










TÍTULO DEL PROYECTO:

**DEFECTOS ÓSEOS CIRCULARES DIAFISIARIOS  
EXPERIMENTALES TRATADOS CON MATRIZ  
ÓSEA DESMINERALIZADA EN CONEJOS**

Vaquero, Pablo	
Audisio, Santiago	
Verna Edgardo	
García Mónica	
Lacolla Daniel	
Buey Valeria	
Mutio Sotz Carla	
Milanta Gisela	
Arriagada Daniela	
Matus Brian	



Número de Proyecto: .....  
Año: .....

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PAMPA**

**Facultad de Ciencias Veterinarias**

**1. IDENTIFICACIÓN del PROYECTO**

**1.1. TÍTULO del PROYECTO:** defectos óseos circulares diafisarios tratados con matriz ósea desmineralizada en conejos

**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 y Departamento de Clínica.

**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	Categ. Invest	Responsabilidad (1)	Cátedra o Institución	Cargo y Dedicación	Tiempo dedicac. Hs./Sem
Vaquero, Pablo	Esp/MV	V	D	Téc y Pat Quirúrgica	Ayu 1° S	10
Audisio, Santiago	Dr/MV	IV	CD	Téc y Pat Quirúrgica	Adj S	5
Verna, Edgardo	Esp/MV	V	I	Téc y Pat Quirúrgica	Ayu 1° S	5
García Mónica	M.V.	V	I	Histología I-II	Ayu 1° E	5
Lacolla Daniel	Esp./MV	III	I	Histología I-II	Adj E	5
Buey Valeria	Mg./MV	V	I	Histología I-II	JTP S	5
Mutio Sotz Carla R.	Estudiante	-	AI	Téc y Pat Quirúrgica	-	2
Milanta Gisela S.	Estudiante	-	AI	Téc y Pat Quirúrgica	Adscripta	2
Arriagada Daniela	Estudiante	-	AI	Téc y Pat Quirúrgica	Adscripta	2
Matus Brian	Estudiante	-	AI	Téc y Pat Quirúrgica	-	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: 01/01/2017 FINALIZACIÓN: 31/12/2019**

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

Los defectos óseos que asientan en las corticales de los huesos largos generan trastornos estructurales pudiendo provocar nuevas fracturas, uniones retardadas, no uniones, osteomielitis y fistulas. La matriz ósea desmineralizada (MOD) posee propiedades osteoinductoras y osteoconductoras capaces de estimular la osteogénesis. El objetivo del proyecto consistirá en evaluar los resultados del tratamiento de defectos óseos circulares experimentales diafisarios con MOD. Se emplearán 15 (n=15) conejos a los que se les realizará un defecto circular de 3 mm de diámetro en el tercio distal de uno de los fémures. Los defectos de 12 animales (n=12) o grupo tratamiento (GT) serán rellenados con MOD; los otros 3 defectos (n=3) no recibirán tratamiento y constituirán el grupo control (GC). La matriz que se utilizará se obtendrá según protocolo modificado por los autores. Se realizará seguimiento radiológico inmediatamente concluidas las intervenciones y a las 2, 4 y 6 semanas. Al cabo de ese período los conejos serán sacrificados y se procederá a realizar examen histológico de los defectos mediante sistema de puntuación histopatológico de Lane y por luminiscencia fotocromica, para lo cual semanalmente a los conejos les serán suministrados 30 mg/Kg/IM de oxitetracilina. Los resultados del sistema de puntuación se introducirán en el software Infostat (Universidad Nacional de Córdoba, Argentina) para ser analizada con ANOVA y Test LSD de Fisher.

#### 4.1. PALABRAS CLAVE:

Matriz ósea desmineralizada, hueso, defecto cortical, conejo.

