





ANEXO I

TITULO DEL PROYECTO:

LA PROTEINA INDIAN HEDGEHOG INTERVIENE EN LA REPARACIÓN DE DEFECTOS OSEOS TRATADOS CON MATRIZ OSEA DESMINERALIZADA

Merkis, Cecilia Inés	 Firma digital
Audisio, Santiago	 Firma digital
Laura Noelia Ocampo	 Firma digital
Cristofolini, Andrea Lorena	 Firma digital
Vaquero, Pablo	 Firma digital
Buey, Valeria	 Firma digital
Salas, Carlos	 M. V. SALAS, Carlos A. Acr. Ent. EQUINA M. P. 1189 CUIT 2032910392-8 Firma digital
Ditz, Yanina	 Firma digital
Alzuri, Nora Alejandra Ayselén	 Firma digital

Clara, Ailin	 Firma digital
Guerra, Andrea Milagros	 Firma digital
Retamal, Federico Ezequiel	 Firma digital
Roth, Kevin Nicolás	 Firma digital



Número de Proyecto:
Año:

UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PAMPA
Facultad de Ciencias Veterinarias

1. IDENTIFICACIÓN del PROYECTO

1.1. **TÍTULO del PROYECTO:** “La Proteína Indian Hedgehog interviene en la reparación de defectos óseos tratados con matriz ósea desmineralizada”

1.2. **TIPO de INVESTIGACIÓN:** Básica

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

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

1.5 **ÁREA DE CONOCIMIENTO:** Agropecuarias y del Ambiente

1.6 **SUBÁREA DE CONOCIMIENTO:** Ciencias Veterinarias

2. INSTITUCIONES y PERSONAL que INTERVIENEN en el PROYECTO

2.1. **AREAS, DEPARTAMENTOS y/o INSTITUTOS:**

2.2. **OTRAS INSTITUCIONES:**

2.3. **EQUIPO de TRABAJO**

2.3.1 . **INTEGRANTES**

Apellido y Nombre	CUIL	Título Académico	Categ. Invest	Respon-sabilidad (1)	Cátedra o Institución	Cargo y Dedicación	Tiempo Hs x semana
Merkis, Cecilia Inés	27-17921785/1	Doctora	I	Directora	Universidad Nacional de Río Cuarto	Prof E	3
Audisio, Santiago	20-16147746/0	Doctor	III	Investigador	Técnica y Patología Quirúrgica	Adj SE	3
Cristofolini, Andrea Lorena	27-25582934/9	Doctora		Investigadora	Universidad Nacional de Río Cuarto	Prof E	3
Vaquero, Pablo	20-22176522/3	Especialista	IV	Investigador	Técnica y Patología Quirúrgica	JTP SE	2
Buey, Valeria	27-22902259/3	Magister	V	Investigadora	Histología	ADJ SE	2

Salas, Carlos	20-32910392/8	MV	-	Investigador	Histología	Ay S	2
Ocampo, Laura Noelia	27-27952500/6	Esp.	-	Tesista	Técnica y Patología Quirúrgica	Ay S	10
Ditz, Yanina	17-34982096/5	Lic. En Matemáticas	-	Investigadora	Estadística	Ay SE	2
Alzuri, Nora Alejandra Ayelén	27-38295818/2	Estudiante	-	Asistente de Investigación	Colaboradores Técnica y Patología Quirúrgica	FCV-UNLPam	2
Clara, Ailin	27-40255761/9	Estudiante	-	Asistente de Investigación	Colaboradores Técnica y Patología Quirúrgica	FCV-UNLPam	2
Guerra, Andrea Milagros	27-39933083/7	Estudiante	-	Asistente de Investigación	Colaboradores Técnica y Patología Quirúrgica	FCV-UNLPam	2
Retamal, Federico Ezequiel	20-35693869/1	Estudiante	-	Asistente de Investigación	Colaboradores Técnica y Patología Quirúrgica	FCV-UNLPam	2
Roth, Kevin Nicolás	20-40612049/0	Estudiante	-	Asistente de Investigación	Colaboradores Técnica y Patología Quirúrgica	FCV-UNLPam	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. TESISTAS:

Apellido y Nombre	Título Académico al que Aspira	Título Proyecto de Tesis	Organismo	Director	Tiempo de Dedicac. Hs./Sem.
Ocampo, Laura Noelia	Doctora en Ciencia Tecnología e Innovación Agropecuaria	Indian Hedgehog Interviene en la reparación de defectos oseos tratados con matriz osea desmineralizada	Facultad De Ciencias Veterinarias	Audisio, Santiago Andrés	10

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.

3. DURACIÓN ESTIMADA del PROYECTO: 3 años

3.1. FECHA de INICIO: 01/10/2021 FINALIZACIÓN: 01/10/2023

4. RESUMEN del PROYECTO:

La matriz ósea desmineralizada (MOD) se halla indicada para reparar defectos óseos amplios debido a la propiedad osteoinductiva que le confiere la proteína constitutiva de la matriz, la *bone morphogenetic protein* (BMP). La proteína *lhh*, cuya síntesis está estimulada por la expresión de BMP y regulada por la proteína relacionada con la paratiroides (PTHr), es un morfogen maestro que controla la esquelotogénesis embrionaria, interviene en la homeostasis del hueso y en la reparación de fracturas. El objetivo del estudio será determinar el rol que desempeña *lhh* en la reparación de defectos óseos ortopédicos tratados con MOD. Se emplearán 25 conejos a los que les serán creados defectos óseos ortopédicos. Los defectos de 20 conejos (grupo tratamiento, GT) se tratarán rellenándolos con MOD, en tanto que los 5 animales restantes no recibirán tratamiento (grupo control, GC). El GT será sacrificado a los 7, 15, 21 y 30 días y al GC a los 30 días. Se obtendrán los defectos para realizar estudios histológicos de rutina e inmunohistoquímica (IHQ) para inmunodetectar a *lhh* y PTHr. Por cada muestra se tomarán 3 microfotografías y se analizarán para determinar las densidades óptica (DO) y óptica integrada (DOI). Las densidades ópticas se estudiarán con un ANOVA y Test ECD de Fisher con $p < 0,05$.

