

## UNIVERSIDAD NACIONAL DE RIO CUARTO FACULTAD DE AGRONOMÍA Y VETERINARIA

Tesis para acceder al título de Doctor en Ciencia Tecnología e Innovación Agropecuaria

# ESTUDIO DE LA DIFERENCIACIÓN CELULAR EN LA REPARACIÓN DE DEFECTOS ÓSEOS ORTOPÉDICOS EXPERIMENTALES TRATADOS CON MATRIZ ÓSEA DESMINERALIZADA

MV Santiago Andrés Audisio

DIRECTORA: Dra. Cecilia Inés Merkis

CO-DIRECTORA: Dra. Andrea Lorena Cristofolini

Río Cuarto, Marzo de 2017

# COMISIÓN ASESORA

Nombre y apellido	Dr. Rodolfo E. Avila Lugar de trabajo Fac. Ciencias Médicas UNC
Firma	Aclaración Lugar de trabajo:

Nombre y apellido Dra. María Elisa Dionisio	de Cabalier Lugar de trabajo
Firma	Aclaración

Nombre y apellido Dr. Juan Tomás Wheeler Lugar de trabajo FAV-UNRC
Firma Aclaración

# DEFENSA ORAL PÚBLICA

Lugar y fecha	Universidad Nacional de Río Cuarto	
Calificación:		

### Recursos financieros para la realización de la Tesis

Los recursos financieros para la realización de la presente Tesis Doctoral provinieron del proyecto de investigación denominado *"Estudio de la diferenciación celular en defectos óseos ortopédicos experimentales tratados con matriz ósea desmineralizada"*. Dirigido por la Dra. Cecilia Merkis, Tesista MV Santiago Audisio, Investigadores MV Pablo Vaquero, MV Edgardo Verna, MV Laura Ocampo, Dra. Perla Torres, Dra. Andrea Cristofolini. Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional de La Pampa. Resolución Nº 285/2011.

### Dedicatoria

A mis padres Nelson y Bibí, por enseñarme el sendero correcto en la vida

- A mi padre, colega y Maestro, por despertar y estimular mí vocación por la medicina veterinaria y la docencia universitaria
- A mi esposa Miriam por su apoyo amoroso e incondicional
- A mis hijos Pablo, Marcos y Rocío por cederme su tiempo para mis investigaciones y ausencias obligadas
- A mis hermanos Eduardo y Nicolás por apoyarme y confiar en mis sueños
- A mis suegros Atilio y Muruma por el apoyo permanente,
- A mis cuñados Gabriela, Atilio, Pancho, Laura, Silvia, Gabriel, sobrinos y amigos por el acompañamiento

### **Agradecimientos**

- A mi Directora Dra. Cecilia Merkis y Co-Directora Dra. Andrea Cristofolini porque se pusieron a mi disposición y confiaron en mí.
- A Liliana Muller por colaborar desinteresadamente en la atención de los animales que empleé.
- A mis compañeros de Cátedra, Pablo Vaquero, Edgardo Verna, Laura Ocampo y Perla Torres por sus contribuciones y cubrir mis ausencias cuando concurrí a los cursos del doctorado.

Al Dr. Juan Tomás Wheeler por despertar mi vocación por la investigación

A la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional de La Pampa, mi lugar de trabajo, por financiar la investigación de esta tesis.

### RESUMEN

La matriz ósea desmineralizada (MOD) es utilizada para reparar pérdidas de hueso debido a su propiedad osteoinductiva. La osteoinducción responde a la proteína constitutiva de la matriz ósea, la bone morphogenetic protein-2 (BMP-2). El objetivo de la presente experiencia consistió en establecer los acontecimientos celulares que conducen a la reparación de los defectos mediante la inmunodetección de las proteínas (BMP-2), wingless int (WNT), Runx2, osteopontina (OPN) y osteocalcina (OC). Para la presente experiencia se procesó MOD por empleo de un protocolo modificado y estandarizado. El producto se caracterizó por microscopía óptica y electrónica e implante intramuscular. Se emplearon 35 conejos a los que se les realizó un defecto óseo ortopédico en uno de los radios. En 30 animales, grupo tratamiento (Gt), los defectos se rellenaron con MOD, mientras que los otros 5 conejos, grupo control (Gc), no recibieron tratamiento. A ambos grupos se les realizó evaluación radiológica a los 7, 15, 21, 30, 60 y 150 días y en igual período los animales del Gt fueron sacrificados para realizar estudios histológicos con técnicas de rutina e inmunodetección de BMP-2, WNT, Runx2, OPN y OC. Los preparados histológicos se fotografiaron y analizaron con un software para establecer la densidad óptica (DO) y densidad óptica integrada (DOI) de cada proteína y establecer el grado de participación de cada una de ellas en la proliferación y diferenciación celular que concluyó con la reparación de los defectos. Los resultados de las DO y DOI se analizaron con ANOVA y Test LSD de Fisher. Las partículas de MOD poseían forma cuadrangular, midieron 532,42 µm y conservaban la arquitectura histológica de las cortezas óseas. La evaluación radiológica mostró reparación completa entre los 30 y 60 días post-tratamiento solo en el Gc. Histológicamente se estableció que la reparación se realizó por osteoinducción mediante osificación transcondral. La proteína BMP-2 estimuló la diferenciación de las células mesenquimáticas (CM) que concurrieron, a la vez influyó en la expresión de WNT; ambas interactuaron para que se manifieste Runx2 que posibilitó la proliferación y diferenciación de las CM en condrocitos y transdiferenciaran en células osteoprogenitoras, preosteoblastos y osteoblastos. El análisis digital de las microfotografías de las inmunodetecciones estableció que BMP-2, WNT y Runx2 tuvieron participación significativa (p<0,05) entre los 15 y 21 días; OPN y OC también tuvieron especial intervención a los 15 y 21 días y luego a los 150 días. La MOD posee capacidad osteoinductiva pues posibilita la transdiferenciación del linaje celular óseo.

### Summary

Demineralized bone matrix (DBM) is used to repair bone loss due to its osteoinductive property. The osteoinduction responds to the constitutive protein of bone matrix, the bone morphongenetic protein-2 (BMP-2). The aim of the present experience consisted in establishing the cellular events/occurrences that lead to the repair of the defects by means of immunodetection of the proteins (BMP-2), wingless int (WNT), Runx2, osteopontin (OPN) and osteocalcin (OC). For the present experience, DBM is processed by means of a modified and standardized protocol. The product is characterized by optic and electronic microscopy and intramuscular implant. A bone defect was caused in one of the radius of the 35 rabbits used in the experience. In 30 animals, the treatment group (TG), the defects were filled with DBM, while the other five rabbits, the control group (CG), did not receive treatment. Both groups were evaluated radiologically at 7, 15, 21, 30, 60 and 150 days, and in the same period, the animals of the TG were killed to perform histological studies with routine techniques and immunodetection of BMP-2, WNT, Runx2, OPN and OC. The histological slides were photographed and analysed with a software to establish the optic density (OD) and the integrated optic density (IOD) of each protein and to establish the degree of participation of each of them in the cellular proliferation and differentiation that concluded in the repair of the defects. The results of the OD and the IOD were analysed with ANOVA and Fisher LSD Test. The DBM particles had a quadrangular form, measured 532,42 µm and kept the histological architectures of the bone cortexes. The radiological evaluation showed complete repair between 30 and 60 days post-treatment of the CG. Histologically, it was established that the repair was realized by the osteoconduction through transcondral ossification. The BMP-2 protein stimulated the differentiation of the mesenchimatic cells (MC) that gathered, while it influenced in the expression of WNT. They both interacted to allow the manifestation of Runx2, which made possible the proliferation and differentiation of the CM into chondrocytes and transdifferentiation into osteoprogenitor cells, preosteoblasts and osteoblasts. The digital analysis of the microphotographs of the immunodetections established that BMP-2, WNT and Runx2 had significant participation (p < 0.05) between days 15 and 21; OPN and OC also had a special intervention between days 15 and 21 and after day 150. The DBM has osteoinductive capacity as it makes the transdifferentiation of the bone cellular lineage possible.

# INDICE

Índice de tablas	ix
Índice de figuras	ix
Resumen en español e inglés	v
,	
1. INTRODUCCION	1
1.1 Injertos óseos y sustitutos óseos	2
1.2. Tejido óseo	4
1.2.1 Histología e histogénesis del hueso	6
1.2.1.1. Osteoblastos	8
1.2.1.2. Células de revestimiento	8
1.2.1.3. Osteocitos	10
1.2.1.4. Osteoclastos	11
1.2.2. Matriz ósea	12
1.2.3. Fase inorgánica o mineral	13
1.2.3.2. Matriz orgánica	15
1.2.3.2.1 Colágeno	15
1.2.3.2.2. Proteínas no colágenas	15
1.3. Matriz ósea desmineralizada (MOD)	16
1.4. Diferenciación celular del tejido óseo	18
1.4.1 Proteína morfogénica ósea (BMP)	10
1.4.2 Wingless int (WNT)	23
1.4.2. Wingless int (Wivi) 1.4.2. Punt related transcriptional factor 2 (Puny2)	25
1.4.4. Ostopporting (ODN)	20
1.4.4. Osteopontina (OPN)	27
1.4.5. Osteocalcina (OC)	29
2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	32
2.1. Hipótesis	33
2.2. Objetivo general	33
2.3. Objetivos específicos	33
	2.4
3. METODOLOGIA	34
3.1. Obtención, procesamiento y almacenamiento de matriz ósea	35
desmineralizada	
3.2. Caracterización de la matriz ósea desmineralizada (MOD)	35
3.2.1. Determinación de fracción lipídica	36
3.2.2. Caracterización microscopía óptica, microscopía de alta	37
resolución (MOAR) y electrónica de transmisión	
3.2.2.1. Microscopía óptica (MO)	37
3.2.2.2. Microscopía de alta resolución (MOAR)	37
3.2.2.3. Microscopía electrónica de transmisión (SEM)	38
3.2.3. Determinación de las propiedades biológicas de la MOD	38
3.3. Implantes de MOD en defectos óseos ortopédicos	39
3.3.1. Inmunodetección de BMP-2, WNT, Runx2, OPN y OC	40
3.3.2. Análisis de densitometría óptica (DO) y densitometría óptica	42
integrada (DOI)	
3.4. Evaluación radiológica	43
3.5. Análisis estadístico	43

vii

4: RESULTADOS Y DISCUSIÓN	44
4.1. Caracterización de MOD	45
4.1.1. Residuos lipídicos	45
4.1.2. Caracterización microscópica	45
4.1.2.1. Microscopía óptica y microscopía de alta resolución (MOAR)	45
4.1.2.2. Microscopía electrónica de barrido (SEM)	45
4.1.3. Propiedades biológicas de la MOD	47
4.2. Modelo animal	48
4.3. Análisis radiológico	48
4.4. Análisis histológico	51
4.4.1. Análisis histológico realizado con tinción de Hematoxilina y Eosina	51
4.4.2. Análisis con técnicas de inmunohistoquímica para BMP-2, WNT, Runx2, OPN y OC	59
4.5. Densidad óptica (DO) y densidad óptica integrada (DOI)	91
4.6. Resultados estadísticos	97
4.7. Discusión	101
5. CONCLUSIONES	109

# **REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla		Página
1	Longitud del radio y dimensiones de los defectos óseos de tamaño critico (longitud y área de superficie)	49
2	Densidades Ópticas (DO) y Densidades Ópticas Integradas (DOI) de BMP, Runx2, WNT, OPN y OC en cada período estudiado	60
3	Resultado de las comparaciones de las medias del test LSD de Fisher para las densidades ópticas (DO) de BMP	97
4	Resultado de las comparaciones de las medias del test LSD de Fisher para las densidades ópticas integradas (DOI) de BMP	97
5	Resultado de las comparaciones de las medias del test LSD de Fisher para las densidades ópticas (DO) de WNT	99
6	Resultado de las comparaciones de las medias del test LSD de Fisher para las densidades ópticas integradas (DOI) de WNT	99
7	Resultado de las comparaciones de las medias del test LSD de Fisher para las densidades ópticas (DO) de Runx?	99
8	Resultado de las comparaciones de las medias del test LSD de Fisher para las densidades ópticas integradas (DOI) de Runx2	100
9	Resultado de las comparaciones de las medias del test LSD de Fisher para la densidad óptica (DO) de OPN	100
10	Resultado de las comparaciones de las medias del test LSD de Fisher Para la densidad óptica integrada (DOI) de OPN	100
11	Resultado de las comparaciones de las medias del test LSD de Fisher para la densidad óptica (DO) de OC	102
12	Resultado de las comparaciones de las medias del test LSD de Fisher para la densidad óptica integrada (DOI) de OC	102

# ÍNDICE DE EICUDAS

	INDICE DE FIGURAS	
Figura		Página
1	Representación esquemática de una cadena de colágeno Tipo I. El colágeno se encuentra formado por un trímero de dos cadenas $\alpha$ 1 y una de $\alpha$ 2. El trímero posee una longitud de 300 nm y en sus extremos poseen una terminación N- terminal y un grupo carboxilo terminal.	C
	Adaptado de Forlino y Marini (2016).	6
2	Anatomía histológica del hueso en donde se aprecian los elementos que	
	las constituyen y la relación entre ellos. Adaptado de Saladin (2007).	7
3	Osteoblastos (Ob) exhibiendo abundante citoplasma rugoso. Se hallan adyacentes al hueso (B). Entre los osteoblastos y la superficie ósea se aprecia el osteoide (Otd). La barra de escala representa 2.7 $\mu$ m. (Silva <i>et</i>	

*al.*, 2015) Células de revestimiento (BLC) adyacente al osteoide (Otd) ubicado en 4 la superficie del hueso (B). presenta escaso citoplasma y núcleo (N)

ix

9

prominente. Las células emiten finas proyecciones citoplasmáticas (flechas) hacia el Otd. Barra de escala: 2  $\mu$ m (Silva *et al.*, 2015).

- 5 Microscopía electrónica mostrando un osteocito (Ot) ocupando una laguna (La) en el interior de la matriz ósea. Se puede apreciar el núcleo (N) y al menos dos procesos citoplasmáticos ocupando cada uno un canalículo (Ca). Barra de escala 2 mµ. (Silva *et al.*, 2015)
- 6 Osteoclasto (OC) multinucleado (N) muestra ribete en cepillo (RB) adyacente al sitio a la superficie de excavación (flechas). Varias vacuolas (V) se observan en citoplasma próximo al ribete en cepillo. Barra de escala: 4mμ. (Silva *et al.*, 2015)
- 7 Vista tridimensional de BMP-2 nativa. Presenta un dímero representado en colores azul y naranja. En verde se encuentran los puentes de disulfuro. (Scheufler *et al.*, 1999)
- 8 Representación esquemática de la señalización osteogénica de BMP-2, que induce la proliferación y diferenciación de las células mesenquimáticas en condrocitos, células osteoprogenitoras, preosteoblastos, osteoblastos inmaduros, osteoblastos maduros y finalmente en osteocitos. Modificado de Gaurav *et al.* (2011).
- 9 Vía canónica de WNT. En ausencia de unión de los ligandos WNT a su receptor (izquierda), la β-catenina se degrada y los genes no se transcriben. Sin embargo, cuando se activa la vía (derecha) disminuye la degradación de la β-catenina, con lo que se acumula en el citoplasma, desde donde puede ingresar en el núcleo y activar los factores de transcripción. APC: proteína de la poliposis adenomatosa del colon; β-cat: β-catenina; cK: caseína-quiinasa; Dsh: dishevelled; GSK3: glucógeno sintetasa quinasa 3; sFRP: proteína soluble similar a frizzled; SOST: esclerostina. En: Velasco y Riancho (2008)
- 10 Rol de la vía canónica de WNT en la diferenciación osteoblástica desde las células mesenquimáticas (CM) mientras que inhibe la diferenciación en condrocitos y adipocitos. WNT aumenta la proliferación de los osteoblastos y mineralización, mientras que bloquea la apoptosis de los osteoblastos, la diferenciación y activación de los osteoclastos por aumento de los gradientes de OPG/RANKL Esclerotin, que es un inhibidor de la vía canónica expresada por los osteocitos, que suprimen la proliferación y función de los osteoblastos. En: (Kubota *et al.*, 2009)
- 11 Modelo de activación de la integrina  $\alpha\nu\beta3$  del osteoclasto (OC) para la migración y adhesión a la matriz. (A) La integrina  $\alpha\nu\beta3$  se encuentra en estado basal (||). Cuando el osteoclasto requiere trasladarse y adherirse a la MEC, requiere que la integrina  $\alpha\nu\beta3$  ubicada en las extensiones de membrana se active (A) y acople al grupo RGD de OPN. (B) La unión con el factor de crecimiento (FC) cambia el cominio externo de  $\alpha\nu\beta3$  de estado basal a activo. El FC a través del receptor tirosin quinasa (RQT) y la integrina inducen los reacomodamientos del citoesqueleo para el desplazamiento del osteoclasto a través del grupo proteico Rho unido a GDP que se activa fosforilizándose (GTP). Modificado de Faccio *et al.*, (2003).
- 12 Procesamiento de hueso para obtener matriz ósea desmineralizada. A) Huesos largos obtenidos de los conejos despojados parcialmente de los

10

13

20

22

24

26

30

36

х

tejidos blandos; B) los mismos huesos a los que les fueron extraídas las epífisis, aún conservan la médula ósea; C) cortezas óseas diafisiarias fragmentadas, lavadas y despojadas de tejidos blandos y restos de médula ósea; D) fragmentación de las diáfisis hasta obtener partículas de MOD de tamaño deseado, a la izquierda molienda gruesa del hueso, a la derecha molienda fina; E) las partículas de MOD suspendidas en HCl 0,5 N sobre un agitador magnético; F) aspecto de las partículas de matriz ósea luego de la desmineralización.

- 13 Procedimiento quirúrgico de creación del defecto óseo ortopédico. A) Abordaje quirúrgico de la cara dorsal del antebrazo con exposición del tercio medio de la diáfisis radial. B) Defecto óseo ortopédico experimental de tamaño crítico en el radio creado por doble osteotomía. C) Defecto tratado mediante relleno con MOD
- 14 Microscopía óptica y microscopía de alta resolución de las partículas de MOD. A) Partículas de MOD observadas en microscopio óptico. A) Partícula de MOD al microscopio óptico con fondo claro a 100X y cuyas dimensiones fueron 570 µm x 426 µm. B) Partícula de MOD teñida con hematoxilina y eosina en donde se apreció tinción basófila e identificó a las osteonas conteniendo cada una de ellas un canal osteónico (flechas) (HE) 400X; C) MOAR correspondiente a una partícula de matriz desmineralizada teñida con azul de tolouidina magnificación 400X.
- 15 Microscopía electrónica de barrido (SEM) de las partículas obtenidas por los dos tipos molino empleados; A) partícula producto de la molienda a 5.000 r.p.m. observada a 400X, 300x y 1000x; B) partículas de MOD procesadas con molino a 20.000 r.p.m. SEM 300X
- 16 Imagen SEM de una partícula de MOD. A) se observan los bordes netos de la partícula; B) partícula de MOD magnificación de 100X (recuadro superior izquierdo) y detalles de una osteona (flechas) observado a 700X.
- 17 Radiografía de un muslo de un conejo empleado para determinar propiedades biológicas de la MOD. Imagen de la presencia de hueso (izq), el hueso nuevo señalado por el círculo.
- 18 Conejo perteneciente al grupo tratamiento luego de 21 días de intervenido. El animal se encuentra haciendo uso funcional del miembro derecho.
- 19 Radiografía control de conejo del Gc. El defecto no se encuentra reparado y los extremos de las osteotomías se observan aguzadas con signos de atrofía
- 20 Evolución radiológica del radio en un conejo tratado con MOD; a los 15 días (A), 21 días (B), 30 días (C) y 150 días (D).
- 21 Corte histológico efectuado a los siete días post-operatorio. Se observan a las partículas de MOD rodeadas por células mesenquimáticas (CM) haciendo contacto con éstas. HE 200X.
- 22 Corte histológico realizado a los 15 días post-operatorios. A) Se observa la presencia de partículas de MOD rodeadas por células mesenquimáticas (CM), cartílago (C) y un área de osificación (Os). HE 100X; B) sobre las partículas se observaron osteoclastos (flecha) en

41

46

47

47

48

49

50

51

proceso de resorción/remodelación. HE 400X.

- A) Condensación de matriz acidófila (MA) conteniendo células de citoplasma redondo y oval. En la superficie de la condensación se depositan osteoblastos (OB) y osteoclastos (OC). También coexisten sectores de matriz acidófila laxo (MAL). HE 200X; B); En este período se observaron trabéculas (T) sobre las que se asentaban osteoblastos (OB) y osteoclastos (OC). Entre las trabéculas se hallan células mesenquimáticas (CM) en relación directa con pre osteoblastos y osteoblastos (OB). HE 200X.
- 24 Área de osificación a los 15 días. A la izquierda de la microfotografía se aprecia la presencia de tejido óseo y a la derecha el tejido cartilaginoso. Las flechas señalan condroplastos de la matriz cartilaginosa mineralizada conteniendo dos células. HE 400X.
- 25 Histopatología de sector de defecto ortopédico tratado con MOD a los 21 días post-operatorios. Hay una combinación de espículas óseas nuevas (E) y tejido condral (TC). Las espículas contienen osteocitos (estrellass) en su matriz y osteoblastos (flechas) en sus superficies. Junto a grupos de osteoblastos de aprecian osteoclastos (Oc). HE 200X
- Figura N°26. Histología a los 30 días post-operatorios. Trabéculas óseas (T) cubiertas por osteoblastos (Flechas). HE 200X.
- 27 Figura N°27. Histología a los 30 días post-operatorios. Tejido cartilaginoso a partir del cual se está llevando a cabo el proceso de osificación HE 200X.
- Figura N°28. Corte histopatológico mostrando variedad de tipos de celulares y de tejido. Por una parte, se aprecian espículas (E) de hueso nuevo que contienen osteocitos y osteoblastos (Ob) acompañados de la presencia de osteoclastos (Oc). En los espacios formados por las espículas se presentan células osteoprogenitoras y pre osteoblastos. A la derecha de la fotografía se encuentra el tejido cartilaginoso (C) con condrocitos hipertróficos (Ch) formando grupos isogénicos axiales. Entre ambos tipos de tejido hay cartílago osificándose (Os) donde se observan condroplastos (Cp) vacíos. HE 400X.
- 29 Hueso nuevo producto de la reparación de un defecto óseo ortopédico tratado con MOD. En él se observa la presencia de trabéculas (T) óseas maduras conteniendo vasos sanguíneos (Vs) y osteocitos (\*). En la superficie interna de algunas de las trabéculas se observan osteoblastos (Ob). HE 100X.
- 30 Hueso denso laminar (Hd) producto de la reparación de defecto óseo ortopédico inducido por implante de MOD luego de 150 días posttratamiento. La matriz contiene osteocitos (Oc) y entre las trabéculas existen espacios con células de médula ósea (M). HE 200X
- 31 Inmunomarcación de BMP a los 7 días. Se observan partículas de MOD en las que se aprecia un incremento de la intensidad de marcación en las lagunas que ocuparon los osteocitos. 200X
- 32 Inmunodetección de WNT en las partículas de MOD a los 7 días posttratamiento. 200X
- 33 Inmunodeterminación de Runx2 en células fenotípicamente mesenquimáticas (CM) en contacto y relación directa con partículas de

54

55

55

56

57

58

57

59

61

61

MOD. 400X.

- 34 Inmunomarcación de OPN en las partículas de MOD. 100X.
- 35 Inmunomarcación de OC en partículas de MOD a los siete días postoperatorio. 200X.
- 36 Inmunomarcación de BMP-2 a los 15 días post-tratamiento. A) Partícula de MOD rodeada por CM; B) Sector de hueso nuevo donde se observan espículas en cuya matriz se inmunodetectó BMP-2 (\*), al igual que en los osteocitos que la componen encuentra. Entre las espículas se observan pre osteoblastos (POb) y osteoblastos (Ob) señalando BMP-2.200X.
- Inmunomarcación de BMP-2. A) Sector correspondiente a condrogénesis iniciada en sector de células mesenquimáticas (CM) se observa cartílago conteniendo condrocitos (Co) y sector de osificación;
   B) Análisis digital de la fotografía en la cual se aprecia en rojo la expresión de BMP-2. 200X.
- 38 Inmunomarcación de BMP-2 en sitio de osificación (Os) en inmediaciones de cartílago (C). BMP-2 se halla señalada en color marrón en la matriz de las espículas óseas en formación (\*); en osteoblastos (Ob), osteoclastos (Oc). En la matriz se aprecia rodeando a los osteocitos y en éstos.
- 39 IHQ WNT de tejido de reparación de defectos óseos tratados con MOD. Las partículas de MOD se hallan rodeadas por células mesenquimáticas, del lado derecho el análisis digital de la misma imagen muestra en color rojo las células marcadas IHQ 200X.
- 40 Inmunodetección de WNT. A) de tejido de reparación de defectos óseos tratados con MOD. En la micro fotografía superior se la inmunomarcación de WNT en células mesenquimáticas (CM), cartílago (C); condrocitos hipertróficos (Ch) y sitio de osificación (Os). B) Análisis digital de la misma microfotografía en la que se muestra en rojo la presencia de WNT. 200X.
- 41 Inmunomarcación de WNT de en corte histológico de un sector de reparación conteniendo espículas neoformadas. En la fotografía superior, en el ángulo superior izquierdo se observan células mesenquimáticas (CM), espículas en centro de la imagen sobre las que se depositan osteoblastos (Ob); entre los espacios formados por las espículas las células osteoprogenitoras (\*) y los pre osteoblastos marcados en rojo como producto del análisis digital de la microfotografía. 200X.
- 42 Inmunodetección de Runx2 en células mesenquimáticas que rodean a las partículas de MOD. 100X
- 43 Inmunodetección de Runx2. A) Runx2 se encuentra en los preosteoblastos y condrocitos; B) Análisis digital de la microfotografía en A) donde Runx2 de se encuentra en color rojo. 200X.
- 44 Técnica IHQ de OPN de defecto óseo ortopédico tratado con MOD 15 días post-operatorio. OPN señalada en las partículas de MOD y en las células tipo mesenquimáticas. 100X.
- 45 Inmunomarcación de OPN de defecto óseo ortopédico tratado con MOD 15 días postoperatorio. A) Tejjdo de matriz denso (MAD) tejido

66

67

67

65

68

70

69

71

71

72

62

mesenquimático de matriz laxa (MAL) inmunomarcada por OPN igual que los osteoblastos (Ob) y osteoclastos (OC) 400X; B) OPN en las células de la matriz laxa (\*) y osteoclastos (OC). 400X.

- A) OPN inmunodetectada en las espículas óseas (Es) en la superficies y rodeando a los osteocitos (Oc), en osteoclastos (Ocl) y osteoblastos (Ob) IHQ OPN 400X; B) Análisis digital de la microfotografía en E) en negro se destacan los sitios inmunomarcados por OPN, IHQ OPN 400X.C) Microfotografía en la que se observan matriz densa (MAD), cartílago ©, zona de osificación (\*), el recuadro indica sitio de transición de matriz ósea y cartílago donde OPN se encuentra en la matriz densa y no en la matriz del cartílago (área enmarcada). 400X.
- Inmunomarcación de OC (OC>) en la superficie de las espículas óseas
   (E) nuevas, en los osteoblastos (Ob) y osteocitos (\*). También se halla en la matriz rodeando a estos últimos. 200X.
- 48 Inmunodetección de BMP-2 a los 21 días post-implante de MOD. A) fotografía incluye un sector de células mesenquimáticas (CM) pluripotentes, cartílago (C) y sitio de osificación. La inmunomarcación se aprecia en las células CM pluripotentes, condrocitos (Co) y sector de osificación (Os). B) Análisis digital de la misma fotografía, en rojo se expresan la señalización de BMP. IHQ BMP 200X.; C) BMP se encuentra expresada en las CM vecinas al cartílago (C). 200X.
- 49 Inmunodetección de BMP-2. En la fotografía se observa un sector con espículas (E) óseas nuevas. BMP se encuentra señalando en células osteoprogenitoras (\*), osteoblastos (Ob) presentes en las superficies espiculares y osteocitos (Oc). 200X.
- 50 Inmunodetección de WNT a los 21 días. A) En sector de espículas óseas nuevas. WNT inmunoseñala en las CM, tejido cartilaginoso (C), condrocitos (Co), condrocitos hipertróficos próximos a los sitios de osificación (Os), preosteoblastos (POb) que se encontraban entre las trabéculas (E), y en osteocitos (Oc) trabeculares. B) Análisis digital de la misma microfotografía, en negro se destaca la presencia de WNT. 200X
- A) Inmunomarcación de Runx2 Corte histológico de sección que incluye sector de células mesenquimáticas (CM), sitio de condrogénesis (CG) y cartílago (C) al que se practicó IHQ para inmunodetectar Runx2. 200X. B) Análisis digital de la misma imagen, en color rojo se aprecia la inmunomarcación de Runx2. 200X.
- 52 Inmunomarcación de Runx2 A) Sitio de osificación y tejido cartilaginoso. Runx2 se inmunodetectó en el sector correspondiente a las directrices y espículas óseas, en los pre osteoblastos y osteoblastos. En el cartílago, algunos condrocitos marcaron Runx2; B) Análisis digital de la fotografía A), en negro se señala la inmunoexpresión de Runx2. 200X.
- 53 Inmundetección de OPN a los 21 post-tratamiento. A) La imagen incluye cartílago (C) tejido mesenquimático donde las células mesenquimáticas (CM) se encuentran marcadas, un área de osificación (Os) donde se identifican células fenotípicamente semejantes a condrocitos hipertróficos señalando OPN (<); en el área de osificación</p>

73

72

74

74

77

76

78

79

xiv

había osteoblastos (Ob) marcados por OPN al igual que en la matriz extracelular ósea (\*) de las espículas (E). 200X; B) espículas óseas (E) con presencia heterogénea de OPN que poseen osteocitos (Oc) en sus matrices igualmente señaladas conteniendo, sobre sus superficies se hallan osteoblastos (Ob) y osteoclastos (OC) marcando OPN al igual que los pre osteoblastos que ocupan los espacios inter espiculares. 400X.

- 54 Inmunodetección de OC. La proteína se encuentra inmunomarcada de forma heterogénea (\*) en la matriz de las espículas óseas rodeando a los osteocitos (Oc), preosteoblastos (POb), osteoblasto (Ob). 400X.
- A) Inmunomarcación de BMP-2 en los preosteoblastos, osteoblastos y osteocitos, 400X. B) análisis digital de la fotografía A donde se destaca en rojo los sitios inmunomarcados por BMP-2. 400X
- 56 Inmunomarcación de WNT. A) Inmunolocalización de WNT en los osteoblastos presentes en la superficie de las trabéculas y en los preosteoblastos que se encuentran en los espacios intertrabeculares; B) análisis digital de la microfotografía A, en rojo se destaca WNT. 200X.
- 57 Inmunomarcación de Runx2. A) Runx2 se encuentra en los preosteoblastos (POb) y osteoblastos (Ob); B) análisis digital de la fotografía (A) donde se aprecia en rojo la marcación de Runx2. 200X.
- 58 Inmunomarcación de OPN a los 30 días post-tratamiento de defectos ortopédicos con MOD. A) cartílago franqueado a la izquierda por células mesenquimáticas (CM) y a la derecha y arriba por cartílago (C) en proceso de osificación (Os). 200X. B) osificación del tejido cartilaginoso, los condrocitos más alejados comienzan manifestando OPN en sus citoplasmas (>), más tarde señala en los bordes de los condroplastos (←)algunos condroplastos contiene dos células en su interior (
  ). Los condroplastos y células internas marcadas por OPN () se fusionan entre ellas (>) creando espacios donde se depositan osteoblastos (Ob) 400X.
- 59 Inmunodeterminación de OC en sector de osificación (Os). OC se inmunodetecta en grupos celulares (Gcel) contenidos en condroplastos donde la proteína se deposita en los bordes. En las espículas (E) la matriz posee OC se deposita homogeamente (\*). Los osteoblastos (Ob) y osteocitos (Oc) señalan tambén a la proteína. 200X
- 60 Inmunomarcación de BMP-2 a los 60 días post-tratamiento. En la microfotografía se observa hueso nuevo denso o cortical señalando BMP-2 en la matriz y con mayor intensidad en los canales y lagunas osteónicas. 100X.
- 61 Inmunomarcación de WNT en las trabéculas (T) óseas, osteocitos (Oc) y células de la médula ósea a los 60 días post-operatorio. 100X.
- 62 Inmunodetección de Runx2 efectuada a los 60 días post-operatorio en hueso cortical producto de la reparación de defecto ortopédico.100X.
- 63 Inmunomarcación de OPN a los 60 días post-operatorio. OPN see encuentra distribuida homogéneamente en la matriz ósea (\*) y en mayor intensidad en los osteocitos (Oc). 200X.
- 64 Inmunodetección de OC a los 60 días post-tratamiento. La misma se encuentra distribuida homogéneamente en la MEC (\*), en osteoblastos

80

80

81

82

83

85

84

86

86

87

(Ob) y osteocitos (Oc). 200X.

	(00) y osteoetios $(0e)$ . 200X.	
65	Inmunomarcación de BMP-2 en hueso denso laminar luego de 150 días post-tratamiento. BMP-2 se encuentra en la matriz y en mayor densidad	
	optica en los canales osteonicos (CnO) y en las lagunas que ocupan los osteocitos (*) 200X	88
66	Inmunomarcación para WNT luego de 150 días post-tratamiento. WNT	00
	se encuentra en ciertos osteocitos y células de la médula ósea. 200X.	89
67	Inmunomarcación de Runx2 en osteocitos (Oc) luego de 150 días post- tratamiento en hueso denso laminar (*). 200X.	89
68	Inmunomarcación de OPN a los 150 días post-tratamiento. La proteína	
	se encuentra distribuida en la en la matriz ósea (*) del hueso denso	
	(DOPN) y en los oluego de 150 días post-tratamiento. OPN conforma	
	depósitos en concordancia con las lamelas de las osteonas (DOPN.	
	También se encuentra en los osteocitos (Oc). 200X.	90
69	Inmunodetección de OC en hueso denso laminar (*) y en osteocitos	
	(Oc) luego de 150 días post-tratamiento. 200X.	90
70	Representación gráfica de las medias de las DO de BMP en el período de estudio.	92
71	Representación gráfica de las medias de las DOI de BMP en el período de estudio.	92
72	Representación gráfica de las medias de las DO de WNT en el período de estudio	93
73	Figura N°71. Representación gráfica de las medias de las DOI de WNT	75
	en el período de estudio.	93
74	Representación gráfica de las medias de las DO de Runx2 en el período de estudio.	94
75	Representación gráfica de las medias de las DOI de Runx2 en el período de estudio.	94
76	Representación gráfica de las medias de las DO de OPN en el período	
	de estudio.	95
77	Representación gráfica de las medias de las DOI de OPN en el período de estudio.	95
78	Representación gráfica de las medias de las DO de OC en el período de	0.5
70	estudio. Representación cráfico de los modios de los DOI de OC en el república de los	96
19	estudio.	96

### **ABREVIATURAS**

Arg-Gli-Asp: RGD Bone morphogenetic protein: BMP Células madres mesenquimáticas: CMM Células mesenquimáticas: CM Condro osteoprogenitores: CO Cromatografía gaseosa con detector de masa: GC-MC Factor de necrosis tumoral alfa: FNT-a Fosfatasa alcalina: FA Hidroxiapatita: HA Matriz extracelular: MEC Matriz ósea desmineralizada: MOD Micrometro: µm Mililitro: mL Nanómetro: nm Osteocalcina: OC Osteopontina: OPN Osteoprotegerina: OPG Osterix: OSX Proteínas no colágenas: PNC Runt related transcriptional factor 2: Runx2 Sialoproteína: BSP Small Integrin-Binding Ligand N-linked Glycoproteins: SIBLING Transforming growth factors  $-\beta$ : TGF $-\beta$ Vesículas extracelulares de la matriz: VEM Wingless-int: WNT

# CAPÍTULO 1 INTRODUCCIÓN

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 (Egermann *et al.*, 2006; Nandi *et al.*, 2010). El tratamiento de defectos óseos ortopédicos amplios constituye un desafío para los cirujanos ortopedistas. 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.

