



TÍTULO:

ESTUDIO DE LA DIFERENCIACIÓN CELULAR DURANTE
LA OSTEOGÉNESIS EN DEFECTOS ORTOPÉDICOS CON
MATRIZ ÓSEA DESMINERALIZADA EN PERROS

INTEGRANTES

MERKIS, Cecilia
TORRES, Perla
CRISTOFOLINI, Andrea
AUDISIO, Santiago
VAQUERO, Pablo
VERNA, Edgardo

FIRMA

Dra. CECILIA MERKIS
Área Microscopía Electrónica
U.N.R.C.

Dra. Andrea Cristofolini



Número de Proyecto:

Año:

(No llenar)

UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PAMPA

Facultad de Ciencias Veterinarias

1. IDENTIFICACIÓN del PROYECTO

1.1. TÍTULO del PROYECTO:

ESTUDIO DE LA DIFERENCIACIÓN CELULAR DURANTE LA OSTEOGÉNESIS EN DEFECTOS ORTOPÉDICOS CON MATRIZ ÓSEA DESMINERALIZADA EN PERROS

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

BÁSICA: Consiste en trabajos experimentales o teóricos que se emprenden 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, Departamento de Ciencias Clínicas. Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional de La Pampa.

2.2. OTRAS INSTITUCIONES: Área de Microscopía Electrónica. Departamento de Patología Animal. Facultad de Agronomía y Veterinaria. Universidad Nacional de Río Cuarto.

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	Categ. Invest.	Responsabilidad (1)	Cátedra o Institución	Cargo y Dedicación	Tiempo dedicac. Hs./Sem	Firma
Merkis, Cecilia I.	Dra.	III	D	Área de Microscopía Electrónica. UNRC	JTP. Exclusiva	6	
Torres, Perla	Dra.	IV	CoDirectora	Química Biológica.	JTP. Simple	6	

				UNLPam			
Cristofolini, Andrea L.	Dra.		I	Área de Microscopía Electrónica. UNRC	Becaria CONICET. Docencia equivalente a ayudante de primera simple.	6	
Vaquero, Pablo	MV	V	I	CTPQ-UNLPam	AP Simple	6	
Verna, Edgardo	MV	V	I	CTPQ-UNLPam	AP Semiex.	6	

(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.
Audisio, Santiago	Doctor	“Estudio de la diferenciación celular durante la osteogénesis en defectos ortopédicos con matriz ósea desmineralizada en perros”	Facultad de Agronomía y Veterinaria. Universidad Nacional de Río Cuarto	Merkis, Cecilia	6

2.3.3. PERSONAL de APOYO:

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

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

3.1. FECHA de INICIO: 01 / 01 / 2011 FINALIZACIÓN: 31 / 12/ 2013

4. RESUMEN del PROYECTO: (Máximo 200 palabras)

La matriz ósea desmineralizada (MOD) posee la propiedad de formar hueso nuevo por osteoinducción, incluso cuando es implantada en el tejido muscular y subcutáneo, por mecanismos de osificación endocondral como sucede en la etapa embrionaria y de reparación de fracturas que se observa en los adultos. La capacidad de regeneración de la MOD le es atribuida a los elementos que la componen, entre los que cuentan la presencia de colágeno Tipo I, proteínas no colágenas como proteínas morfogénicas del hueso (BMP), factores transformadores del crecimiento- β (TGF- β), osteogenina, factores similares de la insulina y factores de crecimiento fibroblástico, que desencadenan la cascada de reparación y regeneración de hueso. Se emplearán caninos longilíneos, de talla mediana, machos y hembras sexualmente maduros. Se seleccionará uno de los miembros anteriores que será preparado para ser intervenido quirúrgicamente. El defecto se rellenará con la matriz ósea desmineralizada, previamente obtenida. La sutura del plano muscular mantendrá el relleno del defecto. Se trabajará con muestras de tejido óseo a los 5, 10, 20, 30, 90 y 180 días post-implante a las que se les determinará por inmunohistoquímica osteopontina, osteocalcina, osteogenina; a través de la técnica de Picrosirius red se analizarán las fibras colágenas.

5. INTRODUCCIÓN y ANTECEDENTES

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

INTRODUCCIÓN

La reconstrucción de defectos óseos segmentales como secuelas de traumatismos, resecciones quirúrgicas para el tratamiento de neoplasias e infecciones óseas, representa un desafío para los cirujanos ortopedistas (De Pablos *et al.*, 1992). Tradicionalmente el tratamiento de estos defectos ha sido mediante el empleo de auto y aloinjertos de hueso, materiales sustitutos y combinación de sustitutos con factores de crecimiento (Habal, 1992; De Pablos *et al.*, 1992).

Urist describe en 1965 la preparación de la matriz ósea desmineralizada (MOD) y su uso como agente osteoinductivo, incluso cuando ésta es implantada en el tejido muscular y subcutáneo demostrando que la implantación extraesquelética de la misma en animales resulta en osificación heterotópica (Urist, 1965; Zárate-Kalfópulos y Reyes-Sanchez, 2006).

Los protocolos de obtención de MOD establecen la fragmentación en partículas de tamaño que oscila entre los 74-420 μm . Los mecanismos de osteoinducción observados correspondieron a los procesos de osificación endocondral tal como sucede en la etapa embrionaria y en la reparación de fracturas que se observa en los adultos (Reddi y Anderson, 1976; Le Geros, 1991).

En la porción osteoinductiva de la MOD se ha determinado la presencia de glicoproteínas solubles de bajo peso molecular, denominadas proteínas morfogénicas del hueso (BMP) que han sido identificadas como miembros de la superfamilia de proteínas del factor de crecimiento transformador de proteínas- β (TGF- β) (Urist, 1965; Wozney *et al.*, 1998; Sonobe *et al.*, 2004; Chen *et al.*, 2004).