4.1 Palabras claves:

Indian Hedgehog, osificación endocondral, hueso, conejo, inmunomarcación, defecto óseo, matriz ósea desmineralizada

4.2 Abstract en Inglés:

Demineralized bone matrix (DBM) is indicated to repair large bone defects due to its osteoinductive properties provided by the matrix constitutive protein, the bone morphogenetic protein (BMP). The Indian Hedgehog protein (*lhh*) – whose synthesis is stimulated by the expression of BMP and downregulated by related parathyroid hormone (PTHr) – is a master morphogen which controls the embryonic skeletogenesis, is involved in the bone homeostasis and in the repair of fractures. The aim of this study will be to determine the role of *lhh* in the repair of orthopedic bone defects treated with DBM. A sample of 25 rabbits will be used, which will be given orthopedic bone defects. The defects of 20 rabbits (treatment group, TG) will be filled with DBM, while the remaining 5 animals will receive no treatment (control group, CG). The TG will be sacrificed at 7, 15, 21 and 30 days and the CG at 30 days. The defects will be obtained to perform routine histological and immunohistochemical (IHC) studies to immunodetect *lhh* and PTHr. Three microphotographies will be taken for each sample and they will be analyzed to determine their optic densities (OD) and integrated optic densities (IOD). The optic densities will be studied with ANOVA and Fisher ECD Test with $p > 0.05$.

4.3. Key words:

Indian Hedgehog, endochondral ossification, bone, rabbit, immunomarkation, bone defect, demineralized bone matrix

5. INTRODUCCIÓN y ANTECEDENTES

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

El hueso es uno de los pocos órganos que conserva el potencial de regeneración en la vida adulta, pues posee capacidad de reparación sin la formación de cicatrices. Esta condición le cabe para la remodelación y para la cascada de acontecimientos celulares y moleculares que suceden en la curación de las fracturas (Nandi *et al.*, 2010).

El tratamiento de defectos óseos ortopédicos amplios constituye un desafío para los cirujanos ortopédicos. Las razones obedecen a factores relacionados con el comportamiento biomecánico del hueso afectado, especialmente si el sitio del defecto debe soportar peso y presiones como consecuencia

de las actividades físicas del paciente, y, por otro lado, por las características del biomaterial utilizado para la reparación del faltante óseo.

Urist (1965) observó que la implantación de MOD en un sitio extra esquelético condujo al desarrollo de un huesecillo. La proteína de la matriz ósea responsable de esta inducción fue denominada proteína morfogenética ósea (BMP) (Urist, 1965; Lieberman *et al.*, 2002).

Las propiedades osteogénicas de la MOD han sido estudiadas en diversas especies animales para ser utilizada como auto- halo- y xenoinjerto. En ese aspecto se estudió en equinos (Vail *et al.*, 1994; Douglas y Clarke, 1995), perros (Bigham-Sadegh *et al.*, 2013), aves (Sanaei *et al.*, 2015), conejos (da Silva *et al.*, 2003, Audisio *et al.*, 2015), ratas (Stevenson y Feighan, 1994).

La MOD halogénica posee mayor propiedad osteoinductiva que los injertos óseos (Khan *et al.*, 2005; Bigham-Sadegh *et al.*, 2015). Por este motivo en medicina veterinaria es empleada para tratar fracturas y resolver no uniones, osteomielitis, grandes defectos ocasionados por razones traumáticas y remoción ósea como tratamiento de neoplasias (Ganesh *et al.*, 1992; Kumar y Ramakrishna *et al.*, 2001, Hoffer *et al.*, 2008; da Silva *et al.*, 2012.)

La propiedad osteoinductiva de la MOD quedó comprobada cuando se registró la presencia de hueso heterotópico extra esquelético en los sitios donde fuera implantada en conejo, perro y bovino y de MOD humana en ratones (xenoinjerto) Aliabadi *et al.*, (2010).

Las proteínas Hedgehog (Hh) conforman una familia de morfogenes con funciones específicas en diversos procesos de desarrollo en vertebrados e invertebrados (Kornberg, 2011). Son sintetizadas como precursoras y actúan mediante un fragmento N-terminal activo que con posterioridad se modifica mediante la unión al colesterol y ácido palmítico. Los fragmentos activos de Hh regulan la actividad de células vecinas y distantes (Ingham y McMahon, 2001). Los vertebrados poseen tres variedades de la proteína Hh. Ellas son Desert Hedgehog (Dhh), Sonic Hedgehog (Shh) e Indian Hedgehog (Ihh). Las tres tienen funciones únicas que regulan distintos procesos de desarrollo embrionario (Bitgood y McMahon, 1995). Dhh es esencial para el desarrollo de nervios periféricos e interviene en la espermatogénesis; Shh participa en la esquelétogénesis estableciendo la asimetría lateral, el eje antero-posterior de las extremidades y el desarrollo del sistema nervioso central; mientras que Ihh es un regulador maestro del desarrollo óseo endocondral (McMahon *et al.*, 2003).

La Ihh cumple un rol en la esquelétogénesis, en los procesos de osificación endocondral, como así también su actividad en la reparación de fracturas y participación en afecciones del sistema osteoarticular. La comprensión de los mecanismos íntimos de acción de Ihh contribuirá establecer estrategias en el tratamiento de afecciones osteoarticulares de los animales.

El rol que desempeña de Shh e Ihh en el desarrollo del esqueleto quedó establecido en los estudios realizados en ratones transgénicos incapaces de expresar estas proteínas. Las experiencias se realizaron en grupos de animales que eran *Shh*^{-/-} e *Ihh*^{-/-}. Ambos grupos mostraron diferentes formas de defectos esqueléticos, lo que demostró que ambas proteínas son esenciales para la orgaogénesis ósea. Los ratones *Shh*^{-/-} presentaron anomalías del desarrollo temprano del esqueleto con retraso severo del crecimiento, ausencia de vértebras y de estructuras distales de los miembros (Chiang *et al.*, 1996). Los ratones *Ihh*^{-/-} manifestaron extremidades cortas pero considerablemente más desarrolladas que la de los animales *Shh*^{-/-}. La ausencia de estructuras óseas mineralizadas en los ratones *Ihh*^{-/-} indica que ésta coordina los eventos celulares durante el desarrollo del hueso endocondral incluida la proliferación y diferenciación de condrocitos (condrocitos redondos → planos → prehipertróficos → hipertróficos) y osteoblastos (St-Jacques *et al.*, 1999).

La actividad celular en la placa de crecimiento se encuentra regulada por un mecanismo de retroalimentación local en la que intervienen la proteína relacionada con la paratiroide (PTHrP), Ihh y la proteína morfogénica del hueso (BMP). La interacción de estas moléculas en la osificación endocondral regula la tasa de condrocitos que dejan la zona proliferativa e inician de forma irreversible la diferenciación en células hipertróficas (Kronenberg 2003, Provot y Schipani 2005, Goldring *et al.*, 2006). La PTHrP es sintetizada y secretada por las células pericondrales periarticulares y condrocitos en fase avanzada de diferenciación. Promueve la proliferación de los condrocitos en la placa de crecimiento a la vez que inhibe su hipertrofia por inhibición de Ihh (Jüppner, 2000) y evita la maduración prematura de los condrocitos (Goldring *et al.*, 2006). Por su lado Ihh, que es secretada por los condrocitos hipertróficos, emite señales para mantener la expresión de PTHrP al final del desarrollo (Shum *et al.*, 2003). Estos factores parácrinos forman un proceso de retroalimentación negativo en el cartílago de crecimiento e identifica a Ihh como coordinador del crecimiento esquelético y la morfogénesis (Karp *et al.*, 2000). La

proteína BMP recibe retroalimentación positiva de *Ihh* y promueve el aumento de síntesis de la PTHrP. Sin embargo, puede actuar directamente sobre los condrocitos inhibiendo su hipertrofia (Grimsrud *et al.*, 2001; Ballock y O'Keefe 2003, Shum *et al.* 2003).