### 1.1 Injertos óseos y sustitutos óseos

Los injertos óseos, y en particular los autoinjertos, son el "estándar de oro" para el tratamiento de defectos ortopédicos amplios. Un injerto de hueso se define como un material implantado que promueve la curación ósea solo o en combinación con otro/s material/es (Elsalanty y Genecov, 2009), a través de la osteogénesis, osteoinducción, osteoconducción (Albrektsson y Johansson, 2001).

El término osteoconducción implica el crecimiento de hueso sobre un injerto óseo. El crecimiento puede realizarse sobre la superficie o hacia el interior a través de poros y canales pre existentes (Albrektsson y Johansson, 2001). En tanto que osteoinducción implica que las células mesenquimáticas (CM) indiferenciadas pluripotentes provenientes de los tejidos circundantes, de alguna forma son estimuladas para desarrollar el linaje de células formadoras de hueso (Albrektsson y Johansson, 2001). Un sinónimo de osteoinducción, es el proceso por el cual se induce la osteogénesis (Wilson-Hench, 1987).

Los autoinjertos óseos son la opción terapéutica que prevalece para la reconstrucción de defectos óseos pequeños. Tienen características osteogénicas relevantes para la consolidación, modelado y remodelación (Athanasiou *et al.*, 2010). Entre las desventajas de los autoinjertos se hallan el dolor y morbilidad del sitio donante (Pollock *et al.*, 2001) sumado a complicaciones en proceso de obtención (Ehrler y Vaccaro, 2000).

Los aloinjertos y xenoinjertos han sido indicados para superar los riesgos asociados a los autoinjertos, aunque su uso es complicado por poseer menor propiedad relativa de incorporarse al huésped (Ehrler y Vaccaro, 2000). La inmunogenicidad y consiguiente

rechazo, el secuestro del injerto, las infecciones y el riesgo potencial de transmisión de enfermedades son algunas de las desventajas (Shafiei *et al.*, 2009; Parizi *et al.*, 2012). Los xenoinjertos, además conllevan los riesgos de transmisión de enfermedades zoonóticas, y el rechazo del injerto es más probable y agresivo (Oryan *et al.*, 2013). Para evitar las complicaciones mencionadas existe interés creciente de los investigadores en hallar nuevos materiales con capacidad osteoconductiva que sirvan de transporte de proteínas y citoquinas con fines de sustituir los injertos óseos (Nandi *et al.*, 2010).

Un sustituto de hueso debe ser biocompatible, reabsorbible, de fácil manejo, con propiedades físicas y químicas similares a la de hueso esponjoso, libre de agentes patológicos y costo adecuado (LeGeros, 2002). Adicionalmente, el material debe actuar como una barrera mecánica para el crecimiento de tejido fibroso o la interposición de músculo en el defecto óseo (Wang *et al.*, 1988).

Los materiales empleados en calidad de injerto óseo o sustitutos óseos se dividen en varias categorías que incluyen a los de base sintética como el fosfato de calcio o hidroxiapatita (HA); y naturales como auto-, alo- y xenoinjertos, componentes minerales del hueso, colágeno, hueso desmineralizado (Dimitriou *et al.*, 2011) y productos de la bioingeniería que combina biomateriales con osteoblastos o células de la médula ósea (Li y Li, 2005; Xu *et al.*, 2009). Cada opción posee ventajas y desventajas. Los alo- y xenoinjertos tienen características osteoinductivas y osteoconductivas pero carecen de las propiedades osteogénicas que poseen los autoinjertos (Brydone *et al.*, 2010; Dimitriou *et al.*, 2011).

El componente mineral del hueso alogénico puede removerse mediante la acción de soluciones ácidas para obtener matriz ósea desmineralizada, con propiedades osteoinductoras y osteoconductoras (Zimmermann y Moghaddam, 2011). La propiedad osteoinductiva le es atribuida a la presencia de factores crecimiento presentes en la matriz extracelular (Parikh, 2002).

El proceso de desmineralización al que es sometida la matriz ósea expone los factores de crecimiento que contiene, incrementando así las propiedades osteoinductoras (Kao y Scott, 2007). No obstante, y debido a que no posee resistencia estructural su uso primario se limita a ser empleada a un entorno estructuralmente estable (Mahendra y Maclean 2007) y en sitios que no deben resistir presiones por efecto del peso corporal y actividad física (Hoffer *et al.*, 2008)

En medicina veterinaria la matriz ósea desmineralizada (MOD) demostró beneficios en la reparación temprana de fracturas (Servin-Trujillo *et al.*, 2011), fracturas conminutas, osteotomías niveladoras del *plateau* tibial, artrodesis y correcciones de osteotomías en caninos (Dahners y Jacobs, 1985; Shih *et al.*, 2005; Hoffer *et al.*, 2008; Bigham-Sadegh *et al.*, 2013). También demostró ser útil para reparar defectos costales en caninos (Tang *et al.*, 2009) y equinos (Kawcak *et al.*, 2000). La MOD también fue utilizada con resultados beneficiosos en la curación de defecto óseos combinada con otros biomateriales (Lindsey *et al.*, 2006), con médula ósea (Shih *et al.*, 2005), vehiculizada de forma inyectable en grandes defectos óseos (Turner *et al.*, 2003) y para resolver no uniones mediante inyección percutánea (Tiedeman, *et al.*, 1991).

### 1.2. Tejido óseo

El hueso es un tejido altamente especializado que en estrecha relación con los ligamentos, músculos y tendones posibilita la locomoción; protege órganos vitales como a la médula ósea, el cerebro, la médula espinal, el corazón y los pulmones; y tiene una función metabólica que actúa como un reservorio de iones, en especial calcio y fosfato en el mantenimiento de la homeostasis del medio interno (Zoch *et al.*, 2016).

Durante la embriogénesis, el tejido conectivo, cartílago y hueso se diferencian a partir del mesodermo difuso conocido como mesénquima. El mesénquima surge principalmente de la línea primitiva y en segundo lugar de los segmentos del mesodermo y las capas somáticas y esplácnicas laterales del mesodermo. El tejido óseo se forma durante el desarrollo fetal por dos mecanismos de osificación: intramembranosa y endocondral.

La osificación intramembranosa se lleva a cabo cuando las CM se agrupan, diferencian en osteoblastos y luego en osteocitos a medida que comienzan a secretar y rodearse de matriz extracelular mineralizada u osteoide, formando hueso. En la osificación endocondral, las CM también condensan y proliferan, pero en lugar de diferenciarse en osteoblastos, los hacen en condroblastos y secretan matriz extracelular formando un modelo cartilaginoso de un hueso. Los vasos sanguíneos se infiltran en esta matriz, los condrocitos mueren por apoptosis para ser sustituidos por osteoblastos que inmediatamente comienzan a secretar la matriz ósea hasta que finalmente se produce la sustitución total del cartílago. Este desarrollo continúa incluso en los mamíferos adolescentes, como el crecimiento longitudinal que sucede en las placas epifisarias o de crecimiento endocondral. La mayoría

de los huesos se forman a través de la formación endocondral, con la excepción de los huesos planos del cráneo y diáfisis de los huesos largos (Dietz y Morcuende, 2006).

Los componentes macromoleculares de la matriz ósea son de tres tipos. El primer grupo posee propiedades estructurales, incluye al colágeno, ácido hialurónico, decorina y biglicano; el segundo grupo se caracteriza por una estructura de dominio modular e incluye a versicano, trombospondina, fibronectina, osteonectina, y tenascina; y, el tercer grupo, no posee motivos estructurales claros e incluye a la sialoproteína (SPB, por su sigla en inglés), osteopontina (OPN), y osteocalcina (OC) (Robey, 1996). La complejidad de las interacciones entre estos diversos componentes de la matriz y las células óseas, hacen del hueso una estructura estable y dinámica. El colágeno que compone a la matriz extracelular es de Tipo I, y representa hasta un 90% de la materia orgánica. El colágeno Tipo I se compone de trímeros de dos cadenas  $\alpha 1$  y  $\alpha 2$ , que forman moléculas de triple hélice. El colágeno de cadenas  $\alpha$  se produce como procolágeno que posee extensiones amino (N-) y carboxilo (C-) terminales (Figura Nº1). La remoción enzimática de las terminaciones N- y C- no colágenas precede a la formación de fibrillas colágenas. El colágeno de Tipo III también se encuentra en la matriz ósea aunque su rol en el metabolismo óseo es poco claro. La rigidez de tejido óseo se sustenta en la mineralización de la matriz ósea con cristales de fosfato tricálcico (Ca<sub>10</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>6</sub>(OH)<sub>2</sub>) o hidroxiapatita (HA).

Posee dos linajes principales de células, los osteoblastos y los osteoclastos (Urist *et al.*, 1983; Vaananen *et al.*, 2000). Los osteoblastos y osteoclastos son responsables de la dinámica del hueso durante el crecimiento y en la vida adulta. Los osteoblastos son las células de revestimiento de las trabéculas y son responsables de la producción de la matriz ósea. Los osteoclastos son células multinucleadas que revisten a las trabéculas y son responsables de la resorción ósea. Durante la formación de hueso los osteoblastos pueden quedar incluidos en la matriz ósea como osteocitos (Franz-Odendaal *et al.*, 2006), mantenerse como osteoblastos inactivos, como células de revestimiento o morir por apoptosis (Manolagas, 2000).



### 1.2.1 Histología e histogénesis del hueso

Marini (2016).

Básicamente hay dos tipos de hueso, el hueso esponjoso y el hueso compacto. El hueso esponjoso se compone de muchas trabéculas que separan numerosas cavidades intercomunicadas rellenas de médula ósea o de tejido graso. Sin embargo, ambos tipos de hueso poseen el mismo tipo de estructura histológica. En los huesos largos, el hueso compacto se encuentra principalmente en la diáfisis, mientras que el hueso esponjoso se halla en las zonas metafisarias y la epífisis, rodeado de una fina capa de hueso (Willenegger, 1971). Los huesos planos del cráneo, escápula y pelvis usualmente poseen un núcleo de hueso esponjoso flanqueado por dos láminas de hueso compacto. Histológicamente hay dos variedades de tejido óseo: óseo primario o inmaduro; y secundario o maduro, o laminar. La diferencia entre los dos se basa en que los haces de colágeno, en el primero, se ubican al azar y en la segunda variedad lo hace en laminillas.

El tejido óseo primario es el primer tejido óseo formado durante la formación de hueso. Es temporal y se sustituye fácilmente por el tejido óseo secundario en la mayoría de los sitios del esqueleto. Además de la deposición irregular de los haces de colágeno, el hueso primario se caracteriza por una menor cantidad de mineralización y una gran cantidad de osteocitos en comparación con el óseo secundario.

El hueso secundario es la variedad encontrada en el esqueleto maduro. Las láminas de hueso que lo caracterizan están dispuestas en paralelo entre sí o rodean concéntricamente un canal central que contiene vasos sanguíneos y nervios. Este complejo de laminillas concéntricas se denomina sistema de Havers u osteon y es la unidad estructural del hueso (Figura N°2). En ocasiones, dentro de las láminas se encuentran lagunas que contienen

osteocitos. Los osteocitos emiten extensiones o procesos celulares que posibilitan el contacto con otros osteocitos y osteoblastos. Los osteocitos son aún capaces de producir matriz. Las osteonas se comunican entre sí, con el endostio, la cavidad medular y el periostio mediante los canales transversales y oblicuos de Volkman o canales perforantes que atraviesan las laminillas de las osteonas. Durante el crecimiento y aún en el esqueleto del animal adulto la remodelación de la osteona es continua y está directamente relacionada con el montaje tridimensional de las fibrillas de colágeno que influyen en la deposición de la fase mineral y las propiedades mecánicas del tejido (Guille Giraud *et al.,* 2003). Esto explica la gran variabilidad del tamaño y forma de las osteonas.

Las osteonas se hallan dispuestas en paralelo al eje longitudinal del hueso. Cada osteona está formada por capas coaxiales de fibrillas de colágeno que se disponen helicoidalmente alrededor de un canal central (Figura N°2).



La bibliografía describe tres tipos de osteonas en base a su aspecto en el microscopio de luz polarizada (Ascenzi y Bonucci, 1968). Las osteonas tipo brillantes, osteonas oscuras y osteonas alternas. Las brillantes se aprecian completamente iluminadas, las oscuras no se observan iluminadas y las alternas, que alternan láminas brillantes con oscuras. Las variaciones lumínicas responden a la disposición de las fibras colágenas en las secciones descalcificadas (Frank *et al.*, 1955).

### 1.2.1.1. Osteoblastos

Los osteoblastos son células grandes (20-30 µm) de forma poliédrica, con citoplasma basófilo, un retículo endoplásmico rugoso y aparato de Golgi sustancial (Figura Nº 3). Se originan en las células madre mesenquimales (CMM) de la médula ósea, endostio, periostio y pericitos perivasculares (Canfield *et al.*, 2000).

Son responsables de sintetizar a la MEC u osteoide a una velocidad de 2 a 3 mm por día y expresan a la fosfatasa alcalina (FA) que permite la mineralización a una velocidad de 1,2 mm por día. Dirigen la disposición de las fibrillas de la matriz extracelular, contribuyen a la mineralización del osteoide a través de la fosfatasa alcalina, sintetizan factores de crecimiento y la resorción osteoclástica a través de la síntesis de citoquinas específicas (Simonet *et al.*, 1997).

Los osteoblastos y los osteocitos se comunican entre sí por proteínas transmembrana o integrinas, que actúan como un enlace entre células o entre una célula y la matriz extracelular, lo que permite el paso de mensajeros tales como calcio, citoquinas y prostaglandinas (Civitelli *et al.*, 1993).

El promedio de vida de los osteoblastos es de 1 a 10 semanas al final de los cuales pueden desaparecer través de la apoptosis. Aproximadamente un 15% se transforman en osteocitos (15%) y células de revestimiento (Aubin y Liu, 1996). Ambos tipos de células representan las etapas más avanzadas de la maduración. Las células de revestimiento son alargadas y planas, con núcleos en forma de huso, y con escasas organelas. Pueden expresar los marcadores osteoblásticos mencionados anteriormente, tales como sialoproteína ósea (BSP), osteopontina (OPN), osteonectina (ON) y fosfatasa alcalina (FA), así como receptor de la hormona paratiroidea (PTH). Siguen siendo lo largo de la superficie interna, formando con el endostio una capa protectora a la superficie ósea, que desempeña un papel importante en la activación de la remodelación ósea.

### 1.2.1.2. Células de revestimiento

Son células aplanadas que revisten las superficies óseas del interior de los huesos, donde tampoco se produce resorción ni formación de hueso (Miller *et al.*, 1989). Estas células, que en su mayoría corresponden a osteoblastos, son de citoplasma aplanado presentan organelas citoplasmáticas tales como aparato de Golgi y retículo endoplasmático rugoso

(Miller *et al.*, 1989). Suelen presentar procesos citoplasmáticos que se extienden hacia los canalículos y hendiduras, también se observan entre las células de revestimiento y entre éstas y los osteocitos (Miller *et al.*, 1989; Aarden *et al.*, 1994) (Figura N°4).





La actividad secretora de las células óseas de revestimiento depende del estado fisiológico del hueso, por lo que estas células pueden adquirir de nuevo su actividad, su tamaño y adquirir la apariencia cuboidal (Donahue *et al.*, 1995). Las funciones de estas células no se entienden completamente, pero se ha demostrado que previenen la interacción directa entre

de escala: 2 µm (Silva et al., 2015).

los osteoclastos y matriz ósea, cuando la resorción ósea no debe ocurrir, y también participan en la diferenciación de osteoclastos, la producción de la osteoprotegerina (OPG) y el activador del receptor del factor nuclear kappa-B ligando (RANKL) (Mosley, 2000; Andersen *et al.*, 2009). Por otra parte, las células de revestimiento del hueso junto con otras células óseas, son un componente importante de la BMU, una estructura anatómica que está presente durante el ciclo de remodelación ósea (Everts *et al.*, 2002).

### 1.2.1.3. Osteocitos

Los osteocitos son las células más abundantes en el hueso (10 veces respecto a los osteoblastos). Una vez que la matriz se mineraliza, algunos osteoblastos quedan atrapados dentro de ésta llegando a transformarse en osteocitos. Este proceso va acompañado de cambios morfológicos y ultraestructurales visibles, que incluyen la reducción del tamaño de los osteoblastos, disminución del número de organelas tales como aparato de Golgi, disminución de retículo endoplasmático rugoso, y la relación núcleo-citoplasma aumenta (Figura N°5). Como consecuencia le corresponden una disminución de la síntesis y secreción de proteínas (Schaffler *et al.*, 2014).



Figura N°5. Microscopía electrónica mostrando un osteocito (Ot) ocupando una laguna (La) en el interior de la matriz ósea. Se puede apreciar el núcleo (N) y al menos dos procesos citoplasmáticos ocupando cada uno un canalículo (Ca). Barra de escala 2 m $\mu$ . (Silva *et al.*, 2015)

Los osteoblastos, osteoclastos y células óseas de revestimiento se encuentran en la superficie del hueso, mientras que los osteocitos se encuentran en el interior. Son células estrelladas y se encuentran en el interior de lagunas, los procesos citoplasmáticos, o filipodios, se comunican entre sí a través de los canalículos del hueso (Bonewald, 1999). De esta manera los osteocitos, osteoblastos y células de revestimiento se organizan en un sincitio de células interconectadas que forma una única estructura, cuya función es la mecanotransducción (Rubin y Lanyon, 1987).

Los osteocitos transducen señales físicas provenientes de la flexión o estiramiento del hueso en actividad biológica. En respuesta a las fuerzas externas generan se genera un flujo de fluidos a través de los canalículos induciendo una variedad de respuestas hacia el interior de los osteocitos. Se cree que el flujo de calcio a través de los filopodios estimula la transmisión de información entre los osteoblastos en la superficie del hueso y los osteocitos en el interior (Jorgensen *et al.*, 2003). Los mecanismos de señalización implicados en la mecanotransducción incluyen la prostaglandina E2, la ciclo oxigenasa 2, diversas quinasas, Runx2 y óxido nitroso

Los osteocitos normalmente no expresan FA pero expresan OC, galectina 3, CD44, como así también varias proteínas de la matriz ósea. Regulan el intercambio mineral entre los fluidos provenientes de las lagunas y la red de canalículos. Los osteocitos son activos durante los procesos osteolíticos y posiblemente actúen como células fagocitarias porque contienen lisosomas.

### 1.2.1.4. Osteoclastos

Son las células responsables de la resorción ósea. Estas son células grandes (100µm), son multinucleadas, ricas en mitocondrias y vacuolas (Figura Nº6). Los osteoclastos contienen fosfatasa ácida resistente al tartrato que permite la defosforilación de las proteínas. Los osteoclastos se originan en las células madre hematopoyéticas de la médula ósea conocidas como granulocitos y unidades formadoras de colonias (GM-CFU), precursores de macrófagos y monocitos (Mundy, 1993).

Los osteoclastos tienen dos características especiales en la membrana: la primera, de aspecto rugoso donde tiene lugar la reabsorción, y una segunda zona rica en microfilamentos, con integrinas para anclarse a la matriz. De esta forma los osteoclastos se mueven hacia el área a ser reabsorbida y luego se adhieren inmediatamente a la superficie

de hueso mineralizado con el borde rugoso y sellar los bordes de la zona con las integrinas. Particularmente la integrina av $\beta$ 3, reconoce la secuencia Arg-Gly-Asp (RGD) de la OPN que se halla en el colágeno y matriz osteoide (Sodek y Ganss, 2000; Lesley *et al.*, 2000). A este nivel el pH es ácido, ya que secretan ácidos (H<sup>+</sup>) generados por la anhidrasa carbónica II y enzimas proteolíticas tales como colagenasas, metaloproteasas, la catepsina K, glucuronidasa, etc. (Mundy, 1993), que inician la resorción ósea por la solubilización de primera lo orgánico y entonces la matriz mineral.

Los osteoblastos son fundamentales para la formación de osteoclastos. Por lo tanto, el factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF) producida por los osteoblastos se requiere en las primeras fases de la osteoclastogénesis para la formación de células gigantes multinucleadas.

La osteoclastogénesis se basa en la existencia de 3 moléculas clave: OPG (osteoprotegerina, una proteína soluble sintetizada por los osteoblastos y pre-osteoblastos), RANKL (un ligando situado en la superficie de los osteoblastos y pre-osteoblastos) y RANK (un receptor de la anterior, situada en las membranas de los osteoclastos y pre-osteoclastos). El RANKL (activador del receptor del ligando NFkB) (Simonet *et al.*, 1997; Burgues *et al.*, 1999) es una citoquina de transmembrana perteneciente a la familia de TNF (Lacey *et al.*, 1998). La interacción entre RANKL y su receptor RANK inicia la actividad osteoclástica y la diferenciación. Del mismo modo, los efectos de RANKL tanto *in vivo* como *in vitro* son inhibidas por OPG. Cuando OPG y RANKL se unen, la unión entre RANK y RANKL se inhibe, y por lo tanto la diferenciación osteoclástica también se inhibe. Por esta razón OPG, RANK y RANKL son importantes reguladores de la osteoclastogénesis.

#### 1.2.2. Matriz ósea

La matriz ósea está comprendida por dos fases, una inorgánica y otra orgánica. La fase inorgánica la conforman depósitos minerales de HA y representa el 65% del peso; en tanto la fase orgánica constituye el 25% del peso del hueso, y el 10% restante de la matriz es agua. El 95% de la fase orgánica está integrada por colágeno tipo I y el 5% restante son proteínas no colágenas. Entre las proteínas no colágenas se encuentran las BMP, OC, OPN y osteonectina (Bauer y Muschler, 2000; Colnot *et al.*, 2005; Eppley *et al.*, 2005). Estas proteínas le confieren a la MOD propiedades osteoinductivas de diferenciación de células

mesenquimáticas en osteoblastos, y osteoconductivas, ejerciendo quimiotaxis sobre los osteoblastos del hueso hospedador hacia la MOD (Lammi *et al.*, 2006).



adyacente al sitio a la superficie de excavación (flechas). Varias vacuolas (V) se observan en citoplasma próximo al ribete en cepillo. Barra de escala:  $4m\mu$ . (Silva *et al.*, 2015).

### 1.2.3. Fase inorgánica o mineral

El componente mineral del hueso representa el 65% de la masa ósea. Está formado por calcio, fosfato y carbonato (en proporciones de 10:6:1) en forma de pequeños cristales de hidroxiapatita  $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$ . En los tejidos duros como dentina y hueso, el grupo OH<sup>-</sup> puede ser sustituido con  $CO_3^2$ ;  $Mg^{2+}$ , F<sup>-</sup> o  $H_2PO_4^-$  (Boskey y Roy, 2008). En los huesos largos, los cristales de apatita se depositan adquiriendo estructuras similares a columnas que miden 20-40 nm de longitud por 3-6 nm de ancho (Gray, 1973). Los cristales de apatita se depositan adoptando una orientación en relación a las fibras de colágeno. Específicamente, en el hueso, los cristales se encuentran dentro de las fibras individuales y a lo largo de las superficies de fibrillas en el espacio extrafibrilar (Orgel *et al*, 2011; Veis y Dorvee, 2013).

El plasma está sobresaturado en calcio y fósforo con respecto a la hidroxiapatita, por esa razón las proteínas constitutivas inhiben la mineralización. Las proteínas con capacidad adhesiva a favor de la mineralización, mientras que los proteoglicanos, magnesio, ATP y pirofosfatos actúan como inhibidores (Fernández-Tresguerres-Hernández-Gil *et al.*, 2006).

La maduración de la matriz ósea se asocia con la expresión de la FA y varias proteínas no colágenas incluidas OC, OPN y BSP. Se cree que estas proteínas que se unen al calcio y a los grupos fosfatos contribuyen a regular la deposición ordenada del mineral mediante la regulación de la cantidad y tamaño de los cristales de hidroxiapatita formados. Los minerales inicialmente se depositan en las zonas los espacios que se generan entre los extremos de las fibrillas de colágeno (Landis, 1995).

Las vesículas extracelulares de la matriz (VEM) sintetizadas por los condrocitos y osteoblastos sirven como protectores del microambiente en donde las concentraciones de calcio y fósforo pueden incrementar lo suficiente para precipitar y formar cristales. El fluido extracelular normalmente no se encuentra hipersaturado con HA y por lo tanto no precipita espontáneamente. Las VEM contienen proteínas y un complejo de fosfolípidos, calcio y fosfato inorgánico que se comportan como nucleadores que precipitan los cristales de HA. No se encuentra determinada la forma en que las VEM contribuyen con la mineralización en sitios específicos ubicados en los espacios existentes entre los extremos de las fibrillas de colágeno. Ya que aparentemente las vesículas no están dirigidas directamente a esos sitios (Anderson, 2003). No existe evidencia que la HA proviene del fosfato amorfo de calcio (Weiner *et al.*, 2005). Conforme el hueso madura, los cristales de HA aumentan de tamaño a la vez que disminuye el nivel de impurezas. El aumento del tamaño de los cristales ocurre por crecimiento del cristal y por agregación. Las macromoléculas pueden unirse a la superficie de los cristales para establecer el tamaño, forma y número de cristales formados.

Los promotores de los nucleadores incluyen en los dientes a la proteína de la matriz de la dentina y en los huesos a la BSP. El colágeno tipo I no es un promotor de la mineralización ósea. Las quinasas y FA regulan el proceso de mineralización. La FA ósea incrementa la concentración local de fósforo, remueve los inhibidores de crecimiento de cristales de HA y modifica las fosfoproteínas que controlan la capacidad de actuar como nucleadores. La vitamina D juega un rol indirecto en el estímulo de la mineralización y desmineralización de la matriz ósea. Luego de la absorción o síntesis de vitamina D en la piel, el hígado sintetiza 25-hydroxivitamina D y subsecuentemente los riñones producen 1,25-dihydroxivitamina D [1,25-(OH)2D] biológicamente activa. La 1,25-(OH)2D sérica es responsable de mantener la calcemia y fosfatemia en concentraciones adecuadas que permitan la mineralización pasiva de la matriz ósea. La vitamina 1,25-(OH)2D lo permite

en primer lugar por estímulo de la absorción intestinal de calcio y fósforo. Además promueve la diferenciación de los osteoblastos y estimula la expresión de FA, OC, osteonectina, OPG, y una variedad de citoquinas. Influye en la proliferación y apoptosis de otras células esqueléticas, incluyendo a los condrocitos hipertróficos.

La matriz mineralizada extracelular debe ser considerada como algo más que un simple depósito de calcio y fósforo, ya que constituye una reserva de proteínas que participan en la regulación de la diferenciación celular y en la integridad y la función del tejido óseo (Young, 2003).

### 1.2.3.2. Matriz orgánica

La matriz orgánica u osteoide constituye un tercio de la masa ósea. Se encuentra comprendida por un 90% de proteínas de colágeno (colágeno tipo I: 97% y colágeno tipo V, 3%) y el 10% restante lo comprenden proteínas no colágenas (PNC) (OC 20%, osteonectina 20%, BSP 12%, proteoglicanos 10%, OPN, factores de crecimiento, BMP, etc.).

### 1.2.3.2.1 Colágeno

El 90% de la matriz extracelular (ECM) se compone de colágeno, sobre todo de tipo I (> 95%) y tipo V (<5%). También se ha encontrado la presencia de pequeñas cantidades de colágeno de tipo III, en relación a las fibras de Sharpey, y el tipo XII, formadas bajo estrés mecánico. En la molécula de colágeno se encuentra la secuencia aminoacídica Arg-Gly-Asp (RGD), que es reconocida por las integrinas superficiales de las células óseas (Robey *et al.*,1993). El colágeno no tiene gran afinidad por el calcio, por esta razón otras proteínas, genéricamente denominadas proteínas no colágenas (PNC) están implicadas en la deposición mineral.

### 1.2.3.2.2. Proteínas no colágenas

Las proteínas no colágenas (PNC) incluyen a la osteopontina (OPN), sialoproteína ósea (BSP), osteonectina (ON) y osteocalcina (OC), que juega un rol en la regulación de la mineralización (Gadeau *et al.*, 2001), permite la unión de los osteoblastos y osteoclastos a la matriz ósea (Lakshmipathy y Verfaille, 2005; Dominici *et al.*, 2006). En este grupo se destacan proteoglicanos que representan el 10% de las proteínas no colágenas. En la matriz
osteoide hay cuatro tipos de proteoglicanos: hialuronato y condroitín sulfato, que son moléculas grandes que participan en las etapas iniciales de la morfogénesis ósea; y, biglicano y decorina que son moléculas más pequeñas y aparecen en las siguientes fases de la formación de hueso.

#### 1.3. Matriz ósea desmineralizada (MOD)

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 matriz ósea desmineralizada han sido estudiadas en diversas especies animales para ser utilizados como auto- halo- y xenoinjertos. 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 inducción de hueso heterotópico extra esquelético de parte de la MOD quedó demostrado de forma contundente en el conejo, perro y bovino y de MOD humana en ratones (xenoinjerto) Aliabadi *et al.*, 2010). Sin embargo, la matriz alogénica nativa de rata induce osificación ectópica pero no en otras especies (Kirker-Head, 1995). Por lo tanto, las restricciones relativas a las especies animales, y sus respuestas a las BMP se deben considerar, y probablemente son de naturaleza inmunológica. Además, los procedimientos de preparación BMP y los vehículos utilizados afectan sus propiedades osteogénicas (Cook *et al.*, 1994).

El proceso de desmineralización de la matriz provoca ligera alteración de la arquitectura ósea (Figueiredo *et al.*, 2011) a la vez expone los factores de crecimiento a las células precursoras de los osteoblastos (Sandhu *et al.*, 1999; Fleming Jr *et al.*, 2000; Zimmermann y Moghaddam, 2011) y disminuye las reacciones inmunogénicas por destrucción de los

antígenos de superficie (Riley *et al.*, 1996). Por esta razón, cuando la MOD es comparada con otros tipos de injertos y materiales sustitutos de hueso, posee mayor capacidad osteoinductiva (Ozdemir y Kit, 2011; Zimmermann y Moghaddam, 2011). La desmineralización también destruye el ADN de virus motivo por el cual se obtiene un producto inocuo de transmisión de agentes etiológicos infecciosos.

Por sus propiedades biológicas osteoinductivas y osteoconductivas, la MOD es empleada en cirugía ortopédica, odontológica, craneofacial y de columna (Bauer y Muschler, 2000; Eppley *et al.*, 2005; Zimmermann y Moghaddam, 2011). Conserva la organización del tejido original que le otorga el contenido de colágeno tipo I que se comporta como un elemento de sostén biológico a las células precursoras de los osteoblastos a pesar de la pérdida de fuerza estructural que aporta la fase mineral preexistente (Lane *et al.*, 1999).

Los tipos de células que constituyen el hueso se originan a partir de células madre que dan lugar a dos poblaciones de células osteogénicamente competentes: células osteoprogenitoras determinadas (COPD), que se diferencian en células osteogénicas, y así garantizan el desarrollo, mantenimiento, reparación y remodelación del hueso; y células osteoprogenitoras inducibles (COI), que necesitan un factor que induzca la diferenciación (Banks, 1992). Las COIs se puede encontrar en el tejido conectivo en general y también en la médula ósea. Pueden participar en la osteogénesis heterotópica e influir en los procesos de reparación (Brighton *et al.*, 1992).

Durante el proceso de reparación ósea, los factores de crecimiento tienen importantes funciones tanto en el inicio y como en el mantenimiento de la diferenciación y proliferación de células osteoprogenitoras y osteoblastos que contribuyen a la formación de hueso nuevo (Lind, 1998). Las BMPs se expresan durante las primeras etapas de reparación ósea, y vehículo es la matriz ósea desmineralizada (Wozney, 1994).

La desmineralización de la matriz ósea expone y activa a las BMPs. Las comparaciones clínicas de éxito de los aloinjertos mineralizados respecto a los desmineralizados son similares, aunque el patrón de los primeros es osteoconductivo, mientras que los aloinjertos desmineralizados se consideran osteoinductivos (Schwartz *et al.*, 1998).

La función de la matriz parece ser la inmovilización de la proteína osteoinductora en un sitio particular durante el tiempo suficiente para la inducción de hueso que se produzca (Wosney, 1994). A medida que el MOD no tiene actividad osteogénica, la formación de

hueso que se produce responde a las propiedades osteoinductiva influida por la matriz implantada (Tuli y Singh, 1978).

Lane y Sandhu (1987) caracterizaron a los fenómenos inductivos manifestados por la MOD como una cascada de eventos secuencialmente interrelacionados, de forma como sucede durante la osificación endocondral. Observaron que histológicamente la formación de hueso intramembranoso con zonas de osificación endocondral y la interfaz de recepción de implante de hueso.

Varias causas pueden explicar los diferentes resultados clínicos cuando en el tratamiento se utiliza MOD. La causa puede ser el hecho que las proteínas osteoinductoras están presentes en cantidades insuficientes para provocar la formación de hueso detectable, o que están en una forma inactiva. Otra explicación puede asociarse con diferentes técnicas de procesamiento de materiales, o bien a las características de donante (Schwartz *et al.*, 1998). Presumiblemente cuanto más minerales se extraen de la matriz ósea, más BMP queda expuesta y en consecuencia se maximiza la propiedad osteoinductiva (Urist, 1965; Mellonig *et al.*, 1982).

El músculo tiene características vasculares capaces de proporcionar células madre mesenquimales que permiten la iniciación de la formación de hueso en respuesta a factores osteogénicos existentes en homoinjerto trasplantado (Brown *et al.*, 1997; Solheim 1998).

El ácido clorhídrico 0,6 N promueve la desmineralización eficiente de la matriz para la obtención de MOD a la vez que mantiene el potencial inductor óseo, en tanto que cuando es sumergida en etanol al 70% proporciona esterilización (Del Carlo *et al.*, 2003).