Bone defects of the long bone corticals produce structural disorders which can even produce new fractures, delayed unions, non-unions, osteomyelitis and fistulas. Demineralized bone matrix (DBM) has osteoinductive and osteoconductive properties which are capable of stimulating osteogenesis. The aim of this project is to evaluate the treatment of experimental shaft circular defects with DBM. A 3 mm circular bone defect will be carried out in the third distal of the femur of 15 (n=15) rabbits. The defects of 12 animals (n=12) or treatment group (TG) will be filled with DBM; the other 3 defects (n=3) will not receive treatment and will be the control group (CG). The matrix to be used will be obtained from following a protocol modified by the authors. A radiological follow up will be carried out immediately after the surgery and at 2, 4 and 6 weeks. After this period, the bones will be sacrificed and a histological examination of the defects will be performed by means of Lane's histopathological punctuation system and by photochromic luminescence, for which the rabbits will receive 30 mg/kg/IM of oxitetraciclín weekly. The results of the punctuation system will be analysed with ANOVA and Fisher LSD Test by the Infostat software (National University of Córdoba, Argentina).

#### KEY WORDS:

Demineralized bone matrix, bone, cortical defect, rabbit.

### 5. INTRODUCCIÓN y ANTECEDENTES

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

El tratamiento de los uniones retardadas, consolidaciones viciosas y pseudoartrosis requiere la restaurar la alineación y estabilizar al miembro y en muchos casos complementarlo con el uso de sustitutos óseos (Finkemeier, 2002). La matriz ósea desmineralizada (MOD) es utilizada en la cirugía ortopédica veterinaria para tratar defectos óseos, fracturas conminutas, osteotomías y artrodesis (Hoffer *et al.*, 2008; Chow y Balfour, 2012; Fitzpatrick *et al.*, 2012; Coggeshall *et al.*, 2014).

La MOD es un biomaterial que se revasculariza rápidamente (Parikh, 2002) y posee propiedades osteoinductivas (Shen *et al.*, 2010) y osteoconductoras (Oakes *et al.*, 2003). El potencial osteoinductivo provoca quimiotaxis sobre las células mesenquimáticas e induce la diferenciación celular de las células de la progenie osteoblástica (Chakkalakal *et al.*, 2001) de forma similar al fenómeno de osificación endocondral que ocurre en la vida embrionaria o durante la reparación de fracturas de huesos largos en los adultos (Le Geros, 1991).

Las propiedades osteoinductivas de la MOD responden a la presencia de la proteína morfogénica del hueso (BMP por su sigla en inglés) (Bessa *et al.*, 2008), factores transformadores del crecimiento  $\beta$  (TGF- $\beta$  por su sigla en inglés) (Honsawek y Dhitiseith, 2005), osteocalcina (OCN) y osteopontina (OPN) (Davis *et al.*, 2008; Yu *et al.*, 2014) que regulan la formación de hueso endocondral (Honsawek *et al.*, 2005), incluso cuando es implantada de forma extraesquelética (Ripamonti, 2009). Por otra parte, las propiedades osteoconductoras responden a la presencia de colágeno tipo I que constituye la matriz extracelular del hueso (Ludwig y Boden, 1999).

La ausencia de resistencia estructural (Iwata *et al.*, 2002) y las variaciones significativas de los resultados obtenidos atribuibles al donante, son algunas de las desventajas de la MOD (Pietrzak *et al.*, 2005).

El proceso de desmineralización del hueso con ácido clorhídrico 0.6N causa alteraciones leves en la arquitectura de la matriz ósea orgánica (Figueiredo *et al.*, 2011). La desmineralización disminuye las reacciones antigénicas a la vez que exponen a los factores de crecimiento en el sitio de implante (Riley *et al.*, 1996).

**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)**

- Audisio, S.A.; Torres, P.; Vaquero, P.; Verna, E.; Cristofolini, A.; Sanchis, G.; Merkis, C. Alternativa de conservación de matriz ósea desmineralizada. IV Jornadas Jornadas y Reunión Anual de la Asociación Argentina de Inmunología Veterinaria. Facultad de Agronomía y Veterinaria, UNRC. 1 y 2 de Diciembre de 2011. *EXPOSITORES modalidad poster*
- Audisio, S.A.; Vaquero, P.G.; Sosa, A.; Torres, P.; Verna, E.C.; Ocampo, L., Cristofolini, A.L.; Merkis, C.I. 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. *EXPOSITORES modalidad poster*
- Audisio, S.A.; 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. General Pico, La Pampa, 12 de Diciembre de 2013. *EXPOSITORES modalidad poster*.
- Audisio, S.A.; 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. General Pico, La Pampa, 12 de Diciembre de 2013. *DISERTANTES*.
- Audisio, S.A.; Vaquero, P.; Ocampo, L.; Verna, E.; Domene, J.; Cancina, M.; Seiffert, P.; Gonzalez, C.; Cuadrelli Andreoli, F.; Torres Arriola, M.L.; 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. CABA, 09 de Agosto de 2014. *EXPOSITORES modalidad poster*.
- Audisio, S.A.; 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. *EXPOSITORES modalidad poster*.
- Audisio, S.A.; 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. *EXPOSITORES modalidad poster*.