La capacidad de regeneración de la MOD le es atribuida a los elementos que la componen, entre los que se destacan la presencia de colágeno Tipo I, y proteínas no colágenas tales como BMP, TGF- β , osteogenina, IGF-I y FGF, las cuales desencadenan la cascada de reparación y regeneración del hueso (Zárate-Kalfópulos y Reyes-Sanchez, 2006).

Cabe destacar que las BMP son potentes factores locales que regulan la diferenciación osteoblástica (Yamaguchi *et al.*, 1991). Se hallan en la matriz ósea y se expresan en la faz temprana de la reparación de las fracturas (Lind y Bumger, 2001; Malafaya *et al.*, 2002). Siendo las BMP 2, 4, 6 y 7 las que mayor propiedad osteogénica poseen (Lind y Bumger, 2001; Jadlowiec *et al.*, 2003). Éstas

ejercen quimiotactismo de las células mesenquimáticas hacia el sitio de reparación y luego estimulan su diferenciación hacia el linaje osteogénico. BMP-7 y -2 intervienen en la diferenciación osteoblástica induciendo e incrementando la expresión del factor de transcripción Cbfa1 (Nishimura *et al.*, 1998; Lee *et al.*, 1999; Malafaya *et al.*, 2002).

La MOD no proporciona integridad estructural, por lo que se debe utilizar en un ambiente de estabilidad como factor osteoinductivo, sin embargo, sin embargo posee potencial osteoconductor debido a su contenido de colágeno (Chapman *et al.*, 1997; Ludwig y Boden, 1999). A pesar de su elevado empleo, en la actualidad existen pocos estudios que validen a la MOD como una alternativa a los injertos óseos, y otros autores destacan el uso de la MOD como potenciador de la fusión cuando se acompaña del injerto óseo autólogo (Sassard *et al.*, 1994; Chapman *et al.*, 1997; Sandhu, 1999; Zárate-Kalfópulos y Reyes-Sanchez, 2006).

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)

PUBLICACIONES EN CONGRESOS INTERNACIONALES (últimos cinco años)

1. **Cristofolini, A.; Merkis, C.**; Zubeldía, D. y M. Koncurat. 2006. "Detección de fibrinógeno durante la placentación porcina. Estudio preliminar". V Congreso de Producción Porcina del MERCOSUR, VII Nacional de Producción Porcina, XIV Jornadas de Producción Porcina. A realizarse los días 22 al 24 de mayo de 2006. Córdoba. Argentina.
2. Zubeldía, D.; Sanchis, E.; **Merkis, C.; Cristofolini, A.**; y M. Koncurat. 2006. "Presencia de D-Glucosa y D-Manosa en muestras de placenta porcina en diferentes períodos gestacionales". V Congreso de Producción Porcina del MERCOSUR, VIII Nacional de Producción Porcina, XIV Jornadas de Producción Porcina. A realizarse los días 22 al 24 de mayo de 2006. Córdoba. Argentina.
3. **Merkis, C.; Cristofolini, A.**; Alonso, G.; Gallo, G.; Principe, F.; Chanique, A.; Zubeldía, D.; M. Koncurat. 2006. "Expresión de receptores de apoptosis y antiapoptosis durante los diferentes estadios gestacionales en porcinos". V Congreso de Producción Porcina del MERCOSUR, VIII Nacional de Producción Porcina, XIV Jornadas de Producción Porcina. A realizarse los días 22 al 24 de mayo de 2006. Córdoba. Argentina.
4. **Merkis, C.; Cristofolini, A.**; Sanchis, E.; Vaquer, V.; Zubeldía, D.; Alonso, G.; Moschetti, E.; Lajmanovich, A. y M. Koncurat. 2006. "Relación entre apoptosis y angiogénesis en la placenta porcina". PorkExpo 2006 and III Congreso Latino-Americano de Suinocultura., Foz de Iguazú, Brasil.
5. **Merkis, C.; Cristofolini, A.**; Zubeldía, D.; Moschetti, E.; Lajmanovich, A. y M. Koncurat. Apoptosis celular y angiogénesis durante la placentación porcina. 2007. XIX REUNIÓN DE LA ASOCIACIÓN LATINOAMERICANA DE PRODUCCIÓN ANIMAL XXXIII REUNIÓN DE LA ASOCIACIÓN MEXICANA DE PRODUCCIÓN ANIMAL IV Congreso Internacional de Ganadería de Doble Propósito. ALPA, Octubre 21 al 25, Cusco, Perú.
6. M. Koncurat. **Merkis, C. Cristofolini, A.**; Zubeldía, D.; Vaquer, V., Barroso, F.; Lloret, M.; Lajmanovich, A. 2007. "Apoptotic phenomenon during porcine placentation". III Latin American Symposium on Maternal Fetal Interaction Placenta-Research and Clinical. Realizado del 4-7 de noviembre de 2007. Los Cocos. Córdoba. Argentina.
7. **Merkis C., Cristofolini A.,** Barroso F., Vaquer V., Lloret M., Alonso G, Chanique A., Schleeff, N., Zubeldia, D. y M. Koncurat. 2008. "Expresión de Bcl-2 y Bax durante la gestación en porcinos". VI Congreso de Producción Porcina del Mercosur. IX Congreso Nacional de Producción Porcina, XV Jornadas de Actualización Porcina. Realizado del 26-28 de mayo de 2008 en Potrero de los Funes, San Luis. Argentina.
8. **Merkis, C., Cristofolini, A.,** Vaquer, V., Barroso, F., Allende, F., Koncurat, M. 2008. "Inmunolocalización de VEGF y de fibrinógeno en placentas porcinas de diferentes estadios de preñez". PORK-EXPO & IV Forum Internacional de Suinocultura. Realizado del 30/9 al 02/10 de 2008. Curitiba. Brasil.
9. Koncurat, M., **Cristofolini, A., Merkis, C.,** Vaquer, V., Barroso, F., Allende, F. 2008. "Expresión de receptores de muerte celular y de proteínas mitocondriales reguladoras en placenta porcina". PORK-EXPO & IV Forum Internacional de Suinocultura. Realizado del 30/9 al 02/10 de 2008. Curitiba. Brasil.
10. Ribeiro, J.M.M.; Vital, Hélio de Carvalho; Magnoli, Carina; Merkis, C.; **Cristofolini, A.**; Rosa, C.A.R. Alterações ultraestruturais em cepas de referência de *Aspergillus spp.* induzidas por irradiação gama. XIII Encontro Nacional de Micotoxinas, 2008, Rio de Janeiro. Brasil.
11. **Merkis, C.; Cristofolini, A.**; Sanchis, G.; Chanique, A.; Campos, M.; Alessio, A.; Taglialegna, A.; Koncurat, M. 2009. "Detección de colágeno a través de Picrosirius red en tejidos placentarios durante la gestación porcina. Estudio Preliminar". Primer Encuentro Internacional Virtual 2009 de Educación e Investigación en Ciencias Morfológicas, realizado del 11 al 30 de septiembre de 2009, Córdoba. Argentina
12. **Cristofolini, A.; Merkis, C.**; Sanchis, G.; Chanique, A.; Allende, F.; Campos, M.; Alessio, A.; Taglialegna, A.; Moschetti, E.; Koncurat M. 2009. Short abstract: "Cellular apoptosis during porcine placentation". Extended abstract: "Cellular apoptosis in porcine placenta of different periods of gestation". 10th Inter-American Congress on Electron Microscopy- CIASEM 2009, 1st Congress of the Argentine Society of Microscopy- SAMIC 2009, realizado del 25 al 28 de octubre de 2009 en Rosario, Santa Fe. Argentina.
13. Campos, M.; Sanchis, G.; **Cristofolini, A.**; Chanique, A.; Moschetti, E.; **Merkis, C.** 2010. VEGF y área vascular en muestras