#### 1.4. Diferenciación celular del tejido óseo

Las células madre mesenquimales (CMM) son células pluripotentes que se encuentran en diversos sitios del cuerpo incluida la médula ósea, el tejido adiposo, en los pericitos de los vasos sanguíneos, el hígado y la sangre del cordón umbilical (Campagnoli *et al.*, 2001; Crisan *et al.*, 2008; Byeon *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2013). Las CMM tienen la plasticidad de diferenciarse en múltiples linajes celulares, dando lugar a los osteoblastos, pero también a los condrocitos, adipocitos, fibroblastos, miocitos y neuronas (Chamberlain *et al.*, 2007). El desarrollo de los osteoblastos comienza con la proliferación y el compromiso de las CMM residentes en la médula ósea y periostio (De Bari *et al.*, 2006). El proceso de diferenciación se encuentra controlado por factores de transcripción específicos como

Runx2 (Ducy *et al.*, 1997) y osterix (OSX) (Nakashima *et al.*, 2002). Además, Runx2 es un gen maestro para la diferenciación de las CMM hacia el linaje de células osteoprogenitoras en osteoblastos (Komori *et al.*, 1997). Durante este proceso se requiere la expresión de genes específicos para síntesis de proteínas BMP y WNT (Grigoriadis *et al.*, 1988). Runx2 regula la transcripción de los genes relacionados con la síntesis de FA, BSP y OC (Fakhry *et al.*, 2013)

#### 1.4.1. Proteína morfogénica ósea (BMP)

La proteína morfogénica del hueso (BMP, por su sigla en inglés) (Figura N°7) es miembro de la superfamilia de los factores transformadores del crecimiento- $\beta$  (TGF- $\beta$ , por su sigla en inglés) (Albrektsson y Johansson, 2001). BMP posee más de una docena de isoformas identificadas, siendo las isoformas -2, -4, -5, -6 y -7 las que tienen marcada capacidad osteogénica (Groeneveld y Burger, 2000).

Las BMP intervienen en la esqueletogénesis durante la etapa embrionaria y en la vida adulta en la remodelación y reparación de las fracturas. Durante la embriogénesis participan en la formación de hueso y cartílago (Yamaguchi *et al.* 2000) y estimulan la diferenciación de las células madre mesenquimales (CMM) hacia diferentes líneas celulares como tejido adiposo, cartílago y hueso, e inhiben la osteoclastogénesis (Canalis *et al.* 2003). Son las únicas moléculas conocidas por ser inductoras de la regeneración de hueso y cartílago. De hecho, la reparación ósea no puede comenzar en ausencia de BMP-2 (Tsuji *et al.*, 2006).

Las BMPs nativas, extraídas de la MOD, son capaces de inducir la formación de hueso en sitios ectópicos al esqueleto (Urist, 1965; Rivera *et al.*, 2003). El hueso inducido se desarrolla a través de un proceso similar al de osificación endocondral, aunque con patrones diferentes (Kawakami *et al.*, 1998). En tanto el proceso osteogénico iniciado por extractos proteicos provenientes de hueso asemejan a la curación de endocondral de las fracturas (Yasko *et al.*, 1992)

Las BMPs son los únicos factores de crecimiento óseo que inducen la diferenciación de las CM en condroblastos y osteoblastos (Kirker-Head, 1995; Lane, 2001). La BMP nativa (obtenida del hueso), BMP recombinante -2, -4, y -7 son capaces de regenerar defectos óseos de tamaño crítico en ovejas, roedores, perros y primates cuando se asocia con

colágeno, MOD, HA, y polímeros biodegradables (Sciadini *et al.*, 1997; Lane, 2001; Granjeiro *et al.*, 2005).



La eficacia de BMP puede ser afectada por la concentración a la que se encuentra, hormonas, factores de crecimiento y la presencia de células diana. Ya sea que BMP haya sido obtenida por técnicas de purificación de tejido óseo, mediante técnicas de recombinación, sea utilizada sola o asociada con distintas matrices, induce la osteogénesis en diferentes especies animales (Groeneveld y Burger, 2000).

En las etapas iniciales de la crondro-osteogénesis BMP interactúa con Runx2 provocando que ésta sensibilice a las células a la acción de BMP, que a su vez estimula aún más a Runx2 a inducir el fenotipo osteoblástico (Phimphilai *et al.*, 2006).

BMP-2 y -4 no juegan un papel crucial en la proliferación de condrocitos y la maduración durante el desarrollo endocondral del hueso (Shu *et al.*, 2011). Por otra parte, BMP-7 induce la diferenciación osteoblástica y acelera la mineralización de la matriz (Shen *et al.*, 2010) y su ausencia puede ser compensada por otras isoformas (Tsuji *et al.*, 2010). La

ausencia de BMP-2 y -4 en ratones da lugar a un deterioro severo de la osteogénesis (Bandyopadhyay *et al.*, 2006). Los ratones que no sintetizan BMP-2 sufren fracturas espontáneas que no se resuelven con el tiempo, incluso otros estímulos osteogénicos no pueden compensar la ausencia de BMP-2 (Tsjui *et al.*, 2006). También demostró efectos sobre la mineralización de la matriz mediante el incremento de la expresión de OC (Huang *et al.*, 2010).

En condiciones óptimas BMP se desbloquea de la matriz ósea y se expone con el fin de participar en el proceso de inducción de hueso por estimulo diferenciación de las células mesenquimales en células óseas (Lieberman *et al.*, 2002).

La osteogénesis inducida por BMP comprende una cascada secuencial con tres fases críticas: 1) la migración y la mitosis de las células mesenquimales; 2) diferenciación de las células mesenquimales en condroblastos y consecuente formación de cartílago y, 3) la sustitución de cartílago por hueso (Figura N°8). Estos eventos secuenciales son desencadenados por la unión de la fibronectina plasmática a la MOD para la adhesión y proliferación de CM a los 3 días post implantación. La condrogénesis se observa después de 5 días y alcanza su punto máximo a las 7 u 8 días. Luego de 9 días se observa hipertrofia del cartílago y mineralización de la matriz. La diferenciación osteoblástica depende de la angiogénesis y el nivel más alto se produce después de 10-11 días (Pacicca *et al.,* 2003). Secuencialmente, el hueso endocondral recién formado se remodela y se convierte en un sitio hematopoyético. La secuencia de eventos morfogenéticos en respuesta a la matriz ósea desmineralizada imita los acontecimientos iniciales de la morfogénesis esquelético y en embriones de reparación ósea en adultos.



Para que se lleve a cabo la osteoinducción de forma irreversible, basta que BMP actúe por un corto período de tiempo (Noel *et al.*, 2004). Dependiendo del gradiente de concentración, BMPs puede ejercer quimiotactismo positivo sobre diversos tipos de células (Wozney, 1992; Reddi y Cunningham, 1993) y actuar como agente mitogénico y de diferenciación (Reddi, 1994). En el hueso, las BMPs inducen la diferenciación de las CM en condroblastos y osteoblastos (Wozney, 1992). Esta última propiedad sugiere que BMP es capaz de inducir la formación ósea directa u endocondral. Durante el proceso de formación de hueso ectópico asociado a la implantación de BMP, la secuencia de eventos recapitula el proceso de formación de hueso que se observa durante el desarrollo embrionario de los huesos largos y muchas de las propiedades BMP se pueden extrapolar a partir de ese modelo (Ripamonti y Duneas, 1998).

BMP desempeña un papel crítico en la reparación de las fracturas (Lieberman et al., 2002). En orden de regenerar hueso el proceso de reparación de las fracturas comienza con el reclutamiento de CM específicas para luego proliferar y diferenciarse en células osteogénicas. La procedencia exacta de esas células no está completamente establecida. Sin embargo, la evidencia señala que derivan del tejido blando circundante, corteza ósea, periostio, médula ósea y células procedentes de sitios hematopoyéticos distantes. Una vez reclutadas las células se inicia una cascada de reacciones moleculares que implica la producción de una matriz conformada por colágeno Tipo I y Tipo II. En este proceso intervienen los miembros de los TGF-β en la condrogénesis y osificación endocondral, mientras que BMP-5 y -6 inducen la proliferación celular en la osificación intramembranosa y en sitios periostales (Cho et al., 2002; Marsell y Einhorn, 2009). BMP-2 demostró ser crucial para dar inicio con la cascada de reparación, como quedó demostrado en investigaciones efectuadas en ratones con inactividad de BMP-2, que fueron incapaces de formar callo para reparar exitosamente fracturas (Tsuji et al., 2006). Si los resultados se deben a los efectos sobre la proliferación de CMM y la diferenciación o efectos sobre la migración de células está todavía en debate entre los investigadores (Marsell y Einhorn, 2011).

Los factores que afectan la capacidad de osteoinducción de BMP son las concentraciones en que se encuentra, la isoforma presente, composición cualitativa, la posible presencia de inhibidores, el correcto procesamiento de obtención y almacenamiento (Raval *et al.*, 1996).

Por otro lado, la dosis, la concentración y el tiempo de acción de BMP son importantes variables del resultado inductivo (Puleo, 1997).

#### **1.4.2.** Wingless int (WNT)

La denominación de la proteína proviene de las dos primeras especies de donde fue aislada. El nombre *wingless* proviene de *Drosophila mallanogaster* e int-1 del ratón (Wodarz y Nusse, 1998).

Las proteínas WNT -int constituyen una familia de glicoproteínas ricas en cisteína y de 39-46 kDa que se encuentra implicada en el desarrollo embrionario, la inducción de tejido, la polaridad axial (Gavin *et al.*, 1990; Cadigan y Nusse, 1997) y la tumorigénesis (Miller, 2001). La cascada de señalización celular provocada por WNT se mantiene a través de los procesos evolutivos entre una variedad de especies que van desde la hidra a los seres humanos, incluyendo a *Caenorhabditis elegans, Drosophila melanogaster, Xenopus laevis,* peces, la gallina, roedores y seres humanos (Behrens, 2000).

WNT actúa a través de vías de señalización canónica y no canónica, siendo la canónica la vía más ampliamente estudiada. Esta vía es importante en los embriones en desarrollo, en el mantenimiento de los tejidos adultos e interviene también en los procesos patológicos (Logan y Nusse, 2004; Clevers, 2006; Fuerer *et al.*, 2008). Los componentes de la vía canónica son: a) ligandos WNT: comprendidos por glicoproteínas que se unen al receptor para iniciar la activación de la vía; b) receptores de membrana, comprendidos por las proteínas *frizzled* y los co-receptores LRP5, -6 y kremen; c) efectores intracelulares donde participan diferentes proteínas. Algunas de ellas son axina, proteínas de la poliposis adenomatosa del colon (PAC), glucógeno sintetasa quinasa 3-β (GSK3), β-catenina y las proteínas *dishevelled*; d) Antagonistas: se describieron diversos tipos moleculares con acción inhibidora sobre la vía WNT entre las que se hallan esclerostina y proteínas miembros de la familia *dickkopf* (Niehrs, 2006) (Figura N°9).

Si bien la canónica es la vía que mejor se conoce (He *et al.*, 2004; Kelly *et al.*, 2004; Huang y He, 2008) existen evidencias que estas señales las pueden activar también otros mecanismos que utilizan mediadores diferentes a los de la vía canónica. Estas vías no canónicas parecen estar implicadas en diversas fases del desarrollo embrionario (Sugimura y Li, 2010).



Figura N°9. Vía canónica de WNT. En ausencia de unión de los ligandos WNT a su receptor (izquierda), la  $\beta$ -catenina se degrada y los genes no se transcriben. Sin embargo, cuando se activa la vía (derecha) disminuye la degradación de la  $\beta$ -catenina, con lo que se acumula en el citoplasma, desde donde puede ingresar en el núcleo y activar los factores de transcripción. APC: proteína de la poliposis adenomatosa del colon;  $\beta$ -catenina; cK: caseína-quinasa; Dsh: dishevelled; GSK3: glucógeno sintetasa quinasa 3; sFRP: proteína soluble similar a frizzled; SOST: esclerostina. En: Velasco y Riancho (2008)

Al menos 7 de las 19 proteínas, WNT-1, -2, -3, -3b, -4, -8 y -10b, activan la vía canónica mediante la regulación de los niveles de  $\beta$ -catenina y localización subcelular (Akiyama, 2000). En ausencia de WNT,  $\beta$ -catenina es fosforilada por la enzima (GSK-3 $\beta$ ) y así se conjuga con ubiquitina. Cuando las WNT se unen a los receptores de superficie celular FZ y LRP5/6, se inhibe la GSK-3 $\beta$  y la  $\beta$ -catenina hipofosforilada se estabiliza y transloca al núcleo donde regula la expresión genética a través de la activación de diversos factores de transcripción como el Tcf-Lef1 (*T cell factor/lymphocyte enhancer factor* o factor de células T/factor potenciador linfoide (FCT)/FPL) (Gordon y Nusse, 2006). Esta vía canónica es importante en los embriones en desarrollo, en el mantenimiento de los tejidos adultos e interviene también en los procesos patológicos (Logan y Nusse, 2004; Clevers, 2006; Fuerer *et al.*, 2008).

Los reguladores de WNT son las proteínas Dickkopf (DKK), que competitivamente se unen a LRP5/6 y previenen la activación de la señalización por acoplarse adicionalmente con un co-receptor negativo denominado Kremen-1 (Bafico *et al.*, 2001). Las proteínas DKK, por lo tanto, regulan la homeostasis ósea por interferencia con las señales de WNT (Morvan *et al.*, 2006)

Los reguladores de la formación de hueso los constituyen la hormona paratiroidea, prostaglandinas, BMP y las proteínas WNT. Las proteínas WNT se unen al receptor

LRP5/6 y conducen a la activación de una vía de señal que implica a GSK3 y  $\beta$ -catenina, que impulsan la diferenciación de las células mesenquimales en osteoblastogenesis (Miller, 2001). El regulador de la formación de hueso inducidos por WNT es la proteína Dickkopf (DKK), que se une competitivamente a LRP5/6 e impide la activación. DKK requiere además de un co-receptor negativo denominado Kremen-1 (Bafico *et al.*, 2001) así proteínas DKK regulan la homeostasis ósea por interferencia con la señalización de WNT (Morvan *et al.*, 2006).

La relación entre la inflamación y la remodelación ósea aún no se encuentra totalmente explicada. El factor de necrosis tumoral alfa (FNT- $\alpha$ ), una citoquina pro-inflamatoria fundamental en la espondilitis esclerosante, es responsable de la inducción de Dickkopf-1 (DKK-1) y esclerotina (Heiland *et al.*, 2010) que regulan la formación de hueso por inhibición de las proteínas WNT y proteínas BMP. Las dos últimas son los principales inductores de la osteoblastogénesis y nueva formación de hueso (Lories y Luyten, 2007). WNT regula la expresión de osteoprotegerina (OPG), responsable de la inhibición de la osteoclastogenesis y por lo tanto de la resorción ósea (Glass *et al.*, 2006) atenuando la influencia del receptor activador del factor nuclear kappa B ligando (RANKL) en los osteoclastos y sus precursores (Boyle *et al.*, 2003) (Figura N°9).

Durante los procesos de osteogénesis WNT regula el nivel de expresión de *sox*9 (Gregory *et al.,* 2005), que influye en el compromiso de las células mesenquimales a un destino esqueletogénico (Mori-Akiyama *et al.,* 2003). WNT influye en la diferenciación tanto en osteoblastos (Luo *et al.,* 2004) como en condrocitos (Rodda y McMahon, 2006) en los animales adultos, existe abundante evidencia de que la señalización WNT regula la masa ósea (Hartmann, 2006) (Figura N°9).

En modelos de osteogénesis distractiva realizados en ratones, WNT se incrementa en el sitio de la lesión y durante las primeras etapas de la osteogénesis (Kasaai *et al.*, 2012).

WNT7b induce la diferenciación de los osteoblastos por la vía canónica (Bennet *et al.,* 2005). En tanto WNT10b promueve la diferenciación de osteoblastos por inducción de la transcripción de los factores osteoblastogénicos Runx2 y osterix; suprime la transcripción de los factores adipogénicos (Bennet *et al.,* 2005; Kang *et al.,* 2007).



#### 1.4.3. Runt related transcriptional factor 2 (Runx2)

Las proteínas Runx son factores de transcripción eucariontes (Levanon *et al.*, 2001; Lian *et al.*, 2003) siendo Runx2 el más relevante. Runx2 determina el linaje osteoblático a partir de las CM en las etapas iniciales de la osteogénesis y la inhibe en las etapas finales (Liu *et al.*, 2001; Komori *et al.*, 2002). Runx2 es requerido para la diferenciación *in vitro* de osteoblastos, la formación de huesos *in vivo* (Komori *et al.*, 1997) y la maduración de condrocitos y mineralización del cartílago. Los genes diana de Runx2 comprenden tanto los que contribuyen a la formación ósea como OC, OPN y BSP (Schoeder *et al.*, 2005)

El gen runx2 codifica al menos dos isoformas, la isoforma tipo I y la isoforma tipo II. La isoforma tipo II se expresa en las células osteoprogenitoras en proliferación, que conforme se diferencia hacia osteoblasto se eleva la expresión de la isoforma tipo II, funcionalmente relevante para la diferenciación ósea (Xiao *et al.*, 1999).

Para llevar a cabo el programa génico relacionado a la expresión de genes de fenotipo óseo, es necesario que Runx2 se asocie con la proteína CbfB, formando un heterodímero (Kundu *et al.*, 2002; Yoshida *et al.*, 2002) que permite que incremente su afinidad por el DNA (Speck y Stacy, 1995). Las regiones del DNA a las que se une el heterodímero Runx2/CbfB, se localizan en el correspondiente al promotor de sus genes blanco. Al unirse a secuencias tan específicas de ADN, Runx2 provee una plataforma donde puedan

ensamblarse estratégicamente complejos macromoleculares regulatorios (Stein *et al.*, 2003; Stein *et al.*, 2004).

Un punto crítico en la osteogénesis normal es el estricto control de la expansión proliferativa de las CM, osteoprogenitoras, preosteoblastos y osteoblastos inmaduros (Liu *et al.*, 2002). Los bajos niveles de Runx2 en células mesenquemáticas osteoprogenitoras y en osteoblastos inmaduros activamente proliferativos no indica necesariamente la maduración osteoblástica (Lee *et al.*, 2000). Ello se debe a que Runx2 es regulado negativamente por el ciclo celular de los preosteoblastos y osteoblastos inmaduros. Sin embargo, a pesar de los bajos niveles, la asociación de Runx2 a los promotores de los genes blanco en los cromosomas durante la mitosis permite que se mantenga el compromiso de estas células con el linaje óseo. Éste también regula a Runx2 a través de mecanismos no establecidos (Young *et al.*, 2007). El extremo carboxi de RUNX2 media interacciones con un número de proteínas reguladoras incluyendo SMADs (Zhang *et al.*, 2000).

La importancia de Runx2 en la osteogénesis se demostró en ratones que no codificaban a esta proteína cuando no se registró osteogénesis endocondral e intramembranosa (Lee *et al.,* 2000). Para que Runx2 posea actividad se requiere la producción autocrina de BMP, por lo que actúan cooperativamente para estimular la expresión de genes de osteoblastos (Phimphilai *et al.,* 2006).

Runx2 determina el linaje osteoblástico a partir de las CM induciendo su diferenciación en estadios tempranos e inhibiéndolo en etapas más tardías (Liu *et al.,* 2001; Komori, 2002).

#### 1.4.4. Osteopontina

La osteopontina (OPN) es una proteína que fue aislada por primera vez del tejido óseo (Giaghelli y Steitz, 2000) y más tarde fue hallada en otros tejidos y órganos como riñones, placenta, músculo liso y epitelio secretor (Denhardt y Gou, 1993; Weber, 2001; Naldini *et al.*, 2006;). Interviene en un amplio rango de funciones biológicas que incluye respuestas inflamatorias, angiogénesis, cicatrización de heridas, tumorigénesis de caninos y felinos (Ozmen *et al.*, 2015), mineralización extra esquelética (Choi *et al.*, 2008) sobrevida y migración celular y mineralización y remodelación ósea.

OPN es sintetizada por varios tipos celulares entre las que cuentan los osteoclastos, osteoblastos, condrocitos, macrófagos, células activas T y células epiteliales, endoteliales

del músculo liso, fibroblastos y células tumorales. Se encuentra en tejidos como el hueso, actúa como citoquina pro-inflamatoria y juega un importante rol regulando procesos inflamatorios (O'Regan *et al.*, 2000).

Es la proteína no colágena que más abunda en la matriz extracelular. Es una glicoproteína fosforilada (McKee *et al.*, 1993) perteneciente a la familia de proteínas SIBLING (<u>S</u>mall <u>Integrin-Binding Ligand N-linked Glycoproteins</u>) (Fisher *et al.*, 2001; Fisher and Fedarko, 2003). Las proteínas SIBLING poseen una secuencia aminoacídica compuesta por Arginina-Glicina-Aspartato, o secuencia RGD, que permite la interrelación con la integrina  $\alpha_v\beta_3$ , la proteína de transmembrana CD44 e hidroxiapatita (Sodek y Ganss, 2000; Lesley *et al.*, 2000). Estas interacciones posibilitan la quimiotaxis de los osteoclastos, la motilidad y anclaje al hueso (Weber *et al.*, 1996; Chellaniah y Hruska, 2003; Zhu *et al.*, 2004) (Figura N°11).

OPN se encuentra *in situ* en los osteoblastos quienes la secretan a la matriz ósea donde se deposita durante los procesos de osificación endocondral e intramembranosa (Chellaniah *et al.*, 2003). Interviene en la proliferación y diferenciación osteoblástica acompañada con aumento de la actividad de la fosfatasa alcalina (FA) (Moore *et al.*, 1991; Jang y Kim, 2005). La detección de osteocalcina y elevado nivel de síntesis de la OPN se presentan en el estadio avanzado de hipertrofia de los condrocitos y posterior diferenciación en células similares a los osteoblastos (Lian *et al.*, 1993)

La OPN secretada por los osteoblastos se localiza en la superficie ósea donde interacciona con la integrina  $\alpha_v\beta_3$  para facilitar el anclaje de los osteoclastos y probablemente OPN también proporciona señales químicas para su programa de diferenciación celular y posterior activación funcional y metabólica (Lakshmipathy y Verfaille, 2005; Dominici *et al.*, 2006).

OPN posee un importante rol en la mineralización de matriz ósea y remodelación del hueso (Fisher y Fedarko, 2003). El papel de OPN en la mineralización del hueso resulta poco claro, posiblemente modula la formación de HA, ya sea previniendo el crecimiento de cristales en sitios que pueden resultar inapropiados, tales como el osteoide, o regulando el incremento del tamaño y forma (Hunter, 2013).

Las cargas electronegativas del ácido glutámico y ácido aspártico así como el putativo motivo de unión de OPN al  $Ca^{2+}$ , motivan que OPN se una fuertemente a la hidroxiapatita (HA;  $Ca_{10}[PO_4]_6[OH]_2$ ). Se comporta como un potente inhibidor del proceso de

mineralización, ya que la unión de OPN con HA inhibe el crecimiento de los cristales de HA (Hunter *et al.*, 1996; Steitz *et al.*, 2002; Pampena, *et al.*, 2004).

Estudios realizados en ratones deficientes en OPN mostraron poseer mayor contenido de HA y cristalinidad en comparación con los animales normales (Boskey *et al.*, 2002). Estas observaciones sugieren que OPN actúa como regulador negativo en la formación de HA.

OPN cumple diversas funciones durante la reparación de las fracturas. La deficiencia de la proteína no colágena altera el funcionamiento de múltiples tipos celulares que resultan en retraso de la neovascularización temprana, alteraciones en la organización de la matriz extracelular y reduce las propiedades biomecánicas del hueso (Duvall *et al.*, 2007)

Las cargas y descargas mecánicas a las que son sometidos los huesos inducen la expresión de OPN para generar la migración de los osteoclastos posibilitando la motilidad y anclaje de estas células (Ishijima *et al.* 2001).

OPN también demostró ser un supresor de la formación ósea osteoblástica durante remodelación por la descarga mecánica de (Ishijima *et al.*, 2001; Gross *et al.*, 2005). Su deficiencia deteriora significativamente la capacidad de hueso para resistir la propagación de grietas incipientes (Thurner *et al.*, 2010).

#### 1.4.5. Osteocalcina (OC)

Desde la década de los años 1970 y 1980 OC es considerada un producto metabólico específico de los osteoblastos (Price *et al.*, 1976; Charles *et al.*, 1985; Sanches *et al.*, 2009) y es la PNC que es más abunda en la matriz ósea (Wolf, 1996). Es una pequeña proteína que se halla constituida por tres residuos de ácido  $\gamma$ -carboxiglutámico (GLA) preferencialmente expresada por los osteoblastos y posee la capacidad de unirse a iones de calcio. Su rol exacto en el hueso no se encuentra completamente comprendido, aunque se tiene la certeza que interviene en la biomineralización de la matriz (Neve *et al.*, 2012).

En modelos caninos de osteogénesis distractiva los niveles elevados de TGF- $\beta$  fueron acompañados por menores niveles de OC después de la iniciación de la osteogénesis por distracción (Lammens *et al.*, 1998). Estas observaciones sugieren que TGF- $\beta$  suprime la maduración de osteoblastos al retrasar la diferenciación de los osteoblastos en la fase de mineralización de la osteogénesis distractiva.



requiere trasladarse y adherirse a la MEC, requiere que la integrina  $\alpha\nu\beta3$  ubicada en las extensiones de membrana se active (A) y acople al grupo RGD de OPN. (B) La unión con el factor de crecimiento (FC) cambia el cominio externo de  $\alpha\nu\beta3$  de estado basal a activo. El FC a través del receptor tirosin quinasa (RQT) y la integrina inducen los reacomodamientos del citoesqueleo para el desplazamiento del osteoclasto a través del grupo proteico Rho unido a GDP que se activa fosforilizándose (GTP) . Modificado de Faccio *et al.*, (2003).

Los osteoblastos sintetizan OC sólo en la etapa final de la final de su diferenciación celular, luego que concluyó la etapa de proliferación y bajo el control de Runx2 (Carvallo *et al.*, 2008). También ha sido hallada, aunque en bajos niveles, en la médula ósea de megacariocitos y plaquetas en sangre periférica (Thiede *et al.*, 1994), en células progenitoras endoteliales (Gössl *et al.*, 2008), en células del músculo liso vascular (Spronk *et al.*, 2001), en el cerebro, el intestino y el riñón (Fleet y Hock, 1994).

La mayor parte de la fracción carboxilada de OC sintetizada por los osteoblastos se deposita en la matriz ósea, mientras que la fracción no carboxilada que no es adsorbida por la HA y circula en el torrente sanguíneo como OC sérica (Lee *et al.,* 2000). Esta fracción sérica es empleada como marcadora del metabolismo óseo, incluso sería más sensible que la FA (Delmas *et al.,* 1990).

La vitamina D estimula directamente la transcripción de OC, (de hecho, el gen es receptivo a la vitamina D receptivo) mientras que la vitamina K regula los procesos de carboxilación. Además, diversos factores de crecimiento, hormonas o citoquinas pueden modular la producción de OC a través de las vías de señalización o la interacción con factores de transcripción que actúan sobre la región promotora del gen de la OC. Este gen es generalmente inactivo durante la proliferación odteoblástica, mientras que se transcribe en abundancia durante la diferenciación de los osteoblastos (Villafan-Bernal *et al.*, 2013).

Los autores consultados hacen referencia a los mecanismos íntimos de acción de los factores de crecimiento, citoquinas e indicadores metabólicos durante la proliferación, diferenciación y maduración celular del linaje osteogénico durante la vida embrionaria e *in vitro*. Esa descripción no se hace como resultado de los implantes de MOD en defectos óseos ortopédicos. El aporte de conocimientos en relación a los fenómenos celulares de proliferación y diferenciación celular y la interacción de las proteínas que participan en esos procesos, permitirá determinar la forma que se reparan lo defectos óseos tratados con MOD. A partir de esos conocimientos se podrán establecer los principios de tratamientos que requieran re-establecer la base ósea.

# CAPÍTULO 2 HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

## 2. Hipótesis

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

## 2.1. Objetivo general

Identificar los fenómenos de proliferación y diferenciación celular durante la reparación de defectos óseos ortopédicos tratados con matriz ósea desmineralizada (MOD).

# 2.2. Objetivos específicos

- Estandarizar un protocolo de obtención de matriz ósea desmineralizada.
- Caracterización de la matriz ósea desmineralizada a través de microscopía óptica, microscopía óptica y microscopía de electrónica de barrido.
- Establecer las propiedades osteogénicas de la MOD por implante intramuscular en los músculos *bíceps femoris*.
- Efectuar seguimiento y evaluación radiológica de los defectos ortopédicos tratados con MOD.
- Analizar la evaluación del uso funcional del miembro de los animales en estudio.
- Obtener muestras de tejido óseo de los sitios de reparación de los defectos ortopédicos a los 7, 15, 21, 30, 60 y 150 días post-implante.
- Identificar y establecer histológicamente el procedimiento de reparación de los defectos ortopédicos.
- Establecer la inmunoexpresión, densidad óptica y densidad óptica integrada de las proteínas BMP-2, WNT, Runx2, OPN y OC en tejidos de reparación y diferenciación celular.
- Relacionar las DO y DOI con los acontecimientos tisulares durante la reparación.

# CAPÍTULO 3 METODOLOGÍA

#### 3.1. Obtención, procesamiento y almacenamiento de matriz ósea desmineralizada

La MOD empleada fue obtenida mediante la estandarización de un protocolo basado en métodos previamente informados (Reddi y Huggins, 1972; Urist *et al.*, 1973; Hallfeldt *et al.*, 1995; Concannon *et al.*, 1997; Rabie *et al.*, 2000; Rivera *et al.*, 2003; Han *et al.*, 2005) y publicado por el tesista (Audisio *et al.*, 2014).

Se emplearon diáfisis de huesos de conejos procedentes de frigorífico, a los que inmediatamente de haber sido sacrificados les fueron extraídos los fémures, las tibias y los húmeros en condiciones de asepsia. Las diáfisis fueron tratadas en un solo grupo, que incluyó remoción de los tejidos blandos, luego se lavaron con abundante agua destilada a 4 °C para prevenir la acción enzimática en los tejidos (Yazdi *et al.*, 1991). Las diáfisis se seccionaron en piezas de 5 a 10 mm y luego fueron fragmentadas en un molino de cuchillas a 20.000 rpm (Yellowline A10, IKA, Alemania) hasta obtener partículas de 200 a 750 µm. Al hueso triturado le fueron 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 (Figura N°12).

El hueso fue lavado con agua destilada a 4 °C y luego fue sometido a la acción de una solución de ácido clorhídrico (HCl) 0,6 N a razón de 25 meq/g de hueso durante 48 horas con agitación permanente a 4 °C (Figura N°12) La MOD obtenida se lavó con agua destilada hasta estabilizar el pH en 7,0 y conservada en alcohol etílico 70° a 4 °C hasta su uso en proporción de 30 partes de alcohol por cada parte de matriz (Junqueira Del Carlo *et al.,* 2003; Han *et al.,* 2005; Audisio *et al.,* 2014).

A los efectos de caracterizar a la MOD, se tomaron tres muestras. A la primera le fueron determinados residuos lípidos, la segunda fue analizada mediante microscopía óptica, microscopía de alta resolución (MOAR) y electrónica de transmisión (SEM); y la tercera se empleó para comprobar las propiedades osteoinductivas y osteoconductivas.

#### 3.2. Caracterización de la matriz ósea desmineralizada (MOD)

La MOD fue caracterizada para establecer las características de las mismas como así también la capacidad osteogénica al ser aplicada en un modelo animal. Se procedió a establecer si las partículas contenían lípidos como así también los aspectos microscópicos ópticos y electrónico.

### 3.2.1. Determinación de fracción lipídica

La muestra de MOD fue suspendida en dicloremetano y luego centrifugada a 500 r.p.m. durante 5 minutos Una fracción del centrifugado se analizó con cromatógrafo gaseoso con detector de masa (GC-MC) (GCMS-QP2010, Shimazdu, Japón) que emplea helio como gas *carrier*.



Figura N°12. Procesamiento de hueso para obtener matriz ósea desmineralizada. A) Huesos largos obtenidos de los conejos despojados parcialmente de los tejidos blandos; B) los mismos huesos a los que les fueron extraídas las epífisis, aún conservan la médula ósea; C) cortezas óseas diafisiarias fragmentadas, lavadas y despojadas de tejidos blandos y restos de médula ósea; D) fragmentación de las diáfisis hasta obtener partículas de MOD de tamaño deseado, a la izquierda molienda gruesa del hueso, a la derecha molienda fina; E) las partículas de MOD suspendidas en HCl 0,5 N sobre un agitador magnético; F) aspecto de las partículas de matriz ósea luego de la desmineralización.

# 3.2.2. Caracterización microscopía óptica, microscopía de alta resolución (MOAR) y electrónica de transmisión

#### 3.2.2.1. Microscopía óptica (MO)

Se tomaron dos muestras, la primera se colocó sobre un portaobjetos para observar las partículas en el microscopio óptico a pequeño aumento y establecer sus dimensiones y características; a la segunda muestra se la deshidrató en una batería de etanol en concentraciones crecientes, luego se sumergió en xileno y embebió en parafina y resina sintética. Se realizaron cortes de 5 µm que fueron montados en portaobjetos de vidrio y teñidos con hematoxilina y eosina (HE).

Para realizar la tinción con HE se procedió a desparafinar las muestras en dos pasos, el primero en estufa a estufa 60 °C durante 10 minutos y posteriormente se sumergieron 2 veces durante 10 minutos cada una en xilol. Luego de hidrataron en una batería de alcoholes en concentraciones decrecientes de 100°, 95° y 70° de 1 a 2 minutos. Luego se lavaron 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 realizó a temperatura ambiente. Luego la muestra se trasladó a un coplin conteniendo la hematoxilina alumínica de Harris durante 3-5 minutos. Las muestras se lavaron con agua corriente hasta que el agua se aclaró. Luego se aplicó eosina al 0,5% durante 15 a 30 segundos y se lavó con agua destilada. Se deshidrató en forma progresiva con sucesivos baños de alcohol, cada vez menos hidratados  $70^{\circ} - 80^{\circ} - 90^{\circ} - 96^{\circ} - 100^{\circ}$ ; del alcohol  $70^{\circ}$  a  $96^{\circ}$  permanecieron 30 segundos y en el alcohol 100° 10 minutos y montados con Entellan (Merck, Alemania). Los cortes se observaron en un microscopio óptico Axiophot (Carl Zeiss, Alemania). La adquisición de las imágenes se realizó con una cámara digital Powershot G6 de 7.1 megapixels (Canon INC, Japón) adosada al microscopio óptico. Éstas se procesaron con el software AxioVision Release 4.6.3 (Carl Zeiss, Alemania).

#### 3.2.2.2. Microscopía de alta resolución (MOAR)

Las muestras destinadas a MOAR se fijaron en glutaraldehído al 2,5% en solución tampón fosfato de Sörensen (PBS) (0,1 M, pH 7,4) durante a 4 °C. Se lavaron dos veces con PBS. Se re-fijaron con tetróxido de osmio al 1% durante 1 hora a temperatura ambiente. Seguidamente se lavaron dos veces en PBS y se deshidrataron en concentraciones

crecientes de acetona. Se procedió luego a la pre-inclusión en resina epoxi EMbed 812 1:1 en acetona 100% durante toda la noche a temperatura ambiente y posteriormente a una inclusión en EMbed 812 a 60 °C, durante 24 horas. A través de un ultramicrótomo manual (Sorvall MT-1A, DuPont, USA), utilizando cuchillas de vidrio, se obtuvieron cortes semifinos de 0,25 mm. Se emplearon 10 cortes los que fueron colocados sobre portaobjetos de vidrio y teñidos con azul de toluidina sobre una platina termostatizada, para permitir la entrada del colorante al tejido incluido en la resina. Los cortes se observaron en un microscopio óptico Axiophot (Carl Zeiss, Alemania). La adquisición de las imágenes se realizó con una cámara digital Powershot G6 de 7.1 megapixels (Canon INC, Japón) adosada al microscopio óptico. Éstas se procesaron con el software AxioVision Release 4.6.3 (Carl Zeiss, Alemania).