**Resultados publicados**

- Audisio, S.A.; Vaquero, P.G.; Torres, P.A.; Verna, E.C.; Ocampo, L.N.; Ratusnu, V.; Cristofolini, A.L.; Merkis, C.I. 2014. Obtención, caracterización y almacenamiento de matriz ósea desmineralizada. *Rev Med Vet*; 95:27-34.
- Audisio, S.A.; Vaquero, P.G.; Torres, P.A.; Verna, E.C.; Ocampo, L.N. Cristofolini, A.C.; Merkis, C.I. 2015. Radiological evaluation of radial bone defects treated with demineralized bone matrix in an experimental rabbit model. *Bulgarian Journal of Veterinary Medicine*. ISSN 1311-1477; online at <http://tru.uni-sz.bg/bjvm/bjvm.htm>

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

Reparación de defectos óseos segmentales con vidrio bioactivo. Director: Audisio, S.N.; Co-Director: Audisio, S.A. Integrantes Vaquero, P.; Wheeler, J.T.; Verna, E.; Toulouse, J.; Bozak, D.; Costi, M.R. Financiado por la Secretaría de Ciencia y Técnica FCV-UNLPam. Resolución CD FCV-UNLPam Nro 029/01.

## 6. DESCRIPCIÓN del PROYECTO

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

#### Problema científico

Los defectos óseos de huesos largos que involucran a la diáfisis generan trastornos estructurales que predisponen a fracturas, uniones retardadas, no uniones, osteomielitis y fistulas.

#### Objetivo

Evaluar la reparación de defectos diafisarios circulares experimentales tratados con matriz ósea desmineralizada obtenida y preservada según protocolo previamente descrito por los integrantes del proyecto (Audisio et al. en imprenta)

#### Objetivos particulares

- Establecer el proceso de reparación y evolución de la curación de los defectos mediante seguimiento radiológico
- Establecer las características histológicas de los defectos reparados
- Comparar los resultados histológicos y radiológicos de los defectos tratados versus los no tratados

#### Hipótesis

Los defectos óseos circulares de diáfisis son factibles de ser tratados con matriz ósea desmineralizada

#### Resultados esperados

Se esperan obtener conocimientos respecto a la respuesta del hueso al tratamiento

### 6.2. METODOLOGÍA, MODELOS y TÉCNICAS.

#### Obtención de MOD

Para la obtención, preparación y conservación de la MOD se empleará el protocolo informado por los miembros del equipo de investigación (Audisio *et al.*, 2014). 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 utilizarán 15 conejos 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 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 de 12 conejos (n=12) serán rellenados con MOD, constituyendo el grupo tratamiento (GT); en tanto que los defectos de 3 conejos (n=3) no recibirán tratamiento y conformarán el grupo control (GC). 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 antibioterapia de amplio espectro (clorhidrato de oxitetraciclina, 50 mg totales IM) durante 3-5 días.

Semanalmente y durante 3 días a cada animal le serán administrados 30 mg/Kg de tetraciclina IM a efectos de establecer histológicamente el proceso de mineralización debido al comportamiento de fluorescencia de la tetraciclina.

### **Controles radiológicos**

Se tomarán radiografías empleando 60kVp y 10 mA a una distancia de foco de 40 cm y tiempo de exposición de 0,4 segundos en proyección medial lateral inmediatamente concluida la intervención y luego a las 2,4 y 6 semanas.

### **Estudios histológicos**

A las 6 semanas los conejos serán sacrificados para recuperar la porción del fémur conteniendo el sitio del experimento. A las muestras les serán removidas los tejidos blandos y luego se fijará en formol al 10% bufferado. Las muestras se descalcificarán con ácido fórmico al 15% bufferado y procesado según técnicas de rutina. Se realizarán cortes sagitales de 5 µm de espesor conteniendo los defectos tratados y sin tratar, según al grupo al que pertenezca la muestra.