placentarias porcinas. Estudio preliminar. X° Congreso de la Asociación Latinoamericana de Veterinarios Especialistas en Cerdos (X° ALVEC); X° Congreso Nacional de Producción Porcina (X° CNPP) y las XVI° Jornadas de Actualización Porcina (XVI° JAP). A realizarse del 8 al 11 de agosto de 2010 en Mendoza.

PUBLICACIONES EN REVISTAS CIENTÍFICAS CON REFERATO (últimos cinco años)

1. **Merkis, C.; Cristofolini, A.**; Franchino, M.; Moschetti, E ; Koncurat, M. “Relación entre área total y área epitelial de vellosidades placentarias porcinas en diferentes estadios gestacionales”. *Revista Investigación Veterinaria (InVet)* 2005, 7 (1): 47-54. ISSN 1514-6634. Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad de Buenos Aires. Buenos Aires. Argentina.
2. Sanchis, E.; **Merkis, C.; Cristofolini, A.**; Franchino, M.; Zubeldía, D. y M. Koncurat. 2005. “Study of glycoconjugates during porcine placentation”. *Biocell* ISSN 0327-9545, 29(2). Argentina.
3. Zubeldía, D.; **Merkis, C.; Cristofolini, A.**; y M. Koncurat. 2007 “Presence of Galactose and n-acetilgalactosamine during porcine placentation”. *Biocell*, ISSN 0327-9545, 31(2): 298. Argentina.
4. **Cristofolini, A.** (expositora); **Merkis, C.**; Zubeldía, D.; Lajmanovich, A. y M. Koncurat. 2007. “Detection of apoptosis with immunochemistry and TUNEL during porcine placentation”. *Biocell*, ISSN 0327-9545, 31(2), 298.. Argentina.
5. **Merkis, C.; Cristofolini, A.**; Franchino, M.; Sanchis, E.; Moschetti, E. y M. Koncurat. 2006. “Angiogénesis placentaria durante la gestación porcina”. *Revista Electrónica de Veterinaria REDVET* ISSN 1695-7504, Vol. VII, N° 04, abril/2006. <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet>.
6. **Cristofolini, A.** (expositora); **Merkis, C.**; Zubeldía, D.; Barroso, F.; Lloret, M.; Sanchis, G.; Vaquer, V. y M. Koncurat. 2007. “FAS B-10, FAS C-20 and TRAIL expression during porcine placentation”. *Biocell* ISSN 0327-9545, 31(1):187. Argentina.
7. **Merkis C, Cristofolini A,** Koncurat M. 2007. Apoptotic phenomena during porcine placentation. *Revista Electrónica de Veterinaria: REDVET* enero 2007, ISSN 1695-7504. www.veterinaria.org/revistas/redvet/n010107.html.
8. **Merkis C, Cristofolini A,** Sanchis G, Moschetti E, Koncurat M. “Preliminary study of cellular apoptosis during porcine placentation”. 2007. *Biocell* 2006, 30(1), en FE DE ERRATAS de *Biocell* 2007, 31(2): 313.
9. **Cristofolini, A.; Merkis, C.**; Zubeldía, D.; Vaquer, V., Barroso, F.; Lloret, Hechem, B.; M.; Schleaf, N; y M. Koncurat. 2008. “Study of apoptotic ways in porcine placenta”. *Biocell*, 2008, 32(1): 91.
10. Koncurat, M., **Merkis, C., Cristofolini, A.,** Zubeldía, D., Vaquer, V., Barroso, F.; Lloret, Lajmanovich, A. 2008. “Apoptotic phenomenon during porcine placentation”. *Placenta*, (2008). 29: 105.
11. **Cristofolini, A., Merkis C.,** Barroso, F., Vaquer, V., Lloret, M., Allende, F., Alonso G, Chanique A., Schleaf, N. y M. Koncurat. 2008. “Immunolocalization of regulators of mitochondrial proteins, Bcl-2 and Bax during porcine placentation”. *Biocell*, enviado a publicar en octubre de 2008. 33 2 2009 pag 161.
12. **Cristofolini, A., Merkis C.,** Barroso, F., Vaquer, V., Lloret, M., Moschetti, E. y M. Koncurat. 2008. “Detección de fibrinógeno, FAS B-10, FAS ZB4 y FAS C-20 durante la placentación porcina”. *Revista Electrónica Veterinaria - REDVET* Vol. IX, N° 7 Julio/2008. <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet> <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n070708.html>
13. **Cristofolini, A., Merkis C.,** Barroso, F., Vaquer Balmaceda, V., Allende, F., Chanique A. y M. Koncurat. 2009. “Inmunoreactividad de las proteínas Bcl-2 y Bax durante la placentación porcina”. *Revista Argentina de Producción Animal*. Editada por la Asociación Argentina de Producción Animal. En evaluación por revisores septiembre de 2009.