En ratones *Ihh*^{-/-}, *Runx2* se expresó en condrocitos pero no en células pericondrales, lo que indica que *Ihh* se requiere para que *Runx2* se exprese en células pericondrales. *Runx2* y *Runx3* son fundamentales para la maduración de los condrocitos e inducen la expresión de *Ihh* en los condrocitos prehipertrofos, que a su vez inducen la expresión de *Runx2* en las células pericondrales. En estos ratones *Ihh*^{-/-} se detectó β -catenina nuclear en las células pericondrales, esta observación indica que se requiere *Ihh* para la señalización canónica de Wnt en células pericondrales (Hu *et al.*, 2005). Por lo tanto, existe una relación entre la maduración de los condrocitos y la diferenciación de los osteoblastos en la osificación endocondral, e *Ihh* media esa relación (Komori, 2006).

En los huesos parietales de ratones *Ihh*^{-/-} se llevó a cabo la osificación intramembranosa aunque resultó en huesos de tamaño reducido. La osificación en esos animales presumiblemente se realizó por una vía independiente a *Ihh* mediante otra molécula Hh (*Shh* o *Dhh*) o bien los osteoblastos en estos huesos no requieren señalización Hh (Chung *et al.*, 2001). Los estudios *in vivo* e *in vitro* sugieren que la pérdida de *Ihh* reduce la expresión de BMP en los huesos del cráneo (Lenton *et al.*, 2011).

Como ya se mencionara *Ihh*, que interviene en la morfogénesis de las vértebras, en embriones de ratones se expresa en condensaciones de condrocitos de los cuerpos vertebrales a partir del día 14 post-concepción y más tarde en las placas terminales de las vértebras (Dipaola *et al.*, 2006).

La principal célula reguladora del desarrollo de la condroepifisis y el cartílago de crecimiento es el condrocito prehipertrofo que es responsable de la síntesis de *Ihh*. La proteína *Ihh* controla la diferenciación temprana de condrocitos redondos (CR) en condrocitos proliferativos planos así como la inducción de osteoblastos adyacentes (Vortkamp *et al.*, 1996; Long *et al.*, 2001; Niswander, 2002; Kronenberg, 2003; Kobayashi *et al.*, 2005). La PTHrP interviene en este sistema como el instrumento por el cual *Ihh* regula el flujo de condrocitos indiferenciados a través de la cascada de diferenciación celular.

En la reparación de la fractura se activa la señalización de *Ihh* para manifestarse en los condrocitos (Ito *et al.*, 1999). En ese sentido, se postuló el uso potencial terapéutico de la vía de *Ihh* como modulador en la reparación de fracturas e integración ósea de implantes (Baht *et al.*, 2014).

En fracturas femorales experimentales en ratas *Ihh* se expresó en los condrocitos maduros e hipertrofos del callo de fractura. (Ferguson *et al.*, 1998; Vortkamp *et al.*, 1998; Murakami y Noda, 2000) En el callo intervino en mineralización temprana aunque no parece ser necesaria para la curación final (Liu *et al.*, 2017). Por otra parte, el estrés mecánico cíclico indujo la expresión de *Ihh* también en los condrocitos, lo que sugiere la condición mecanosensible del gen *Ihh* que contribuye en la reparación de las fracturas (Wu *et al.*, 2001).

La señalización elevada de *Ihh* en células mesenquimáticas mejoró la regeneración ósea de manera efectiva en un modelo animal con lesión aguda clínicamente relevante mediante el incremento de la condrogénesis, la osteogénesis y la angiogénesis (Zou *et al.*, 2014)

En otros estudios donde también se estudió la reparación de fracturas experimentales de huesos largos de ratas, la activación de la señalización de Hh mejoró la deposición de osteoide en el callo de fractura. Mientras que la inhibición de la señalización resultó en una disminución de la deposición de la matriz. Este efecto adquirió mayor relevancia en cultivos osteogénicos *in vitro* donde la activación de la señalización de Hh mejoró la diferenciación y actividad osteoblástica. Estas observaciones confirman que la activación de la señalización de Hh en los osteoblastos afecta positivamente la reparación de fracturas óseas a la vez que sugiere que el uso potencial de agentes moduladores de Hh poseerían efectos positivos en la reparación ósea y para contribuir a la integración ósea con los implante (Baht *et al.*, 2014)

Entre los moduladores de *Ihh* se encuentra un agonista conocido como *smoothened agonist* (SAG). Estudios experimentales realizados en ratones con fractura de fémur a los que se les suministró SAG se constató aumentó en el tamaño de los callos cartilaginoso y óseo a los 14 días post-cirugía. En esos animales el análisis histológico mostró aumento del número de células que expresaron un marcador de proliferación y un marcador de condrocitos en el callo cartilaginoso y de osteoblastos en el callo óseo (Kashiwagi *et al.*, 2016).

El tratamiento con SAG indujo un aumento significativo y dependiente de la dosis en la curación del hueso en defectos de huesos planos. El análisis histomorfométrico mostró aumento en todos los parámetros de formación ósea y en el número y la densidad de los vasos sanguíneos (Lee *et al.*, 2016).

Le *et al.*, (2001) compararon la actividad de Ihh en fracturas tibiales estables versus inestables en las etapas de curación inicial o inflamatoria, la fase intermedia o de callo blando y en el estadio de callo duro. Ihh se expresó en el callo de fractura no estabilizado en comparación con un callo estabilizado. Persistió en la fractura no estabilizada mientras que su expresión se redujo en el hueso estabilizado. La estabilización de la fractura, que evita o disminuye la fase cartilaginosa de la reparación ósea, se correlaciona con una disminución de la señalización de Ihh en el callo de fractura. El entorno mecánico afecta la inducción temporal de Ihh. Mientras que en fracturas condilares mandibulares experimentales en dos grupos de ratas, jóvenes y viejas, se observó retraso de la reparación en los animales viejos. En tanto, en los animales jóvenes el número de células que expresaban Ihh se incrementó en las primeras dos semanas post-fractura y luego disminuyó gradualmente hasta la octava semana (Tatsumi *et al.*, 2014).