Sobre los cortes histológicos se realizarán exámenes de fluoresceína y se teñirán con hematoxilina y eosina (HE).

En los cortes se teñidos con HE se evaluarán según el sistema de puntuación histopatológico de Lane y Sandhu (1987), modificado por Heiple *et al.* (1987) (Tabla N°1).

Para el examen de fluorescencia de tetraciclina, todos los conejos recibirán 30 mg/kg de oxitetraciclina IM, por tres días consecutivos de forma semanal durante el tiempo que dure en experimento (Volpon 1985). Los cortes se examinarán en fotomicroscopio de fluorescencia por epi iluminación con filtro tipo DFE.

La ponderación obtenida de cada corte será introducida en el software Infostat (Universidad Nacional de Córdoba, Córdoba, Argentina) para realizar estadística descriptiva y test ANOVA.

Tabla N°1

Sistema de puntuación histopatológico de Lane y Sandhu (1987)  
modificado por Heiple *et al.* (1987)

Union	
No evidencia de union	0
Unión fibrosa	1
Unión osteocondral	2
Unión ósea	3
Organización completa de diáfisis	4
Hueso esponjoso	
Sin actividad celular ósea	0
Aposición temprana de hueso nuevo	1
Aposición activa de hueso nuevo	2
Reorganización de hueso esponjoso	3
Organización completa de hueso esponjoso	4
Hueso cortical	
Sin hueso	0
Aparición temprana	1
Formation en curso	2
Mayormente reorganizado	3
Completamente formado	4
Médula	
Sin médula en el área	0
Comenzando a aparecer	1
Presente en más de la mitad del defecto	2
Colonización complete por médula roja	3
Médula grasa Madura	4
Puntaje total posible por categoría	
Unión	4
Hueso esponjoso	4
Corteza	4
Médula	4
Puntaje máximo	16

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

Los resultados obtenidos aportarán conocimientos de la MOD para reparar defectos óseos corticales para ser utilizados en la cirugía ortopédica cotidiana.

### 6.4. CRONOGRAMA ANUAL de ACTIVIDADES

Año	Actividad	E	F	M	A	M	J	J	A	S	O	N	D
2017	Intervenciones												
	Seguimientos radiológicos												
	Estudios histopatológicos												
2018	Intervenciones												
	Seguimientos radiológicos												
	Estudios histopatológicos												
	Redacción de informe final												



## **7. INFRAESTRUCTURA y PRESUPUESTO**

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

La Cátedra Técnica y Patología Quirúrgica posee:

a) CPU ubicado en el gabinete de la cátedra

b) Los programas de análisis de imágenes y de análisis estadísticos de distribución gratuita instalados en el CPU del gabinete de la cátedra.

### **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) \***

El presupuesto total del proyecto asciende a \$ 17.240,00. Distribuidos es partes iguales para los años 2017 y 2018, es decir \$ 8.620,00

<b>AÑO 2017</b>	<b>Cantidad</b>	<b>Costo unitario</b>	<b>Costo por rubro</b>
<b>Bienes de consumo</b>			
Ketamina	5 fcos x 50 mL	\$ 150,00	\$ 750,00
Ketofen	1fco x 10 ml	\$ 200,00	\$ 200,00
Descartables de cirugía (guantes, cofias, barbijos, batas, jeringas 3 mL, agujas 25G)			\$ 1250,00
Alimento balanceados (120 gr/día/15 animales /42 días)	3 bolsas de 25 Kgs	\$ 130,00	\$ 390,00
Inscripciones a jornadas y congresos para presentación de producción	1	\$ 1.000,00	\$ 1.000,00
Confección de posters		\$ 700,00	\$ 700,00
Pasajes de omnibus	2	\$ 650,00	\$ 2.600,00
<b>Bienes de Servicios</b>			
Cortes histopatológicos	7	\$ 150,00	\$ 1.050,00
Radiografías	15 conejos x 4 controles	\$ 100,00	\$ 6.000,00
<b>TOTAL AÑO 2017</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.			
<b>TOTAL</b>			<b>\$ 11.340,00</b>