14. **Cristofolini, A., Merkis C.,** Barroso, F., Vaquer Balmaceda, V., Allende, F., Chanique, A. y M. Koncurat. 2009. “Inmunolocalización de proteínas mitocondriales reguladoras durante la placentación porcina”. *Revista Electrónica Veterinaria - REDVET*. <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet> <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n070708.html>. **REDVET** Revista Electrónica de Veterinaria. <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet> - <http://revista.veterinaria.org> Vol. 10, N° 9, Septiembre/2009 – <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n090909.html>.
15. **Cristofolini, A.** 2008. Expositora en el Simposio: Actualización en Técnicas Aplicadas a la Histología e Histopatología. Lectinohistoquímica: Principios básicos y aplicaciones. En el XI Congreso Argentino de Ciencias Morfológicas, I Congreso Internacional de Educación e Investigación de Ciencias Morfológicas, I Encuentro de Histotecnólogos. *International Journal of Morphology* ISSN 0717-9502 versión on-line, 26(3):718-786, 2008, Temuco Chile.
16. Ribeiro, J.M.M.; Vital, Hélio de Carvalho; Magnoli, Carina; **Merkis, C.; Cristofolini, A.**; Rosa, C.A.R. Alterações ultraestruturais em cepas de referência de *Aspergillus spp.* induzidas por irradiação gama. In: XIII Encontro Nacional de Micotoxinas, 2008, Rio de Janeiro. *Revista de Ciências da Vida. Seropédica*: Editora Universidade Rural, 2008. v. 28. p. 19-21.
17. Sanchis, E.; Williamson, D.; **Cristofolini, A.; Merkis, C.** y M. Koncurat. 2009. “Osteopontin and $\alpha\beta 3$ integrin immunoeexpression in porcine placental tissues. Preliminary study”. *Biocell* ISSN 0327-9545 - 33(3): 256 - Mendoza. Argentina.
18. **Cristofolini, A.; Merkis, C.**; Sanchis, E.; Chanique, A.; Moschetti, E.; Campos, M.; Taglialegna, A.; Alessio, A.; Allende, F. 2009. “Localization of collagen through Picrosirius red in porcine placenta”. *Biocell* ISSN 0327-9545 - 33(3): 256 - Mendoza. Argentina.
19. **Merkis, C.**; Turiello, M.; **Cristofolini, A.**; Sanchis, E.; Chanique, A.; Campos, M.; Pastorino, I. 2009. “Placental structure an ultrastructure in Anglo-Nubian goats. Preliminar study”. *Biocell* ISSN 0327-9545 33(3): 256 - Mendoza. Argentina.
20. Sanchis*, E.; **Cristofolini, A.; Merkis, C.**; Chanique, A.; Moschetti, E.; Koncurat, M. 2009. “Preliminary results of osteopontin immunoeexpression in the porcine placenta”. *Anatomía Histología Embryología*, 39, 87-88. Journal of World Association of Veterinary Anatomists. Munich. Alemania.
21. **Cristofolini, A.; Merkis, C.**; Sanchis, G.; Chanique, A.; Allende, F.; Campos, M.; Alessio, A.; Taglialegna, A.; Moschetti, E.; Koncurat M. 2009. “Cellular apoptosis in porcine placenta of different periods of gestation”. *Acta Microscopica*, 1(C): 691-692. Caracas. Venezuela.
22. Ribeiro, J.; Vital, H.; **Merkis, C.; Cristofolini, A.**; Astoreca, A.; Magnoli, C.; Orlando, j.; Carú, M.; Dalcero, A.; Cavaglieri, L.; da Rocha Rosa, C. 2009. “Effect of gamma radiation on *Aspergillus flavus* and *Aspergillus ochraceus*

morphological, toxigenic and genetic profile". Enviado (N° res090303) a la Revista *Research in Microbiology*. Paris. Francia.

23. **Merkis, C.; Cristofolini, A.;** Sanchis, E.; Koncurat, M. 2010. Expression of death cellular receptors FAS/CD95 and DR4 during porcine placentation. En revisión por consultores. *International Journal of Morphology*. Chile.

24. Magnoli, A.; Monge, M.; Miazzi, R.; Cavaglieri, L.; Magnoli, C.; **Merkis, C.; Cristofolini, A.;** Dalcero, A.; Chiacchiera, S. 2010. Effect of Low Levels of Aflatoxin B1 on Performance, Biochemical Parameters and Aflatoxin B1 in Broilers Liver Tissues in Presence of Monensin and Sodium Bentonite's. En revision por consultores PS-10-00971. *Poultry Science*. Francia.

MENCION ESPECIAL: Expresión de FAS B-10, FAS C-20 y TRAIL durante la placentación porcina. Reunión Científica Anual-Sociedad de Biología de Cuyo. IV Reunión Anual Sociedad de Microscopía Argentina. San Luis. 2006.