Ihh ha sido ampliamente estudiada en la embriogénesis y se cuenta con poca información del rol que cumple en los procesos de reparación de las fracturas como así también en reparación de defectos óseos amplios.

El estudio propuesto buscará establecer la presencia de Ihh mediante la inmunodetección y de esa forma establecer en la fases de la reparación en la que intervendría y así relacionarla con la actividad celular que se lleva a cabo durante la reparación de defectos óseos ortopédicos tratados con MOD.

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)

Tesis doctoral

- Audisio, SA. 2017. Estudio de diferenciación celular en defectos óseos ortopédicos tratados con matriz ósea desmineralizada. Tesis doctoral para acceder al título de Doctor en Ciencia Investigación y Tecnología Agropecuaria – Facultad de Agronomía y Veterinaria Universidad Nacional de Río Cuarto. 15 de Agosto de 2017.

Presentación en eventos científicos

- IV Jornadas y Reunión Anual de la Asociación Argentina de Inmunología Veterinaria. Audisio SA, Torres PA, Vaquero PG, Verna EC, Cristofolini AL, Sanchis G, Merkis C. Alternativa de conservación de matriz ósea desmineralizada. Río Cuarto, diciembre de 2011.
- VII Jornada de Ciencia y Técnica. Audisio SA, Torres P, Vaquero P, Verna E, Cristofolini A, Merkis C. Preservación de matriz ósea desmineralizada en alcohol. Estudio preliminar. Organizada por la Facultad de Ciencias Veterinarias de la UNLPam. (Res. CD N° 144/11). General Pico, 12 de octubre de 2011. *EXPOSITOR MODALIDAD POSTER*.
- XXVII Jornadas Científicas de la Asociación de Biología de Tucumán. Torres P, Lacolla D, Audisio SA, Adagio L, Vaquero P, Yaful G, Merkis C, Gobello C. Efectos del bloqueo de los receptores de progesterona con aglepristone en la glándula mamaria de la perra. Organizadas por la Asociación de Biología de Tucumán. 13-15 de octubre de 2010. *EXPOSITOR MODALIDAD POSTER*.
- 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. 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 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*.
- VIII Jornada de Ciencia y Técnica – I Jornada Interinstitucional Facultad de Ciencias Veterinarias – Facultad de Ingeniería de la UNLPam. Audisio SA, Vaquero P, Torres P, Verna E, Ocampo L, Merkis C, Cristofolini A. 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. *EXPOSITOR MODALIDAD POSTER*.

- 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*.
- 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*.
- II Congreso Argentino de Cirugía de Pequeños Animales. 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. Facultad de Ciencias Veterinarias – UBA. (Res. CD N° 2863/13). Ciudad Autónoma de Buenos Aires. 9 de agosto de 2014 *EXPOSITOR MODALIDAD POSTER*.
- Latin American Veterinary Conference. 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. Lima, Perú. 21-24 de abril de 2015. *EXPOSITOR MODALIDAD POSTER*.
- Latin American Veterinary Conference. 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. Lima, Perú. 21-24 de abril de 2015. *EXPOSITOR MODALIDAD POSTER*.
- Taller de estrategias para la transferencia de tecnologías: investigadores, emprendedores y políticas. Organizado por el Proyecto D-TEC0007/13. CS UNLPam Resolución N° 390/15. 12 de noviembre de 2015. *EXPOSITOR MODALIDAD ORAL*.
- II Jornada Interinstitucional Facultad de Ciencias Veterinarias – Facultad de Ingeniería. Audisio SA. Estudio de la diferenciación celular durante la osteogénesis en defectos ortopédicos con matriz ósea desmineralizada. Resoluciones CD FCV N°120/15 CD FI N°120/15. 18 de noviembre de 2015. *EXPOSITOR MODALIDAD ORAL*.
- XV Congreso Internacional de AVEACA. 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. Ciudad Autónoma de Buenos Aires, 6 y 7 de octubre de 2015. *EXPOSITOR MODALIDAD POSTER*.
- XVIº Congreso Internacional de AVEACA. 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. Ciudad Autónoma de Buenos Aires, 6 y 7 de octubre de 2016. *EXPOSITOR MODALIDAD POSTER*.
- II Jornada Interinstitucional Facultad de Ciencias Veterinarias – Facultad de Ingeniería. Ambiente multimedial para la enseñanza de patologías quirúrgicas osteoarticulares. (Res CD N° 120/15 y 193/15). General Pico, 18 de noviembre de 2015. *DISERTANTE*.
- II Jornada Interinstitucional Facultad de Ciencias Veterinarias – Facultad de Ingeniería. Estudio de la diferenciación celular durante la osteogénesis en defectos ortopédicos con matriz ósea desmineralizada. (Res CD N° 120/15 y 193/15). General Pico, 18 de noviembre de 2015. *DISERTANTE*.
- XVIº Congreso Internacional de AVEACA. 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. 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.

- Audisio SA, Vaquero PG, Verna EC. 2019. El rol de osterix en la diferenciación osteoblástica: potencial en el tratamiento de afecciones osteoarticulares. *Ciencia Veterinaria*. 21(1):15-26. DOI: <http://dx.doi.org/10.19137/cienvet-201921101>
- Audisio SA, Vaquero PG, Verna EC, Cristofolini AL, Merkis CI. 2019. Inmunodetección de Wingless int-3 (Wnt3) en la reparación de defectos óseos ortopédicos en conejos tratados con matriz ósea desmineralizada. *Ciencia Veterinaria*. 21(1):27-42. DOI: <http://dx.doi.org/10.19137/cienvet-201921102>
- Audisio SA, Vaquero PG, Verna EC, Cristofolini AL, Merkis CI. 2019. Temporal and spatial immunolocalization of osteopontin in the repair of orthopaedic bone defects treated with demineralized bone matrix. *Ciencia Veterinaria*. 21(1):53-68. DOI: <http://dx.doi.org/10.19137/cienvet-201921104>