#### 3.2.2.3. Microscopía electrónica de transmisión (SEM)

La muestra se fijó con glutaraldehido al 2,5% y más tarde se procedió a deshidratarla con etanol en una serie de concentración creciente. Luego fue secada por punto crítico empleando dióxido de carbono (Denton Vacuum DCP1), fijada con cinta bifaz sobre soporte de aluminio y recubierta con oro Denton Vacuum DeskIV (22-24 nm de espesor). La muestra se examinó en un microscopio JEOL Modelo JSM 6480 LV SEM (Japón). La adquisición de imágenes y las mediciones morfométricas se realizaron con software original del equipo.

#### 3.2.3. Determinación de las propiedades biológicas de la MOD

Se emplearon 10 conejos de la raza neozelandesa, sexualmente maduros, de 2,5 a 2,8 kg, los que fueron mantenidos en jaulas individuales, alimentados con una fórmula balanceada comercial y agua potable *ad-libitum*. Las condiciones de bienestar animal, así como las condiciones experimentales de los animales fueron aprobadas por el Comité de Ética de la Universidad Nacional de Río Cuarto.

Los animales se dividieron en grupo tratamiento (GT) n=8 y grupo control (GC) n=2 para proceder a realizar las intervenciones quirúrgicas. Los individuos fueron sedados y anestesiados con 1,5 mg/kg de xilacina y 40 mg/kg de ketamina IM. Se acondicionó uno de los miembros posteriores para ser intervenido en condiciones de asepsia y proceder a implantar MOD de forma intramuscular. Luego de realizar una incisión de aproximadamente 2 cm en la cara lateral del muslo, se efectuó un bolsillo en el músculo bíceps femoral (*m. biceps femoris*). El bolsillo se rellenó con 100 mg de MOD y el músculo y la piel se suturaron con poligalactina. Los animales recibieron terapia antiinflamatoria (ketoprofeno 0,1 mg/kg IM; Kalmavet, Lab. Zoovet) y antibioticoterapia de amplio espectro (clorhidrato de oxitetraciclina, 50 mg totales IM) durante 3-5 días VO. Se realizaron proyecciones latero-mediales de los miembros a los 30 días postquirúrgico. En cada radiografía se emplearon 60 kVp y 10 mA a una distancia de foco de 40 cm y tiempo de exposición de 0,4 segundos. Se estableció que la presencia de una imagen radiodensa en el sitio del implante sería considerada como positiva a la presencia de hueso nuevo extraesquelético.

#### 3.3. Implantes de MOD en defectos óseos ortopédicos

Se emplearon 35 conejos de la raza neocelandeza de sexualmente maduros que fueron atendidos según las pautas de bienestar animal de la Universidad Nacional de Río Cuarto. Durante el tiempo que duró la experiencia los animales se mantuvieron en jaulas individuales alimentados con una fórmula comercial de alimento balanceado y agua a*d*-*libitum*.

Luego de un período de adaptación a las condiciones de confinamiento los conejos fueron 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 acondicionó para ser intervenido en condiciones de asepsia. A los efectos de obtener analgesia del miembro se procedió al bloqueo del plexo braquial mediante administración de lidocaína al 2%.

Se realizó una incisión en la cara dorsal del antebrazo que permitió identificar los músculos extensores de la mano. Los músculos se disecaron para exponer al radio para proceder a crear un defecto ortopédico de tamaño crítico, cuyas mínimas dimensiones impiden 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 determinó mediante radiografías de control pre-operatorio. Cuando se expuso al radio se realizaron dos osteotomías paralelas y transversales al eje longitudinal con una distancia entre ambas de 1,5 veces el diámetro óseo. Los defectos de 30 animales se recibieron tratamiento mediante relleno con MOD y constituyeron el grupo tratamiento (GT) (Figura

N°13); en tanto que 5 animales no recibieron tratamiento y conformaron el grupo control (GC). Los músculos extensores fueron suturados con poligalactina con puntos separados. El tejido subcutáneo y piel también se suturaron con el mismo material según técnicas de rutina.

Concluidas las intervenciones los conejos permanecieron en jaulas individuales. Diariamente recibieron antibioticoterapia y terapia antiinflamatoria (ketoprofeno 0,1 mg/kg IM; Calmavet, Lab. Zoovet) durante 5 días. Diariamente durante 8-10 días los conejos recibieron atención de las heridas (lavado, desinfección y control de puntos de sutura) como así también eran 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 conformaron subgrupos de tratamiento (SgT) de 5 animales cada uno. A cada (SgT) le fue 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 fue sacrificado a los 7 días post-operatorio, El Sgt2 a los 15 días, el Sgt3 a los 21 días; el SgT4 a los 30días; el Sgt5 a los 60 días y el SgT6 a los 150 días. Los animales del GC fueron sacrificados a los 60 días post-operatorio.

Los animales de cada subgrupo tratamiento fueron sacrificados al concluir el período de sobrevida establecido, a los 7, 15, 21, 60 y 150. De cada cadáver se recuperaron las porciones de las diáfisis que contenían los defectos tratados. Las muestras se fijaron con formol salino tamponado, se deshidrataron con baterías de alcoholes de graduación creciente, para ser incluidos en parafina. Se realizaron cortes histológicos correspondiente a los defectos provocados y tratados de aproximadamente 4 µm con micrótomo (Microtom®, USA) y montaron 3-4 cortes sobre cada portaobjeto. Los cortes histológicos se tiñieron con hematoxilina-eosina (HE) para el reconocer estructuras tisulares e inmunomarcar RUNX2, WNT. BMP. OPN. OCN mediante técnica de inmunohistoquímica.

#### 3.3.1. Inmunodetección de BMP-2, WNT, Runx2, OPN y OC

Para la realización de estas técnicas se utilizaron los cortes histológicos obtenidos según el punto 3.2. Los mismos fueron desparafinados mediante dos pasajes por xilol de 15 minutos cada uno. Posteriormente se rehidrataron con baterías de alcoholes de graduación decreciente de 5 minutos cada uno. Luego se lavaron 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 realizó a temperatura ambiente. Antes de la primera incubación con los anticuerpos los portaobjetos conteniendo los cortes fueron tratados con 3% (v/v) de peróxido de hidrógeno por 5 minutos y lavados con PBS pH 7,2. Luego fueron incubados con el primer anticuerpo correspondiente al receptor buscado durante una hora a temperatura ambiente en cámara húmeda cámara húmeda (Runx2 (27-K): sc-101145 dilución 1:200; Wnt-3 (H-70): sc-28824 dilución 1/200; BMP-2 (N-14): sc-6895 dilución 1/200; Osteocalcin (FL-100): sc-30044, dilución 1:200 y OPN AKm2A1:sc-21742 dilución 1/50; todos de Santa Cruz Biotechnlogy Inc, USA). Posteriormente fueron 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)

(LSAB®+Systems HRP, Dako Cytomation). Luego del período de incubación fueron lavados 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 fueron 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 concentración creciente y montados con Entellan (Merck) para ser observados en un microscopio óptico Axiophot (Carl Zeis, Alemania). La adquisición de imágenes se realizó mediante una cámara digital Powershot (G6, 7.1 megapixeles (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 consideraron positivas a BMP-2, WNT, Runx2, OPN y OC cuando se inmunomarquen con color marrón a la matriz extracelular, células mesenquimáticas, pre-osteoblatos, osteoblastos, osteocitos, condrocitos y osteoclastos.

#### 3.3.2. Análisis de densitometría óptica (DO) y densitometría óptica integrada (DOI)

Se adquirieron imágenes de los cortes inmunomarcados con aumento 200X. Las imágenes adquiridas correspondieron 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, 30, 120 y 150 días post-operatorio. Las imágenes capturadas se introdujeron en software Image J 1.49b (Media Cybernetics, USA) para cuantificar la expresión de BMP-2, WNT, Runx2, OPN y OC. El software convirtió el color marrón correspondientes a las expresiones de cada proteína en una escala de grises que se extendió de 0 a 255 (0 = blanco y 255 = negro). Con los valores obtenidos se calculó la densidad óptica (DO) y densidad óptica integrada (DOI). La densidad óptica se determinó 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 obtiene del producto entre la DO y la unidad de superficie expresada en micras cuadradas ( $\mu^2$ ) ocupada por la expresión de las proteínas en estudio según la fórmula DOI = (DO \*AREA). El resultado de ambas fórmulas se expresó en unidades arbitrarias (UA) (Vasconcellos et al., 2014). Las imágenes adquiridas también fueron observadas con aumento a 40X y 100X para analizar aspectos citoplasmáticos que resultaran de interés.

#### 3.4. Evaluación radiológica

Se realizó seguimiento radiológico en los miembros intervenidos a los 15, 21, 30, 60 y 150 días post-operatorios. Los conejos se colocaron en posición de decúbito lateral con el miembro objeto de estudio en contacto con el chasis que contenía la película radiológica. Se efectuaron proyecciones latero-medial empleando 60 kVp y 10 mA a una distancia de foco de 40 cm con tiempo de exposición de 0,4 segundos. Las radiografías se emplazaron en un negatoscopio y se fotografiaron con una cámara marca Kodak© de 12 megapixeles. Cada fotografía fue analizada con el software ImageJ 1.49b (Media Cybernetics, USA). Se estipuló que la presencia de una imagen radiodensa en el sitio del implante sería considerada como positiva a la presencia de hueso nuevo. En tanto se consideraría al defecto reparado cuando el hueso nuevo ocupara la totalidad del defecto y tuviera integración con los extremos de las osteotomías. Una vez que las imágenes se introdujeron en el software se procedió a medir la longitud del radio, la longitud del defecto, la superficie del defecto y la presencia de hueso nuevo que rellenaba el defecto.

#### 3.5. Análisis estadístico

Los datos obtenidos de las DO y DOI correspondiente a BMP, WNT, Runx2, OPN y OC como así también de los datos provenientes de las radiografías de los defectos óseos tratados se introdujeron 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.

CAPITULO 4 RESULTADOS y DISCUSIÓN

#### 4.1. Caracterización de MOD

#### 4.1.1. Residuos lipídicos

Los análisis realizados a las partículas de MOD para determinar la presencia de residuos lipídicos resultó negativo.

#### 4.1.2. Caracterización microscopía

#### 4.1.2.1. Microscopía óptica y microscopía óptica de alta resolución (MOAR)

Las partículas que se observaron con fondo blanco presentaron forma cuadrangular y sus bordes eran bordes lisos y redondeados (Figura N°13 A). En tanto que en las partículas teñidas con HE se identificaron las unidades funcionales del hueso cortical, la osteonas. En ellas, claramente se observaron los conductos osteónicos centrales rodeados por las *lamelas* o láminas dispuestas en forma concéntrica conteniendo las *lacunae* o lagunas (Figura N° 13 B).

La técnica MOAR se observó con mayor definición y detalles los elementos estructurales del hueso cortical previamente anunciados con la técnica y tinción convencional con HE. El azul de toluidina tiñó de forma homogénea los cortes MOAR, en tanto los cortes teñidos con HE se mostraron basófilos (Figura Nº 13 C).

#### 4.1.2.2. Microscopía electrónica de barrido (SEM)

Durante la estandarización del protocolo de procesamiento y conservación de MOD, se efectuaron pruebas de molienda con dos molinos que poseían distintas conformaciones de cuchillas y velocidades. El primero disponía de cuchillas con bordes cortantes y 5.000 r.p.m. mientras que el segundo molino las cuchillas no tenían filo y desarrollaba una velocidad de 20.000 r.p.m. Las comparaciones realizadas por SEM mostraron que como resultado de la acción del primer molino las partículas poseían forma ligeramente cilíndrica y superficie irregular. Las fibras de colágeno se observaron seccionadas en varios sitios y poco compactas (Figura N° 14 A). Con el segundo molino se obtuvieron partículas de bordes netos (Figura N° 15 A), tamaño uniforme al igual que su geometría, que fue cuadrangular (Figuras N° 14 B y 15) y aspecto compacto (Figura N° 15 B).

Las observaciones realizadas con SEM mostraron que las partículas poseían forma cuadrangular con una dimensión media de 532,42  $\mu$ m (±181,14). En la superficie de las

partículas se reconoció la disposición horizontal de las osteonas y en los cortes transversales se identificaron los conductos centrales cuyo diámetro fue de 13,45  $\mu$ m (±6,49) y las *lamelas* o láminas concéntricas conteniendo las *lacunae* o lagunas (Figura N°16).





Figura Nº15. Microscopía electrónica de barrido (SEM) de las partículas obtenidas por los dos empleados; A) partícula producto de la molienda a 5.000 r.p.m. observada a 400X, 300x y 1000x; B) partículas de MOD procesadas con molino a 20.000 r.p.m. SEM 300X



observado a 700X.

#### 4.1.3. Propiedades biológicas de la MOD

Durante el período que duró la experiencia ninguno de los animales intervenidos manifestó signos y síntomas producto de reacciones inflamatorias o complicaciones post-operatorias locales o sistémicas. Las radiografías tomadas de los miembros posteriores mostraron en correspondencia con el sitio del implante la presencia de una imagen densa fusiforme en dicho sitiocompatible con hueso nuevo y en correspondencia con los sitios de implantes extra esqueléticos de MOD (Figura N°17).



Figura Nº17. Radiografía de un muslo de un conejo empleado para determinar propiedades biológicas de la MOD. Imagen de la presencia de hueso (izq), el hueso nuevo señalado por el círculo.

#### 4.2. Modelo animal

En el lapso de tiempo de estudio no se registraron muertes o complicaciones como secuestros producto del rechazo a los implantes. En ese sentido los miembros intervenidos no mostraron edemas inflamatorios y emanación de ningún tipo de secreciones provenientes de las heridas o sitios de los implantes de MOD.

Una vez que las intervenciones concluyeron los animales ingirieron alimentos y agua a las 6 o 12 horas. Los conejos hicieron uso funcional de los miembros intervenidos a los 2-3 días de haberles realizado los tratamientos (Figura Nº18).



Figura Nº18. Conejo perteneciente al grupo tratamiento luego de 21 días de intervenido. El animal se encuentra haciendo uso funcional del miembro derecho.

#### 4.3. Análisis radiológico

El análisis radiológico mostró que los radios poseían una longitud media de 69,6  $\pm$ 1,51 mm. Los defectos midieron 8,65  $\pm$ 0,70 mm y sus superficies 28,88  $\pm$ 4,55 mm<sup>2</sup>. En tanto la longitud relativa de los defectos respecto a la longitud del hueso fue 12,44%  $\pm$ 1,15 (Tabla N°1). Los defectos tratados repararon completamente luego de 60 días, mientras que los defectos de los animales control a los 150 días no curaron y los extremos de las osteotomías se apreciaron atrofiadas (Figura N°19).

#### Tabla Nº1

(longitud y area de superficie)									
Conejo No	Longitud del	Longitud del	Longitud del	Área del					
	radio (mm)	defecto (mm)	defecto/longitud del radio	defecto (mm <sup>2</sup> )					
Grupo tratamiento									
1	69	8,23	11,92%	27,109					
2	70	8,38	11,97%	37,581					
3	69	7,75	11,23%	22,380					
4	70	8,19	11,70%	32,148					
5	72	7,96	11,05%	32,700					
6	66	9,58	14,51%	26,440					
7	70	8,99	12,84%	26,953					
8	70	9,80	14,00%	24,490					
Grupo control									
1	70	8,43		31,783					
2	70	9,22		27,240					

Longitud del radio y	dimensiones de	los defectos	óseos de	tamaño (	critico
	(longitud v áre	a de superfic	ie)		



A los 15 días post-operatorio se observó reacción periosteal y la presencia de hueso nuevo. Las imágenes de hueso nuevo poseían ligera forma triangular orientadas hacia el centro de los defectos. A los 21 días post-operatorios estas porciones de hueso nuevo se encontraban fusionadas entre sí y a la corteza inmediata de la ulna. Entre los 30 y 60 días el hueso nuevo ocupaba la totalidad del defecto y hacia el día 150 la imagen mostraba remodelación perióstica (Figura N°20).

Hacia el día 15 el hueso nuevo ocupaba  $6,43\pm1,51 \text{ mm}^2$  del defecto, equivalente al 22,47% de su superficie. A los 21 días el nuevo hueso cubría  $9,94\pm1,64 \text{ mm}^2$ , el 34,97% de los defectos. Hacia el día 30, 18,18 ±2,96 mm<sup>2</sup>, el 63,45% de la superficie de los defectos. Luego de 60 días post-operatorios el 26,62 ±7,08 mm<sup>2</sup>, 88,33% del defecto, se encontraba ocupado por hueso producto de la reparación. Finalmente, hacia el día 150 los defectos contenían el 28,72 ±5,00 mm<sup>2</sup> de hueso nuevo, el 100% de los defectos (Tabla N°1). La

cantidad relativa de hueso que ocupaba la superficie de los defectos a los 15 días fue de 22,48% (min: 15,76; max: 28,48), a los 21 días: 34,97% (min: 30,71; max: 48,45), a los 30 días 40: 63,45% (min: 60,56; max: 71,75). A los 60 días post-operatorios la superficie relativa de hueso fue el 88,83% (min: 80,02; max: 99,05) y la cantidad relativa de hueso a los 150 días fue de 100%, sin embargo, la reacción promovida por el periostio generó un callo óseo que agregó volumen a la región.

El análisis estadístico de los resultados indicó diferencias significativas entre los 15, 21 y 30, mientras que no se registraron diferencias significativas a entre los 60 y 150 días (p>0,05).



#### 4.4. Análisis histológico

#### 4.4.1. Análisis histológico realizado con tinción de Hematoxilina Eosina (HE).

Los estudios histológicos realizados a las muestras obtenidas de los animales pertenecientes al GT, según la secuencia temporal post-quirúrgica, demostraron la reparación completa de los defectos al término de los 60 días. Mientras que los cortes histopatológicos realizados a los animales del GC mostraron que los espacios correspondientes a los defectos se encontraban ocupados por tejido conectivo. Las observaciones de la reparación de los defectos correspondientes a cada período de estudio se describen a continuación.

A los 7 días post-tratamiento se identificaron a las partículas de MOD basófilas de forma poliédrica irregular. No se observaron células inflamatorias y ni células de la serie blanca entre las partículas y entre éstas y los músculos que las rodeaban. Las partículas se encontraban rodeadas por células aguzadas morfológicamente similares a células mesenquimáticas, que estaban dispuestas de forma paralela a la superficie de las partículas haciendo contacto con éstas (Figura N°21).


A los 15 días post-operatorios se identificaron sectores con características histológicas distintas. Se apreciaron partículas de MOD, espículas óseas (formación de hueso nuevo que comienza con el desarrollo de una matriz ósea formada por redes de fibras delgadas con depósitos mineralizados), pequeñas áreas de tejido cartilaginoso y cartílago en proceso de osificación.

Sobre la superficie de las partículas se observaron osteoclastos y fibras colágenas conteniendo células morfológicamente alargadas (Figura N°22). Las fibras colágenas y células estaban dispuestas de forma paralela a la MOD. A partir de los distintos sitios de contacto se observó condensación de células fenotípicamente mesenquimáticas que emitían prolongaciones colágenas de aspecto denso, acidófilas y forma de espículas (Figura N°23 B). En contacto con la matriz densa también había tejido laxo Éste poseía células delgadas y aguzadas que se continuaban en osteoblastos cuboidales que apoyaban en la superficie de las espículas (Figura N°23 A) mientras que la matriz albergaba osteocitos que aún poseían la morfología de osteoblastos.

El tejido cartilaginoso presentaba condrocitos hipertróficos que se continuaban con el tejido óseo trabecular y además presentaba sitios de osificación. Los condrocitos hipertróficos que se encontraban en las inmediaciones de la osificación estaban rodeados por matriz, otros habían desaparecido dejando condroplastos vacíos que forman lagunas o condroceles sobre los que se depositan osteoblastos y osteoclasto. Los condroceles coalescían para ser colonizados por osteoblastos y osteoclastos. En los lugares de osificación no se observó invasión de vasos sanguíneos. En estos sitios se pudieron detectar matriz condral en proceso de mineralizada y condroplastos ocupados por dos células (Figura N°24).

A los 21 días en el interior de los defectos no se hallaron partículas de MOD. Había tejido cartilaginoso, áreas de cartílago en proceso de osificación y espículas óseas y además albergaba numerosos osteocitos (Figura N°25).

El tejido cartilaginoso se hallaba contiguo a las espículas óseas. Los condrocitos tendían a conformar líneas sinuosas similares a los grupos isogénicos observados en cartílago de crecimiento. En éstos el tamaño de las células variaba de menor a mayor en dirección a los sitios de osificación. En inmediaciones a los sitios de osificación había condroplastos vacíos y condroceles que era ocupado por osteoblastos y osteoclastos en clara formación de espículas. En la matriz de las espículas se diferenciaba la presencia de osteoide



Figura N°22. Corte histológico realizado a los 15 días post-operatorios. A) Se observa la presencia de partículas de MOD rodeadas por células mesenquimáticas (CM), cartílago (C) y un área de osificación (Os). HE 100X; B) sobre las partículas se observaron osteoclastos (flecha) en proceso de resorción/remodelación. HE 400X.



Figura N°23. A) Condensación de matriz acidófila (MA) conteniendo células de citoplasma redondo y oval. En la superficie de la condensación se depositan osteoblastos (OB) y osteoclastos (OC). También coexisten sectores de matriz acidófila laxo (MAL). HE 200X; B); En este período se observaron trabéculas (T) sobre las que se asentaban osteoblastos (OB) y osteoclastos (OC). Entre las trabéculas se hallan células mesenquimáticas (CM) en relación directa con pre osteoblastos y osteoblastos (OB). HE 200X.



Figura N°24. Área de osificación a los 15 días. A la izquierda de la microfotografía se aprecia la presencia de tejido óseo y a la derecha el tejido cartilaginoso. Las flechas señalan condroplastos de la matriz cartilaginosa mineralizada conteniendo dos células. HE 400X.



Figura N°25. Histopatología de sector de defecto ortopédico tratado con MOD a los 21 días postoperatorios. Hay una combinación de espículas óseas nuevas (E) y tejido condral (TC). Las espículas contienen osteocitos (estrellass) en su matriz y osteoblastos (flechas) en sus superficies. Junto a grupos de osteoblastos de aprecian osteoclastos (Oc). HE 200X

sintetizado por los osteoblastos y depositados sobre la matriz de cartílago pre existente En este período también se detectó abundante cantidad de espículas óseas sobre las que se hallaban osteoblastos cuboidales. (Figura N°25).

A los 30 días post-operatorios en los defectos se observó existencia de trabeculas, zonas de cartílago y zonas osificación. Las trabéculas combinaban áreas de tinciones acidófilas con basófilas. Las tinciones acidófilas se encontraban ubicadas en las superficies de las trabéculas y se correspondían con la presencia de los osteoblastos cuboidales adheridos a sus superficies (Figura N°26).



Figura N°26. Histologia a los 30 días post-operatorios. Trabéculas óseas (1) cubiertas por os (Flechas). HE 200X.

El tejido cartilaginoso estaba conformado por condrocitos orientados en líneas sinuosas y se continuaban con zonas de osificación, de forma similar a lo observado a los 21 días (Figura N°27). Las áreas de osificación no presentaban invasión de vasos sanguíneos. Entre el tejido óseo y cartilaginoso había un área de transición que se diferenciaban por los cambios tintoriales en la matriz y variedad de tipos celulares que incluía cartílago con

condrocitos, cartílago en osificación con sectores donde se apreciaban espículas óseas entre las cuales había preosteoblastos y osteoblastos (Figura N°28).



Figura N°27. Histología a los 30 días post-operatorios. Tejido cartilaginoso a partir del cual se está llevando a cabo el proceso de osificación HE 200X.



Figura N°28. Corte histopatológico mostrando variedad de tipos de celulares y de tejido. Por una parte, se aprecian espículas (E) de hueso nuevo que contienen osteocitos y osteoblastos (Ob) acompañados de la presencia de osteoclastos (Oc). En los espacios formados por las espículas se presentan células osteoprogenitoras у pre osteoblastos. A la derecha de la fotografía se encuentra el tejido cartilaginoso (C) con condrocitos hipertróficos (Ch) formando grupos isogénicos axiales. Entre ambos tipos de tejido hay cartílago osificándose (Os) donde se observan condroplastos (Cp) vacíos. HE 400X.

A los 60 días el hueso que reparó los defectos óseos era de tipo denso que limitaba una cavidad ocupada por células de la médula ósea. El hueso denso emitía trabéculas hacia dicha cavidad (Figura N°29).

Luego de 150 días de haber sido tratados los defectos ortopédicos, el hueso que los reparaba estaba comprendido por hueso denso laminar conteniendo osteocitos. En otros sitios, el hueso laminar presentaba osteonas cuyos contornos no eran circulares u ovales, eran irregulares. El hueso laminar emitía trabéculas también de hueso denso. Entre los espacios intertrabeculares espacios intertrabeculares había células de la médula ósea (Figura N°30).



Figura N°29. Hueso nuevo producto de la reparación de un defecto óseo ortopédico tratado con MOD 60 días post-operatorio. En él se observa la presencia de trabéculas (T) óseas maduras conteniendo vasos sanguíneos (Vs) y osteocitos (\*). En la superficie interna de algunas de las trabéculas se observan osteoblastos (Ob). HE 100X.



Figura N°30. Hueso denso laminar (Hd) producto de la reparación de defecto óseo ortopédico inducido por implante de MOD luego de 150 días post-tratamiento. La matriz contiene osteocitos (Oc) y entre las trabéculas existen espacios con células de médula ósea (M). HE 200X.

## 4.4.2. Análisis con técnicas de inmunohistoquímica para BMP-2, WNT, Runx2, OPN y OC

Los resultados de las inmunomarcaciones de BMP-2, WNT, Runx2, OPN y OC se describen a continuación en tanto que las DO y DOI para cada molécula estudiada se presentan en la Tabla Nº2.

A los 7 días post-operatorio BMP-2 se encontró en la matriz de las partículas, con mayor intensidad en las lagunas donde se alojaron los osteocitos (Figura N°31). En éstas, la media de la DO fue 0,14 ( $\pm$ 0,11 min: 0,05-máx: 0,63) en tanto que la DOI se encontró en 0,77 ( $\pm$ 0,86 min: 0,03-máx: 3,41) (Tabla N°2).

La proteína WNT se inmunodetectó en las células mesenquimáticas (CM) ocupando los espacios entre las partículas de MOD. La DO para WNT fue 0,10 (±0,05; min:0,04-máx:0,21) y la DOI 3,15 (±4,66; min :0,09-máx: 21,07) (Figura N°32) (Tabla N°2).

Por su parte, Runx2 se inmunodetectó en grupos de células aglomeradas en relación con las partículas de MOD (Figura N°33). La DO para Runx2 fue 0,13 (±0,04 min: 0,08-máx: 0,23) y la DOI 0,39 (±0,51 min: 0,02-máx: 2,00) (Tabla N°2).

La OPN se distribuyó en forma homogénea en la matriz, con mayor intensidad en los canales centrales de las osteonas y lagunas de los osteocitos (Figura N°34). La DO fue 0,08 ( $\pm 0,09$ ; min: 0,008-máx: 0,50) y DOI 1,64 ( $\pm 2,11$ ; min: 0,05-máx: 7,37) (Tabla N°2).

OC inmunomarcó en la matriz de las partículas de MOD (Figura N°35). La DO y DOI fueron 0,20 (±0,05; min: 0,13 máx: 0,30) y 1,97 (±1,90; min: 0,05 máx: 7,38) (Tabla N°2) respectivamente.

## Tabla Nº2

Densidades Ópticas (DO) y Densidades Ópticas Integradas (DOI) de BMP, Runx2, WNT, OPN y OC en Cada Período Estudiado

	BMP		Runx2		WNT		OPN		OC	
	DO	DOI	DO	DOI	DO	DOI	DO	DOI	DO	DOI
7	0,14	0,77	0,13	0,39	0,10	3,15	0,08	1,64	0,20	1,97
días	(±0,11)	(±0,86)	(±0,04)	(±0,51)	(±0,05)	(±4,66)	(±0,09)	(±2,11)	(±0,05)	(±1,90)
	(min: 0,05	(min: 0,03	(min:0,08	min:0,02	(min: 0,04	(min:0,09	(min:0,008	(min:0,05	min: 0,13	(min: 0,05
	máx:0,63)	máx:3,41)	máx:0,230)	máx:2,00)	máx:0,21)	máx:21,07)	máx:0,50)	máx:7,37)	máx:0,30)	máx:7,38)
15	0,14	3,55	0,18	1,21	0,31	5,27	0,20	9,26	0,28	5,19
días	(±0,05)	(±5,10)	(±0,07)	(±1,47)	(±0,12)	(±5,98)	(±0,09)	(±11,92)	(±0,07)	(±2,67)
	(min: 0,04	(min: 0,20	(min:0,11	(min:0,17	(min: 0,07	(min:0,06	(min:0,11	(min:0,97	(min: 0,12	(min: 1,36
	máx:0,31)	máx:20,92)	máx:0,309	máx:4,97)	máx:0,46)	máx:23,17)	máx:0,33)	máx:32,60)	máx:0,39)	máx:12,47)
21	0,20	3,49	0,30	0,58	0,14	1,77	0,17	6,22	0,34	0,53
días	(±0,05)	(±1,96)	(±0,06)	(±0,28)	(±0,05)	(±2,01)	(±0,05)	(±3,22)	(±0,15)	(±0,66)
	(min: 0,12	(min: 1,26	(min:0,26	(min:0,30	(min:0,11	(min:0,25	(min:0,11;	(min:2,83	(min: 0,20	(min: 0,11
	máx:0,27)	máx:8,97)	máx:0,37)	máx:0,87)	máx:0,27)	máx:6,17)	max:0,28)	máx:13,78)	máx:0,54)	máx:1,89)
30	0,18	2,07	0,21	0,72	0,19	6,45	0,14	2,52	0,26	8,46
días	(±0,06)	(±2,14)	(±0,09)	(±1,05)	(±0,06)	(±7,42)	(±0,06)	(±3,23)	(±0,22)	(±12,8)
	(min: 0,14	(min: 0,45	(min:0,08	(min:0,01	(min:0,11	(min:0,06	(min:0,08;	(min:0,09;	(min: 0,09	(min: 0,40
	máx:0,27)	máx:5,20)	máx:0,43)	máx:4,97)	máx: 0,26)	máx:21,76)	max:0,28)	máx:8,07)	máx:0,95)	máx:49,83)
60	0,20	1,52	0,29	0,15	0,39	0,97	0,10	0,48	0,21	3,06
días	(±0,08)	(±1,88)	(±0,02)	(±0,09)	(±0,17)	(±2,07)	(±0,07)	(±0,60)	(±0,06)	(±2,42)
	(min: 0,11	(min: 0,16	(min:0,26	(min:0,06	(min:0,17	(min:0,001	(min:0,01;	(min:0,01;	(min: 0,12	(min: 0,01
	máx:0,40)	máx:7,68)	máx:0,32)	máx:0,28)	máx:0,57	máx:5,20)	max:0,21)	máx:1,61)	máx:0,31)	máx:9,70)
150	0,19	3,88	0,22	0,02	0,36	0,27	0,35	3,80	0,05	4,24
días	(±0,08)	(±6,30)	(±0,01)	(±0,02)	(±0,12)	(±0,23)	(±0,41)	(±3,36)	(±0,24)	(±3,68)
	(min: 0,10	(min: 0,62	(min:0,21	(min:0,01	(min:0,26	(min:0,03	(min:0,14;	(min:1,27	(min: 0,05	(min: 0,51
	máx:0,27)	máx:16,70)	máx:0,23)	máx:0,05)	máx:0,55)	máx:0,62)	max:0,97)	máx:8,37)	máx:0,37)	máx:9,60)



Figura Nº31. Inmunomarcación de BMP a los 7 días. Se observan partículas de MOD en las que se aprecia un incremento de la intensidad de marcación en las lagunas que ocuparon los osteocitos. 200X



Figura Nº32. Inmunodetección de WNT en las partículas de MOD a los 7 días post-tratamiento. 200X.





Luego de 15 días de tratamiento BMP-2 inmunomarcó en las partículas de MOD presentes según las características observadas ya descriptas y en las CM que las rodeaban (Figura N°36 A). BMP-2 se detectó además en las superficies de la matriz de las espículas óseas rodeando a los osteocitos atrapados en la matriz y en los osteoblastos que se asentaban en la superficie de la matriz ósea nueva. En la matriz de las espículas se encontraba distribuida de forma heterogénea con mayor densidad rodeando a los osteocitos (Figura Nº36 B). Además, BMP-2 se inmunodetectó en las CM contiguas al cartílago, en los condrocitos planos cercanos a esas células, y también en algunos condrocitos hipertróficos inmediatos a los sectores de osificación. En particular BMP-2, en el cartílago se la detectó en condrocitos planos e hipertróficos. En los lugares de osificación se la encontró en los condrocitos hipertróficos y en los límites de los condroplastos. En los espacios formados por la fusión de los condroplastos vacíos, BMP-2 se detectó en las superficies donde asentaban los osteoblastos inmunomarcados (Figura N°38). En el hueso nuevo producto de la osificación se encontró en los osteoblastos, osteocitos, osteoclastos y en la matriz ósea (Figura N°37). En esta etapa de la reparación la DO para BMP fue 0,14 (±0,05; min: 0,04máx: 0,31) y la DOI 3,55 (±5,10; min:0,20-máx:20,92) (Tabla N°2).

La proteína se encontró en WNT inmunomarcó en las CM que rodeaban a las partículas de MOD (Figura N°39), en las CM donde se realizaba la condrogénesis, en los condrocitos del cartílago y en los sitios de osificación (Figura N°40). En sectores donde predominaban espículas óseas nuevas, inmunoseñaló en las células osteoprogenitoras, condrocitos hipertróficos, preosteoblastos, osteoblastos y osteocitos (Figura N°41). La DO para WNT fue 0,31 ( $\pm$ 0,12; min: 0,07-máx: 0,46) y la DOI 5,27 ( $\pm$ 5,98; min: 0,06-máx: 23,17) (Tabla N°2).

La proteína Runx2 se inmunodetectó en las CM que se hallaban entre las partículas de MOD (Figura N°42) y en condensaciones de ese tipo celular (Figura N°43). En otros sitios de la reparación Runx2 se inmunodetectó en condrocitos y en células fenotípicamente similares a condrocitos, preosteoblastos y osteoblastos. En este período de la reparación la DO fue 0,18 ( $\pm$ 0,07 min: 0,11 máx: 0,309) y la DOI registrada fue 1,21 ( $\pm$ 1,47 min: 0,17 máx: 4,97) (Tabla N°2).

Por su parte, la OPN se encontró en las partículas de MOD y en las CM que las rodeaban (Figura N°44) en el tejido de matriz densa contiguo, en las espículas de hueso nuevo y en los sitios de osificación. En los sitios de matriz densa OPN se encontraba distribuida en forma homogénea y granular. En el tejido vecino a de matriz laxa, OPN también se inmunodetectó (Figura N°45).