MENCION ESPECIAL: "Alterações ultraestruturais em cepas de referência de *Aspergillus* spp. induzidas por irradiação gama". In: XIII Encontro Nacional de Micotoxinas, 2008, Rio de Janeiro.

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

6.1.1. Problema

La reparación de defectos óseos ortopédicos es un desafío para los cirujanos ortopedistas debido a las escasas disponibilidad de tejido óseo para realizar autoinjertos, elevados costos de mantenimiento de bancos de hueso, posibilidades de transmisión de enfermedades y el siempre probable rechazo inmunológico.

6.1.2. Hipótesis

Los defectos óseos ortopédicos en el perro son factibles de ser tratados por combinación de matriz ósea desmineralizada (MOD), logrando la activación de procesos de proliferación y diferenciación celular, durante la regeneración y remodelación ósea.

6.1.3. Objetivos

- Estandarizar del método de obtención de matriz ósea desmineralizada.
- Evaluación de la matriz ósea desmineralizada a través de microscopía óptica de alta resolución.
- Realizar implantes de matriz ósea desmineralizada en defectos ortopédicos en perros.
- Analizar la equivalencia de hueso obtenido por regeneración respecto a la matriz ósea implantada, a través de la determinación de cenizas.
- Obtener muestras de tejido óseo a los 5, 10, 20, 30, 90 y 180 días post-implante.
- Analizar la evaluación del uso funcional del miembro del animal en estudio.
- Evaluar la evolución radiológica en los animales estudiados.
- Relacionar las etapas de diferenciación celular con los cambios de la matriz extracelular a través de técnicas de tinción diferencial y la composición de fibras colágenas con la técnica de picrosirius red.
- Determinar la secuencia de acontecimientos celulares durante el proceso de regeneración ósea, a través de histopatología con tinciones diferenciales y con la inmunomarcación de osteopontina, osteocalcina, osteogenina.
- Determinar cambios de conformación histológica del hueso neoformado durante los procesos de remodelación ósea, a través de técnicas de tinción diferencial.

6.1.4. Resultados esperados

A través del diseño del presente proyecto se espera reparar defectos óseos ortopédicos en perros a través de la utilización de MOD, determinando y describiendo los procesos celulares de regeneración y remodelación ósea a través de diferentes marcadores moleculares y del seguimiento radiológico.

6.2. METODOLOGÍA, MODELOS y TÉCNICAS

6.2.1. Animales

Se emplearán 30 caninos longilíneos, de talla mediana, machos y hembras sexualmente maduros, que previo a ser sometidos a los experimentos serán examinados clínicamente, vacunados, desparasitados y los antebrazos radiografiados. A los perros les serán creados defectos óseos segmentales de tamaño crítico, en los radios. Entendiéndose como defecto de tamaño crítico, al defecto que debido a sus dimensiones no cura de forma espontánea. El tamaño del defecto crítico equivale a 1.5 veces el diámetro del hueso. Los animales se manipularán de acuerdo a Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, Committee for the Update of the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, Institute for Laboratory Animal Research, Division on Earth and Life Studies. Se adjunta formulario para uso de animales de laboratorio del Comité de Asesoramiento ético de investigación en animales (CAE), UNRC.

6.2.2. Obtención de la matriz ósea desmineralizada

La matriz ósea desmineralizada se obtendrá del procesamiento de diáfisis de huesos largos (fémur, húmero, tibia y radio) de caninos. A cada segmento óseo les serán removidos los tejidos blandos y lavados con agua destilada. Seguidamente se les serán extraídas la grasa sumergiéndolos en solución de 1:1 de cloroformo-metanol en proporción de 30 ml de solución/gr de hueso durante 1,5 horas. Las diáfisis se dejarán a secar durante una noche a temperatura ambiente para luego ser triturados en partículas de 70-850 micrones y desmineralizados en una solución de ácido clorhídrico (HCl) 0,6 M en proporción de 50 ml HCl/gr de hueso. El material resultante se lavará sucesivamente con agua destilada estéril hasta obtener un pH de 3.5. Este procedimiento se completará en condiciones de esterilidad a 2° C. Del producto final se tomarán 2 muestras, una de destinará a cultivo bacteriológico para constatar ausencia de contaminaciones bacteriológicas y fúngicas; con la segunda muestra se realiza implante intramuscular en animales testigos.

6.2.3. Técnica de Microscopía Óptica de Alta Resolución (MOAR)

Se utilizaron los cortes semifinos ($\pm 0.25 \mu\text{m}$) de tejido placentario procesados para microscopía electrónica de transmisión. Los mismos fueron colocados sobre un portaobjetos de vidrio y teñidos con azul de toluidina sobre una platina termostatazada, para permitir la entrada del colorante al tejido incluido en la resina. Los cortes semifinos coloreados fueron montados en DPX (Merk®) y observados a través de un microscopio óptico Axiophot (Carl Zeiss, Alemania), la adquisición de las imágenes se realizó mediante una cámara digital Powershot G6, 7.1 megapixels (Canon INC, Japón) adosada al microscopio óptico y el procesamiento de las mismas a través del software AxioVision Release 4.6.3 (Carl Zeiss, Alemania).

6.2.4. Tratamiento

Los perros serán sedados con diazepam (0,2 mg/kg), sedados con acepromacia (0,1 mg/kg) y anestesiados con sevoflurano. Se seleccionará uno de los miembros anteriores que será preparado para ser intervenido quirúrgicamente, y el antebrazo será abordado por su cara dorsal para exponer el radio y se procederá a crear el defecto segmental crítico por osteotomía con sierra oscilante. El

defecto se rellenará con la matriz ósea desmineralizada. La sutura del plano muscular mantendrá el relleno del defecto. Los planos muscular, subcutáneo y piel se suturarán según técnicas de rutina.