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

- Estudio de la diferenciación celular durante la osteogénesis en defectos ortopédicos con matriz ósea desmineralizada. Directora: Merkis C, Co-Directora: Torres P, Cristofolini A, Audisio SA, Vaquero P, Verna E, Audisio SA. Financiado por la Secretaría de Ciencia e Investigación FCV-UNLPam. Res. CD FCV-UNLPam N° 285/2011.
- Defectos óseos circulares diafisarios experimentales tratados con matriz ósea desmineralizada. Director Esp Pablo Guillermo Vaquero, Co-Director Audisio SA. Integrantes Verna EC, Lacolla D, Buey V; Asistentes: Mutio Sotz C, Milanta G, Arriagada D, Matus B. Resolución CD FCV-UNLPam N°340/2017.
- Inmunodetección de osterix en la reparación de defectos óseos tratados con matriz ósea desmineralizada. Director: Audisio SA, Co-Director Vaquero PG; Integrantes Verna EC, Buey V; Asistentes: Blanco Sereno M, Arriagada D, Milanta G, Fernandez Gomez A, Ponce M, Talmon ML, Mutio Sotz C. Financiado por la Secretaria Investigación, Posgrado y Extensión FCV-UNLPam. Resol. FCV-UNLPam Nro 334/2018

6. DESCRIPCIÓN del PROYECTO

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

6.1.1. PROBLEMA CIENTÍFICO

La reparación de defectos óseos amplios requiere terapias que garanticen condiciones locales para que se lleven a cabo procesos celulares de proliferación y diferenciación celular que culminen por restablecer la pérdida de hueso. Ihh es una proteína cuya función es ampliamente conocida en la esquelotogénesis embrionaria y de la cual resta tener mayores conocimientos del rol que desempeña en la reparación de defectos ortopédicos tratados con MOD.

OBJETIVOS

Objetivos Generales:

Establecer el rol que desempeña Ihh en la reparación de defectos óseos ortopédicos tratados con matriz ósea desmineralizada.

Objetivos Específicos:

- Inmunodetectar al Ihh en la reparación de defectos óseos tratados con matriz ósea desmineralizada
- Establecer el lapso de tiempo en que se inmunoexpresa Ihh durante la reparación de defectos óseos
- Establecer el lapso de tiempo en que se inmunoexpresa PTHr durante la reparación de defectos óseos
- Relacionar la inmunodetección de Ihh con el proceso de proliferación y diferenciación celular
- Relacionar la inmunodetección de Ihh con la inmunoexpresión de PTHr
- Cuantificar las densidades óptica (DO) y óptica integrada (DOI) de Ihh
- Cuantificar las densidades óptica (DO) y óptica integrada (DOI) de PTHr

HIPÓTESIS

Ihh interviene en los mecanismos de proliferación y Diferenciación celular llevadas a cabo en proceso de reparación de defectos óseos ortopédicos tratados con MOD.

RESULTADOS ESPERADOS del PROYECTO

Se espera obtener conocimiento respecto a cuál es la actividad de Ihh en los procesos celulares que conllevan en la reparación de los defectos óseos.

6.2. METODOLOGÍA, MODELOS y TÉCNICAS.**Obtención de matriz ósea desmineralizada**

Para la realización del estudio se empleará matriz ósea alogénica según protocolo previamente publicado por los autores (Audisio *et al.*, 2014). Se emplearán diáfisis de conejos procedentes de frigorífico, a los que inmediatamente de sacrificados les serán extraídos los fémures, las tibias y los húmeros en condiciones de asepsia. A las diáfisis les serán removidos los tejidos blandos circundantes y la médula ósea y se lavarán con abundante agua destilada a 4°C para prevenir la acción enzimática en los tejidos. Las diáfisis se seccionarán en piezas de 5 a 10 mm y luego se fragmentarán en un molino de cuchillas a 20.000 rpm (Yellowline A10, IKA, Alemania) hasta obtener partículas de 100 a 750 µm. Al hueso triturado le serán extraídos los lípidos sumergiéndolo en una solución de cloroformo:metanol en proporción 1:1 durante 12 horas, manteniendo una relación 1:30 de hueso:solución. El hueso será lavado con agua destilada a 4°C y sometido a la acción de una solución de ácido clorhídrico (HCl) 0,6N a razón de 25 meq/g 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 conservada en alcohol etílico 95° a 4°C hasta su uso en proporción de 30 partes de alcohol por cada parte de matriz.

Modelo animal y procedimientos quirúrgicos

Se emplearán 25 conejos de la raza neocelandeza sexualmente maduros. Durante el tiempo que durará la experiencia los animales se mantendrán en jaulas individuales alimentados con una fórmula comercial de alimento balanceado y agua *ad-libitum*.

Luego de un período de adaptación a las condiciones de confinamiento los conejos serán sedados con 0,1 mg/Kg de acepromacina (Acedan® inyectable, Lab. Holliday Scott, Argentina) y anestesiados con 40 mg/Kg de ketamina IM (Ketamina 50®, Lab. Holliday Scott, Argentina). Uno de los miembros torácicos se acondicionará para ser intervenido en condiciones de asepsia. A los efectos de obtener analgesia del miembro se procederá al bloqueo del plexo braquial mediante administración de lidocaína al 2%.

Se practicará una incisión en la cara dorsal del antebrazo que permitirá identificar los músculos extensores de la mano. Los músculos se disecarán para exponer al radio y procederá a crear un defecto ortopédico de tamaño crítico, cuyas mínimas dimensiones impidan la reparación espontánea durante la vida del animal. La longitud del defecto equivale a 1,5 veces el diámetro del hueso (Schmitz y Hollinger, 1986). El diámetro de cada radio se determinará mediante radiografías de control pre-operatorio. Una vez expuesto el radio se realizarán dos osteotomías paralelas y transversales al eje longitudinal con una distancia entre ambas de 1,5 veces el diámetro óseo. Los defectos de 20 animales recibirán tratamiento mediante relleno del defecto con MOD y constituirán el grupo tratamiento (GT); los restantes 5 animales no recibirán tratamiento y conformarán el grupo control (GC). Los músculos extensores fueron suturados con poligalactina con puntos separados. El tejido subcutáneo y piel también se suturarán con el mismo material según técnicas de rutina.

Concluidas las intervenciones los conejos permanecerán en jaulas individuales. Diariamente recibirán antibioticoterapia y terapia antiinflamatoria (ketoprofeno 0,1 mg/kg IM; Calmavet, Lab. Zoovet) durante 5 días. Diariamente durante 8-10 días los conejos recibirán atención de las heridas (lavado, desinfección y control de puntos de sutura) como así también serán examinados para evaluar condiciones de salud.

A los efectos de evaluar los procesos histológicos de reparación de los defectos óseos ortopédicos experimentales con MOD, se conformarán subgrupos de tratamiento (SgT) de 5 animales cada uno. A cada (SgT) le será asignado un período de sobrevida post-quirúrgica a los efectos de proceder a realizar estudio histológico e inmunohistoquímico de la reparación ósea. Los conejos del SgT1 será sacrificado a los 7 días post-operatorio, el SgT2 a los 15 días, el SgT3 a los 21 días; el SgT4 a los 30 días. Los animales del GC serán sacrificados a los 30 días post-operatorio.