AÑO 2018	Cantidad	Costo unitario	Costo por rubro
<b>Bienes de consumo</b>			
Ketamina	5 fcos x 50 mL	\$ 150,00	\$ 750,00
Descartables de cirugía (guantes, cofias, barbijos, batas, jeringas 3 mL, agujas 25G)			\$ 1.250,00
Inscripciones a jornadas y congresos para presentación de producción	1	\$ 1.000,00	\$ 1.000,00
Confección de posters		\$ 700,00	\$ 700,00
Pasajes de omnibus	2	\$ 650,00	\$ 1.300,00
<b>Bienes de Servicios</b>			
Cortes histopatológicos	8	\$ 150,00	\$ 1.200,00
<b>TOTAL AÑO 2018</b>			\$ 6.200,00
* 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.			
<b>TOTAL AÑO 2017, 2018</b>			17.540,00

## 8. BIBLIOGRAFÍA

1. Audisio, S.A.; Vaquero, P.G.; Torres, P.A.; Verna, E.C.; Ocampo, L.N.; Ratusnu, V.; Cristofolini, A.L.; Merkis, C.I. 2014. Obtención, caracterización y almacenamiento de matriz ósea desmineralizada. *Revista Medicina Veterinaria*; 95:27-34.
2. Bessa, P., Casal, M.; Reiss, R. 2008. Bone morphogenetic protein in tissue engineering: The road from the laboratory to the clinic. Part I (Basic concepts). *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, 2, 1–13.
3. Chakkalakal, D.A.; Strates, B.S.; Garvin, K.L.; Novak, J.R.; Fritz E.D; Mollner, T.J. 2001. Demineralized bone matrix as a biological scaffold for bone repair. *Tissue Engineering*, 7, 161–177.
4. Chow, E.P.; Balfour, R.J. 2012. Tarsometatarsal arthrodesis using tarsometatarsal intramedullary pin stabilization. *Veterinary Surgery*, 41, 733–737.
5. Coggeshall, J.D.; Reese, D. J.; Kim S.E.; Pozzi, A. 2014 Arthroscopic-guided ulnar distraction for the correction of elbow incongruity in four dogs. *Journal of Small Animal Practice*, 55, 46–51.
6. Davis, J., M. Tucci, L. Franklin, G. Russell & H. Benghuzzi, 2008. The effects of growth factors on the production of osteopontin and osteoclastin. *Biomedical Sciences Instrumentation*, 42, 31–36.
7. Figueiredo, M., S. Cunha, G. Martins, J. Freitas, F. Judas & H. Figueiredo, 2011. Influence of hydrochloric acid concentration on the demineralization of cortical bone. *Chemical Engineering Research and Design*, 89, 116–124.
8. Finkemeier, C.G. 2002. Bone-Grafting and Bone-Graft Substitutes. *J Bone Joint Surg Am*, 2002 Mar; 84:454-464
9. Fitzpatrick, N., R. Yeadon, T.J. Smith, J. Johnson, W.I. Baltzer, R. Amils, M. Farrell, A. Frost & I. Holsworth, 2012. Shoulder arthrodesis in 14 dogs. *Veterinary Surgery*, 41, 745–754.
10. Heiple, K.G.; Goldberg, V.M.; Powell, A.E.; Bos, G.D.; Zika, J.M. 1987. Biology of cancellous bone grafts. *Orthopedic Clinics North America*; 18:179–185.