Durante el post-operatorio a los perros les serán controlados estados de la herida quirúrgica y les serán aplicados antiinflamatorios no esteroideos (Ketofen 1 mg/kg) y antibioticoterapia de amplio espectro durante 5 días. Los perros serán divididos en 6 grupos de 5 perros. A la totalidad de los animales se les realizará seguimiento post-quirúrgico para evaluar la evolución radiológica, funcionalidad del miembro intervenido, determinación de la secuencia de acontecimientos celulares durante el proceso de regeneración ósea a través de histopatología con tinciones diferenciales, distribución de fibras colágenas a través de la técnica de Picosirius red y establecer los cambios de conformación histológica durante los procesos de remodelación ósea. Los caninos se dividirán en 6 grupos de n=5 para realizar las evaluaciones enunciadas a los 5, 10, 20, 30, 90 y 180 días post-quirúrgicos.

6.2.5. Seguimiento radiológico

En el tiempo pre-establecido se tomarán radiografías en proyecciones latero-lateral y dorso-palmar de los antebrazos intervenidos según técnicas de rutina.

6.2.6. Obtención de las muestras

A los 5, 10, 20, 30, 90 y 180 días post-quirúrgico a cada grupo de animales les será extraído una porción del radio conteniendo el defecto y el implante. La muestra se colocará en formol bufferado para los posteriores técnicas de microscópicas

6.2.7. Técnica de histología convencional para microscopia óptica

Se tomarán porciones de tejido óseo de 6 mm³ aproximadamente y se fijarán con formol salino tamponado. Posteriormente, se deshidratarán con baterías de alcoholes de graduación creciente, para ser incluidos en parafina. Se realizarán cortes histológicos de aproximadamente 4 µm, con un micrótopo (Microtom) y se montarán de a 3-4 cortes sobre cada portaobjeto. Previo al montaje, los cortes serán pasados por un recipiente con agua para evitar plegamientos de los mismos. Los portaobjetos con los cortes se guardarán toda la noche a 37° C en estufa, para lograr el secado completo de los mismos. Parte de los cortes histológicos se utilizarán para la realización de técnicas de tinción con hematoxilina-eosina para el reconocimiento de estructuras tisulares, y el resto para las técnicas de inmunohistoquímica y picosirius red.

6.2.8. Tinción de hematoxilina-eosina

Para la realización de la tinción de hematoxilina-eosina los cortes, previamente desparafinados y rehidratados, serán coloreados con hematoxilina durante 1,5 min., luego lavados con agua corriente. Posteriormente serán coloreados con la solución de eosina durante 1 min. y lavados con agua corriente. Luego serán deshidratados en y montados con Entellan (Merck) para ser observados en un microscopio óptico Axiophot (Carl Zeiss). La adquisición de las imágenes se realizará mediante una cámara digital Powershot G6, 7.1 megapíxeles (Canon INC, Japón) adosada al microscopio óptico.

6.2.9. Técnica de Picosirius red: determinación de fibras colágenas

Los cortes histológicos obtenidos según el párrafo 6.2.5. *Técnica de histología convencional para microscopia óptica*, serán desparafinados y rehidratados. Primero se procederá a teñir los núcleos, colocando los tejidos durante 30 minutos en hematoxilina de Weigert. Posteriormente se realizará un lavado con agua corriente durante 10 minutos. Luego se agregará la solución de Picosirius red dejándolos durante 1 hora. Al terminar esto, se realizarán dos lavados con agua ácida. Dejar secar. Se deshidratarán los cortes en tres lavados con etanol al 100%. Por último se lavarán en xilol y se montarán con Entellan (Merck) para ser observados en microscopio óptico de luz polarizada (Nikon

eclipse E-600 POL, Japón). La adquisición de imágenes se realizará mediante una cámara digital Powershot G6, 7.1 megapixels (Canon INC, Japón).

6.2.10. Técnicas inmunohistoquímicas: determinación de osteopontina, osteogenina y osteocalcina

Se estudiarán en las muestras óseas de perros, la expresión de osteopontina, osteogenina y osteocalcina por inmunohistoquímica utilizando anticuerpos específicos (Santa Cruz Biotechnology).

Para la realización de estas técnicas se utilizarán los cortes histológicos obtenidos según el párrafo 6.2.6. *Técnica de histología convencional para microscopía óptica*, los cuales serán desparafinados y rehidratados. La técnica se realizará a temperatura ambiente. Antes de la primera incubación con los anticuerpos, se tratarán los cortes histológicos con peróxido de hidrógeno al 3% (v/v), dejando actuar durante 5 minutos. Luego se lavarán con PBS. Posteriormente, los tejidos serán incubados con el primer anticuerpo, correspondiente a la respectiva molécula (anticuerpos anti-osteopontina, anti-osteogenina y anti-osteocalcina), durante 1 hora a temperatura ambiente en cámara húmeda. Se lavarán los preparados con 2 lavados de PBS de 10 minutos cada uno y se incubarán durante 20 minutos con el segundo anticuerpo biotinilado. Luego serán lavados con PBS (2 lavados de 10 minutos cada uno) y tratados con el complejo streptavidina- peroxidasa por 20 minutos. Posterior al periodo de incubación serán lavados con PBS (2 lavados de 10 minutos cada uno) y tratados con la solución cromógena (diaminobencidina: DAB) durante 15 minutos. Posteriormente serán contrastados con hematoxilina de Mayer por 50 segundos, lavados con solución de hidróxido de amonio al 0,08% por 30 segundos, deshidratados en batería de alcoholes de graduación creciente y montados con Entellan (Merck) para ser observados en microscopio óptico Axiophot (Carl Zeiss). La adquisición de las imágenes se realizará mediante una cámara digital Powershot G6, 7.1 megapixeles (Canon INC, Japón) adosada al microscopio óptico.

6.2.11. Evaluación del uso funcional del miembro

A cada animal le será evaluado durante el período post-quirúrgico la recuperación funcional del miembro, estableciendo la presencia o ausencia de claudicación; y en el caso de que haya claudicación se evaluará si el perro apoya o no el miembro, si apoya en estación o no y si manifiesta claudicación en la marcha o no.