En los lugares de osificación, OPN se expresó en la matriz extracelular que se estaba mineralizando. De esa forma se evidenció la transición de la MEC de cartílago a ósea (Figura N°46). En los condrocitos hipertróficos próximos a las áreas de osificación, en los bordes de los condroplastos también se depositaba OPN confiriendo un aspecto circular u oval. También se inmunodetectó en los bordes de los condroceles que coalescieron y en los osteoblastos que arribaron a ocupar esos sitios provenientes de la proliferación de preosteoblastos también marcados para OPN (Figura N°47). En las espículas óseas se inmunodistribuyó de forma heterogénea en la matriz, con mayor intensidad en las superficies de las mismas y rodeando a los osteocitos incluidos en ella. En los espacios conformados por las espículas se inmunomarcaba en los preosteoblastos, osteoblastos y osteoclastos (Figura N°47 A y B), en sus citoplasmas y en las membranas celulares. Luego de 15 días de tratamiento, la densidad óptica de OPN fue de 0,20 ( $\pm$ 0,09;



Figura N°36. Inmunomarcación de BMP-2 a los 15 días post-tratamiento. A) Partícula de MOD rodeada por CM; B) Sector de hueso nuevo donde se observan espículas en cuya matriz se inmunodetectó BMP-2 (\*), al igual que en los osteocitos que la componen encuentra. Entre las espículas se observan pre osteoblastos (POb) y osteoblastos (Ob) señalando BMP-2.400X.



Figura N°37. Inmunomarcación de BMP-2. A) Sector correspondiente a condrogénesis iniciada en sector de células mesenquimáticas (CM) se observa cartílago conteniendo condrocitos (Co) y sector de osificación; B) Análisis digital de la fotografía en la cual se aprecia en rojo la expresión de BMP-2. 200X.



Figura N°38. Inmunomarcación de BMP-2 en sitio de osificación (Os) en inmediaciones de cartílago (C). BMP-2 se halla señalada en color marrón en la matriz de las espículas óseas en formación (\*); en osteoblastos (Ob), osteoclastos (Oc). En la matriz se aprecia rodeando a los osteocitos y en éstos. 400X.



Figura N°39. IHQ WNT de tejido de reparación de defectos óseos tratados con MOD. Las partículas de MOD se hallan rodeadas por células mesenquimáticas, del lado derecho el análisis digital de la misma imagen muestra en color rojo las células marcadas IHQ 200X.



Figura N°40. Inmunodetección de WNT. A) de tejido de reparación de defectos óseos tratados con MOD. En la micro fotografía superior se la inmunomarcación de WNT en células mesenquimáticas (CM), cartílago (C); condrocitos hipertróficos (Ch) y sitio de osificación (Os). B) Análisis digital de la misma microfotografía en la que se muestra en rojo la presencia de WNT. 200X.



Figura N°41. Inmunomarcación de WNT de en corte histológico de un sector de reparación conteniendo espículas neoformadas. En la fotografía superior, en el ángulo superior izquierdo se observan células mesenquimáticas (CM), espículas en centro de la imagen sobre las que se depositan osteoblastos (Ob); entre los espacios formados por las espículas las células osteoprogenitoras (\*) y los pre osteoblastos marcados en rojo como producto del análisis digital de la microfotografía. 200X.

min: 0,11-máx: 0,33) mientras que la DOI era 9,26 (±11,92; min: 0,97-máx: 32,60) (Tabla N°2).

La osteocalcina al igual que BMP-2 y OPN inmunomarcó en las partículas de MOD y en las superficies de las nuevas espículas generadas con la reparación. Allí se inmunoexpresó también en los osteoblastos y osteocitos (Figura N°46). La DO y DOI respectivamente fueron 0,28 ( $\pm$ 0,07; min: 0,12 máx: 0,39) y 5,19 ( $\pm$ 2,67; min: 1,36 máx: 12,47) (Tabla N°2).





Figura N°43. Inmunodetección de Runx2. A) Runx2 se encuentra en los preosteoblastos y condrocitos; B) Análisis digital de la microfotografía en A) donde Runx2 de se encuentra en color rojo. 200X.



Figura N°44. Inmunomarcación de OPN en defecto óseo ortopédico tratado con MOD 15 días postoperatorio. OPN señalada en las partículas de MOD y en las células tipo mesenquimáticas. 100X.



Figura N°45. Inmunomarcación de OPN de defecto óseo ortopédico tratado con MOD 15 días postoperatorio. A) Tejjdo de matriz denso (MAD) tejido mesenquimático de matriz laxa (MAL) inmunomarcada por OPN igual que los osteoblastos (Ob) y osteoclastos (OC) 400X; B) OPN en las células de la matriz laxa (\*) y osteoclastos (OC). 400X.





La técnica de IHQ efectuada a los 21 días post tratamiento inmunolocalizó a BMP-2 en las CM vecinas al cartílago nuevo (Figura Nº48), en las células osteoprogenitoras, preosteoblastos, osteoblastos y osteocitos. En los sitios de osificación y en la matriz de las espículas óseas se mostró inmunodistribuida rodeando a los osteocitos (Figura N°49). En este período post-operatorio la DO fue 0,20 ( $\pm$ 0,05; min: 0,12-máx: 0,27) y para la DOI 3,49 ( $\pm$ 1,96; min: 1,26-máx: 8,97) (Tabla N°2).

La proteína WNT inmunoexpresó en las células CM y en las células precursoras de tejido condral. En los condroplastos y condroceles; y aisladamente en condrocitos hipertróficos que se encontraban cercanos a los lugares de osificación (Figura N°50). La DO y DOI a los 21 días post-operatorio fue 0,14 ( $\pm$ 0,05; min: 0,11-máx: 0,27) y 1,77 ( $\pm$ 2,01; min: 0,25-máx: 6,17) respectivamente (Tabla N°2)

La proteína Runx2 se inmunlocalizó en los sitios donde de condrogénesis y en condrocitos (Figura N°51). Donde se realizaba la osificación se encontró en los preosteoblastos y en condrocitos hipertróficos (Figura N°52). La DO registró 0,30 ( $\pm$ 0,06 min: 0,26 máx: 0,37) DOI: 0,58 ( $\pm$ 0,28 min:0,30 máx:0,87) (Tabla N°2).





Figura N°48. Inmunodetección de BMP-2 a los 21 días post-implante de MOD. A) fotografía incluye un sector de células mesenquimáticas (CM) pluripotentes, cartílago (C) y sitio de osificación. La inmunomarcación se aprecia en las células CM pluripotentes, condrocitos (Co) y sector de osificación (Os). B) Análisis digital de la misma fotografía, en rojo se expresan la señalización de BMP. IHQ BMP 200X.; C) BMP se encuentra expresada en las CM vecinas al cartílago (C). 200X.



Figura Nº49. Inmunodetección de BMP-2. En la fotografía se observa un sector con espículas (E) óseas nuevas. BMP se encuentra señalando en células osteoprogenitoras (\*), osteoblastos (Ob) presentes en las superficies espiculares y osteocitos (Oc). 200X.

OPN se evidenció en los sitios de osificación, en el citoplasma de los condrocitos hipertróficos próximos al hueso nuevo y en los bordes de los condroplastos que los contenían. En estos sectores la matriz extracelular se hallaba teñida por la hematoxilina sin presencia de OPN. En las espículas directrices OPN estaba presente en la matriz extracelular, en el osteoide, en los osteocitos, osteoplastos y osteoclastos. En las líneas de erosión los osteoclastos que expresaban OPN en el citoplasma se hallaban en contacto con la matriz extracelular en los sitios inmunomarcados por OPN. En las líneas de erosión los osteoblastos cuboidales se encontraban depositando osteoide inmunomarcado por OPN (Figura N°53 A)

En las espículas OPN inmunomarcó en la matriz extracelular de las trabéculas, osteoblastos, osteoclastos y osteocitos. En los espacios intertrabeculares OPN se encontró en la matriz y en las células allí presentes (Figura N°53 B). En esta fase de la reparación la DO fue 0,17 ( $\pm$ 0,05; min: 0,11-máx:0,28) en tanto la DOI se registró en 6,22 ( $\pm$ 3,22; min:2,83-máx:13,78) (Tabla N°2).

OC se inmunodetectó en las espículas óseas nuevas, allí se encontró distribuida de forma heterogénea en la matriz de las mismas y rodeando a los osteocitos, también marcados por OC (Figura N°54). La DO para OC en este estadio de la reparación fue 0,34 (±0,15; min: 0,20 máx: 0,54) en tanto la DOI se encontró en 0,53 (±0,66; min: 0,11 máx: 1,89) (Tabla N°2).

Luego de 30 días, BMP-2 se expresó en condrocitos, en el tejido cartílaganoso y en los osteoblastos cuboidales que cubrían las superficies de las trabéculas y en la matriz de las mismas (Figura N°55). Los registros indicaron que la DO fue 0,18 ( $\pm$ 0,06; min: 0,14-máx: 0,27) y DOI 2,07 ( $\pm$ 2,14; min: 0,45-máx: 5,20) (Tabla N°2).

La proteína WNT se halló en los osteoblastos y preosteoblastos (Figura N°56). El análisis de las densidades fue DO 0,19 ( $\pm$ 0,06) (min: 0,11-máx: 0,26) y DOI 6,45 ( $\pm$ 7,42) (min:0,06-máx:21,76) (Tabla N°2).



Figura N°50. Inmunodetección de WNT a los 21 días. A) En sector de espículas óseas nuevas. WNT inmunoseñala en las CM, tejido cartilaginoso (C), condrocitos (Co), condrocitos hipertróficos próximos a los sitios de osificación (Os), preosteoblastos (POb) que se encontraban entre las trabéculas (E), y en osteocitos (Oc) trabeculares. B) Análisis digital de la misma microfotografía, en negro se destaca la presencia de WNT. 200X



Figura N°51. A) Inmunomarcación de Runx2 Corte histológico de sección que incluye sector de células mesenquimáticas (CM), sitio de condrogénesis (CG) y cartílago (C) al que se practicó IHQ para inmunodetectar Runx2. 200X. B) Análisis digital de la misma imagen, en color rojo se aprecia la inmunomarcación de Runx2. 200X.



En relación a Runx2, se encontró en los preosteoblastos. En el cartílago se presentó en el 30,21% de condrocitos hipertróficos contiguos a los sitios de osificación (Figura N°57). En tanto las DO y DOI para Runx2 fue  $0,21 (\pm 0,09)$  (min: 0,08-máx: 0,43) y  $0,72 (\pm 1,02)$  (min: 0,01-máx: 4,97) respectivamente (Tabla N°2).

OPN se encontró en los mismos sitios histológicos reportados a los 21 días. En el tejido cartilaginoso se hallaba en algunos condrocitos hipertróficos cercanos al lugar de la osificación. En los lugares de osificación algunos condroplastos se hallaban inmunomarcados, otros se fusionaban y contenían osteoblastos que también inmunomarcaban OPN (Figura N°58). Era elemento constitutivo de las trabéculas óseas, en ellas presentaba densidades heterogéneas de mayor densidad óptica en los osteocitos y en la matriz que los rodeaba. A los 30 días la DO fue 0,140 (min: 0,082-máx: 0,284) y la DOI 2,522 (min: 0,086-máx: 8,074) (Tabla N°2).

OC se expresó en la zona de osificación del cartílago, particularmente en los osteoblastos y en las superficies de las directrices en formación. Asimismo, se presentaba distribuida en forma heterogénea en la MEC de las espículas óseas en formación, donde además inmunomarcaba en los osteocitos, superficie espicular y osteoblastos. En los lugares donde predominaban las trabéculas óseas, OC se encontró en la matriz y osteocitos; los osteoblastos no se encontraban señalados (Figura N°59). Respecto a la DO, ésta fue 0,26 ( $\pm$ 0,22; min: 0,09 máx:0,95) y la DOI 8,46 ( $\pm$ 12,8; min: 0,40 máx:49,83) (Tabla N°2).



Figura N°53. Inmundetección de OPN a los 21 post-tratamiento. A) La imagen incluye cartílago (C) tejido mesenquimático donde las células mesenquimáticas (CM) se encuentran marcadas, un área de osificación (Os) donde se identifican células fenotípicamente semejantes a condrocitos hipertróficos señalando OPN (<); en el área de osificación había osteoblastos (Ob) marcados por OPN al igual que en la matriz extracelular ósea (\*) de las espículas (E). 200X; B) espículas óseas (E) con presencia heterogénea de OPN que poseen osteocitos (Oc) en sus matrices igualmente señaladas conteniendo, sobre sus superfícies se hallan osteoblastos (Ob) y osteoclastos (OC) marcando OPN al igual que los pre osteoblastos que ocupan los espacios inter espiculares. 400X.



Figura N°54. Inmunodetección de OC. La proteína se encuentra inmunomarcada de forma heterogénea (\*) en la matriz de las espículas óseas rodeando a los osteocitos (Oc), preosteoblastos (POb), osteoblasto (Ob). 400X.



Figura Nº55. A) Inmunomarcación de BMP-2 en los preosteoblastos, osteoblastos y osteocitos, 400X. B) análisis digital de la fotografía A donde se destaca en rojo los sitios inmunomarcados por BMP-2. 400X



Figura Nº56. Inmunomarcación de WNT. A) Inmunolocalización de WNT en los osteoblastos presentes en la superficie de las trabéculas y en los preosteoblastos que se encuentran en los espacios intertrabeculares; B) análisis digital de la microfotografía A, en rojo se destaca WNT. 200X.



B Figura N°57. Inmunomarcación de Runx2. A) Runx2 se encuentra en los preosteoblastos (POb) y osteoblastos (Ob); B) análisis digital de la fotografía (A) donde se aprecia en rojo la marcación de Runx2. 200X.



A) cartílago franqueado a la izquierda por células mesenquimáticas (CM) y a la derecha y arriba por cartílago (C) en proceso de osificación (Os). 200X. B) osificación del tejido cartilaginoso, los condrocitos más alejados comienzan manifestando OPN en sus citoplasmas (>), más tarde señala en los bordes de los condroplastos ( $\checkmark$ )algunos condroplastos contiene dos células en su interior ( $\checkmark$ ). Los condroplastos y células internas marcadas por OPN ( $\Leftarrow$ ) se fusionan entre ellas (>) creando espacios donde se depositan osteoblastos (Ob) 400X.



celulares (Gcel) contenidos en condroplastos donde la proteína se deposita en los bordes. En las espículas (E) la matriz posee OC se deposita homogeamente (\*). Los osteoblastos (Ob) y osteocitos (Oc) señalan tambén a la proteína. 200X

A los 60 días post-operatorio, BMP-2 inmunomarcó en la matriz ósea, con mayor densidad en los canales osteónicos y osteocitos aislados (Figura N°60). La DO registrada en este período fue 0,20 ( $\pm$ 0,08; min:0,11-máx:0,40) y la DOI fue 1,52 ( $\pm$ 1,88; min:0,16-máx:7,68) (Tabla N°2).

En tanto WNT se inmunomanifestó en los osteocitos y células de la médula ósea presente entre los espacios trabeculares (Figura N°61). La DO registrada fue 0,39 ( $\pm$ 0,17; min: 0,17-máx: 0,57) y la DOI 0,97 ( $\pm$ 2,07; min: 0,001-máx:5,20) (Tabla N°2).

Por otra parte, Runx2 se encontró en el hueso denso producto de la reparación de los defectos, en los osteocitos y células de la médula ósea (Figura N°62). Las DO y DOI a los 60 días de tratamiento fue 0,22 ( $\pm$ 0,01; min:0,21-máx:0,23) y 0,02 ( $\pm$ 0,02; min:0,01-máx:0,05) (Tabla N°2).

La proteína OPN se hallaba distribuida de forma heterogénea en el hueso laminar, en la matriz de las trabéculas. En el hueso laminar también se encontró en los osteocitos y en la

matriz que constituyen las láminas. En el hueso trabecular se encontraba en la superficie de sobre las que localizaban osteoblastos morfológicamente planos. (Figura N°63). La DO fue 0,10 ( $\pm$ 0,07; min: 0,01-max: 0,21) y la DOI 0,48 ( $\pm$ 0,60; min: 0,01-máx: 1,61) (Tabla N°2).

La OC se manifestó en la matriz extracelular de las trabéculas óseas, en los osteocitos y osteoblastos (Figura N°64). La DO fue 0,21 (±0,06; min: 0,12 máx:0,31) y la DOI 3,06 (±2,42; min: 0,01 máx:9,70) (Tabla N°2).



Figura Nº60. Inmunomarcación de BMP-2 a los 60 días post-tratamiento. En la microfotografía se observa hueso nuevo denso o cortical señalando BMP-2 en la matriz y con mayor intensidad en los canales y lagunas osteónicas. 100X.



Figura Nº61. Inmunomarcación de WNT en las trabéculas (T) óseas, osteocitos (Oc) y células de la médula ósea a los 60 días post-operatorio. 100X



Figura Nº62. Inmunodetección de Runx2 efectuada a los 60 días post-operatorio en hueso cortical producto de la reparación de defecto ortopédico.100X.



Figura Nº63. Inmunomarcación de OPN a los 60 días post-operatorio. OPN se encuentra distribuida homogéneamente en la matriz ósea (\*) y en mayor intensidad en los osteocitos (Oc). 200X.



Figura Nº64. Inmunodetección de OC a los 60 días post-tratamiento. La misma se encuentra distribuida homogéneamente en la MEC (\*), en osteoblastos (Ob) y osteocitos (Oc). 200X.
Luego de 150 días BMP-2 se halló distribuida en la matriz ósea, en los contornos de los canales osteónicos y osteocitos (Figura N°65). La DO fue 0,19 ( $\pm$ 0,08; min: 0,10-máx: 0,27) y la DOI era 3,88 ( $\pm$ 6,30; min: 0,62-máx: 16,70) (Tabla N°2).

WNT se encontró en escasos osteocitos y en las células de la médula ósea presentes entre los espacios trabeculares (Figura N°66). La DO fue 0,36 (±0,12; min: 0,26-máx: 0,55) y DOI 0,27 (±0,23; min: 0,03-máx: 0,62) (Tabla N°2).

En cuanto a Runx2, ésta fue inmunodetectada en osteocitos que ocupaban las lagunas de las osteonas (Figura N°67). La DO en este período estudiado fue 0,22 ( $\pm$ 0,01; min: 0,21 - máx: 0,23) y la DOI, 0,02 ( $\pm$ 0,02; min: 0,01 - máx: 0,05) (Tabla N°2).

La OPN estaba distribuida en la matriz ósea en donde se presentaban en depósitos circulares en concordancia con las láminas concéntricas de las osteonas (Figura N°68). La DO fue 0,35 ( $\pm$ 0,41; min: 0,14-max: 0,97) y la DOI ,80 ( $\pm$ 3,36; min: 1,27- máx: 8,37) (Tabla N°2).

OC inmunoseñaló de forma homogénea en la MEC del hueso laminar denso como así también en los osteocitos (Figura N°69). La DO en este período de estudio fue 0,05 ( $\pm$ 0,24; min: 0,05 máx: 0,37) y la DOI 4,24 ( $\pm$ 3,68; min: 0,51 máx: 9,60) (Tabla N°2).



Figura N°65. Inmunomarcación de BMP-2 en hueso denso laminar luego de 150 días post-tratamiento. BMP-2 se encuentra en la matriz y en mayor densidad óptica en los canales osteónicos (CnO) y en las lagunas que ocupan los osteocitos (\*). 200X.

00

Figura Nº66. Inmunomarcación para WNT luego de 150 días post-tratamiento. WNT se encuentra en ciertos osteocitos y células de la médula ósea. 200X.



Figura Nº67. Inmunomarcación de Runx2 en osteocitos (Oc) luego de 150 días post-tratamiento en hueso denso laminar (\*). 200X.



Figura Nº68. Inmunomarcación de OPN a los 150 días post-tratamiento. La proteína se encuentra distribuida en la en la matriz ósea (\*) del hueso denso laminar, depositada en correspondencia con las lamelas de las osteonas (DOPN) y en los oluego de 150 días post-tratamiento. OPN conforma depósitos en concordancia con la lamelas de las osteonas (DOPN. También se encuentra en los osteocitos (Oc). 200X.



Figura Nº69. Inmunodetección de OC en hueso denso laminar (\*) y en osteocitos (Oc) luego de 150 días post-tratamiento. 200X.

### 4.5. Densidad óptica (DO) y densidad óptica integrada (DOI)

En la Tabla N°2 se reúnen los resultados de las medias de las DO y DOI halladas a los 7, 15, 21, 30, 60 y 150 días de cada molécula estudiada. Esos valores fueron empleados para trazar gráficos de líneas a efectos de cuantificar la participación de BMP-2, WNT, Runx2, OPN y OC en los distintos períodos estudiados en la reparación de los defectos óseos

La DO de BMP-2 indicó que ésta tuvo un incremento a los 21 días y luego decayó a los 30 para elevarse hasta los 60 días y decaer levemente a los 150 días (Figura N°70). Por su parte, la DOI mostró marcada intensificación a los 15 días, que se sostuvo hasta los 21 días a partir de los cuales descendió hasta los 60 y para aumentar hacia los 150 días (Figura N°71).

La DO de WNT tuvo un valor basal a los 7 días, aumentó hacia el día 15 para decaer a los 21 días e incrementarse hasta los 60 días, a partir de los cuales descendió hasta alcanzar valores próximos a cero (Figura N°72). La DOI tuvo un comportamiento disímil en relación a la DO; ya que tuvo un aumento a los 15 días a partir del valor basal de los 7 días; luego decayó a los 21 días y nuevamente se elevó hasta los 60, para luego descender levemente a los 150 días (Figura N°73).

Para Runx2, la DO tuvo un comportamiento bifásico con dos picos que alcanzaron valores similares a los 21 y 60 días. Luego descendió hasta los 150 días alcanzando valores similares a los 30 días (Figura N°74). Por otro lado, la DOI de Runx2 mostró un alto nivel de densidad a los 15 días y fue disminuyendo hacia los 150 días, alcanzando valores cercanos a cero a excepción del día 30 donde tuvo un leve incremento (Figura N°75).

Los registros observados de DO para OPN indican que ésta se duplicó a los 15 días, a partir de los cuales descendió hasta los 60 días, para ascender considerablemente hacia el día 150 (Figura N°76). En cuanto a la DOI, si bien tuvo un comportamiento similar, se manifestó marcadamente a los 15 días para descender hasta los 60 días y luego incrementarse hacia el día 150 (Figura N°77).

La DO de OC registró incremento hasta el día 21 a partir de los cuales descendió hasta los 150 días (Figura N°78). La curva de DOI mostró picos de máxima densidad a los 15 y 30 días alternados con decaimiento de las densidades a los 21 y 60 días para finalizar con un leve aumento a los 150 días (Figura N°79).



Figura Nº70. Representación gráfica de las medias de las DO de BMP en el período de estudio.







Figura Nº72. Representación gráfica de las medias de las DO de WNT en el período de estudio.



Figura Nº73. Representación gráfica de las medias de las DOI de WNT en el período de estudio.



Figura Nº74. Representación gráfica de las medias de las DO de Runx2 en el período de estudio.





Figura Nº76. Representación gráfica de las medias de las DO de OPN en el período de estudio.





La DO de OC registró incremento hasta el día 21 a partir de los cuales descendió hasta los 150 días (Figura N°76). La curva de DOI mostró picos de máxima densidad a los 15 y 30 días alternados con decaimiento de las densidades a los 21 y 60 días para finalizar con un leve aumento a los 150 días (Figura N°77).

## 4.6. Resultados estadísticos

El análisis estadístico de los resultados obtenidos en los seguimientos radiológicos mostró diferencias significativas entre los controles realizados a los 15, 21 y 30 días, mientras que no se registraron diferencias significativas entre las áreas cubiertas de hueso nuevo a los 60 y 150 días (p>0,05).

El análisis ANOVA y test comparativo LSD de Fisher para las DO de BMP-2 creó dos grupos de comparación con los que se estableció que hubo diferencias estadísticamente significativas (p>0,05) en las observaciones realizadas a los 7 y 15 días respecto a los 21 y 60 días y no hubo diferencias en las observaciones a los 30 y 150 días (Tabla N°3). En relación a la DOI el ANOVA y Test LSD Fisher generó dos grupos de comparación mediante los cuales se estableció que hubo diferencias significativas (p>0,05) entre los controles de 7,15, 21 y 150 días y no hubo diferencias entre los 30 y 60 días post-tratamiento (Tabla N°4).

#### Tabla N°3

Resultado de las comparaciones de las medias del test LSD de Fisher para las densidades ópticas (DO) de BMP-2

	Media	Clasificación 1	Clasificación 2
7 días	0,14	А	
15 días	0,14	А	
30 días	0,18	А	В
150 días	9,19	А	В
60 días	0,20		В
21 días	0,20		В

<sup>(1)</sup> Medidas con una letra común no son significativas diferentes (p>0,05)

Tabla N°4

Resultado de las comparaciones de las medias del test LSD de Fisher para las densidades ópticas integradas (DOI) de BMP-2

	Media	Clasificación 1	Clasificación 2
7 días	0,77	А	
60 días	1,52	А	В
30 días	2,07	А	В
21 días	3,49		В
15 días	3,55		В
150 días	3,88		В

<sup>(1)</sup> Medidas con una letra común no son significativas diferentes (p>0,05)

Para WNT, el ANOVA y la comparación de las medias mediante el Test LSD de Fisher para DO generó tres grupos de clasificación, el primer grupo incluyó a las medias de los 15, 60 y 150; el segundo grupo lo constituyeron las medias de los 21 y 30 días y el tercer grupo las medias de los 7 y 21 días. La clasificación permitió establecer que no hubo diferencia significativa entre las medias de los 15, 60 y 150 días. La comparación de las medias clasificadas estableció que no hubo diferencias estadísticamente significativas a los 21 días. Las medias, que se vieron incrementadas entre los grupos, indicó que la DO tenía diferencia estadísticamente significativa (p>0.05)entre las técnicas de inmunohistoquímicas realizadas del grupo de clasificación 1 (15, 60 y 150 días) con las medias del grupo de clasificación 2 (21 y 30 días), mientras que la DO a los 7 días poseía diferencia (p>0.05) con las medias los grupos 1 y 2 (a excepción de los 21días) (Tabla N°5). El mismo análisis estadístico arrojó que para DOI hubo diferencias significativas (p>0.05) entre las medias de los 30 días respecto a los 60 y 150 días (Tabla N°6).

Respecto a Runx2, el test comparativo LSD de Fisher para las medias de las DO estableció 3 grupos comparativos. Al primer grupo lo conformaron las medias de los controles realizados a los 7 y 15, al segundo grupo las medias de los días 15 y 150 días y al tercer grupo las medias tomadas a los 21, 30, 60 y 150 días. Entre los grupos hubo diferencia significativa (p>0,05) entre las medias de los 7 días, respecto a las medias correspondientes a los 21, 30 y 60 días (Tabla N°7). Con referencia a la DOI, el Test LSD Fisher indicó que hubo diferencias significativas (p>0,05) entre las medias de los días 7 y 150 (Tabla N°8). Para OPN el análisis de contraste LSD Fisher también conformó tres grupos de clasificación. Entre estos grupos hubo diferencias significativas (p>0,05) a los 7, 21 y 150 días (Tabla N°9).

Las medias de la DOI también compusieron tres grupos de clasificación. En la comparación efectuada por el Test de Fisher de las medias de los DOI estableció que las medias del primer grupo (7 y 60 días) poseían diferencias significativas (p>0,05) con la media de los 15 días (tercer grupo de clasificación) (Tabla N°10).

El ANOVA y análisis de contraste LSD Fisher de OC para la DO conformó dos grupos de clasificación. Entre estos grupos hubo diferencias significativas (p>0,05) entre las medias de los 7 y 60 días con respecto a los 15, 21 y 150 días (Tabla N°11). Las medias de la DOI también compusieron dos grupos de clasificación el primero estaba integrado con las

medias de los 7, 15, 21, 60 y 150 días y el segundo grupo lo integraban las medias de los días 15, 30 y 150 días. En la comparación efectuada por el Test de Fisher hubo diferencias estadísticamente significativas (p>0,05) entre las DOI de los 7, 21 y 60 días respecto a los 30 días y no hubo diferencias a los 15 y 150 días (Tabla N°12).

## Tabla N°5

para las densidades opticas (DO) de WNT						
	Media	Clasificación 1	Clasificación 2	Clasificación 3		
60 días	0,39	А				
150 días	0,36	А				
15 días	0,31	А				
30 días	0,03		В			
21 días	0,14		В	С		
7 días	0,10			С		

Resultado de las comparaciones de las medias del test LSD de Fisher para las densidades ópticas (DO) de WNT

<sup>(1)</sup> Medidas con una letra común no son significativas diferentes (p>0,05)

## Tabla N°6

Resultado de las comparaciones de las medias del test LSD de Fisher para las densidades ópticas integradas (DOI) de WNT

	Media	Clasificación 1	Clasificación 2
30 días	6,45	А	
15 días	5,27	А	В
7 días	3,15	А	В
21 días	1,77	А	В
60 días	0,97		В
150 días	0,27		В

<sup>(1)</sup> Medidas con una letra común no son significativas diferentes (p>0,05)

#### Tabla N°7

Resultado de las comparaciones de las medias del test LSD de Fisher para las densidades ópticas (DO) de Runx2

	Media	Clasificación 1	Clasificación 2	Clasificación 3
7 días	0,13	А		
15 días	0,18	А	В	
150 días	0,22		В	С
30 días	0,24			С
60 días	0,29			С
21 días	0,30			С

<sup>(1)</sup> Medidas con una letra común no son significativas diferentes (p>0,05)

## Tabla N°8

	Media	Clasificación 1	Clasificación 2
150 días	0,02	А	
60 días	0,15	А	В
7 días	0,39	А	В
21 días	0,58	А	В
30 días	0,93	А	В
15 días	1,21		В

Resultado de las comparaciones de las medias del test LSD de Fisher para las densidades ópticas integradas (DOI) de Runx2

<sup>(1)</sup> Medidas con una letra común no son significativas diferentes (p>0,05)

#### Tabla N°9

Resultado de las comparaciones de las medias del test LS	D de Fisher
para la densidad óptica (DO) de OPN	

	Media	Clasificación 1	Clasificación 2	Clasificación 3
7 días	0,08	А		
60 días	0,10	А	В	
30 días	0,14	А	В	
21 días	0,17		В	
15 días	0,20		В	С
150 días	0,35			С

<sup>(1)</sup> Medidas con una letra común no son significativas diferentes (p>0,05)

#### Tabla N°10

Resultado de las comparaciones de las medias del test LSD de Fisher Para la densidad óptica integrada (DOI) de OPN

	Media	Clasificación 1	Clasificación 2	Clasificación 3
60 días	0,48	А		
7 días	1,64	А		
30 días	2,52	А	В	
150 días	3,80	А	В	С
21 días	6,22		В	С
15 días	9,26			С

<sup>(1)</sup> Medidas con una letra común no son significativas diferentes (p>0,05)

#### Tabla N°11

Resultado	de las	compara	aciones	de las	medias	del to	est LSD	de Fisher
	]	Para la d	lensida	d óptic	a (DO)	de O	С	

		- · · /	
	Media	Clasificación 1	Clasificación 2
7 días	0,20	Α	
60 días	0,21	А	
30 días	0,26	А	В
15 días	0,28		В
150 días	0,32		В
21 días	0,34		В

<sup>(1)</sup> Medidas con una letra común no son significativas diferentes (p>0,05)

#### Tabla N°12

Resultado de las comparaciones de las medias del test LSD de Fisher Para la densidad óptica integrada (DOI) de OC

	Media	Clasificación 1	Clasificación 2
21 días	0,53	А	
7 días	1,97	А	
60 días	3,06	А	
150 días	4,24	А	В
15 días	5,19	А	В
30 días	8,46		В

<sup>(1)</sup> Medidas con una letra común no son significativas diferentes (p>0,05)

#### 4.7. Discusión

A los fines de garantizar el abastecimiento de MOD alogénica para el experimento y que además conservara las propiedades osteoinductiva y osteoconductiva, se resolvió estandarizar un protocolo en base a los previamente publicados Urist, 1965; Urist *et al.*, 1973; Halfeldt *et al.*, 1995; Han *et al.*, 2005). Una vez obtenida la matriz desmineralizada se procedió a caracterizar el producto obtenido según propiedades histológicas y biológicas, entendiendo como propiedad biológica a la capacidad de generar hueso nuevo en el sitio donde es implantado, incluso en sitios extra esqueléticos (Urist, 1965) u osificación heterotópica (Vanden Bossche y Vanderstraeten, 2005).

El modelo animal y quirúrgico seleccionado fue empleado con anterioridad en investigaciones similares (da Silva *et al.*, 2003; Bigham *et al.*, 2008) y respondió a la necesidad de evitar sistemas de fijación interna o esquelética externa que pudieran interferir con el proceso de reparación. Las investigaciones referidas a las propiedades e

indicaciones clínicas de MOD suelen utilizar matrices de origen comercial (Wang *et al.*, 2001; Louis-Ugbo *et al.*, 2004; Peterson *et al.*, 2004; Acarturk y Hollinger, 2006; Wildemann *et al.*, 2007; Hoffer *et al.*, 2008; Bae *et al.*, 2010; Markel *et al.*, 2012; Bigham *et al.*, 2013; Bigham *et al.*, 2015; Brown *et al.*, 2016), provenientes de bancos de tejidos (Han *et al.*, 2003; Rodrigues y Filho, 2005; Boudrieau, 2009), y en menor grado, procesada por los respectivos equipos de investigación (Kawcak *et al.*, 2000; Bigham *et al.*, 2008; Koga *et al.*, 2016).

Los procedimientos no generaron traumatismo quirúrgico severo en los animales, pues tanto los conejos del grupo tratamiento como del grupo control tuvieron pronta recuperación clínica que se tradujo en la ingesta de alimentos y agua como así también pronto retorno del uso funcional del miembro intervenido. Los conejos que recibieron tratamiento no registraron síntomas compatibles con rechazos como fiebre, secreciones, edematización del miembro involucrado, entre otros.

A diferencias de otros protocolos para procesar MOD, en el empleado en la presente experiencia primero se procedió a la molienda de los fragmentos hasta obtener las partículas de tamaño deseado. El motivo respondió a facilitar la acción de los solventes para retirar los lípidos de las partículas y con ello garantizar una adecuada acción de la solución ácida.

En nuestro estudio se utilizo cromatografía gaseosa para determinar residuos lipídicos en la MOD, la bibliografía consultada no refiere el uso de esta técnica. Hunter *et al.*, (2011) emplearon la técnica de GC-MS para determinar residuos de alandronato en MOD humana. El protocolo de desmineralización fue de fácil ejecución y no requirió equipamiento de complejidad. El procedimiento demandó aproximadamente 36 horas para obtener un producto osteoinductivo (Audisio *et al.*, 2014).

Entre los factores que se tuvieron en cuenta para garantizar la osteoinducción de la MOD fue la edad de los animales de los cuales se obtendría las diáfisis para procesar. En ese sentido se resolvió emplear huesos largos de conejos jóvenes, pues poseen mayor contenido de la proteína BMP que los animales adultos (Zhang *et al.*, 1997).

La decisión de emplear el molino cuyas cuchillas giraban a una velocidad de 20.000 r.p.m. se debió a que se quería garantizar un tamaño y forma de las partículas que contribuyeran con la osteoinductividad. De forma similar a Sampath y Reddi (1984), se obtuvieron partículas cuyas superficies y formas resultaron homogéneas que midieron entre 200 y 750

μm, brindando resultados osteoinductivos que permitieron la reparación de defectos óseos ortopédicos de tamaño crítico. Es importante de destacar que el tamaño de las partículas de MOD influye en la interacción con las células mesenquimáticas, pues si son demasiado pequeñas pueden ser reabsorbidas sin provocar osteoinducción (Sampath y Reddi, 1984) y si resultan muy grandes se comportan como cuerpos extraños (Sampath y Reddi, 1984; Vail *et al.*, 1994; Zhang *et al.*, 1997; Klüppel *et al.*, 2013; Koga *et al.*, 2016).