11. Hoffer, M. J., D. J. Griffon, D. J. Schaeffer, A. L. Johnson & M. W. Thomas. 2008. Clinical applications of demineralized bone matrix: a retrospective and case-matched study of seventy-five dogs. *Veterinary Surgery*, **37**, 639–647.
12. Honsawek, S. & D. Dhitiseith, 2005. Content of bone morphogenetic protein-4 in human demineralized bone: Relationship to donor age and ability to induce new bone formation. *Journal of the Medical Association of Thailand*, **88**, Suppl. 4, S260–265.
13. Iwata, H., S. Sakano, T. Itoh & T. W. Bauer. 2002. Demineralized bone matrix and native bone morphogenetic protein in orthopaedic surgery. *Clinical Orthopaedics and Related Research*, **395**, 99–109.
14. Lane, J.M.; Sandhu, H.S. 1987. Current approaches to experimental bone grafting. *Orthop Clin North Am.*; 18:213–225
15. Le Geros, R. Z., 1991. Calcium phosphate biomaterials in preventive and restorative dentistry, in calcium phosphates. In: *Oral Biology and Medicine*, ed R. Z. Le Geros, Basel, Switzerland, pp. 154-192.
16. Ludwig, S. C., & S. D. Boden. 1999. Osteoinductive bone graft substitutes for spinal fusion. *Orthopedic Clinics of North America*, **30**, 635-645.
17. Oakes, D. A., C. C. Lee & J. R. Lieberman, 2003. An evaluation of human demineralized bone matrices in a rat femoral defect model. *Clinical Orthopaedics and Related Research*, **413**, 281–290.
18. Parikh, S. N., 2002. Bone graft substitutes: Past, present, future. *Journal of Postgraduate Medicine*, **48**, 142–148.
19. Pietrzak, W. S., S. V. Perns, J. Keyes, J. Woodell-May & N. M. McDonald, 2005. Demineralized bone matrix graft: A scientific and clinical case study assessment. *Journal of Foot and Ankle Surgery*, **44**, 345–353.
20. Riley, E. H., J. M. Lane, M. R. Urist & J. R. Lieberman, 1996. Bone morphogenetic protein-2: Biology and applications. *Clinical Orthopaedics and Related Research*, **324**, 39–46.
21. Ripamonti, U., 2009. Biomimetism, biomimetic matrices and the induction of bone formation. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, **13**, 2953–2972.
22. Shen, B., A. Wei, S. Whittaker, L. A. Williams, H. Tao, D. D. Ma & A. D. Diwan, 2010. The role of BMP-7 in chondrogenic and osteogenic differentiation of human bone marrow multipotent mesenchymal stromal cells *in vitro*. *Journal of Cell Biochemistry*, **109**, 406–416.
23. Volpon, J.B. 1985. A marcação do osso com substâncias fluorescentes. *Rev Bras Ortop*, 20:207-210.
24. Yu, S.H.; Chan, H.L.; Chong, L.Y.; Jheng, Y.H.; Chang, P.C. 2014. Evaluation of the osteogenic potential of growth factor-rich demineralized bone matrix *in vivo*. *Journal of Periodontology*, **2**, 1–16.

## ANEXO I

### PAUTAS DE ÉTICA DE INVESTIGACIÓN MODELO ANIMAL

#### **CARACTERÍSTICAS DE LOS ANIMALES**

- . Especie: Conejo (*Oryctolagus cuniculus*)
- . Sexo Machos y hembras
- . Edad/Peso: animales sexualmente maduros de 4-5 Kg
- . Proveedores: Criaderos de la provincia de La Pampa
- . Total de animales a ser utilizados: 15

#### **MATERIALES O PROCEDIMIENTOS PELIGROSOS**

(Radioisótopos, agentes infecciosos, carcinógenos, tóxicos)

No se emplearán elementos de esta naturaleza

#### **Propósito del estudio.**

Describir los eventos histológicos del proceso de reparación de defectos óseos circulares experimentales de diáfisis femorales tratados con matriz ósea desmineralizada heteróloga.

#### **Valor potencial del estudio**

Ampliar el campo de conocimientos en el área de la cirugía ortopédica y reparadora. Los conocimientos serán traspolados a otras especies domésticas.

#### **Justificación de la especie y de la utilización de animales (si corresponde)**

Se empleará el conejo por la razón que es una especie que por su dimensión y docilidad se la puede mantener en espacios reducidos sin poner en riesgo a las personas que los cuidan. En relación al experimento, el conejo es especie de laboratorio empleada en por numerosos investigadores del tema motivo del presente proyecto. Por otra parte, las maniobras quirúrgicas como así también los cuidados que se deben dispensar es posible realizarlos en estos animales.

#### **Procedimientos a utilizar con detalles del diseño y la metodología experimental incluyendo las variables a controlar**

A los efectos de incluir a los animales, cada conejo será sometido a un examen clínico para establecer sus condiciones de salud y parámetros fisiológicos. Esa información será tomada como pautas basales para el monitoreo intra y post-quirúrgico. Los parámetros se volcarán en los registros que se llevarán para cada individuo.