6.2.12. Análisis estadístico

Se realizará un análisis estadístico de tipo descriptivo (Mosteller and Turkey, 1982), observando el comportamiento de las variables intensidad de coloración de fibras colágenas.

Las fibras de colágeno coloreadas verde, amarillo, naranja o rojo, en orden de grosor creciente, detectadas mediante Picrosirius red se expresarán en forma semicuantitativa, determinando para cada color: (-): negativo, (+): pobre, (++) : abundante y (+++): cuantioso marcaje.

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

<p>La descripción de los procesos celulares de regeneración y remodelación ósea a través de diferentes marcadores moleculares y del seguimiento radiológico, nos permitirá aplicarlo en la reparación de los defectos óseos ortopédicos en perros, utilizando matriz ósea desmineralizada, lo cual redundará en el bienestar animal.</p>
--

6.4. CRONOGRAMA ANUAL de ACTIVIDADES

AÑO 2011													
Tipo de actividad	mes	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Revisión bibliográfica		x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
Toma de muestra					x	x	x	x	x	x	x		
Inicio de protocolo experimental					x	x	x	x	x	x	x	x	
Informe de avance												x	x
 AÑO 2012													
Tipo de actividad	mes	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Revisión bibliográfica		x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
Toma de muestra					x	x	x	x	x	x	x		
Continuación de protocolo experimental					x	x	x	x	x	x	x	x	
Análisis histológico estructural						x	x	x	x	x	x		
MOAR									x	x	x	x	
Técnica de Picrosirius red										x	x	x	
Técnicas inmunohistoquímicas										x	x	x	
Análisis estadístico													x
Informe de avance												x	x
 AÑO 2013													
Tipo de actividad	mes	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Revisión bibliográfica		x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
Toma de muestra					x	x	x	x	x				
Finalización de protocolo experimental					x	x	x	x	x				
Análisis histológico estructural						x	x	x	x				
MOAR									x	x	x	x	
Técnica de Picrosirius red										x	x	x	
Técnicas inmunohistoquímicas										x	x	x	
Análisis estadístico													x
Informe final													x

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

Servicio de Internet
 Servicio de Biblioteca: Bases de datos.
 Servicio de fotocopias e impresiones.
 Servicio de impresión de posters
 Infraestructura edilicia de consultorios y laboratorios.
 Equipo de rayos X (RAIX, Buenos Aires, Argentina con potencia de 90 kv y 30 mA.)
 Equipamiento informático básico.

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

Recursos disponibles del Área de Microscopía Electrónica

Infraestructura edilicia

El Área de Microscopía Electrónica de la Facultad de Agronomía y Veterinaria, está organizada en 10 cubículos, cuenta con aire acondicionado central, sistema de alarmas centralizado con la Guardia de la Universidad y salida de emergencia.

Cubículos:

- 1- Laboratorio Central:** cuenta con amplias mesadas, una campana extractora de gases, una heladera con freezer, una estufa de polimerización y secado DB, un espectrofotómetro Metrolab RC 325 junior, un agitador Precytec A11R, una centrífuga Rolco 3070, un pHmetro UltraBasic-Denver Instrument, una centrífuga Centronic S-577 y una balanza analítica APX-200-Denver Instrument.
- 2- Laboratorio Auxiliar:** consta de mesadas disponibles para el procesamiento del material.
- 3- Sala de Ultramicrotomía:** cuenta con un ultramicrotomo manual Sorvall MT1, un microscopio óptico Axiolab (Zeiss), y una platina térmica con agitación FBR.
- 4- Sala de Cultivo:** equipada con un flujo laminar Filtrar y una estufa de incubación gaseada Thermo Electron Corporation.
- 5- Sala de Fotografía:** cuenta con las instalaciones necesarias para el revelado de negativos de microscopía electrónica.
- 6- Sala de Microscopía Electrónica:** equipada con un microscopio Elmiskop 101 (Siemens).
- 7- Sala de Apoyo del Microscopio Electrónico y de Lavado:** equipada con la fuente de poder del microscopio electrónico Elmiskop 101, una mesada para el lavado del material, una estufa de esterilización DB, un sonicador Branson 220, un destilador Rolco, un freezer y tres heladeras con freezer.
- 8- Sala de Microscopía Óptica:** equipada con un microscopio óptico Axiophot (Zeiss) con cámara digital Canon PowerShot G6 7.1 Mp para captura de imágenes y un equipo Analizador de Imágenes VIDAS (Zeiss).
- 9- Sala de Cómputos:** cuenta con cuatro computadoras Pentium, con grabadoras de CD y DVD, un scanner Genios ColorPage HR8 y tres impresoras (Hewlett Packard LaserJet 6L, Lexmark Z705 y Epson Stylus C430).
- 10- Sala de Estudio:** equipada con escritorio y mesada destinados al análisis de datos y al estudio.
- 11- Quirófano para pequeños animales.** Equipado con camillas, instrumental, equipo de anestesia inhalatoria, instrumental especial y general, monitoreo multiparamétrico, sala de internación, cuidados intensivos y recuperación.
- 12- Sala de diagnóstico radiológico.** Equipo de 100 Kv
- 13- Eccógrafo** Kaixin 5500 digital con transductor longitudinal de onda variable entre 3,5 a 9 Mhz (UNLPam)
- 14- Caniles** individuales con parque de espacimiento

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

Gastos corrientes: se utilizará en la compra de reactivos y anticuerpos para las técnicas inmunohistoquímicas a aplicar. Se adquirirán medicamentos, antiparasitarios, vacunas y alimentos para el bienestar de los animales como así también insumos radiológicos.

Bienes y servicios no personales: en este ítem se considera lo necesario para presentaciones de los resultados en jornadas, simposios y congresos (inscripciones y viáticos) y revistas de publicación periódica.