Los animales de cada subgrupo tratamiento serán sacrificados al concluir el período de sobrevida establecido, a los 7, 15, 21, 30 días. De cada cadáver se recuperarán las porciones de las diáfisis conteniendo los defectos tratados. Las muestras se fijarán con formol salino tamponado, se deshidratarán con baterías de alcoholes de graduación creciente, para ser incluidos en parafina. Se harán cortes histológicos correspondiente a los defectos provocados y tratados de aproximadamente 4 µm con

micrótopo (Microtom®, USA) y montarán 3-4 cortes sobre cada portaobjeto. Los cortes histológicos se teñirán con hematoxilina-eosina (HE) para el reconocer estructuras tisulares e inmunomarcarse Ihh y PTHr mediante técnica de inmunohistoquímica.

Inmunodetección de Ihh y PTHr

Para la realización de estas técnicas se utilizarán los cortes histológicos obtenidos según descripción previa. Los mismos serán desparafinados mediante dos pasajes por xilol de 15 minutos cada uno. Posteriormente se rehidratarán con baterías de alcoholes de graduación decreciente de 5 minutos cada uno. Seguidamente se lavarán 2 veces en agua destilada (10 minutos cada una) y dos veces en solución tampón fosfato salino (PBS pH 7,2), 10 minutos cada uno. La técnica se realizará a temperatura ambiente. Antes de la primera incubación con los anticuerpos los portaobjetos conteniendo los cortes se tratarán con 3% (v/v) de peróxido de hidrógeno por 5 minutos y lavados con PBS pH 7,2. Luego se incubará con el primer anticuerpo correspondiente al receptor buscado durante una hora a temperatura ambiente en cámara húmeda Anticuerpo anti Ihh (ab.39634) y PTHr de OriGene Technologies, Inc.USA). Posteriormente serán lavados con PBS (2 lavados de 10 minutos cada uno) e incubados durante 20 minutos con el segundo anticuerpo biotinilado (compuesto por inmunoglobulinas biotiniladas anti-conejo, anti-ratón y anti-cabra). Luego de ser lavados con PBS (2 lavados de 10 minutos cada uno) se tratarán con el complejo de streptavidina conjugada con peroxidasa por 20 minutos 42 (LSAB®+Systems HRP, Dako Cytomation). Luego del período de incubación se lavarán con PBS (lavados 10 minutos cada uno) y tratados con la solución de sustrato cromógeno 3,3'-diaminobenzidina (DAB) durante 15 minutos. Posteriormente, los cortes histológicos se contrastarán 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 concentración creciente y montados con Entellan (Merck) para ser observados en un microscopio óptico Axiophot (Carl Zeis, Alemania). La adquisición de imágenes se hará mediante una cámara digital Powershot (G6, 7.1 megapíxeles (Canon INC, Japón) adosada al microscopio óptico y el procesamiento de las mismas a través del software AxioVision 4.6.3 (Carl Zeis, Alemania).

En las técnicas IHQ se considerarán positivas a Ihh y PTHr cuando se inmunomarquien con color marrón a la matriz extracelular, células mesenquimáticas, condrocitos, condrocitos hipermaduros, pre-osteoblastos y osteoblastos.

Análisis de densidad óptica (DO) y densidad óptica integrada (DOI)

Se adquirirán imágenes de los cortes inmunomarcados con aumento 200X. Las imágenes adquiridas corresponderán a las partículas de MOD, tejido osteocondroide, a la fase de osificación y del hueso nuevo trabecular y maduro hallados en los defectos óseos a los 7, 15, 21 y 30 días post-operatorio. Las imágenes capturadas se introducirán en el software Image J 1.49b (Media Cybernetics, USA) para cuantificar la expresión de Ihh y PTHr. El software convierte el color marrón correspondiente a las expresiones de cada proteína en una escala de grises que se extiende de 0 a 255 (0=blanco y 255=negro). Con los valores obtenidos se calculará la densidad óptica (DO) y densidad óptica integrada (DOI). La densidad óptica se determinará según la fórmula $DO = \log_{10} (IT/II)$; donde IT es la intensidad transmitida (equivale a 255) y la II que es la intensidad incidente que corresponde a el valor de la media de grises de la imagen analizada por el software. La densidad óptica integrada (DOI) se obtendrá del producto entre la DO y la unidad de superficie expresada en micras cuadradas (μ^2) ocupada por la expresión de las proteínas en estudio según la fórmula $DOI = (DO \times AREA)$. El resultado de ambas fórmulas se expresará en unidades arbitrarias (UA) (Vasconcellos *et al.*, 2014). Las imágenes adquiridas también se observarán con aumento a 40X y 100X para analizar aspectos citoplasmáticos que resultaran de interés.

Análisis estadístico

Los datos obtenidos de las DO y DOI correspondiente a Ihh y PTHr se introducirán en el software Infostat (Di Rienzo *et al.*, 2010) para ser analizados con un ANAVA, los resultados se compararon con un test LSD de Fisher con una significación estadística definida como $p < 0,05$.

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

La experiencia permitirá establecer el desempeño de Ihh en los distintos estadios de la reparación de defectos óseos ortopédicos tratados con MOD. Se harán aportes al conocimiento que se posee acerca de Ihh esperando a contribuir a comprender los procesos íntimos de la reparación a efectos de ser aplicados en terapias osteoinductivas.

6.4. CRONOGRAMA ANUAL de ACTIVIDADES

Año	Actividad	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
2020	Revisión bibliográfica												
	Obtención de MOD												
	Tratamiento												
2021	Revisión bibliográfica												
	Inmunohistoquímicas												
2022	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
- Quirófano
- Laboratorio donde realizar los estudios inmunohistoquímicos
- Microscopio

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
- Molino

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) *

BIENES DE CONSUMO				
Concepto	Cantidad	Precio unitario		
Conejos	25	\$ 400		\$10000
Alimento balanceado	120 gr/día x 20 conejos = 2 bolsas de 25 kg	\$850,00		\$1.700
Ketamina	2 fcos x 50 mL	\$800,00		\$1.600
Acepromacina	1 fco x 50 mL	\$550,00		\$550
Poligalactina	15 hebras de 70 cm	\$4.120,00		\$1.800
Descartables	Gasa, antiséptico, soluciones, jeringas 3 mL, agujas hipodérmicas, parenterales,	\$2.000,00		\$2.000