Con posterioridad al implante de las partículas de MOD, las células mesenquimáticas se pondrían en contacto con las moléculas de BMP-2 para dar inicio a la proliferación y diferenciación en condrocitos y osteoblastos. Para que la BMP-2 ejerza su propiedad osteogénica, ésta requiere encontrarse unida a un carrier específico (Peel *et al.*, 2003) que la retenga en el sitio del implante y en las concentraciones requeridas (Uludag *et al.*, 2001; Woo *et al.*, 2001); y la MOD es el vehículo natural. Cuando los osteoclastos intervinieron absorbiendo a las partículas de MOD expusieron a las moléculas de BMP-2 contenidas en el interior de la matriz y así prolongó la acción sobre las CM liberándose entre 15 y 21 días post-tratamiento.

En referencia a la concentración de la solución ácida y tiempo de exposición a la que fueron sometidas las partículas de hueso, no alteraron la arquitectura histológica de la matriz. Si la concentración se hubiera incrementado con el fin de acortar el tiempo de desmineralización la arquitectura histológica se habría alterado aumentando el tamaño de los poros de la matriz (Figueiredo *et al.*, 2011). Por otra parte, Pietrzak *et al.*, (2011) reportaron que cuando los baños ácidos son prolongados se afecta negativamente la osteoinductividad pues BMP, que difunde hacia la solución, lo hace en mayor cantidad sin considerar la cantidad de mineral que se desaloja de la matriz.

Los estudios realizados por microscopía óptica y electrónica mostraron que las partículas de MOD conservaron la arquitectura histológica característica del hueso que permitió la interacción con las CM y los osteoclastos a las que reconocen.

Nuestro método posibilitó La conservación de las propiedades físico química y logrando que las CM hallaran un medio propicio para iniciar la reparación. Este principio de osteoinductividad es el que se comprobó en los desafíos biológicos cuando se implantó la MOD en los músculos bíceps femoris (Kawakami *et al.*, 2001).

En nuestra experiencia las características y propiedades analizadas de la MOD son consistentes con la hipótesis de Urist (1970) de que el carrier ideal para las BMPs debe

permitir una liberación de la proteína durante las primeras 24 horas post-implantación y sostenerse en las semanas subsecuentes. Por esta razón, el tiempo de exposición de BMP a las CM puede ser crítico para que se inicie y sostenga la formación de hueso. Aunque otras investigaciones concluyen en que la expresión de BMP por un corto período de tiempo es suficiente y de carácter irreversible para inducir la formación de hueso (Noël *et al.*, 2004). En cuanto a las observaciones radiológicas el patrón de reparación de los defectos parecía indicar que la reparación de los mismos se estaba realizando por osteoconducción. No obstante, las observaciones histológicas mostraron que la reparación se realizó por osteoinducción.

La esterilización de la MOD tiene como objetivo erradicar microorganismos contaminantes producto de la manipulación incluso la potencial presencia de virus presentes en el hueso cortical (Swenson y Amoczkv, 2003). El alcohol etílico mostró ser un medio de conservación eficaz y seguro pues no se registraron infecciones y/o abscesos producto de contaminaciones por microorganismos, y preservó las propiedades osteoinductiva y osteoconductiva. A la vez es económico y de fácil manipulación respecto a las metodologías reportadas (Han *et al.*, 2005; Wong *et al.*, 2014).

La MOD implantada que no era identificada en las imágenes radiológicas tomadas a los 7 días post-tratamiento puede ser analizada en dos sentidos. En primer término, se puso de manifiesto la eficiencia de la desmineralización. Diversas técnicas y protocolos de desmineralización generaron MOD que radiológicamente demostraban densidades variables (Paskalev *et al.*, 2006; Ozdemir y Kit, 2011). En segundo lugar, las comparaciones radiológicas permitieron establecer el progreso de las reparaciones de los defectos cuantificando incremento relativo del hueso nuevo que los ocupaba (Audisio *et al.*, 2014).

En el presente trabajo de tesis, mediante técnicas histológicas de rutina y técnicas inmunohistoquímicas se estudiaron las expresiones de las fases de proliferación, síntesis, maduración y mineralización de la matriz para poner en evidencia a las proteínas BMP, WNT, Runx2, OPN y OC. A través de estas proteínas se establecieron los cambios celulares e histológicos que concluyeron en la reparación de los defectos óseos ortopédicos.

La inmunodetección de BMP-2, OPN y OC en las partículas de MOD fue predecible por cuanto son proteínas constitutivas de la matriz ósea desmineralizada MEC ósea. Éstas son

proteínas no colágenas constitutivas de la matriz orgánica, siendo OPN la proteína que más abunda luego del colágeno (Oldber *et al.*, 1986), mientras que las marcaciones de WNT y Runx2 respondieron a la actividad de las CM que arribaron, proliferaron y luego se diferenciaron hacia el linaje óseo.

Las partículas de MOD oficiaron de vehículo de la proteína BMP-2 para ser ofrecida a las CM que arribaron al defecto. Las células que ocupaban los espacios existentes entre las partículas de MOD inmunoseñalaron OPN, WNT y Runx2. La presencia de OPN sugiere que ésta se encontraría cumpliendo el rol de adhesión que posibilita la migración y sobrevida celular por interacción de la secuencia aminoacídica Arg-Gli-Asp (RGD) con las integrinas de membrana (Sodek y Ganss, 2000; Lesley *et al.*, 2000; Standal *et al.*, 2004).

La manifestación de WNT en las CM se relaciona con el rol que ésta posee en la esqueletogénesis (Mori-Akiyama *et al.,* 2003) mediante diferenciación de los osteoblastos y condrocitos (Luo *et al.,* 2004; Rodda y McMahon, 2006).

La inmunnoseñalización de BMP, WNT y Runx2 durante la proliferación y diferenciación celular como así también los cambios que se producen a nivel de la agregación y condensación de las CM durante la reparación de los defectos, se condice con funciones de esas proteínas en la embriogénsis e in vitro (Rawadi *et al.*, 2003, Fujita *et al.*, 2004; Phimphilai *et al.*, 2006). Para que se inicie esta primera etapa de la reparación se requiere adecuado tamaño de las partículas de MOD y que a la vez sean reconocidas tanto por las CM y osteoclastos. La conjugación de estos elementos posibilitó que la BMP desempeñe un rol crítico para la osteoinducción, la agregación y compactación de las CM, condensaciones pre-cartilaginosas con posterior diferenciación en condrocitos (Yoon *et al.*, 2005; Barna y Niswander, 2007) a la que se suma y complementa Wnt (Nelson, 2008). Otros autores como producto de sus investigaciones embriológicas le atribuyen las condensaciones a la expresión de Runx2 (Lenger *et al.*, 2002; Smith *et al.*, 2003; Komori, 2005).

Cabe destacar, que en el presente ensayo los osteoclastos reabsorbieron por completo a las partículas de MOD entre los 15 y 21 días post-implante, por lo que resulta evidente que actuaron en consecuencia al reconocimiento de la matriz ósea como tal. Esto se posibilita por la presencia de OPN. Con dicha proteína se lograría el anclaje de los osteoclastos a la matriz ósea (Reinholt *et al.*, 1990).

En nuestro estudio, la reabsorción de la MOD inició la reparación por osteoinducción como ya lo establecieron otros autores (Urist, 1965; Forel *et al.*, 1993; Kao y Scott, 2007. La MOD de conejo, al igual que la proveniente de hueso cortical de perro (Forel *et al.*, 1993) mostró capacidad osteoinductiva, a diferencia de la MOD de caballo (Kawcak *et al.*, 2000) y babuino (Ripamonti, 1991) donde la formación de hueso nuevo se realizó a por aposición y no por osificación endocondral.

La osificación transcondral sería el modelo de reparación que se presentó en los defectos óseos ortopédicos tratados con MOD. Con la tinción de HE y las inmunomarcaciones de BMP, WNT, Runx2, OPN y OC se obtuvo información que analizada en su conjunto sustenta la transdiferenciación y con ella la osificación transcondral. Este modelo de osificación se observó en la experiencia a partir de los 15 días y se hizo más evidente a los 21 y 30 días post-implante de MOD de forma similar a los reportes de Kawakami *et al.*, (1998, 2001)

La osteogénesis transcondral también requirió de una matriz de cartílago. Sólo que el cartílago, tal lo observado, no tuvo origen embrionario, sino que se generó a partir de la proliferación, condensación y diferenciación de las CM desencadenada por BMP-2 en coordinación con WNT; que a la vez posibilitaron la expresión de Runx2 (Grace *et al.,* 2011). Este nuevo tejido condral posee características similares al cartílago hialino de las placas de crecimiento en cuanto posee condrocitos pre-hipertróficos e hipertróficos, pero que también contendrían células condro osteoprogenitoras. En ellos, se expresaron BMP y Runx2 y en menor proporción WNT. La expresión de BMP y WNT corresponden con los reportes que dan cuenta que intervienen en la diferenciación de los condrocitos a condrocitos hipertróficos (Wang *et al.,* 2013; Takegamia *et al.,* 2016). La forma de intervenir sería a través de Runx2 que regula la transcripción de los genes que controlan el ciclo celular de los condrocitos y de esta forma su capacidad proliferativa y de diferenciación celular (Galindo *et al.,* 2005; Galindo *et al.,* 2007).

La evidencia de la transdiferenciación se halla también a nivel de algunos condrocitos hipertróficos del cartílago en los sitios próximos a la osificación. Esta observación se debe a que se trata de células condro osteoprogenitoras, fenotípicamente semejantes a los condrocitos, y que no son condrocitos hipertróficos maduros (Lian *et al.*, 1993; O'Regan *et al.*, 2000). Cabe mencionar que la OPN y la fosfatasa alcalina (FA) son los primeros

indicadores metabólicos de los osteoblastos inmaduros (Zohar et al., 1998; Aubin et al., 1995).

La síntesis y depósito de OPN en la transdiferenciación también podría estar cumpliendo la función de posibilitar la adhesión de los osteoblastos y osteoclastos a las nuevas espículas óseas en formación entre los días 15 y 21 del ensayo. El depósito de BMP-2 en estos sitios aporta estímulo a los nuevos osteoblastos y promueve la proliferación de células precursoras de osteoblastos y preosteoblastos (Granjeiro *et al.*, 2005), de igual forma como sucedió con las células mesenquimáticas tal como lo reportaron Pizette y Niswander (2000).

En el hueso inmaduro reportado entre los 21 y 30 días post-tratamiento los osteoblastos continuaron proliferando producto de la actividad de BMP-2 que continuó inmunomarcando en los preosteoblastos y osteoblastos que se encontraban en los espacios intertrabeculares y sobre la superficie de las trabéculas. La migración de los osteoblastos estaría relacionada con el quimiotactismo positivo que ejerce Runx2 sobre éstos mediante un mecanismo de retroalimentación, como sucede en las fracturas óseas (Fujita *et al.,* 2004).

La proteína Runx2 es clave en la osteogénesis, a través de ella se transcriben las señales bioquímicas necesarias para influir en el ciclo celular y con la proliferación y diferenciación celular estimulando o deprimiendo la actividad de las células y de los mediadores que éstas producen, en coincidencia con Stricker *et al.*, (2002), Runx también se expresó, en los estadios avanzados de los condrocitos hipertróficos y osteoblastos. Promovió la diferenciación de los osteoblastos en las etapas iniciales y la inhibió en etapas posteriores de maduración celular. La diferenciación de células mesenquimáticas en osteoblastos se produjo por la intervención de Runx2 en diferentes fases del ciclo celular. Cada una de esas fases se caracteriza por un patrón particular de la expresión genética de los marcadores metabólicos de los osteoblastos (Bruderer *et al.*, 2014). Runx2 posibilitó la expresión de OPN, OC (Kern *et al.*, 2001), FA, BSP, OPN y colágeno Tipo I (Ducy *et al.*, 1996; 1997).

Conforme avanzó la reparación, los osteoblastos fueron quedando atrapados en su propia matriz donde algunos desaparecieron por apoptosis y otros se diferenciaron en osteocitos y células de revestimiento. El estudio de la DO y DOI posibilitó establecer la presencia/ausencia de las cinco proteínas estudiadas y a la vez cuantificarlas. Las cuantificaciones contribuyeron a establecer el grado de participación de cada proteína en el momento analizado como así también concluir acerca de las o interacciones entre ellas.

Las cinco proteínas se manifestaron a partir de los 7 días post-operatorio. La presencia de BMP-2, OPN y OC en las partículas de MOD corrobora que son elementos constitutivos de la matriz y que persisten a pesar del proceso de desmineralización. No obstante, no existen reportes que indique valores de la DO y DOI en matriz desmineralizada. Por otra parte, la expresión de WNT inducida por BMP-2, no solo a través de la vía canónica, al igual que con Runx2 indicó la presencia de las CM pluripotentes marcando el inicio de la cascada de eventos de proliferación y diferenciación celular.

# CAPÍTULO 5 CONCLUSIONES

- El protocolo modificado de desmineralización permitió obtener un producto osteoinductible confiable cuyas propiedades físicas y biológicas quedaron bien establecidas.
- El proceso de molienda influyó en la osteoinductividad de la MOD pues se obtuvieron partículas de tamaño y forma uniformes que contribuyeron en la interacción con el medio donde se implantó y con el acceso y adhesión de las células mesenquimáticas que arribaron para iniciar la reparación.
- La evidencia histológica estableció que la reparación de los defectos se llevó a cabo por intermedio de la capacidad osteoinductiva de la MOD.
- El alcohol etílico es un medio efectivo para conservar a la MOD en condiciones de asepsia y a la vez preservar las propiedades osteoinductivas.
- La inmunodetección de BMP-2, WNT, Runx2, OPN y OC proporcionaron la cronología de la diferenciación celular que concluyó en la reparación y curación de los defectos óseos ortopédicos experimentales La osteoinducción comenzó cuando las células mesenquimáticas que concurrieron al sitio tratado con la MOD se pusieron en contacto con la BMP-2 contenida en la matriz desmineralizada. A partir de ese momento por acción de BMP-2 en esas CM se desencadenó una cascada de acontecimientos bioquímicos que propició la síntesis de WNT, y ambas interactuaron posibilitando la expresión de Runx2. La proteína Runx2 permite el arribo de diversas citoquinas que celularmente se manifiesta en la proliferación y diferenciación celular.
- La reparación se efectuó por osificación transcondral mediante un proceso de transdiferenciación de un tipo de linaje celular que serían los condro osteoblastos.
- La determinación de la inmunoexpresión de las proteínas BMP-2, WNT, Runx2, OPN y OC mediante la densidad óptica y densidad óptica integrada posibilitó establecer el grado de participación y de significancia de cada una de ella en la diferenciación celular, tipos de células y en los períodos de estudios.
- La síntesis y depósito de OPN en la transdiferenciación también podría estar cumpliendo la función de posibilitar la adhesión de los osteoblastos y osteoclastos a las nuevas espículas óseas en formación. El depósito de BMP en estos sitios aportaria estímulo a los nuevos osteoblastos y promovería la

proliferación de células precursoras de osteoblastos y preosteoblastos, de igual forma como sucedió con las CM.

Se modificó y estandarizó un protocolo de desmineralización de matriz ósea con capacidad osteoinductiva comprobada, que cuando se la implantó en defectos óseos ortopédicos indujo la reparación por inducción de hueso nuevo. Las técnicas histológicas tradicionales e inmunohistoquímicas para BMP-2, WNT, Runx2, OPN y OC permitieron establecer las características y cronología de la proliferación y diferenciación celular. La tesis aporta conocimiento a nivel celular de la reparación de defectos óseos ortopédicos tratados con MOD que podrá ser empleado en la curación de defectos óseos amplios.

## REFERENCIAS

- 1. Aarden EM, Burger EH, Nijweide PJ. (1994). Function of osteocytes in bone. Journal of Cellular Biochemistry. 55(3): 287–299Akiyama T. (2000). Wnt/beta-catenin signaling. Cytokine Growth Factor Review. 11(4): 273–282. DOI: 10.1016/S1359-6101(00)00011-3.
- Acarturk TO, Hollinger JO. (2006). Commercially available demineralized bone matrix compositions to regenerate calvarial critical-sized bone defects. *Plastic & Reconstructive Surgery*. 118(4):862-873. DOI: 10.1097/01.prs.0000232385.81219.87.
- 3. Albrektsson T, Johansson C. (2001). Osteoinduction, osteoconduction and osseointegration. *European Spine Journal*. 10Suppl2: S96-101. DOI: 10.1007/s005860100282.
- 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, 2010. pp 534-535
- Alliston T, Choy L, Ducy P, Karsenty G, Derynck R. (2001). TGF-beta-induced repression of CBFA1 by Smad3 decreases cbfa1 and osteocalcin expression and inhibits osteoblast differentiation. *The EMBO Journal.* 20(9):2254-2272. DOI: 10.1093/emboj/20.9.2254.
- 6. Andersen TL. Sondergaard TE, Skorzynska, KE. Dagnaes-Hansen F, Plesner TL, Hauge EM, Plesner T, Delaisse JM. (2009). A physical mechanism for coupling bone resorption and formation in adult human bone. *American Journal of Pathology*. 174(1): 239–247. DOII: 10.2353/ajpath.2009.080627.
- 7. Anderson HC. (2003). Matrix vesicles and calcification. Current Rheumatology Rep; 5(3): 222–226. DOI: 10.1007/s11926-003-0071-z.
- 8. Ascenzi A, Bonucci E. (1968). The compressive properties of single osteons. *Anatomical Record* 161(3): 377–392.
- 9. Athanasiou AT, Papachristou DJ, Panagopoulos A, Saridis A, Scopa SD, Megas P. (2010). Histological comparison of autograft, allograft-DBM,xenograft, and synthetic grafts in a trabecular bone defect: An experimental study in rabbits. *Medical Science Monitor*. 16(1): 24-31.
- 10. Aubin JE, Liu F, Malaval L, Gupta AK. (1995). Osteoblast and chondroblast differentiation *Bone*. 17(2): S77-S83. DOI:10.1016/8756-3282(95)00183-E.
- 11. Aubin JE, Liu F. (1996). The osteoblasts lineage. En: Bilezikian JP, Raisz LG, Rodan GA, (eds.) *Principles of Bone Biology*. San Diego, California: Academic Press.
- 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.
- 13. 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.
- 14. Bae H, Li Z, Zhu D, Kanim LE, Wang JC, Delamarter RB. (2010). Variability across ten production lots of a single demineralized bone matrix product. *Journal Bone and Joint Surgery*. 92(2):427-435. DOI: http://dx.doi.org/10.2106/JBJS.H.01400.
- Bafico A, Liu G, Yaniv A, Gazit A, Aaronson SA, Bafico A. (2001). Novel mechanism of Wnt signalling inhibition mediated by Dickkopf-1 interaction with LRP6. *Nature Cell Biology*. 3(7): 683– 686. DOI: 10.1038/35083081.
- Bandyopadhyay A, Tsuji K, Cox K, Harfe, BD, Rosen V, Tabin CJ. (2006). Genetic analysis of the roles of BMP2, BMP4, and BMP7 in limb patterning and skeletogenesis. *PLoS Genetics*. 2(12):e216. DOI: 10.1371/journal.pgen.0020216.
- 17. Banks WJ. (1992). Tecidos de sustentação: osso. In: Banks WJ. Histologia veterinária aplicada. 2ed. Manole, São Paulo Brasil.
- 18. Barna M, Niswander L. (2007). Visualization of cartilage formation: insight into cellular properties of skeletal progenitors and chondrodysplasia syndromes. *Developmental Cell*. 12(5): 931-941.
- 19. Bauer TW, Muschler GF. (2000). Bone graft materials. An overview of the basic science. *Clinical Orthopaedic and Related Research*. 371:10-27.
- 20. Behrens J. (2000). Cross-regulation of the Wnt signalling pathway: A role of MAP kinases. *Journal of Cell Science*. 113(6): 911–919.
- 21. Bennett CN, Longo KA, Wright WS, Suva LJ, Lane TF, Hankenson KD, MacDougald OA. (2005). Regulation of osteoblastogenesis and bone mass by Wnt10b. *Proceeding of the National Academy of Science USA*. 102(9): 3324–3329.

- 22. Bennett CN, Ouyang H, Ma YL, Zeng Q, Gerin I, Sousa KM, Lane TF, Krishnan V, Hankenson KD, MacDougald OA. (2007). Wnt10b increases postnatal bone formation by enhancing osteoblast differentiation. *Journal of Bone and Mineral Research* 22(12):1924–1932.
- 23. Bigham AS, Dehghani SN, Shafiei Z, Nezhad ST. (2008). Xenogenic demineralized bone matrix and fresh autogenous cortical bone effects on experimental bone healing: radiological, histopathological and biomechanical evaluation. *Journal of Orthopaedics and Traumatology*. 9(2):73–80. DOI: 10.1007/s10195-008-0006-6.
- 24. Bigham AS, 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. http://doi.org/10.4142/jvs.2013.14.3.337
- 25. 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 Arhives*. 85(1):23-36.
- 26. Byeon YE, Ryu HH, Park SS, Koyama Y, Kikuchi M, Kim WH, Kang KS, Kweon OK. (2010). Paracrine effect of canine allogenic umbilical cord blood-derived mesenchymal stromal cells mixed with beta-tricalcium phosphate on bone regeneration in ectopic implantations. *Cytotherapy*. 12(5): 626-36. DOI: 10.3109/14653249.2010.481665
- 27. Bonewald LF. (1999). Establishment and characterization of an osteocyte-like cell line, MLO-Y4. *Journal of Bone and Mineral Metabolism*. 17:61–65.
- 28. Boskey AL, Roy R. (2008). Cell culture systems for studies of bone and tooth mineralization. *Chemical Review*. 108(11): 4716-4733. DOI: 10.1021/cr0782473
- 29. Boudrieau RJ. (2009), Tibial plateau leveling osteotomy or tibial tuberosity advancement?. *Veterinary Surgery*. 38(1):1–22. DOI: 10.1111/j.1532-950X.2008.00439.x
- 30. Boyle WJ, Simonet WS, Lacey DL. (2003). Osteoclast differentiation and activation. *Nature*. 423(6937): 337-342. DOI:10.1038/nature01658.
- 31. Brighton CT, Lorich DG, Kupcha R, Reilly TM, Jones AR, Woodbury RA2nd. (1992). The pericyte as a possible osteoblast progenitor cell. *Clinical Orthopaedic Related Research*. 275:287-299.
- 32. Browder LW, Erickson CA, Jeffery WR. (1991). Developmental Biology, 3rd ed. Saunders College Publishing, Philadelphia, USA
- Brown DM, Chung SH, Lantieri LA, Sampath TK, Hodge JC, Kania NM, Vannier, MW, Khouri RK. (1997). Osteochondral allografts with an intramedullary muscle flap in rabbits. *Clinical Orthopaedic Related Research*. 334:282-290.
- 34. Brown G, Kalff S, Gemmill TJ, Pink J, Oxley B, McKee WM, Clarke SP. (2016). Highly comminuted, articular fractures of the distal antebrachium managed by pancarpal arthrodesis in 8 dogs. *Veterinary Surgery*. 45(1):44–51. DOI: 10.1111/vsu.12417
- 35. Bruderer M, Richards RG, Alini M, Stoddart MJ. (2014). Role and regulation of Runx2 in osteogenesis. *European Cells and Materials*. 28:269-286
- 36. Brydone AS, Meek D, Maclaine S. (2010). Bone grafting, orthopaedic biomaterials, and the clinical need for bone engineering. *Journal of Engineering in Medicine*. 224(12): 1329–1343. DOI: 10.1243/09544119JEIM770.
- 37. Burgess TL, Quian Y, Kaufman S, Ring BD, Van G, Capparelli C. (1999). The ligand for osteoprotegerin (OPGL) directly activates mature osteoclasts. *Journal of Cell Biology*. 145(3): 527-38.
- 38. Cadigan KM, Nusse R. (1997). Wnt signaling: a common theme in animal development. Genes Development. 11(24): 3286-3305. DOI: 10.1101/gad.11.24.3286Genes & Dev. 1997. 11:3286-3305.
- Campagnoli C, Roberts IAG, Kumar S, Bennett PR, Bellantuono I, Fisk NM. (2001). Identification of mesenchymal stem/progenitor cells in human first-trimester fetal blood, liver, and bone marrow. *Blood*. 98(8): 2396-2402. DOI: 10.1182/blood.V98.8.2396.
- 40. Canalis E, Economides AN, Gazzerro E. (2003) Bone morphogenetic proteins, their antagonists, and the skeleton. Endocrinology Review. 24(2): 218–235. DOI: 10.1210/er.2002-0023.
- 41. Canfield AE, Doherty MJ, Ashton BA. (2000). Osteogenic potential of vascular pericytes. En: Davies JE (ed). *Bone Engineering*. Toronto, Canada, EM Squared, Inc.
- 42. Carson, M, Bugg CE. (1986). Algorithm for ribbon models of proteins. *Journal of Molecular Graphics and Modelling.* 4:121-1222.
- 43. Carvallo L, Henríquez B, Paredes R, Olate J, Onate S, vanWijnen AJ, Lian JB, Stein GS, Stein JL, Montecino M. (2008). I alpha, 25-dihydroxy vitamin D3-enhanced expression of the osteocalcin gene involves increased promoter occupancy of basal transcription regulators and gradual recruitment of the

1alpha, 25-dihydroxy vitamin D3 receptor-SRC-1 coactivator complex. *Journal of Cell Physiology*. 214(3): 740–749. DOI: 10.1002/jcp.21267

- 44. Charles P, Poser JW, Mosekilde L, Jensen FT. (1985). Estimation of bone turnover evaluated by 47 Ca-Kinetics. Efficiency of serum gamma-carboxyglutamatic acid-containing protein, serum alkaline, phosphatase and urinary hydroxyproline excretion. *Journal of Clinic Investigation*. 76(6): 2254-2258. DOI: 10.1172/JCI112234.
- 45. Chellaniah MA, Kizer N, Biswas R, Alvarez U, Strauss-Schoenberger J, Rifas L, Rittling SR, Denhardt DT, Hruska K.A. (2003). Osteopontin deficiency produces osteoclast dysfunction due to reduced CD44 surface expression. *Molecular Biology of the Cell*. 14(1): 173–189. DOI: 10.1091/mbc.E02-06-035
- 46. Chellaniah MA, Hruska KA. (2003). The integrin alpha(v)beta(3) and CD44 regulate the actions of osteopontin on osteoclast motility. *Calcified Tissue International*. 72(3):197–205. DOI: 10.1007/s00223-002-1025-6
- 47. Chen H, Ghori-Javed FY, Rashid H, Adhami MD, Serra R, Gutierrez SE, Javed A. (2014). Runx2 regulates endochondral ossification through control of chondrocyte proliferation and differentiation. *Journal of Bone and Mineral Research*. 29(12): 2653-2665. DOI: 10.1002/jbmr.2287.
- 48. Cho TJ, Gerstenfeld LC, Einhorn TA. (2002). Differential temporal expression of members of the transforming growth factor beta superfamily during murine fracture healing. *Journal of Bone and Mineral Research*. 17(3):513–520. DOI: 10.1359/jbmr.2002.17.3.513.
- Civitelli R, Beyer EC, Warlow PM, Robertson AJ, Geist ST, Steinberg TH. (1993). Conexin 43 mediates direct intercellular communication in human osteoblastic cells networks. *Journal Clinic Investigation*. 91:1888-1896. DOI: 10.1172/jci116406.
- 50. Clevers H. (2006). Wnt/beta-catenin signaling in development and disease. Cell. 127(3):469–480.
- 51. Colnot C, Romero DM, Huang S, Helms J. (2005). Mechanisms of action of demineralized bone matrix in the repair of cortical bone defects. *Clinical Orthopaedic Related Research*. 435:69-78.
- 52. Colnot C. (2009). Skeletal cell fate decisions within periosteum and bone marrow during bone regeneration. *Journal of Bone and Mineral Research*. 24:274–282. doi: 10.1359/jbmr.081003.
- 53. Concannon MJ, Boschert MT, Puckett CL. (1997) Bone induction using demineralized bone in the rabbit femur: A long term study. *Plastic and Reconstructive Surgery*. 99(7): 1983–1988.
- 54. Cook SD, Baffes GC, Wolfe MW, Sampath TK, Rueger DC. (1994). Recombinant human bone morphogenetic protein-7 induces healing in a canine long-bone segmental bone defects. *Clinical Orthopaedics and Related Research*. 301:302-312.
- 55. Crisan M, Yap S, Casteilla L, Chen CW, Corselli M, Park TS, Andriolo G, Sun B, Zheng B, Zhang L, Norotte C, Teng PN, Traas J, Schugar R, Deasy BM, Badylak S, Buhring HJ, Giacobino JP, Lazzari L, Huard J, Péault B. (2008). A perivascular origin for mesenchymal stem cells in multiple human organs. *Cell Stem Cell*. 11(3): 301-313. DOI: 10.1016/j.stem.2008.07.003.
- 56. da Silva AM, del Carlo RJ, Viloria 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
- 57. 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.
- 58. Dahners LE, Jacobs RR. (1985). Long bone defects treated with demineralized bone. South Medical Journal. 78(8): 933-934.
- 59. Davies JE, Hosseini MM (2000) Histodynamics of endosseous wound healing. In: Bone Engineering (Davies JE, ed), Em squared Inc., Toronto, Canada, pp 1-14.
- De Bari C, Dell'Accio F, Vanlauwe J, Eyckmans J, Khan IM, Archer CW, Jones EA, McGonagle D, Mitsiadis TA, Pitzalis C, Luyten FP. (2006). Mesenchymal multipotency of adult human periosteal cells demonstrated by single-cell lineage analysis. *Arthritis Rheumatology*. 54(4): 1209-1221. DOI: 10.1002/art.21753
- 61. Del Carlo RJ, da Silva AM, Vargas Viloria AM, Fonseca CC, Rizzo Oliveira D. (2003). Potencial osteoinductor da matriz óssea homóloga desmineralizada de coelho. *Ciência Rural*; 33:533-538.
- 62. Denhardt DT, Gou X. (1993). Osteopontin: a protein with diverse functions. *FASEB Journal*. 7(15):1475–1482.
- 63. Dietz FR, Morcuende JA. (2006). Bone formation and growth. In: Morrissy RT, Weinstein SL. (Eds.), *Lovell & winter's pediatric orthopaedics* (6th ed). Philadelphia, USA, Lippincott Williams & Wilkins.
- 64. Dimitriou R, Jones E, McGonagle D, Giannoudis PV. (2011) Bone regeneration: current concepts and future directions. *Bio Med Central*. 9:66. DOI: 10.1186/1741-7015-9-66.

- 65. Ding M, Lu Y, Abbassi S, Li F, Li X, Song Y, Geoffroy V, Im HE, Zheng Q. (2012). Targeting Runx2 expression in hypertrophic chondrocytes impairs endochondral ossification during early skeletal development. *Journal of Cell Physiology*. 227(10): 3446–3456. DOI: 10.1002/jcp.24045
- 66. Dinopoulous HT, Giannoudis PV. (2006). Safety and efficacy of use of demineralised bone matrix in orthopaedic and trauma surgery. *Expert Opinion on Drug Safety*. 5(6): 847-866. DOI: 10.1517/14740338.5.6.847
- 67. Di Rienzo JA, Casanoves F, Balzarini MG, Gonzalez L, Tablada M, Robledo CW. InfoStat versión 2010. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina
- 68. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Staper Cortenbach I, Marini F, Krause D. (2006). Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. *The International Society for Cellular Therapy Position Statement Cytotherapy*. 8(4):315-317.
- 69. Donahue HJ, McLeod KJ, Rubin CT, Andersen J, Grine EA, Hertzberg EL, Brink PR. (1995). Cell-tocell communication in osteoblastic networks: cell line-dependent hormonal regulation of gap junction function. *Journal of Bone and Mineral Research*. 10(6): 881–889. DOI: 10.1002/jbmr.5650100609.
- 70. 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.
- Ducy PC, Desbois C, Boyce B, Dunstan C, Smith E, Bonadio J, Goldstein S, Gundberg C, Bradley A. (1996). Increased bone formation in osteocalcin-deficient mice. *Nature*. 82(6590):448-452. DOI: 10.1038/382448a0
- 72. Ducy P, Zhang R, Geoffroy V, Ridall AL, Karsenty G. (1997). Osf2/Cbfa1: a transcriptional activator of osteoblast differentiation. *Cell*. 89(5):747-754. DOI: http://dx.doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80257-3.
- 73. Duvall CL, LiTaylor WR, Weiss D, Wojtowicz AM, Guldberg RE. (2007). Impaired angiogenesis, early callus formation, and late stage remodeling in fracture healing of osteopontin-deficient mice. *Journal of Bone and Mineral Research*. 22(2):286-297.
- 74. Egermann M, Lill CA, Griesbeck K, Evans CH, Robbins PD, Schneider E, Baltzer AW (2006). Effect of BMP-2 gene transfer on bone healing in sheep: *Gene Therapy*. 13(17): 1290–1299.
- 75. Ehrler DM, Vaccaro AR. (2000). The use of allograft bone in lumbar spine surgery. *Clinical Orthopaedic Related Research*. 371(6): 38-45. DOI: 10.1007/s00586-008-0648-3.
- 76. Elsalanty ME, Genecov DG. (2009). Bone grafts in craniofacial surgery. *Craniomaxillofacial Trauma Reconstruction*. 2(3):125–134. DOI 10.1055/s-0029-1215875.
- 77. Enishi T, Yukata K, Takahashi M, Sato R, Sairyo K, Yasui N. (2014). Hypertrophic chondrocytes in the rabbit growth plate can proliferate and differentiate into osteogenic cells when capillary invasion is interposed by a membrane filter. *PLoS ONE 9, e104638*. DOI: 10.1371/journal.pone.0104638.
- Eppley BL, Pietrzak WS, Blanton MW. (2005). Allograft and alloplastic bone substitutes: a review of science and technology for the craniomaxillofacial surgeon. *Journal of Craniofacial Surgery*. 16(6): 981-989. DOI: 910.1097/1001.scs.0000179662.0000138172.dd.
- Everts, E., Delaisse JM, Korper, W, Jansen DC, Tigchelaar-Gutter W, Saftig P, BeertsenBeertsen W. (2002). The bone lining cell: its role in cleaning Howship's lacunae and initiating bone formation. *Journal of Bone and Mineral Research*. 17(1): 77–90.
- Faccio R, Novack DV, Zallone A, Ross P, Teitelbaum SL. (2003). Dynamic changes in the osteoclast cytoskeleton in response to growth factors and cell attachment are controlled by β3 integrin. *The Rockefeller University Press.* 162(3): 499-509. DOI: 10.1083/jcb.200212082.
- 81. Fakhry M, Hamade E, Badran B, Buchet R, Magne D. (2013). Molecular mechanisms of mesenchymal stem cell differentiation towards osteoblasts. *World Journal of Stem Cells*. 5(4): 136–148. DOI: 10.4252/wjsc.v5.i4.136.
- 82. Feighan JE, Davy D, Prewett AB, Stevenson S. (1995). Induction of bone by a demineralized bone matrix gel: a study in a rat femoral defect model. Journal of Orthopaedic Research. 13(6): 881-891.
- Fernández-Tresguerres Hernández-Gil I, Alobera Gracia MA, del Canto Pingarrón M, Blanco Jerez L. (2006). Physiological bases of bone regeneration I. Histology and physiology of bone tissue. *Medicina Oral Patología Oral Cirugía Bucal*. 11(1): 47-51.
- 84. Figueiredo M., Cunha S., Martins G., Freitas J., Judas F., Figueiredo H. (2011). Influence of hydrochloric acid concentration on the demineralization of cortical bone. *Chemical Engineering Research and Design*.89(1): 116–124. DOI: 10.1016/j.cherd.2010.04.013.
- 85. Fleming Jr JE, Cornell CN, Muschler GF. (2000). Bone cells and matrices in orthopedic tissue engineering. *Orthopaedics Clinics of North America*. 31:357-374. DOI: <u>http://dx.doi.org/10.1016/S0030-5898(05)70156-5</u>.