7.4. ESPECIFICAR otras FUENTES de FINANCIACIÓN:

--

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

GASTOS CORRIENTES		
1-	Laboratorio: anticuerpos para inmunohistoquímica, drogas y reactivos	\$ 19.500,00
2-	Molino analítico con cámara de molienda	\$ 10.000,00
3-	Medicamentos, antiparasitarios, vacunas, descartables, alimento balanceado, antibióticos y antiinflamatorios	\$ 5.000,00
4-	Placas radiográficas, líquidos reveladores, líquidos fijadores	\$ 1.200,00
6-	Insumos informáticos: diskettes, cartuchos, CD, etc.	\$ 400,00
7-	Útiles de oficina: resmas papel, lapicera, folios, etc.	\$ 300,00
Total del rubro		\$36.400,00
BIENES Y SERVICIOS NO PERSONALES		
1-	Inscripciones, viáticos, pasajes a congresos (*2)	\$ 3.000,00
2-	Viáticos o gastos de campos	\$ 500,00
3-	Franqueo, fotocopias	\$ 250,00
4-	Arancel publicaciones	\$ 1800,00
Total del rubro		\$ 5.500,00
Total		\$ 41.900,00



*** 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.**

8.1. BIBLIOGRAFÍA

Chapman MW, Bucholz R, Cornell C. 1997. Treatment of acute fractures with collagen-calcium phosphate graft material. A randomized clinical trial. *J Bone Joint Surg Am*, 79:495-502.

Chen D, Zhao M, Mundy G. 2004. Bone morphogenetic proteins. *Growth Factors*, 22(4):233-241.

De Pablos J, Martinez Lotti G., Alfaro C, Gil Albarova J, Nilsson O, Barrios C. 1992. Aoinjerto de matriz ósea descalcificada *versus* injerto autólogo en la reparación de defectos óseos segmentales masivos. Estudio experimental. *Rev Esp Cir Osteoart*, 27:23-31.

Habal M.B. 1992. Different forms of bone grafos. In: Bone Grafos and Bone Substitutes. Habal, M.B.; Reddi, H.D. (Eds) Saunders, PA, USA. p 6-8.

Jadlowiec JA, Celil AB, Hollinger JO. 2003. Bone tissue engineering: recent advances and promising therapeutic agents. *Expert Opin Biol Ther*, 3: 409-423.

Lee MH, Javed A, Kim HJ, Shin HI, Gutierrez S, Choi YJ, Rosen V, Stein JL, Van Wijnen AJ, Stein GS, Lian JB, Ryoo HM. 1999. Transient upregulation of Cbfa1 in response to bone morphogenetic protein-2 and transforming growth factor β 1 in C2C12 myogenic cells coincides with suppression of the myogenic phenotype but is not sufficient for osteoblast differentiation. *J Cell Biochem*, 73:114-125.

Le Geros R. 1991. Calcium phosphate biomaterials in preventive and restorative dentistry, in calcium phosphates. In RZ Legeros (ed): Oral Biology and Medicine. Basel, Switzerland, Karger, p 154-192.

Lind M and Bumger C. 2001. Factors stimulating bone formation. *Eur Spine J*, 10:102-109.

Ludwig SC and Boden SD. 1999. Osteoinductive bone graft substitutes for spinal fusion. *Orthop Clin North Am*, 30:635-645.

- Malafaya PB, Silva GA, Baran ET, Reis RL. 2002. Drug delivery therapies general trends and its importance on bone tissue engineering applications. *Curr Opin Solid State Mater Sci*, 6:283–95.
- Nishimura R, Harris E, Imamura K, Miyazono K, Mundy GR, Yoneda T. 1998. Expression of transcription factor Cbfa1 is enhanced by the BMP-2/SMAD signal transduction cascade in pluripotent mesenchymal cells. *J Bone Miner Res*, 23 (Suppl):S150.
- Reddi AH, Anderson WA. 1976. Collagenous bone matrix induced endochondral ossification and hemopoiesis. *J Cell Biol*, 69:557-572.
- Sandhu HS. 1999. Bone grafting for spinal fusion. *Orthop Clin North Am*, 30:685-698.
- Sassard WR, Eidman DK, Gray PM. 1994. Analysis of spine fusion utilizing demineralized bone matrix. *Orthor Trans*, 18:886-887.
- Selam B, Kayisli U, Mulayim N, Arici A. 2001. Regulation of Fas Ligand Expression by Estradiol and Progesterone in Human Endometrium. *Biol Reprod*, 65: 979–985
- Simmons PJ, Torok-Storb B. 1991 Identification of stromal cell precursors in human bone marrow by a novel monoclonal antibody STRO-1. *Blood*, 78:55-62.
- Sonobe J, Okubo Y, Kaihara S, Miyatake S, Bessho K. 2004. Osteoinduction by bone morphogenetic protein 2-expressing adenoviral vector: application of biomaterial to mask the host immune response. *Hum Gene Ther*, 15:659-668.
- Urist MR. 1965. Bone: formation by autoinduction. *Science*, 150(698):893-9.
- Wozney JM, Rosen V, Celeste AJ, Mitsock LM, Whitters MJ, Kriz RW, Hewick RM, Wang EA. 1998. Novel regulators of bone formation: molecular clones and activities. *Science*, 242:1528- 1534.
- Yamaguchi A, Katagari T, Ikeda T, Wozney J, Rosen V, Wang E, Kahn A, Suda T, Yoshiki S. 1991. Recombinant human bone morphogenetic protein-2 stimulates osteoblastic maturation and inhibits muogenic differentiation in vitro. *J Cell Biol*, 113:681-687.
- Zárate-Kalfópulos B and Reyes-Sánchez A. 2006. Injertos óseos en cirugía ortopédica. *Cir Ciruj*, 74:217-222.