Durante el tiempo que dure el experimento los conejos se mantendrán en jaulas individuales. Diariamente recibirán 120 gr de alimento balanceado de formulación comercial y agua potable *ad-libitum*.

A los seguimientos que se efectuarán en relación al procedimiento quirúrgico, quincenalmente los conejos serán evaluados en sus condiciones clínicas comparándolas con las condiciones basales. Las situaciones de salud emergentes serán tratadas para darles solución terapéutica (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)

En relación a los experimentos, a los animales les será creado un defecto circular de 3 mm de diámetro en el tercio distal de una de las diáfisis femorales. En los animales que integren el grupo tratamiento el defecto se rellenará con MOD, mientras que los animales del grupo control no recibirán tratamiento.

Para el procedimiento quirúrgico los conejos animales recibirán 1,5 mg/Kg IM de xilacina y 20 minutos posteriores 40 mg/Kg IM de ketamina. Complementariamente se realizará anestesia infiltrativa local en el sitio de abordaje quirúrgico.

Abordado el tercio distal del fémur del miembro seleccionado se creará un defecto circular que involucrará sólo a la cortical expuesta. Para esta maniobra se utilizará una mecha de carbono de 3 mm de diámetro. Los defectos de los animales integrantes del grupo tratamiento (GT) se rellanarán con matriz ósea desmineralizada, en tanto los defectos de los animales del grupo control (GC) o recibirán tratamiento. Los planos quirúrgicos se suturarán con poligalactina y la piel con nylon.

En el post-operatorio inmediato a los conejos les serán evaluadas las condiciones de la herida, la que será higienizada y desinfectada. Durante los primeros 3-5 días se les administrarán antiinflamatorios no esteroides (ketofen, 1 mg/kg) y antibioterapia de amplio espectro (cefalexina 25 mg/kg).

### **Alojamiento**

En el proceso de admisión de los animales serán acostumbrados a permanecer en las instalaciones, condiciones de alimento, agua y a familiarizarse con el personal que los atenderán.

### **Control del dolor y sufrimiento durante el procedimiento**

Los animales recibirán xilacina en el protocolo pre-anestésico con los fines de contribuir con la analgesia. De forma complementaria se realizará anestesia local infiltrativa en la región anatómica donde se realizará el procedimiento. Durante los primeros 3-5 días se suministrará ketofen (1 mg/Kg/IM) para prevenir y evitar inflamaciones y obtener efectos analgésicos de forma secundaria. Se efectuará monitoreo del grado de dolor de los animales conforme a las variables establecidas por <sup>1</sup>Carrol, 1998 y <sup>2</sup>Hellyer, 1998) y que se reproducen en la Tabla N° 1

### **Estimación del potencial dolor post-quirúrgico e intervenciones a realizar en relación al mismo**

En general, la mortalidad en cirugía no cardíaca es baja (0,15% a 0,3%), y las complicaciones ocurren en un porcentaje mínimo. Las intervenciones que se harán, de índole ortopédica, presupone un traumatismo quirúrgico de nivel intermedio para pacientes no cardíacos. El dolor será manejado desde el inicio de los tratamientos mediante analgesia preventiva y manifestaciones clínicas en los post-operatorios según las variables expresadas en la Tabla N°1 y cuantificadas mediante la escala del dolor de Melbourne adjuntas en el Anexo III del presente.

Tabla N°1

#### **VARIABLES PARA ESTABLECER EL GRADO DE DOLOR**

<b>Variables</b>	<b>Signos específicos</b>
Comportamiento	Letargia, anorexia, retención de a orina
Comportamiento anormal	Eliminación inadecuada de orina y heces, vocalización, agresividad o menor interacción con humanos u otros animales, expresión facial modificada (inmóvil, orejas hacia atrás, mirada fija), autoprotección de la zona, apoyo incorrecto de la zona dolorosa.

<sup>1</sup>Carrol, G.L. 1998. The behavioral characteristics in dogs, cats and horses wich are related to pain response. In: Small animal pain management. Lakewood. Am Anim Hosp Assoc Press, USA

<sup>2</sup> Hellyer, P. 1998. AAHA/AAFP Pain Management guideliness for dogs and cats. J Am Anim Hosp Assoc Press, USA

Respuesta a la palpación	Incremento de la tensión muscular, lamido, mordisqueo, frotado de la zona.
Postura	Raquis flexionado, decúbito lateral, decúbito esternal, posición de rezo.
Parámetros fisiológicos	Taquicardia, taquipnea, hipertermia, hipertensión arterial, midriasis.

