 activity, although dispensable for bone formation, is required for the initiation of fracture healing. *Nature Gen.* 2006; 38:1424-1429.
36. Urist, M.R. Bone formation by autoinduction. *Science.* 1965, 150,893-899.
37. Vasconcellos, A.; Cisternas C.; Paredes, M. Estudio inmunohistoquímico comparativo del receptor de estrógeno en tejido endometrial de ovejas razas Texel y Araucana. *Int J Morphol.* 2014; 32:1120-1124.
38. Yagi, K.; Tsuji, K.; Nifuji, A.; Shinomiya, K.; Nakashima, K.; deCrombrughe, B.; Noda, M. Bone morphogenetic protein-2 enhances osterix gene expression in chondrocytes. *J. Cell. Biochem.* 2003; 88:1077-1083
39. Zhang, C. 2010. Transcriptional regulation of bone formation by the osteoblast-specific transcription factor *Osx*. *J Ortho Surg Res.* 5:37-45.
40. Zhang, C.; Tang, W.; Li, Y.; Yang, F.; Dowd, D.R.; MacDonald, P.N. 2011. Osteoblast-Specific Transcription Factor Osterix Increases Vitamin D Receptor Gene Expression in Osteoblasts. *PLoS ONE.*
41. Zhou, X.; Zhang, Z.; Feng, J.Q.; Dusevich, V.M.; Sinha, K.; Zhang, H.; Darnay, B.G.; deCrombrughe, B. Multiple functions of Osterix are required for bone growth and homeostasis in postnatal mice. *Proc Nat Ac Sc.* 2010; 107:12919-12924.