- 86. Fleet JC, Hock JM. (1994). Identification of osteocalcin mRNA in nonosteoid tissue of rats and humans by reverse transcription-polymerase chain reaction. *Journal of Bone and Mineral Research*. 9(10):156-1573. DOI: 10.1002/jbmr.5650091009.
- 87. Fisher LW, Torchia DA, Fohr B, Young MF, Fedarko NS. (2001). Flexible structures of SIBLING proteins, bone sialoprotein, and osteopontin. *Biochemical Biophysical Research Communication*. 280(2): 460-465.
- 88. Fisher LW, Fedarko NS. (2003). Six genes expressed in bones and teeth encode the current members of the SIBLING family of proteins. *Connective Tissue Research*. 44(Suppl 1):33-40.
- Fitzpatrick N, Yeadon R, Smith TJ, Johnson J, Baltzer WI, Amils R, Farrell M, Frost A, Holsworth IG. (2012). Shoulder arthrodesis in14 dogs. *Veterinary Surgery*, 41(6):745–754. DOI: 10.1111/j.1532-950X.2012.01004.x
- 90. Forell EB, Straw RC, Powers BE, Johnson J, Cooper MF, Withrow StJ. (1993). Evaluation of the osteoinductive capacity of canine demineralized bone matrix in heterotopic muscle sites of athymic rats. *Veterinary and Comparative Orthopaedics and Traumatology*. 6(1):25-32.
- 91. Forlino A, Marini JC. Osteogenesis imperfecta. *The Lancet.* 388(10047): 841-934. DOI: http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(15)00728-X
- 92. Frank R, Frank P, Klein M, Fontaine R. (1955). Microscopie e'lectronique de l'os humain. *Archives d'Anatomie Pathologique*. 44(2): 191–206.
- 93. Franz-Odendaal TA, Hall BK, Witten PE. (2006). Buried alive: how osteoblasts become osteocytes. *Development Dynamic*. 235(1):176–190.
- 94. Fuerer C, Nusse R, Ten Berge D. (2008). Wnt signalling in development and disease. *EMBO Report*. 9(2): 134–138. DOI: 10.1038/sj.embor.7401159.
- 95. Fujita T, Azuma Y, Fukuyama R, Hattori Y, Yoshida C, Koida M, Ogita K, Komori T. (2004). Runx2 induces osteoblast and chondrocyte differentiation and enhances their migration by coupling with PI3K-Akt signaling. *Journal of Cell Biolgy*. 166(1): 85–95. DOI: 10.1083/jcb.200401138
- 96. Gadeau AP, Chaulet H, Daret D, Kockx M, Daniel-Lamazière JM, Desgranges C. (2001). Time course of osteopontin, osteocalcin, and osteonectin accumulation and calcification after acute vessel wall injury. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*. 49(1): 79-86. DOI: 10.1177/002215540104900108.
- 97. Galindo M, Pratap J, Young DW, Hovhannisyan H, Im HJ, Choi JY, Lian JB, Stein JL, Stein GS, van Wijnen AJ. (2005). The bone-specific expression of Runx2 oscillates during the cell cycle to support a G1-related antiproliferative function in osteoblasts. *Journal of Biological Chemistry*. 280(21): 202740-20285. DOI: 10.1074/jbc.M413665200.
- 98. Galindo M, Kahler RA, Teplyuk NM, Stein JL, Lian JB, Stein GS, Westendorf JJ, van Wijnen AJ. (2007). Cell cycle related modulations in Runx2 protein levels are independent of lymphocyte enhancerbinding factor 1 (Lef1) in proliferating osteoblasts. *Journal of Molecular Histology*. 38(5):501–506. DOI: 10.1007/s10735-007-9143-0.
- 99. 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
- 100. Gao J, Knaack D, Goldberg VM, Caplan AI. (2004). Osteochondral defect repair by demineralized cortical bone matrix. *Clinical Orthopaedic Related Research*. 427S:S62-66.
- 101. Gaur T, Lengner CJ, Hovhannisyan H, Bhat RA, Bodine PVN, Komm BS, Javed A, van Wijnen AJ, Stein JL, Stein GS, Lian JB. 2005. Canonical WNT Signaling promotes osteogenesis by directly stimulating Runx2 gene expression. *The Journal of Biological Chemistry*. 280(39): 33132–33140. DOI 10.1074/jbc.M500608200.
- 102. Gaurav L, Wagner ER, Zhu G, Kang Q, Luo Q, Lamplot J, Bi Y, Luo X, Luo J, Teven C, Shi Q, Kim SH, Gao JL, Huang E, Yang K, Rames R, Liu X, Li M, Hu N, Liu H, Su Y, Chen L, He BC, Zuo GW, Deng ZL, Reid RR, Luu HH, Haydon RC, He TC. (2011). BMP-9 Induced osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells: molecular mechanism and therapeutic potential. *Current Gene Therapy*. 11(3): 1-12
- 103. Gavin BJ, McMahon JA, McMahon AP. (1990). Expression of multiple novel Wnt-1/int-1-related genes during fetal and adult mouse development. *Genes Development*. 4(12): 2319–2332.
- 104. Gay CV, Gilman VR, Sugiyama T. (2000). Perspectives on osteoblast and osteoclast function. *Poultry Science*. 79(7): 1005-1008. DOI: 10.1093/ps/79.7.1005
- 105. Gazdag AR, Lane JM, Glaser D, Forster RA. (1995). Alternatives to autogenous bone graft: efficacy and indications. *Journal of American Academy of Orthopaedic Surgeons*. 3(1): 1-8. *DOI*: 10.5435/00124635-199501000-00001.

- 106. Giachelli C, Steitz S. (2000). Osteopontin: A versatile regulator of inflammation and biomineralization. *Matrix Biology*. 19(7): 615–622.
- 107. Giraud-Guille MM, Besseau L, Martin R. (2003). Liquid crystalline assemblies of collagen in bone and in vitro systems. *Journal of Biomechanics* 36(10): 1571–1579.
- 108. Glass DA, Bialek P, Ahn JD, Starbuck M, Patel MS, Clevers H, Taketo MM, Long F, McMahon AP, Lang RA, Karsenty G. (2005). Canonical Wnt signaling in differentiated osteoblasts controls osteoclast differentiation. *Development Cell*. 8(5): 751–764.
- 109. Gordon MD, Nusse R. (2006). Wnt signaling: multiple pathways, multiple receptors and multiple transcription factors. *Journal of Biology Chemistry*. 281:22429-33.
- Gössl M, Mödder UI, Atkinson EJ, Lerman A, Khosla S. (2008). Osteocalcin expression by circulating endothelial progenitor cells in patientswith coronary atherosclerosis. *Journal of American College of Cardiology*. 52(16): 1314-1325. DOI: 10.1016/j.jacc.2008.07.019.
- 111. Granero-Moltó F, Weis JA, Miga MI, Landis B, Myers TJ, O'Rear L, Longobardi L, Jansen ED, Mortlock DP, Spagnoli A. (2009). Regenerative effects of transplanted mesenchymal stem cells in fracture healing. Stem Cells. 27(8): 1887-1898. DOI: 10.1002/stem.103.
- 112. Granjeiro JM, Oliveira RC, Bustos-Valenzuela JC. (2005). Bone morphogenetic proteins: from structure to clinical use. *Brazilian Journal of Medicine Biology Research*. 38(10):1463–1473. DOI: <u>Http://dx.doi.org/10.1590/S0100-879X2005001000003</u>
- 113. Gray H (1973). Osteology. In: Gray's Anatomy (Warwick, R. and Williams, P. L., eds), 35 edn. Longman Group Ltd., Edinburgh, 200-387.
- 114. Gregory CA, Gunn WG, Reyes E, Smolarz AJ, Muñoz J, Spees JL, Prockop DJ. (2005). How Wnt signaling affects bone repair by mesenchymal stem cells from the bone marrow. *Annals of the New York Academy of Science*. 1049:97–106.
- 115. Grigoriadis AE, Heersche JNM. Aubin JE. (1988). Differentiation of muscle, fat, cartilage, and bone from progenitor cells present in a bone-derived clonal cell population: effect of dexamethasone, *Journal of Cell Biology*. 106(6): 2139–2151.
- 116. Groeneveld EHJ, Burger EH. (2000). Bone morphogenetic proteins in human bone regeneration. *European Journal of Endocrinology*. 142(1): 9-21.
- 117. Gross TS, King KA, Rabaia NA, Pathare P & Srinivasan S 2005 Upregulation of osteopontin by osteocytes deprived of mechanical loading or oxygen. *Journal of Bone and Mineral Research*. 20 250– 256. DOI:10.1359/JBMR.041004.
- 118. Hallfeldt KKJ, Stützle H, Puhlmann M, Kessler S, Schweiberer L. (1995). Sterilization of partially demineralized bone matrix: the effects ofdifferent sterilization techniques on osteogenetic properties. *Journal Surgery Research*. 59(5): 614-620.
- 119. Han B, Tang B, Nimni ME. (2003). Quantitative and sensitive in vitro assay for osteoinductive activity of demineralized bone matrix. *Journal of Orthopaedic Research* 21(4):648-654. doi: 10.1016/S0736-0266(03)00005-6
- 120. Han B, Yang Z, Nimni M. (2005). Effects of moisture and temperature on the osteoinductivity of demineralized bone matrix. *Journal of Orthopaedic Research*. 23(4): 855-861. DOI: 10.1016/j.orthres.2004.11.007.
- 121. Harada H, Tagashira S, Fujiwara M, Ogawa S, Katsumata T, Yamaguchi A, Komori T, Nakatsuka M. (1999). Cbfa1 isoforms exert functional differences in osteoblast differentiation. *Journal of Biology Chemistry*. 274(11): 6972-6978. *DOI*: 10.1074/jbc.274.11.6972.
- 122. Hartmann C. (2006). A Wnt canon orchestrating osteoblastogenesis. Trends Cell Biol 16(3): 151–158. DOI: 10.1016/j.tcb.2006.01.001.
- 123. He X, Semenov M, Tamai K, Zheg X. (2004). LDL receptor related proteins 5 and 6 in Wnt/b-catenin signaling: arrows point the way. *Development*. 131(8): 1663–1677. DOI: doi: 10.1242/dev.01117.
- 124. Heiland GR, Zwerina K, Baum W, Kireva, T, Distler JH, Grisanti M, Asuncion F, Li X, Ominsky M, Richards W, Schett G, Zwerina J. (2010). Neutralisation of Dkk-1 protects from systemic bone loss during inflammation and reduces sclerostin expression. *Annals Rheumatoid Diseases*. 69(12): 2152-219. DOI: 10.1136/ard.2010.132852.
- 125. 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.
- 126. Holmbeck K, Bianco P, Chrysovergis K, Yamada S, Birkedal-Hansen H. (2003). MT1-MMPdependent, apoptotic remodeling of unmineralized cartilage a critical process in skeletal growth. *Journal* of Cell Biology. 163(3): 661–671. DOI: 10.1083/jcb.200307061.

- 127. Huang W, Carlsen B, Rudkin G, Berry M, Ishida K, Yamaguchi DT, Miller TA. (2004). Osteopontin is a negative regulator of proliferation and differentiation in MC3T3-E1 pre-osteoblastic cells. *Bone.* 34(5): 799-808. DOI: 10.1016/j.bone.2003.11.027
- 128. Huang H, He X. (2008). Wnt/beta-catenin signaling: new (and old) players and new insights. *Current Opinion in Cell Biology*. 20(2):119-125. DOI: 10.1016/j.ceb.2008.01.009.
- 129. Huang Z, Ren PG, Ma T, Smith RL, Goodman SB. (2010). Modulating osteogenesis of mesenchymal stem cells by modifying growth factor availability. *Cytokine*. 51(3): 305-310. DOI: 10.1016/j.cyto.2010.06.002.
- 130. Hunter GK, Hauschka PV, Poole AR, Rosenberg LC, Goldberg HA. (1996). Nucleation and inhibition of hydroxyapatite formation by mineralized tissue proteins. *Biochemical Journal*. 317(1): 59–64
- 131. Hunter SA, Orheim R, Sazon M, Newman H, Woll JE, Bergevin M. (2011). Demineralization removes residual alendronate in allograft bone procured from donors with a history of bisphosphonate use. *Journal of Periodontology*. 82(2):281-286. DOI: 10.1902/jop.2010.100236.
- 132. Hunter GK. 2013. Role of osteopontin in modulation of hydroxyapatite formation. *Calcified Tissue International*. 93(4):348-354. DOI: 10.1007/s00223-013-9698-6.
- 133. Inada M, Yasui T, Nomura S, Miyake S, Deguchi K, Himeno M, Sato M, Yamagiwa H, Kimura T, Yasui N, Ochi T, Endo N, Kitamura Y, Kishimoto T, Komori T. (1999). Maturational disturbance of chondrocytes in Cbfa1-deficient mice. *Developmental Dynamics*. 214(4): 279–290. DOI: 10.1002/(SICI)1097-0177(199904)214.
- 134. Ishijima M, Rittling SR, Yamashita T, Tsuji K, Kurosawa H, Nifuji A, Denhardt DT, Noda M. (2001). Enhancement of osteoclastic bone resorption and suppression of osteoblastic bone formation in response to reduced mechanical stress do not occur in the absence of osteopontin. *Journal of Experimental Medicine*. 193(3):399–404.
- 135. Jalila A, Redig PT, Wallace LJ, Ogema TR, Bechtold JE, Kidder L. (2004). The effect of chicken, pigeon, and turkey demineralized bone matrix (DBM) implanted in ulnar defects fixed with the intramedullary-external skeletal fixator (IM-ESF) tie-in in pigeons (Columba livia): histological evaluations. *Medical Journal of Malaysia*. 59S:125-126
- 136. Jang JH, Kim JH. (2005). Improved cellular response of osteoblast cells using recombinant human osteopontin protein produced by Escherichia coli. *Biotechnology Letters*. 27(22): 1767–1770. DOI: <u>http://dx.doi.org/10.1007/s10529-005-3551-6</u>.
- Jorgensen NR, Teilmann SC, Henriksen Z, Civitelli R, Sorensen OH, Steinberg TH. (2003). Activation of L-type calcium channels is required for gap junction-mediated intercellular calcium signaling in osteoblastic cells. *Journal Biology Chemistry*. 278(6): 4082–4086.
- 138. Jung P, Gebhardt M, Golovchenko S, Perez-Branguli F, Hattori T, Hartmann C, Zhou X, deCrombrugghe B, Stock M, Schneider H, von der Mark K. (2015). Dual pathways to endochondral osteoblasts: a novel chondrocytederived osteoprogenitor cell identified in hypertrophic cartilage. *Biology Open*; 4:608–621.
- Junqueira Del Carlo R, da Silva AM, Vargas Viloria MI, Fonseca CC, Rizzo Oliveira D. (2003). Potencial osteoindutor da matriz óssea homóloga desmineralizada de coelho. *Ciência Rural*. 33(3): 533-538.
- 140. Kang S, Bennett CN, Gerin I, Rapp LA, Hankenson KD, Macdougald OA. (2007). Wnt signaling stimulates osteoblastogenesis of mesenchymal precursors by suppressing CCAAT/enhancerbinding protein alpha and peroxisome proliferator-activated receptor gamma. *Journal Biology Chemistry*. 282:14515–14524. DOI:10.1074/jbc.M700030200.
- 141. Kao ST, Scott DD. (2007). A review of bone substitutes. Oral Maxillofacial Surgery Clincal of North America. 19(4): 513–521. DOI: http://dx.doi.org/10.1016/j.coms.2007.06.002.
- 142. Karsenty G. (2001). Minireview: transcriptional control of osteoblast differentiation. *Endocrinology*. 142(7): 2731-2733. DOI: 10.1210/endo.142.7.8306.
- 143. Khang G, Kim MS, Cho SH, Lee I, Rhee JM, Lee HB. (2004). Natural scaffolds biomaterials for tissue regeneration. *Tissue Engineering Regenerative Medicine*. 1:9–20.
- 144. Karsenty G. (2001). Minireview: transcriptional control of osteoblast differentiation. *Endocrinology*. 142(7): 2731-2733. DOI: 10.1210/endo.142.7.8306
- 145. Kasaai B, Moffatt P, Al-Salmi L, Lauzier D, Lessard L, Hamdy RC. (2012). Spatial and temporal localization of WNT signaling proteins in a mouse model of distraction osteogenesis. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*. 60(3): 219–228. DOI: 10.1369/0022155411432010
- Kawakami T, Kawai T, Kimura A, Hasegawa H, Yoshikawa Y, Eda S. (1998). Transchondroid bone formation displayed in BMP-induced heterotopic osteogenesis. *Journal of Hard Tissue Biology*; 7: 21-26.

- 147. Kawakami T. (2001). Immunohistochemistry of BMP induced heterotopic osteogenesis. *Journal of Hard Tissue Biology*. 10: 73-76.
- 148. Kawahata H, Kikkawa T, Higashibata Y, Sakuma T, Huening M, Sato M, Sugimoto M, Kuriyama K, Terai K, Kitamura Y, Nomura S. (2003). Enhanced expression of Runx2/PEBP2alphaA/CBFA1/AML3 during fracture healing. *Journal of Orthopadic Science*. 8(1): 102-108. DOI: 10.1007/s007760300017
- 149. Kawakami T, Kawai T, Kimura A, Hasegawa H, Tsujigiwa H, Gunduz M, Nagatsuka H, Nagai N. (2001). Characteristics of bone morphogenetic protein-induced chondroid bone: histochemical, immunohistochemical and in situ hybridization examinations. *Journal of Internal Medicine Research*. 29(6): 480-487.
- 150. Kawcak CE, Trotter GW, Powers BE. (2000). Comparison of bone healing by demineralized bone matrix and autogenous cancellous bone in horses. *Veterinary Surgery*. 29:218-226.
- 151. Kelly OG, Pinson KI, Skarnes WC. (2004). The Wnt co-receptors Lrp5 and Lrp6 are essential for gastrulation in mice. *Development*. 131(12): 2803–2815. DOI: 10.1242/dev.01137.
- 152. Kern B, Shen J, Starbuck M, Karsenty G. (2001). Cbfa1 contributes to the osteoblast-specific expression of type I collagen genes. *Journal of Biological Chemistry*. 276(10): 7101-7107. DOI 10.1074/jbc.M006215200.
- 153. 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.
- 154. Kim IS, Otto F, Zabel B, Mundlos S. (1999). Regulation of chondrocyte differentiation by cbfa1. *Mechanisms of Development*. 80(2): 159–170. DOI: 10.1016/S0925-4773(98)00210-X.
- 155. Kim JM, Kim MH, Kang SS, Kim GH, Choi SH. (2014). Comparable bone healing capacity of different bone graft matrices in a rabbit segmental defect model. *Journal of Veterinary Science*. 15(2): 289-295
- 156. Kirker-Head, C.A. 1995. Recombinant bone morphogenetic proteins: novels substances for enhancing bone healing. *Veterinary Surgery*. 24(5): 408–418.
- 157. Klüppel LE, Antonini F, Olate S, Nascimento FF, Albergaria-Barbosa JR, Mazzonetto R. (2013). Bone repair is influenced by different particle sizes of anorganic bovine bone matrix: a histologic and radiographic study in vivo. *The Journal of Craniofacial Surgery*. 24(4): 1074-1077.
- 158. Koga T, Minamizato T, Kawaii Y, Miura K-i, Nakatani Y, Sumita Y, Asahina I. (2016) Bone regeneration using dentin matrix depends on the degree of demineralization and particle size. *PLoS ONE* 11(1): e0147235. DOI:10.1371/journal.pone.0147235
- 159. Komori T, Yagi H, Nomura S, Yamaguchi A, Sasaki K, Deguchi K, Chimisu Y, Bronson RT, Gao YH, Inada M, Sato M, Okamoto R, Kitamura Y, Yoshiki S, Kishimoto T. (1997). Targeted disruption of Cbfa1 results in a complete lack of bone formation owing to maturational arrest of osteoblasts. *Cell*. 89(5): 755-764. DOI: <u>http://dx.doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80258-5</u>
- 160. Komori T. (2002). Runx2, a multifunctional transcription factor in skeletal development. *Journal of Cell Biochemistry*. 87(1): 1–8. DOI: 10.1002/jcb.10276.
- 161. Komori T. (2005). Regulation of skeletal development by the Runx family of transcription factors. *Journal of Cell Biochemistry*. 95(3): 445-453. DOI: 10.1002/jcb.20420.
- 162. Kosher RA, Gay SW, Kamanitz JA, Kilyk WM, Aodgers BJ, Sai S, Tanaka T, Tanzer M. (1986a). Cartilage proteoglycan core protein gene expression during limb cartilage differentiation. *Journal of Development Biology*. 118(1): 112-117. doi:10.1016/0012-1606(86)90078-3.
- 163. Kosher RA, Kulyk WM, Gay SW. (1986b). Collagen gene expression during limb cartilage differentiation, *The Journal of Cell Biology*. 102(4):1151-1156.
- 164. Krupa S, Majeed Z, Jonason J, O'Keefe RJ. (2013). The role of muscle in bone repair: the cells, signals, and tissue responses to injury. *Current Osteoporosis Report*. 11(2): 130–135. DOI: 10.1007/s11914-013-0146-3
- 165. Kubota T, Michigami T, Ozono K. (2009). Wnt signaling in bone metabolism. *Journal of Bone and Mineral Metabolism*. 27(3): 265–271. DOI 10.1007/s00774-009-0064-8.
- 166. Kumar RVS, Ramakrishna O. (2001). Femoral fracture repair by demineralized bone matrix combinations in canines. *Indian Journal of Animal Sciences*. 71(8):749-751
- 167. Kundu M, Javed A, Jeon JP, Horner A, Shum L, Eckhaus M, Muenke M, Lian JB, Yang Y, Nuckolls GH, Stein GS, Liu PP. (2002). Cbfbeta interacts with Runx2 and has a critical role in bone development. *Nature Genetics*. 32:639-644. DOI:10.1038/ng1050.
- 168. Lacey DL, Timms E, Tan HL, Kelley MJ, Dunstan CR, Burgess T, Elliott R, Colombero A, Elliott G, Scully S, Hsu H, Sullivan J, Hawkins N, Davy E, Capparelli C, Eli A, Qian YX, Kaufman S, Sarosi I, Shalhoub V, Senaldi G, Guo J, Delaney J, Boyle WJ. (1998) Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation. *Cell.* 93(2): 165–176. DOI: http://dx.doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81569-X.

- 169. Lakshmipathy Lammi MJ, Hayrinen J, Mahonen A. (2006). Proteomic analysis of cartilage- and bone associated samples. *Electrophoresis*. 27:2687-2701. DOI: 10.1002/elps.200600004.
- 170. Landis WJ. (1995). The strength of a calcified tissue depends in part on the molecular structure and organization of its constituent mineral crystals in their organic matrix. *Bone*. 16(5): 533–544. DOI: 10.1016/8756-3282(95)00076-P.
- 171. Lane JM, Sandhu HS 1987. Current approaches to experimental bone grafting. Orthopaedic Clinics of North America. 18:213-225.
- 172. Lane JM, Tomin E, Bostrom MP. (1999). *Biosynthetic bone grafting*. Clinical Orthop Related Research. 367(Suppl):S107-117.
- 173. Lane JM. (2001). BMPs: why are they not in everyday use? *Journal of Bone and Joint Surgery*. 83Suppl(2):161–163.
- 174. LeGeros RZ. (2002). Properties of osteoconductive biomaterials: calcium phosphates *Clinical Orthopaedic and Related Research*. 1(1):81-98.
- 175. Lee AJ, Hodges S, Eastell R. (2000). Measurement of osteocalcin. Annals of Clinical Biochemistry. 37(4): 432-446.
- 176. Lee KS, Kim HJ, Li QL, Chi XZ, Ueta C, Komori T, Wozney JM, Kim EG, Choi JY, Ryoo HM, Bae SC. (2000). Runx2 is a common target of transforming growth factor beta1 and bone morphogenetic protein 2, and cooperation between runx2 and smad5 induces osteoblast-specific gene expression in the pluripotent mesenchymal precursor cell line C2C12. *Molecular Cell Biology*. 20(23): 8783-8792. DOI: 10.1128/MCB.20.23.8783-8792.2000.
- 177. Lengner CJ, Drissi H, Choi JY, van Wijnen AJ, Stein JL, Stein GS, Lian JB. (2002). Activation of the bone-related Runx2/Cbfa1 promoter in mesenchymal condensations and developing chondrocytes of the axial skeleton. *Mechanisms of Development*. 114(1-2):167-170.
- 178. Lesley J, Hyman R, Kincade PW. (2000). Hyaluronan binding by cell surface CD44. *Journal of Biological Chemistry*. 275(3): 26967-26975.
- 179. Levanon D, Brenner O, Negreanu V, Bettoun D, Woolf E, Eilam R, Lotem J, Gat U, Otto F, Speck N, Groner Y. (2001). Spatial and temporal expression pattern of Runx3 (Aml2) and Runx1 (Aml1) indicates non-redundant functions during mouse embryogenesis. *Mechanisms and Development*. 109(2): 413-417. DOI:10.1016/S0925-4773(01)00537-8.
- 180. Li Z, Li Z. (2005). Repair of mandible defect with tissue engineering bone in rabbits. *ANZ Journal Surgery*. 75(11):1017-1021.
- 181. Li XJ, Jee WSS. (2005). Integrated bone tissue anatomy and physiology. Deng HW, Liu YZ, eds Currents Topics in Bone Biology. World Scientific Publishing. ISBN 981-256-209-5. Singapore. Pp41.
- 182. Lian JB, McKee MD, Todd AM, Gerstenfeld LC. (1993). Induction of bone-related proteins, osteocalcin and osteopontin, and their matrix ultrastructural localization with development of chondrocyte hypertrophy in vitro. *Journal of Cellular Biochemistry*. 52(2): 206–219.
- 183. Lian JB, Balint E, Javed A, Drissi H, Vitti R, Quinlan EJ, Zhang L, van Wijnen AJ, Stein JL, Speck N, Stein GS. (2003). Runx1/AML1 hematopoietic transcription factor contributes to skeletal development in vivo. Journal of Cellular Physiology. 196(2): 301–311. DOI: 10.1002/jcp.10316.
- 184. 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.
- 185. Lin GL, Hankenson KD. (2011). Integration of BMP, Wnt, and notch signaling pathways in osteoblast differentiation. *Journal of Cellular Biochemistry*. 112(12):3491–3501. DOI: 10.1002/jcb.23287
- 186. Lind M. (1998). Growth factor stimulation of bone healing: effects on osteoblasts, osteotomies, and implants fixation. *Acta Orthopaedica Scandinavica*. 288:S2-S37.
- 187. Lindsey RW, Gugala Z, Milne E, Sun M, Gannon, FH, Latta LL. (2006). The efficacy of cylindrical titanium mesh cage for the reconstruction of a critical-size canine segmental femoral diaphyseal defect. *Journal Orthopaedic Research*. 24(7):1438-1453.
- 188. Liu W, Toyosawa S, Furuichi T, Kanatani N, Yoshida C, Liu Y, Himeno M, Narai S, Yamaguchi A, Komori T. (2001). Overexpression of Cbfa1 in osteoblasts inhibits osteoblast maturation and causes osteopenia with multiple fractures. *Journal of Cell Biology*. 155(1):157–166.
- Liu F, Aubin JE, Malaval L. (2002). Expression of leukemia inhibitory factor (LIF)/interleukin-6, family cytokines and receptors during in vitro osteogenesis: differential regulation by dexamethasone and LIF. Bone. 31(1): 212-219.
- 190. Lories R, Luyten F. (2007). Bone morphogenic proteins in destructive and remodelling arthritis. *Arthritis Research Therapy*. 9(2): 207–214.
- 191. Logan CY, Nusse R. (2004). The Wnt signaling pathway in development and disease. *Annual and Review Cell Development Biology*. 20: 781–810. DOI: 10.1146/annurev.cellbio.20.010403.113126.

- Louis-Ugbo John, Hideki M, Sun K, Akihito N, Scott B. (2004). Evidence of osteoinduction by grafton demineralized bone matrix in nonhuman primate spinal fusion. *Spine*. 29(4):360-366. DOI: 10.1097/01.BRS.0000090823.12652.F9.
- 193. Ludwig C, Boden SD. (1999). Osteoinductive bone graft substitute for spinal fusion, *Orthopaedic Clinics of North America*. 30(4): 635-645.
- 194. Luo Q, Kang Q, Si W, Jiang W, Park Y, Li X, Luu H, Luo J, Montaq AG, Haydon RC, He TC. Connective tissue growth factor (CTGF) is regulated by Wnt and bone morphogenetic protein signaling in osteoblast differentiation of mesenchymal stem cells. *Journal Biological Chemistry*. 279(53):55958-55968. DOI: 10.1074/jbc.M407810200.
- 195. Mahendra A, Maclean A. (2007). Available biological treatments for complex non-unions. *Injury*. 38(Suppl 4): S7–S12. DOI: 10.1016/S0020-1383(08)70004-4.
- 196. McKee MD, Farach CM, Butler WT, Hauschka PV, Nanci A. (1993). Ultrastructural immunolocalization of noncollagenous (osteopontin and osteocalcin) and plasma (albumin and alpha 2HSglycoprotein) proteins in rat bone. *Journal of Bone Mineral Research*. 8(4):485–496 DOI: 10.1002/jbmr.5650080413.
- 197. Manolagas SC. (2000). Birth and death of bone cells: basic regulatory mechanisms and implications for the pathogenesis and treatment of osteoporosis. *Endocrine Review*. 21(2):115–137.
- 198. Mardas N, Kostopoulos L, Stavropoulos A, Karring T. (2003). Osteogenesis by guided tissue regeneration and demineralized bone matrix. *Journal of Clinical Periodontology*. 30(3):176-183.
- 199. Markel DC, Guthrie ST, Wu B, Song Z, Wooley PH. (2012). Characterization of the inflammatory response to four commercial bone graft substitutes using a murine biocompatibility model. *Journal of Inflammation Research*. 5 13–18. http://dx.doi.org/10.2147/JIR.S21411
- 200. Marsell R, Einhorn A. (2011). The biology of fracture healing. *Injury*. 42(6):551-5. DOI: 10.1016/j.injury.2011.03.03.
- 201. Martin GJJr, Boden SD, Titus L, Scarborough NL. (1999). New formulations of demineralized bone matrix as a more effective graft alternative in experimental posterolateral lumbar spine arthrodesis. *Spine*. 24(7): 637-645.
- 202. Maruyama Z, Yoshida CA, Furuichi T, Amizuka N, Ito M, Fukuyama R, Miyazaki T, Kitaura H, Nakamura K, Fujita T, Kanatani N, Moriishi T, Yamana K, Liu W, Kawaguchi H, Nakamura K, Komori T. (2007). Runx2 determines bone maturity and turnover rate in postnatal bone development and is involved in bone loss in estrogen deficiency. *Development Dynamic*. 236(7):1876-90. DOI: 10.1002/dvdy.21187
- Mellonig JT, Bowers GM, Cotton WR. (1981). Comparison of bone graft materials. Part II. New bone formation with autografts and allografts: a histological evaluation. *Journal Periodontology*. 52(6):297-302.
- 204. Miller SC, de Saint-Georges L, Bowman BM, Jee WSJ. (1989). Bone lining cells: structure and function. *Scanning Microscopy*. 3(3): 953–961.
- 205. Miller JR. (2001). The Wnts. Genome Biology. 3:3001-3015.
- 206. Mori-Akiyama Y, Akiyama H, Rowitch DH, de Crombrugghe B. (2003). Sox9 is required for determination of the chondrogenic cell lineage in the cranial neural crest. *Proceedings of the Natural Academy of Science USA*. 100(16): 9360–9365. DOI: 10.1073/pnas.1631288100.
- 207. Morvan F, Boulukos K, Clément-Lacroix P, Roman Roman S, Suc-Royer I, Vayssière B, Ammann P, Martin P, Pinho S, Pognonec P, Mollat P, Niehrs C, Baron R, Rawadi G. (2006). Deletion of a single allele of the Dkk1 gene leads to an increase in bone formation and bone mass. *Journal Bone Mineral Research*. 21(6): 934-45.
- 208. Moskalewski S, Malejejcyk J. (1989). Bone formation following intrarenal transplantation of isolated murine chondrocytes: chondrocyte bone cell differentiation. *Development*. 107: 473-480.
- 209. Moore MA, Gotoh Y, Rafidi K, Gerstenfeld LC. (1991). Characterization of a cDMA for chicken osteopontin: expression during bone development, osteoblast differentiation, and tissue distribution. *Biochemistry*. 30:2501–2508.
- Mosley JR. (2000). Osteoporosis and bone functional adaptation: mechanobiological regulation of bone architecture in growing and adult bone, a review," *Journal of Rehabilitation Research and Development*. 37(2): 189–199.
- 211. Mundy GR. (1993). Cytokines and growth factors in the regulation of bone remodeling. *Journal of Bone and Mineral Research*. 8(Suppl2):S505-S510.
- 212. Nakamura A, Dohi Y, Akahane M, Ohgushi H, Nakajima H, Funaoka H, Takakura Y. (2009). Osteocalcin secretion as an early marker of *in vitro* osteogenic differentiation of rat mesenchymal stem cells. *Tissue Engineering*. 15(2): 169-180. DOI: 10.1089=ten.tec.2007.0334

- 213. Nakashima K, Zhou X, Kunkel G, Zhang Z, Deng JM, Behringer RR, de Crombrugghe B. (2002). The novel zinc finger-containing transcription factor osterix is required for osteoblast differentiation and bone formation. *Cell*. 108(1): 17-29. DOI: <u>http://dx.doi.org/10.1016/S0092-8674(01)00622-5</u>
- 214. Naldini A, Leali D, Pucci A. (2006). IL-1\_ medicates the pro angiogenic activity of osteopontinactivated human monocytes. *Journal of Immunology*. 177(7): 4267–4270.
- 215. 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.
- 216. Nelson WJ. (2008). Regulation of cell-cell adhesion by thecadherin-catenin complex. *Biochemistral Society Transactions*. 36(2):149-155. DOI: 10.1042/BST0360149
- 217. Niehrs C. 2006. Function and biological roles of the Dickkopf family of Wnt modulators. *Oncogene*. 25(57): 7469-81. DOI: 10.1038/sj.onc.1210054.
- 218. Noël D, Gazit D, Bouquet C, Apparailly F, Bony C, Plence P, Millet V, Turgeman G, Perricaudet M, Sany J, Jorgensen C. (2004). Short-term BMP-2 expression is sufficient for in vivo osteochondral differentiation of mesenchymal stem cells. *Stem Cells*. 22(1): 74-85. 10.1634/stemcells.22-1-74.
- 219. O'Regan AW, Nau GJ, Chupp GL, Berman JS. (2000). Osteopontin (Eta-1) in cell-mediated immunity: teaching an old dog new tricks. *Immunology Today*. 21(10): 475–478.
- 220. Orgel JP, San Antonio JD, Antipova O. (2011). Molecular and structural mapping of collagen fibril interactions. *Connective Tissue Research*. 52: 2-17. DOI: 10.3109/03008207.2010.511353.
- 221. Oryan A, Alidadi S, Moshiri A. (2013). Current concerns regarding healing of bone defects. *Hard Tissue*. 2(2):13-25.
- 222. Ozdemir MT, Kit MÇ. (2011). Repair of long bone defects with demineralized bone matrix and autogenous bone composite. *Indian Journal of Orthopaedic*. 45(3): 226-230. DOI: 10.4103/0019-5413.80040
- 223. Ozmen O, Haligur M, Ipek V. (2015). Immunohistochemical expression of osteopontin in canine and feline tumors. *Revue Médicine Vétèrinarie*. 166(1-2): 2-10.
- 224. Pacicca DM, Patel N, Lee C, Salisbury K, Lehmann W, Carvalho R, Gerstenfeld LC, Einhorn TA. (2003). Expression of angiogenic factors during distraction osteogenesis. *Bone*. 33(6): 889–898.
- 225. Pampena DA, Robertson KA, Litvinova O, Lajoie G, Goldberg HA, Hunter GK. (2004). Inhibition of hydroxyapatite formation by osteopontin phosphopeptides. *Biochemistry Journal*. 378(3):1083–1087. DOI: 10.1042/BJ20031150.
- 226. Parizi AM, Oryan A, Shafiei-Sarvestani Z, Bigham AS. (2012). Human platelet rich plasma plus Persian Gulf coral effects on experimental bone healing in rabbit model: radiological, histological, macroscopical and biomechanical evaluation. *Journal Materials Science*. 23(2): 473–483. DOI: 10.1007/s10856-011-4478-1.
- 227. Parikh SN. (2002). Bone graft substitutes: Past, present, future. *Journal of Postgraduate Medicine*, 48(2): 142–148.
- 228. Paskalev M, Krastev S, Mechkarski SV, Philipov J, Dyakova SV. (2006). Experimental study on guided bone regeneration in canine segmental ulnar defects. *Bulgarian Journal of Veterinary Medicine*. 9(4): 281–291.
- 229. Peel SAF, Hu ZM, Clokie CML. (2003). In Search of the ideal bone morphogenetic protein delivery system: in vitro studies on demineralized bone matrix, purified, and recombinant bone morphogenetic protein. *Journal of Craniofacial Surgery*. 14(3):284-291
- 230. Peterson B, Whang PG, Iglesias R, Wang JC, Lieberman JR. (2004). Osteoinductivity of commercially available demineralized bone matrix preparations in a spine fusion model. *Journal of Bone and Joint Surgery*. 86(10) 2243-2250. http://dx.doi.org/
- 231. Phimphilai M, Zhao Z, Boules H, Roca H, Franceschi RT. (2006). BMP signaling is required for RUNX2-dependent induction of the osteoblast phenotype. *Journal of Bone Minereral Research*. 21(4):637–646. DOI: 10.1359/jbmr.060109.
- 232. Pietrzak WS, Ali SN, Chitturi D, Jacob M, Woodell-May JE. (2011). BMP depletion occurs during prolonged acid demineralization of bone: characterization and implications for graft preparation. *Cell and Tissue Banking*. 12(2): 81-88. DOI: 10.1007/s10561-009-9168-9176.
- 233. Pizette S, Niswander L. (2000). BMPs are required at two steps of limb chondrogenesis: formation of prechondrogenic condensations and their differentiation into chondrocytes. Developmental Biology. 219(2):237-249. DOI: 10.1006/dbio.2000.9610.
- Pratap J, Galindo M, Zaidi SK, Vradii D, Bhat BM, Robinson JA, Choi JY, Komori T, Stein JL, Lian JB, Stein GS, van Wijnen AJ. (2003). Cell growth regulatory role of Runx2 during proliferative expansion of preosteoblasts. *Cancer Research*. 63(17): 5357-5362.