Carrol, 1998; y Hellyer, 1998.

**Cuidados post-procedimientos (incluye los monitoreos y criterios para establecer dolor o sufrimiento)**

Los resultados que se esperan obtener requieren de animales sanos y que mantengan esa condición con mínimo estrés hasta que finalicen los experimentos. Por ello se empleará la Guía Para Cuidados Veterinarios de Animales de Investigación provista por la Federation of European Laboratory Animal Science Associations (FELASA, 2008). La ponderación del dolor se hará mediante la escala para dolor quirúrgico de Firth y Haldane (1999) según modelo adjunto. Tomando como guía las variables del dolor y la cuantificación se intervendrá en el manejo post-operatorio del mismo (Anexo II).

**Eutanasia y disposición de animales**

(Métodos, criterios, criterios para eutanasia anticipada y destino final de los animales)

Concluidos los ensayos los conejos serán sacrificados para realizar necropsia de los miembros intervenidos y análisis histopatológico de los defectos tratados y sin tratar. Se les realizará eutanasia mediante sobredosificación endovenosa de barbitúrico, procedimiento publicado por la Asociación Americana de Medicina Veterinaria (AVMA) en la Guidelines on Euthanasia (2007). Los cadáveres se descartarán mediante el protocolo de eliminación de residuos patológicos de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la UNLPam.

**ANEXO II  
PROTOCOLO SEGUIMIENTO POST-OPERATORIO**

Fecha		Conejo N°		Peso		Sexo ♂ ♀
Examen clínico						
Estado general B – M	T°: °C	FC:	FR	Mucosas		
Anestesia recibida	Xilacina:	Ketamina:				
Fémur intervenido I - D	Dosis ketofen		ATB:	dosis		
Seguimiento post-operatorio						
Día	Estado de la herida	AINEs	ATB	Tetraciclina	Acepta alimento y agua	
1						
2						
3						
4						
5						
6						
7						
8						
9						
10						
Seguimiento radiológico						
Control #	Fecha	Identificación Rx				
1° día						
Semana 2						
Semana 4						
Semana 6						
Suministro de tetraciclina						
1° día						
2° día						
3° día						
Semana 2 -1						
Semana 2-2						
Semana 2-3						
Semana 4-1						
Semana 4-2						
Semana 4-3						
Semana 6-1						
Semana 6-2						
Semana 6-3						
Observaciones						

**ANEXO III**  
**Escala de Valoración del Dolor de Melbourne**

<b>Categoría</b>	<b>Características</b>	<b>Valoración</b>
Datos fisiológicos	Normalidad	0
	Pupilas dilatadas	2
	*Incremento frecuencia cardíaca sobre basal	
	>20%	1
	>50%	2
	>100%	3
	*Incremento frecuencia respiratoria sobre basal	
	>20%	1
	>50%	2
	>100%	3
	Temperatura rectal elevada	1
	Salivación	2
Respuesta a la palpación*	No cambia	0
	Reacciona <sup>1</sup> cuando se le toca	2
	Reacciona <sup>1</sup> antes de tocarle	3
Actividad*	Descansando, durmiendo, semi-inconciente	0
	Descansando, despierto	1
	Comiendo	0
	Inquieto	2
	Girándose, revolcándose	3
Estado mental*	Sumiso	0
	Muy amigable	1
	Asustado	2
	Agresivo	3
Postura	Protege la zona afectada	2
	*Decúbito lateral	0
	Decúbito esternal	1
	Acostado/sentado/en estación cabeza erguida	1
	En estación, cabizbajo	2
	Moviéndose	1
	Postura anormal (rezo, arqueamiento)	2
Vocalización*,**	No vocaliza	0
	Vocaliza cuando le tocan	2
	Vocalización intermitente	2
	Vocalización continua	3
*Escoger una opción; ** Se excluye el ladrado alerta. 1.- Lamido, rascado, frotado, mordisqueado, tensión, se protege. Valor mínimo de la escala=0; Valor máximo de la escala=27		