Dipenisol® Retard - Bayer	1 fco x 10 mL	\$500,00		\$500
Ácido Clorhídrico	120 ml	\$ 1000		\$ 1000
Metanol		\$ 4000		\$ 4000
Cloroformo		\$ 2000		\$ 2000
Anticuerpo anti Ihh (ab.39634), Rabbit polyclonal to Ihh, 100 µg/ml. Marca: ABCAM	1 Kit	\$40000		\$40.000
Rabbit polyclonal anti- PTHrP (107- 111) antibody, Serum 20 µl	1 kit	\$ 30000		\$30000
Subtotal 1				\$ 95.150
BIENES DE SERVICIOS				
Concepto	Cantidad	precio unitario		
Viajes presentación de trabajo en eventos científicos	Viajes	\$15000		\$15000
Confección de posters		\$5000		\$5000
Inscripción eventos científicos		\$10000		\$10000
Subtotal 2				30.000
TOTAL				125.150

* 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. Aliabadi A, Farahmand M, Hojati A, Mohebi A. 2010. Evaluation of the effects of bovine demineralized bone matrix and coralline hydroxyapatite on radial fracture healing in rabbit. Proceedings, 3rd World Veterinary Orthopaedic Congress, ESVOT-VOS, 15th ESVOT Congress, Bologna, Italy, 15-18 September. pp 534-535
2. 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):27-34.
3. Audisio SA, Vaquero P G, Torres PA, Verna EC, Ocampo LN, Cristofolini AL, Merkis CI. 2015. Radiological evaluation of radial bone defects treated with demineralized bone matrix in an experimental rabbit model. *Bulgarian Journal of Veterinary Medicine*. 18(2): 132-139.
4. Baht GS, Silkstone D, Nadesan P, Whetstone H, Alman BA. 2014. Activation of hedgehog signaling during fracture repair enhances osteoblastic-dependent matrix formation. *Journal Orthopedic Research*. 32(4):581-586. DOI: 10.1002/jor.22562.
5. Ballock RT, O'Keefe RJ. 2003. The biology of the growth plate. *Journal of Bone and Joint Surgery American*. 85(4):715-26.
6. Bigham-Sadegh A, Karimi I, Alebouye M, Shafie-Sarvestani Z, Oryan A. 2013. Evaluation of bone healing in canine tibial defects filled with cortical autograft, commercial-DBM, calf fetal DBM,

- omentum and omentum-calf fetal DBM. *Journal of Veterinary Science*. 14(3):337-343 DOI: <https://doi.org/10.4142/jvs.2013.14.3.337>
7. Bigham AS, Karimi I, Shariati SE, Oryan A. 2015. Učinak kortikalnog autopresatka, komercijalnog pripravka demineralizirane koštane matrice, demineralizirane koštane matrice telećeg ploda i praška od epifizealnog diska telećeg ploda na cijeljenje kostiju u kunića. *Veterinary Archives*. 85(1):23-36.
 8. Bitgood MJ, McMahon AP. 1995. Hedgehog and Bmp genes are coexpressed at many diverse sites of cell-cell interaction in the mouse embryo. *Developmental Biology*. 172(1):126-138.
 9. Chiang C, Litingtung Y, Lee E, Young KE, Corden JL, Westphal H, Beachy PA. 1996. Cyclopia and defective axial patterning in mice lacking Sonic hedgehog gene function. *Nature* 383:407-413.
 10. Chung U, Schipani E, McMahon AP, Kronenberg HM. 2001. Indian hedgehog couples chondrogenesis to osteogenesis in endochondral bone development. *Journal Clinic Investigation*. 107:295-304. DOI: <https://doi.org/10.1172/JCI11706>.
 11. da Silva AM, del Carlo RJ, Vilorio MIV, Silva AS, Filgueiras RR. 2003. Matriz óssea homóloga desmineralizada na preparação de falhas ósseas segmentares produzidas no rádio de coelhos. *Ciência Rural*. 33(3): 539-545
 12. da Silva SWG, de Castro RP, deViana GA, dos Santos FR, de Moraes RS, do Oriente VN. (2012). Estenose de pelve em felino tratado com anel de matriz óssea desmineralizada (MOD) - relato de caso. *Clínica Veterinária*. 17(98) 46-50.
 13. Dipaola CP, Farmer JC, Manova K, Niswander LA. 2006. Molecular signaling in intervertebral disk development. *Journal of Orthopaedic Research*. 23:1112-1119. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.orthres.2005.03.008>
 14. Douglas J, Clarke A. 1995. Response to demineralized bone matrix implantation in foals and adult horses. *American Journal of Veterinary Research*. 56(5): 649-665.
 15. Ferguson CM, Miclau T, Hu D, Alpern E, Helms JA. 1998. Common molecular pathways in skeletal morphogenesis and repair. *Annals New York Academy of Science*. 857:33-42. DOI: 10.1111/j.1749-6632.1998.tb10105.x
 16. Ganesh TN. 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 Journal of Veterinary Surgery*. 14:1-48
 17. Goldring MB, Tsuchimochi K, Ijiri K. 2006. The control of chondrogenesis. *Journal of Cellular Biochemistry*. 97(1):33-44. DOI: 10.1002/jcb.20652
 18. Grimsrud DC, Romano PR, D'Souza M, Puzas JE, Schwarz EM, Reynolds PR, Roiser RN, O'Keefe RJ. 2001. BMP signaling stimulates chondrocyte maturation and the expression of Indian hedgehog. *Journal of Orthopaedic Research*. 19(1):18-25
 19. 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(7): 639-647. DOI: 10.1111/j.1532-950X.2008.00430.x.
 20. Hu H, Hilton MJ, Tu X, Yu K, Ornitz DM, Long F. 2005. Sequential roles of Hedgehog and Wnt signaling in osteoblast development. *Development*. 132: 49-60; DOI: 10.1242/dev.01564
 21. Ingham PW, McMahon AP. 2001. Hedgehog signaling in animal development: Paradigms and principles. *Genes Development*. 15:3059-3087. DOI: 10.1101/gad.938601
 22. Jüppner H. 2000. Role of parathyroid hormone-related peptide and Indian hedgehog in skeletal development. *Pediatric Nephrologic*. 14(7):606-611.
 23. Karp SJ, Schipani E, St-Jacques B, Hunzelman J, Kronenberg H, McMahon AP. 2000. Indian hedgehog coordinates endochondral bone growth and morphogenesis via parathyroid hormone related-protein-dependent and -independent pathways. *Development*. 127: 543-548.
 24. Kashiwagi M, Hojo H, Kitaura Y, Maeda Y, Aini H, Takato T, Chung UI, Ohba S. 2016. Local administration of a hedgehog agonist accelerates fracture healing in a mouse model. *Biochemical and Biophysical Research Community*. 479(4):772-778. DOI: 10.1016/j.bbrc.2016.09.134
 25. Khan SN, Cammisa FPJ, Sandhu HS, Diwan AD, Girardi FP, Lane JM. 2005. The biology of bone grafting. *Journal of American Academy of Orthopaedic Surgeons*. 13(1):77-86.
 26. Komori T. 2006. Regulation of osteoblast differentiation by transcription factors. *Journal of Cell Biochemistry*. 99(5):1233-1239. DOI: 10.1002/jcb.20958