- 235. Price PA, Poser JW, Raman N. (1976). Primary structure of the gamma-carboxyglutamic acid containing protein from bovine bone. *Proceedings of the National Academy Science USA*. 73(10): 3374-3375.
- 236. Pollock R, Alcelik I, Bhatia C, Chuter G, Lingutla K, Budithi C, Krishna M. (2008). Donor site morbidity following iliac crest bone harvesting for cervical fusion: a comparison between minimally invasive and open techniques. *European Spine Journal*. 17(6): 845–852. DOI: 10.1007/s00586-008-0648-3
- Puleo DA. (1997). Dependence of mesenchymal cell responses on duration of exposure to bone morphogenetic protein-2 in vitro. *Journal Cell Physiology*.173:93-101. DOI: 10.1002/(SICI)1097-4652(199710)173:1<93:AID-JCP11>3.0.CO;2-O.
- 238. Rabie AB, Wong R, Hägg U. (2000). Composite autogenous bone and demineralized bone matrices used to repair defects in the parietal bone of rabbits. *British Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*. 38(5): 565–570. DOI: <u>http://dx.doi.org/10.1054/bjom.2000.0464</u>.
- 239. Ramazanoglu M, Lutz R, Rusche P, Trabzon L, Kose GT, Prechtl C, Schlegel KA. (2013). Bone response to biomimetic implants delivering BMP-2 and VEGF: an immunohistochemical study. *Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery*. 41(8): 826–835. DOI: 10.1016/j.jcms.2013.01.037.
- 240. Raval P, Hsu HH, Schneider DJ, Sarras MPJ, Masuhara K, Bonewald LF, Anderson HC. (1996). Expression of bone morphogenetic proteins by osteoinductive and non-osteoinductive human osteosarcoma cells. *Journal Dental Research*. 75:1518-1523.
- 241. Rawadi G, Vayssière B, Dunn F, Baron R, Roman-Roman S. (2003). BMP-2 controls alkaline phosphatase expression and osteoblast mineralization by a Wnt autocrine loop. *Journal of Bone and Mineral Research*. 18(10): 1842–1853. DOI: 10.1359/jbmr.2003.18.10.1842
- 242. Reddi AH, Huggins C. (1972). Biochemical sequences in the transformation of normal fibroblasts in adolescents rats. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*. 69(6): 1601-1605.
- 243. Reddi AH, Cunningham NS. (1993). Initiation and promotion of bone differentiation by bone morphogenetic proteins. *Journal of Bone and Mineral Research*. 8(Suppl2):S499-S502. DOI: 10.1002/jbmr.565008131.
- 244. Reddi AH. (1994). Bone and cartilage differentiation. *Current Opinion Genetetic Development*. 4(5): 737-744.
- 245. Reddi AH. (2004). Morphogenesis and tissue engineering of bone and cartilage: inductive signals, stem cells, and biomimetic biomaterials. *Tissue Engineering*. 6(4):351-359. doi:10.1089/107632700418074.
- 246. Riley EH, Lane JM, Urist MR. Lyons KM, Lieberman JR. (1996). Bone morphogenetic protein-2: Biology and application. *Clinical Orthopaedics and Related Research*. 324:39-46.
- 247. Reinholt FP, Hultenby K, Oldberg A, Heinegård D. (1990). Osteopontin--a possible anchor of osteoclasts to bone. *Proceeding of National Academy of Science of Unated States of America*. 8(12): 4473-4475.
- 248. Ripamonti U. (1991). Bone induction in nonhuman primates. An experimental study of the baboon. *Clinical Orthopaedics*. 269:284-294.
- 249. Ripamonti U, Duneas N. (1998) Tissue morphogenesis and regeneration by bone morphogenetic proteins. *Plastic and Reconstructive Surgery*. 101:227–239.
- 250. Ripamonti U, Ramoshebi LN, Matsaba T, Tasker J, Crooks J, Teare J. (2001). Bone induction by BMPs/OPs and related family members in primates. *Journal of Bone and Joint Surgery*. 83-A Suppl (Pt 2):S116-127.
- 251. Ripamonti U. (2006). Soluble osteogenic molecular signals and the induction of bone formation. *Biomaterials*. 27(6): 807-822. DOI:10.1016/j.biomaterials.2005.09.021
- 252. Rivera JA, Riaño CH, Monsalve PA, Osorio A (2003). Injertos óseos Nueva alternativa. Fase I. Extracción de proteínas morfogenéticas parcialmente purificadas de hueso bovino. *Revista Colombiana Ciencia Pecuaria*. 16(2): 139-146.
- 253. Robey PM, Fedarko NS, Hefferan TE, Bianco P, Vetter UK, Grzesik W, Friedenstein A, van der Pluijm G, Mintz KP, Young MF, Kerr JM, Ibaraki K, Heegaard AM. (1993). Structure and molecular regulation of bone matrix proteins. *Journal of Bone and Mineral Research*. 8 (Suppl 2):S483-487. DOI: 10.1002/jbmr.5650081310.
- 254. Roach HI. (1992). Trans-differentiation of hypertrophic chondrocytes into cells capable of producing a mineralized bone matrix. *Bone and Mineral*. 19(2): 1-20. DOI:10.1016/0169-6009(92)90840-A.
- 255. Robey PG. (1996). Vertebrate mineralized matrix proteins: structure and function. *Connective Tissue Research*; 35(1-4):131-136.
- Rodda SJ, McMahon AP. (20069. Distinct roles for Hedgehog and canonical Wnt signaling in specification, differentiation and maintenance of osteoblast progenitors. *Development*. 133(16):3231– 3244. DOI: 10.1242/dev.02480.
- 257. Rodrigues J, Filho L. (2005). Comparative Study analysis among two types of demineralized bone matrix and polyurethane resin derived of the castor bean oil on the bone regeneration process. A histological study in rabbit's skull. Journal of Oral and Maxillofacial *Surgery*. 63(8S):84–85. http://dx.doi.org/10.1016/j.joms.2005.05.262
- 258. Rubin CT, Lanyon LE. (1987). Osteoregulatory nature of mechanical stimuli: Function as a determinant for adaptive bone remodeling. *Journal Orthopaedic Research*. 5(2): 300–310
- 259. Saladin K. (2007). Anatomy & Physiology: The Unity of Form and Function., New York, USA. McGraw-Hill.
- 260. Sampath TK, Reddi AH. (1984). Importance of geometry of the extracellular matrix in endochondral bone formation. *Journal of Cell Biology*. 98(6): 2192-2197.
- 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.
- 262. Sanches DS, Pires CG, Fukumasu H, Cogliati B, Matsuzaki P, Chaible LM, Torres LN, Ferrigno CRA, Dagli MLZ. (2009). Expression of connexins in normal and neoplastic canine bone tissue. *Veterinary Pathology*. 46:846–859 (2009). DOI: 10.1354/vp.08-VP-0263-S-FL
- 263. Sandhu HS, Grewal HS, Parvataneni H. (1999). Bone grafting for spinal fusion. Orthopaedics Clinics of North America. 30: 685-698. DOI: 10.1016/S0030-5898(05)70120-6.
- 264. Scammell BE, Roach HJ. (1996). A new role for the chondrocyte in the fracture repair: endochondral ossification includes direct bone formation by former chondrocytes. *Journal of Bone Mineral Research*. 11: 737-745.
- 265. Scadden DT. (2006). The stem-cell niche as an entity of action. *Nature*. 441(7097): 1075-1079. DOI: 10.1038/nature04957
- 266. Sciadini MF, Dawson JM, Johnson KD. (1997). Bovine derived bone protein as a bone graft substitute in a canine segmental defect model. *Journal of Orthopaedic Trauma*; 11(7): 496–508.
- 267. Schaffler MB, Cheung WY, Majeska R, Kennedy O. (2014). Osteocytes: master orchestrators of bone. *Calcified Tissue International*. 94(1): 5–24. DOI: 10.1007/s00223-013-9790-y.
- 268. Scheufler C, Sebald W, Hülsmeyer M. (1999). Crystal structure of human bone morphogenetic protein-2 at 2.7Å resolution. *Journal of Molecular Biology*. 287:103-115
- 269. Schmitz JP, Hollinger JO. (1986). The critical size defect as an experimental model for craniomandibulofacial nonunions. *Clinical Orthopaedic Related Research*. 205:299-308.
- 270. Schoeder TM, Jensen ED, Westendorf JJ. (2005). Runx2: a master organizer of gene transcription in developing and maturing osteoblasts. *Birth Defects Research: Embryo Today.* 75(3): 13-225. DOI: 10.1002/bdrc.20043.
- 271. Schwartz Z, Sommers A, Mellonig, JT, Carnes Jr DD, Dean DL, Cochran L. (1998). Ability of commercial demineralized freeze-dried bone allograft to induce new bone formation is dependent on donor age but not gender. *Journal of Periodontology*; 69(4):470-478.
- 272. Serafini M, Sacchetti B, Pievani A, Redaelli D, Remoli C, Biondi A, Riminucci M, Bianco P. (2014). Establishment of bone marrow and hematopoietic niches in vivo by reversion of chondrocyte differentiation of human bone marrow stromal cells. *Stem Cell Research*. 12:659-672. DOI: 10.1016/j.scr.2014.01.006
- 273. Servin-Trujillo MA, Reyes-Esparza JA, Garrido-Fariña G, Flores-Gazca, E, Osuna-Martinez U, Rodriguez-Fragoso L. (2011). Use of a graft of demineralized bone matrix along with TGF-β1 leads to an early bone repair in dogs. *Journal Veterinary Medicine Science*; 73(9): 1151-1161.
- 274. Shafiei Z, Bigham AS, Dehghani SN, Nezhad ST. (2009). Fresh cortical autograft versus fresh cortical allograft effects on experimental bone healing in rabbits: radiological, histopathological and biomechanical evaluation. *Cell Tissue Bank*. 10(1):19-26. DOI: 10.1007/s10561-008-9105-0.
- 275. Sheikh SS, Mbalaviele G, Warlow P, Civitelli R. (2001). Beta-catenin signaling during osteoblast differentiation. *The American Society of Bone and Mineral Research* 23rd Annual Meeting SU239. Phoenix, AZ, USA, October 12–16, 2001, p. S368.
- 276. Shekaran A, García AJ. (2011). Extracellular matrix-mimetic adhesive biomaterials for bone repair. *Journal of Biomedical Material Research*. A 2011; 96:261–272. DOI: 10.1002/jbm.a.32979.
- 277. Shen B, Wei A, Whittaker S, Williams LA, Tao H, Ma DD. (2010). The role of BMP-7 in chondrogenic and osteogenic differentiation of human bone marrow multipotent mesenchymal stromal cells in vitro. *Journal Cell Biochemistry*. 109(2): 406-16. DOI: 10.1002/jcb.2241.
- 278. Shih HN, Shih LY, Sung TH, Chang YC. (2005). Restoration of bone defect and enhancement of bone ingrowth using partially demineralized bone matrix and marrow stromal cells. *Journal Orthopaedic Research*. 23(6): 1293-1299.

- 279. Shu B, Zhang M, Xie R, Wang M, Jin H, Hou W, Tang D, Harris SE, Mishina Y, O'Keefe RE, Hilton MJ, Wang Y, Chen D. (2011). BMP2, but not BMP4, is crucial for chondrocyte proliferation and maturation during endochondral bone development. *Journal of Cell Science*. 124:3428-3440. DOI: 10.1242/jcs.083659.
- 280. Silbermann M, Lewinson D, Gonen H, Lizarbe MA, von der Mark K. (1983). In vitro transformation of chondroprogenitor cells into osteoblasts and the formation of new membrane bone. *The Anatomy Record*. 206(4): 373-383.
- 281. Silva RF, Rodrigues da Silva Sasso G, Sasso-Cerri E, Simões MJ, Cerri PS. (2015). Biology of bone tissue: structure, function and factors that influence bone cells. *BioMed Research International* http://dx.doi.org/10.1155/2015/421746
- 282. Simonet WS, Lacey DL, Dunstan CR, Kelley M, Chang MS, Lüthy R, Nguyen HQ, Wooden S, Bennett L, Boone T, Shimamoto G, DeRose M, Elliott R, Colombero A, Tan HL, Trail G, Sullivan J, Davy E, Bucay N, Renshaw-Gegg L, Hughes TM, Hill D, Pattison W, Campbell P, Sander S, Van G, Tarpley J, Derby P, Lee R, Boyle WJ. (1997). Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density. *Cell.* 89(2): 309-319.
- 283. Smith N, Dong Y, Lian JB, Pratap J, Kingsley PD, Van Wijnen AJ, Stein JL, Schawarz EM. O'Keefe RJ, Stein GS, Drissi MH. (2005) Overlapping expression of Runx1(Cbfa2) and Runx2(Cbfa1) transcription factors supports cooperative induction of skeletal development. *Journal of Cell Physiology*. 203:133–143. DOI: 10.1002/jcp.20210.
- 284. Sodek J, Ganss B, McKee MD. (2000). Osteopontin. *Critical Review in Oral Biology and Medicine*. 11(3): 279–303.
- 285. Solheim E. (1998). Osteoinduction by demineralized bone. International Orthopaedics. 22(5): 335-342.
- 286. Speck NA, Stacy T. (1995). A new transcription factor family associated with human leukemias. *Critical Review Eukaryotic Gene Expression*. 5(3-4):3337-3364.
- 287. Spronk HM, Soute BA, Schurgers LJ,Cleutjens JP, Thijssen HH, De Mey JG, Vermeer C. (2001). Matrix Gla protein accumulates at the border of regions of calcification and normal tissue in the media of the arterial vessel wall. *Biochemical and Biophyscal Research Communications*. 289(2): 485-490. DOI:10.1006/bbrc.2001.5996.
- 288. Standal T, Borset M, Sundan A. (2004). Role of osteopontin in adhesion, migration, cell survival and bone remodeling. *Experimental Oncology*; 26(3): 179-184.
- 289. Stein GS, Lian JB, Stein JL, van Wijnen AJ, Choi JY, Pratap J, Zaidi SK. (2003). Temporal and spatial parameters of skeletal gene expression: targeting RUNX factors and their coregulatory proteins to subnuclear domains. *Connective Tissue Research*. 44(Suppl 1):149-53.
- 290. Stein GS, Lian JB, van Wijnen AJ, Stein JL, Javed A, Montecino M, Zaidi SK, Young D, Choi JY, Gutierrez S, Pockwinse S. (2004b). Nuclear microenvironments support assembly and organization of the transcriptional regulatory machinery for cell proliferation and differentiation. *Journal Cell Biochemistry*. 91(2): 287-302. DOI: 10.1002/jcb.1077.
- 291. Steitz SA, Speer MY, McKee MD, Liaw L, Almeida M, Yang H, Giachelli CM. (2002). Osteopontin inhibits mineral deposition and promotes regression of ectopic calcification. American Journal of Pathology. 161(6):2035-2046.
- 292. 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
- 293. Stevenson S. (1998). Enhancement of fracture healing with autogenous and allogeneic bone grafts. *Clinic Orthopaedic Related Research.* 355S:S239-46.
- 294. Stewart A, Guan H, Yang K. (2010). BMP-3 promotes mesenchymal stem cell proliferation through the TGF-beta/activin signaling pathway. *Journal of Cell Physiology*. 223(3): 658-666. DOI: 10.1002/jcp.22064.
- 295. Stricker S, Fundele R, Vortkamp A, Mundlos S. (2002). Role of Runx2 genes in chondrocyte differentiation. *Development Biology*. 245(1):95-108. DOI:10.1006/dbio.2002.0640
- 296. Sugimura R, Li L. (2010). Noncanonical Wnt signaling in vertebrate development, stem cells, and diseases. *Birth Defects Research. Part C. Embryo Today.* 90(4):243-56. DOI: 10.1002/bdrc.20195
- 297. Swenson CL, Arnoczky SP (2003). Demineralization for inactivation of infectious retrovirus in systemically infected cortical bone: in vitro and in vivo experimental studies. *Journal of Bone and Joint Surgery*. 85-A(2): 323-332.
- 298. Takeda S, Bonnamy JP, Owen MJ, Ducy P, Karsenty G. (2001). Continuous expression of Cbfa1 in nonhypertrophic chondrocytes uncovers its ability to induce hypertrophic chondrocytes differentiation and partially rescues Cbfa1- deficient mice. *Genes & Development*. 15(4):467-481. DOI: 10.1101/gad.845101

- 299. Takegamia Y, Ohkawara B, Itoa M, Masudaa A, Nakashimab H, Ishigurob N, Ohnoa K. R-spondin 2 facilitates differentiation of proliferating chondrocytes into hypertrophic chondrocytes by enhancing Wnt/β-catenin signaling in endochondral ossification (2016). *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 473(1): 255–264. DOI:10.1016/j.bbrc.2016.03.089
- 300. Tang H, Xu Z, Qin X, Wu B, Wu L, Zhao X, Li. Y. (2009). Chest wall reconstruction in a canine model using polydioxanone mesh, demineralized bone matrix and bone marrow stromal cells. *Biomaterials*. 30(19): 3224-33. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2009.02.007.
- 301. Thiede MA, Smock SL, Petersen DN, Grasser WA, Thompson DD, Nishimoto SK. (1994). Presence of messenger ribonucleic acid encoding osteocalcin, a marker of bone turnover, in bone marrow megakaryocytes and peripheral blood platelets. *Endocrinology* 135(3) :929–937. DOI: http://dx.doi.org/10.1210/endo.135.3.8070388.
- 302. Thompson EM, Matsiko A, Farrell E, Kelly DJ, O'Brien FJ. (2015). Recapitulating endochondral ossification: a promising route to in vivo bone regeneration. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*. 9(8): 889–902. DOI: 10.1002/term.1918
- 303. Thurner PJ, Chen CG, Ionova-Martin S, Sun L, Harman A, Porter A, Ager III JW, Ritchie RO, Alliston T. (2010). Osteopontin deficiency increases bone fragility but preserves bone mass. *Bone*. 46(6):1564-1573. DOI: 10.1016/j.bone.2010.02.014.
- 304. Tiedeman JJ, Connolly JF, Strates BS, Lippiello L. (1991). Treatment of nonunion by percutaneous injection of bone marrow and demineralized bone matrix. An experimental study in dogs. *Clinical Orthopaedic Related Research*. 268(3):294-302.
- 305. Tsuji K, Bandyopadhyay A, Harfe BD, Cox K, Kakar S, Gerstenfeld L, Einhorn T, Tabin CJ, Rosen V. (2006). BMP2 activity, although dispensable for bone formation, is required for the initiation of fracture healing. *Nature Genetic.* 38(12): 1424-1429. DOI: 10.1038/ng1916.
- 306. Tsuji K, Cox K, Gamer L, Graf D, Eeconomides A, Rosen V. (2010). Conditional deletion of BMP7 from the limb skeleton does not affect bone formation or fracture repair. *Journal Orthopaedics Research*. 28(3): 384–389. DOI: 10.1002/jor.20996.
- 307. Tuli SM, Singh AD. 1978. The osteoinductive property of decalcified bone matrix. *Journal of Bone and Joint Surgery*; 60B:116-123.
- 308. Turner TM, Urban RM, Hall DJ, Cheema N, Lim TH. (2003). Restoration of large bone defects using a hard-setting, injectable putty containing demineralized bone particles compared to cancellous autograft bone. *Orthopedics*. 26(5 Suppl):S561-S565.
- 309. Uludag H, Gao T, Porter TJ, Friess W, Wozney JM. (2001). Delivery systems for BMPs: factors contributing to protein retention at an application site. *Journal of Bone Joint Surgery*. 83A Suppl 1(Pt 2):S128-135.
- 310. Ueta C, Iwamoto M, Kanatani N, Yoshida C, Liu Y, Enomoto-Iwamoto M, Ohmori T, Enomoto H, Nakata K, Takada K, Kurisu K, Komori T. (2001). Skeletal malformations caused by overexpression of Cbfa1 or its dominant negative form in chondrocytes. *Journal of Cell Biology*. 153(1): 87–100.
- 311. Urist MR. (1965). Bone formation by autoinduction. *Science*. 150(3698): 893-899. DOI: 10.1126/science.150.3698.893.
- 312. Urist MR. (1970). A morphogenetic matrix for differentiation of bone tissue. *Calcified Tissue Research*. 4(1):98-101.
- 313. Urist MR, Iwata H, Cecotti PL, Dorfman RL, Boyd SD, McDowell R, Chien C. (1973). Bone morphogenesis in implants of insoluble bone gelatin (cell differentiation/osteogenesis/noncollagenous proteins). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 70(12):3511-3515.
- 314. Urist MR, DeLange RJ, Finerman GA. (1983). Bone cell differentiation and growth factors. *Science* 220(4598):680–686.
- 315. van de Loo PG, Soute BA, van Haarlem LJ, Vermeer C. (1987). The effect of Gla-containing proteins on the precipitation of insoluble salts. *Biochemical and Biophyscal Research Communication*. 142:113–119
- 316. Vaananen HK, Zhao H, Mulari M, Halleen JM. (2000). The cell biology of osteoclast function. *Journal* of Cell Science. 113:377-381.
- 317. 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.
- 318. Vanden Bossche L, Vanderstraeten G. (2005). Heterotopic ossification: a review. *Journal of Rehabilitation Medicine*. 37(3):129–136. DOI: 10.1080/16501970510027628.

- 319. 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.
- 320. Veis A, Dorvee JR. (2013). Biomineralization mechanisms: a new paradigm for crystal nucleation in organic matrices. *Calcified Tissue International*. 93(4): 307-315. DOI: 10.1007/s00223-012-9678-2.
- 321. Velasco J, Riancho JA, La vía Wnt y el hueso. *Revista Española de Enfermedades Metabólicas Óseas;* 17:5-9.
- 322. Villafan-Bernal JR, Sanchez-Enríquez S, Muñoz-Valle, JF. (2011). Molecular modulation of osteocalcin and its relevance in diabetes. *International Journal of Molecular Medicine*. 28(3): 283–293. DOI: 10.3892/ijmm.2011.706.
- 323. Wang EA, Rosen V, Cordes P, Hewick RM, Kriz MJ, Luxenberg DP, Sibley BS, Wozney JM. (1988). Purification and characterization of other distinct bone-inducing factors. *Proceeding of National Academy of Science*. 85(24): 9484-9488.
- 324. Wang JC, Kanim LE, Nagakawa IS, Yamane BH, Vinters HV, Dawson E. (2001). Dose-dependent toxicity of a commercially available demineralized bone matrix material. *Spine*. 26(3):1429-1435.
- 325. Wang C, Yuana X, Yanga S. (2013). IFT80 is essential for chondrocyte differentiation by regulating Hedgehog and Wnt signaling pathways. *Experimental Cell Research*. 319(5): 623–632.
- 326. Weber GF, Ashkar S, Glimcher MJ, Cantor H. (1996). Receptor-ligand interaction between CD44 and osteopontin (Eta-1). *Science*; 271(5248): 509-12.
- 327. Weber GF. (2001). The metastasis gene osteopontin: a candidate target for cancer therapy. *Biochimica et Biophys Acta*. 552(2): 61–85.
- 328. Weiner S, Sagi I, Addadi L. (2005). Structural biology: Choosing the crystallization path less traveled. *Science*. 309(5737): 1027-1028. DOI: 10.1126/science.1114920.
- 329. Wildemann B, Kadow-Romacker A, Haas NP, Schmidmaier G. (2007). Quantification of various growth factors in different demineralized bone matrix preparations. *Journal of Biomedical Materials Research*. 81(2): 437–442. DOI:10.1002/jbm.a.31085
- 330. Willenegger H, Perren SM, Schenk R. (1971). Primary and secondary healing of bone fractures. *Der Chirurg*; 42(6):241-252.
- Wilson-Hench J. (1987) Osteoinduction. In: Williams DF (ed) Progress in biomedical engineering, vol 4. Definitions in biomaterials. (pp29) Amsterdam, Elsevier.
- 332. Winn SR, Uludag H, Hollinger JO. (1999). Carrier systems for bone morphogenetic proteins. *Clinical and Orthopaedic Related Research*. 367(Suppl):S95-106.
- 333. Włodarski K. (1985). Orthotopic and ectopic chondrogenesis and osteogenesis mediated by neoplastic cells. *Clinical Orthopaedic.Related. Research*. 200: 248-265.
- 334. Włodarski, K.H.; Włodarski, P.K.; Brodzikowska, A. 2006. Metaplasia of chondrocytes into osteoblasts. *Folia biológica*. 54(3-4): 75-80.
- 335. Wong MY, Yu Y, Yang JL, Woolford T, Morgan DA, Walsh WR. (2014). 11 kGy gamma irradiated demineralized bone matrix enhances osteoclast activity. *European Journal of Orthopaedic Surgery Traumatology*. 24(5):655-661. DOI: 10.1007/s00590-013-1238-6.
- Wodarz A, Nusse R. (1998). Mechanisms of Wnt signal transduction. *Annual Review Cell Development Biology*; 14:59-88. DOI: http://dx.doi.org/10.1146/annurev.cellbio.14.1.59.
- 337. Woo BH, Fink BF, Page R, Schrier JA, Jo YW, Jiang G, Deluca M, Vasconey HC, Deluca PP. (2001). Enhancement of bone growth by sustained delivery of recombinant human bone morphogenetic protein-2 in a polymeric matrix. *Pharmaceutical Research*. 18(12):1747-53. DOI: 10.1023/A:1013382832091.
- 338. Wozney JM. (1992) The bone morphogenetic protein family and osteogenesis. *Molecular Reproduction and Development*. 32(2): 160-167. DOI: 10.1002/mrd.1080320212.
- 339. Wozney JM. (1994). Molecular biology of the bone morphogenetic proteins. In: Urist, MR, Oconnor BT, Burwell G (eds). *Bone grafts, derivates and substitutes*. Butterworth Heinemann, Oxford: UK.
- 340. 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(4885): 1528-1534. DOI: 10.1126/science.3201241
- 341. Xiao ZS, Hinson TK, Quarles LD. (1999). Cbfa1 isoform overexpression upregulates osteocalcin gene expression in non-osteoblastic and pre-osteoblastic cells. *Journal Cell Biochemistry*. 74(4):596-605.
- 342. Xu J, Qin H, Wang X, Zhou Q, Luo F, Hou T, He Q. (2009). Repair of large segmental bone defects using bone marrow stromal cells with demineralized bone matrix *Orthopaedic Surgery*. 1:34–41. DOI: 10.1111/j.2757-7861.2008.00007.x
- 343. Yamaguchi A, Komori T, Suda T. (2000). Regulation of osteoblast differentiation mediated by Bone Morphogenetic Proteins, Hedgehogs, and Cbfa1. *Endocrinology Review*. 21(4): 393-411.

- 344. Yang G, Zhu L, Hou N, Lan Y, Wu XM, Zhou B, Teng Y, Yang X. (2014a). Osteogenic fate of hypertrophic chondrocytes. *Cell Research*. 24, 1266-1269.
- 345. Yang L, Tsang KY, Tang HC, Chan D, Cheah KS. (2014b). Hypertrophic chondrocytes can become osteoblasts and osteocytes in endochondral bone formation. *Proceedings of National Academy Science*. 111(33):12097-12102. DOI: 10.1073/pnas.1302703111.
- 346. Yasko AW, Lane JM, Fellinger EJ, Rosen V, Wozney JM, Wang EA. (1992). The healing of segmental bone defects, induced by recombinant human bone morphogenetic protein (rhBMP-2). A radiographic, histological, and biomechanical study in rats. *Journal Bone Joint Surgery*. 74(5): 659-670.
- 347. Yasui N, Sato M, Ochi T, Kimura T, Kawahata H, Kitamura Y, Nomura S. (1997). Three modes of ossification during distraction osteogenesis in the rat. *Journal of Bone and Joint Surgery*. 79(5): 824-830.
- 348. Yazdi M, Bernick S, Paule WJ, Nimni ME. (1991). Postmortem degradation of demineralized bone matrix osteoinductive potential. Effect of time and storage temperature. *Clinical Orthopaedic Related Research*. 262(1): 281-285.
- 349. Yoon BS, Ovchinnikov DA, Yoshii I, Mishina Y, Behringer RR, Lyons KM. (2005). Bmpr1a and Bmpr1b have overlapping functions and are essential for chondrogenesis in vivo. *Proceeding of National Acdemy of Sciences USA*. 102(14): 5062–5067.
- 350. Young MF. (2003). Bone matrix proteins: more than markers. *Calcified Tissue Research*. 72(1):2-4. DOI: 10.1007/s00223-002-1017-6.
- 351. Yoshida CA, Furuichi T, Fujita T, Fukuyama R, Kanatani N, Kobayashi S, Satake M, Takada K, Komori T. (2002). Core-binding factor beta interacts with Runx2 and is required for skeletal development. *Nature Genetics.* 32:633-638. DOI:10.1038/ng1015.
- 352. Zhang M, Powers Jr RM, Wolfinbarger Jr L. (1997). Effect(s) of the demineralization process on the osteoinductivity of demineralized bone matrix. *Journal of Periodontology*. 68(11): 1085-1092. DOI 10.1902/jop.1997.68.11.1085
- 353. Zhang YW, Yasui N, Ito K, Huang G, Fujii M, Hanai JI, Nogami H, Ochi T, Miyazono K, Ito Y. (2000). A RUNX2/PEBP2αA/CBFA1 mutation displaying impaired transactivation and Smad interaction in cleidocranial displasia. Proceedings of National Academy of Science. 97(19): 10549-10554. DOI: 10.1073/pnas.180309597
- 354. Zhang C, Cho K, Huang Y, Lyons JP, Zhou X, Sinha K, McCrea PD, de Crombrugghe B. (2008). Inhibition of Wnt signaling by theosteoblast-specific transcription factor Osterix. *Proceeding of Natural Academy of Science USA*. 105(19):6936-6941. DOI: 10.1073/pnas.0710831105.
- 355. Zhang N, Dietrich MA, Lopez MJ. (2013). Canine intra-articular multipotent stromal cells (MSC) from adipose tissue have the highest in vitro expansion rates, multipotentiality, and MSC immunophenotypes. *Veterinary Surgery*. 42(2):137-46. DOI; 10.1111/j.1532-950X.2013.01091.
- 356. Zohar R, Cheifetz S, McCulloch CAG, Sodek J. (1998). Analysis of intracellular osteopontin as a marker of osteoblastic cell differentiation and mesenchymal cell migration. *European Journal of Oral Sciences*. 106(S1): 401–407. DOI: 10.1111/j.1600-0722.1998.tb02206.x
- 357. Zhou X, von der Mark K, Henry S, Norton W, Adams H, de Crombrugghe B. (2014). Chondrocytes transdifferentiate into osteoblasts in endochondral bone during development, postnatal growth and fracture healing in mice. *PLoS Genet.* 10, e1004820. <u>http://dx.doi.org/10.1371/journal.pgen.1004820</u>
- 358. Zhu B, Suzuki K, Goldberg HA, Rittling SR, Denhardt DT, McCulloch CA, Sodek J. (2004). Osteopontin modulates CD44-dependent chemotaxis of peritoneal macrophages through G-proteincoupled receptors: evidence of a role for an intracellular form of osteopontin. *Journal of Cell Physiology*. 198(1): 155–67.
- 359. Zimmermann G, Moghaddam A. (2011). Allograft bone matrix versus synthetic bone graft substitutes. *Injury*. 42: S16–S21. DOI: 10.1016/j.*injury*.2011.06.199.
- 360. Zoch ML, Clemens TL, Riddle RC. (2016). New insights into the biology of osteocalcin. *Bone*. 82(6) :42-49. DOI: 10.1016/j.bone.2015.05.046