27. Kobasyashi T, Soegiarto DW, Yang Y, Lanske B, Schipani E, McMahon AP, Kronenberg HM. 2005. Indian hedgehog stimulates periarticular chondrocyte differentiation to regulate growth plate length independently of PTHrP. *Journal Clinical Investigation*. 115:1734–1742. DOI: 10.1172/JCI24397
28. Kornberg TB. 2011. Barcoding Hedgehog for Intracellular Transport Cell Biology. 4(200), pe44. DOI: 10.1126/scisignal.2002447.
29. Kronenberg HM. 2003 . Development regulation of the growth plate. *Nature*. 423:332-336.
30. Kumar RVS, Ramakrishna O. 2001. Femoral fracture repair by demineralized bone matrix combinations in canines. *Indian Journal of Animal Sciences*. 71(8):749-751
31. Lieberman JR, Daluiski A, Einhorn TA. 2002. The role of growth factors in the repair of bone. Biology and clinical applications. *Journal of Bone and Joint Surgery*. 84-A(6):1032-1044.
32. Ito H, Akiyama H, Shigeno C, Iyama K, Matsuoka H, Nakamura T. 1999. Hedgehog signalling molecules in bone marrow cells at the initial stage of fracture repair. *Biochemical Biophysical Research Communications*. 262(2):443–451. DOI: <https://doi.org/10.1006/bbrc.1999.1197>
33. Le AX, Miclau T, Hu D, Helms JA. 2001. Molecular aspects of healing in stabilized and non-stabilized fractures. *J Orthop Res*. 19(1):78-84. DOI: 10.1016/S0736-0266(00)00006-1
34. Lee S, Shen J, Pan HC, Shrestha S, Asatrian G, Nguyen A, Meyers C, Nguyen V, Lee M, Soo C, Ting K, James AW3. 2016. Calvarial defect healing induced by small molecule smoothed agonist. *Tissue Engineering Part A*. 22(23-24):1357-1366. DOI: 10.1089/ten.TEA.2016.0167
35. Lenton K, James AW, Manu A, Brugmann SA, Birker D, Nelson ER, Leucht P, Helms JA, Longaker MT. 2011. Indian Hedgehog positively regulates calvarial ossification and modulates bone morphogenetic protein signalling. *genesis* 49:784–796. DOI: DOI: 10.1002/dvg.20768
36. Liu X, McKenzie JA, Maschhoff CW, Gardner MJ, Silva MJ. 2017. Exogenous hedgehog antagonist delays but does not prevent fracture healing in young mice. *Bone*. 103:241-251. DOI: 10.1016/j.bone.2017.07.017
37. Murakami S, Noda M. 2000. Expression of Indian hedgehog during fracture healing in adult rat femora. *Calcified Tissue International*. 66(4):272-276.
38. McMahon AP, Ingham PW, Tabin CJ. 2003. Developmental roles and clinical significance of hedgehog signaling. *Current Topics Development Biology*. 53:1–114.
39. Nandi SK, Roy S, Mukherjee P, Kundu B, De DK, Basu D. 2010. Orthopaedic applications of bone graft and graft substitutes: a review. *The Indian Journal Medicine Research* 132(1): 15–30.
40. Niswander L. Interplay between the molecular signals that control vertebrate limb development. *International Journal Developmental Biology*. 46 (7):877–881
41. Provot S, Schipani E. 2005. Molecular mechanisms of endochondral bone development. *Biochemical Biochemistry Research Communications*. 328(3):658-665. DOI: 10.1016/j.bbrc.2004.11.068
42. Sanaei R, Abu J, Zuki MA, Alludin ZN. 2015. Evaluation of osteogenic potentials of avians demineralized bone matrix in the healing of osseous defects in pigeons. *Veterinary Surgery*. 44(5):603-612. DOI: 10.1111/vsu.12292.
43. Shum L, coleman CM, hatakeyama Y, tuan RS. 2003. Morphogenesis and dysmorphogenesis of the appendicular skeleton. *Birth Defects Research C Embryo Today*. 69(2):102-122. DOI: 10.1002/bdrc.10012
44. St.-Jacques B, Hammerschmidt M, McMahon AP. 1999. Indian hedgehog signaling regulates proliferation and differentiation of chondrocytes and is essential for bone formation. *Genes Development*. 13(19):2072-2086. DOI: 10.1101/gad.13.16.2072
45. Stevenson S, Feighan J, Davy D. 1994. Long bone defect healing in dogs and rats induced by demineralized bone matrix gel. *Veterinary Surgery*. 23: 5 417
46. Tatsumi H, Hideshima K, Kanno T, Hashimoto R, Matsumoto A, Otani H, Sekine J. 2014. Effect of ageing on healing of bilateral mandibular condyle fractures in a rat model. *International Journal Oral Maxillofacial Surgery*. 43(2):185-193. DOI: 10.1016/j.ijom.2013.07.742.
47. Urist MR. 1965. Bone formation by autoinduction. *Science*. 150(3698): 893-899. DOI: 10.1126/science.150.3698.893.
48. Vail T, Trotter GW, Powers BE. 1994. Equine demineralized bone matrix: relationship between particle size and osteoinduction. *Veterinary Surgery*. 23(5): 386–395. DOI: 10.1111/j.1532-950X.1994.tb00499.x.

49. Vasconcellos A., Cisternas C., Paredes M. (2014). Estudio inmunohistoquímico comparativo del receptor de estrógeno en tejido endometrial de ovejas razas Texel y Araucana. *International Journal of Morphology*. 32(3):1120-1124. DOI: 10.4067/S0717-95022014000300060.
50. Vortkamp A, Pathi S, Peretti GM, Caruso EM, Zaleske DJ, Tabin CJ. 1998. Recapitulation of signals regulating embryonic bone formation during postnatal growth and in fracture repair. *Mech Dev*. 71(1-2):65–76.
51. Wu Q, Zhang Y, Chen Q. 2001. Indian hedgehog is an essential component of mechanotransduction complex to stimulate chondrocyte proliferation. *Journal Biological Chemistry*. 276(38):35290-35296. DOI: 10.1074/jbc.M101055200
52. Zou S, Chen T, Wang Y, Tian R, Zhang L, Song P, Yang S, Zhu Y, Guo X, Huang Y, Li Z, Kan L, Hu H. 2014. Mesenchymal stem cells overexpressing Ihh promote bone repair. *Journal Orthopedic Surgery Research*. 9:102-115. DOI: 10.1186/s13018-014-0102-7