

## **Inmunodetección de Wingless int-3 (Wnt3) en la reparación de defectos óseos ortopédicos en conejos tratados con matriz ósea desmineralizada**

*Audisio, S.A.<sup>1</sup>; Vaquero, P.G.<sup>1</sup>; Verna, E.C.<sup>1</sup>; Cristofolini, A.L.<sup>2</sup>; Merkis, C.I.<sup>2</sup>*

*1 Cátedra Técnica y Patología Quirúrgica – Facultad de Ciencias Veterinarias, UNLPam, Calle 5 y 116, General Pico (6360), La Pampa, Argentina.*

*2 Área Microscopía Electrónica - Facultad de Agronomía y Veterinaria, UNRC, Río Cuarto, Córdoba, Argentina*

*Correo electrónico: [saudisio@vet.unlpam.edu.ar](mailto:saudisio@vet.unlpam.edu.ar)*

---

### **RESUMEN**

Si bien la expresión de Wnt y sus isoformas se conocen ampliamente en la esquelotogénesis embrionaria, poco se sabe del rol que desempeña, en particular la isoforma Wnt3, en la reparación de defectos óseos ortopédicos. Se emplearon 30 conejos a los que se les practicó a cada uno, un defecto óseo en sus miembros torácicos, el que se procedió a rellenar con matriz ósea desmineralizada (MOD). Los conejos fueron sacrificados a los 7, 15, 21, 30, 60 y 150 días post-tratamiento para realizar inmunodetección de Wnt3 en los sitios de reparación. La inmunodeterminación se efectuó mediante densidad óptica (DO) y densidad óptica integrada (DOI). Las DO y DOI se analizaron mediante ANOVA y Test LSD de Fisher. La proteína Wnt3 se inmunodetectó en células mesenquimáticas, en los sitios donde se produjo la condrogénesis y en células osteoprogenitoras, preosteoblastos y osteoblastos. La DO tuvo variaciones significativas ( $p < 0,05$ ) a los 7, 15, 60 y 150 días post-tratamiento. El mismo análisis estadístico para DOI señaló que hubo diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ) a los 30 días respecto a los 60 y 150 días. La evidencia expuesta mostró los sitios histológicos como así también la cronología de expresión de Wnt3 en la reparación de defectos óseos ortopédicos tratados con matriz ósea desmineralizada.

---

**Palabras clave:** Wnt, matriz ósea desmineralizada, hueso, conejo, inmunomarcación

## ***Wingless int-3 (Wnt3) Immunodetection in the repair of orthopedic bone defects in rabbits treated with demineralized bone matrix***

### **SUMMARY**

Although the expression Wnt and its isoforms are widely known in the embryonic skeletogenesis, little is known about the role they play in the particular Wnt3 isoform in the repair of orthopedic bone defects. Thirty rabbits were used, which were given a bone defect in one of the radiuses. The defect was refilled with demineralized bone matrix (DBM). The rabbits were sacrificed at 7, 15, 21, 30, 60 and 150 days post-treatment to immuno-detect the Wnt3 in the repair sites. The immuno-determination was done by optic density (OD) and integrated optic density (IOD). Both, the OD and the IOD were analyzed using ANOVA and Fisher LSD test. The Wnt3 protein was immuno-detected in mesenchymal cells, in the sites where the chondrogenesis was produced and in osteoprogenitor, preosteoblasts and osteoblasts cells. The OD had significant variations ( $p < 0,05$ ) at 7, 15, 60 and 150 days post-treatment. The same statistical analysis for IOD showed significant statistical differences ( $p < 0,05$ ) at day 30 with respect to 60 and 150 days post-treatment. The evidence showed the histological sites as well as the chronological immune expression of Wt3 in the repair of orthopaedic bone defects treated with demineralized bone matrix.

**Key words:** Wnt, demineralized bone matrix, rabbit, bone, immunostaining

Fecha de recepción artículo original: 06-06-2018

Fecha aceptación para su publicación: 10-04-2019

---

## ***Introducción***

La matriz ósea desmineralizada (MOD) es utilizada en cirugía veterinaria debido a su propiedad osteoinductiva<sup>(1)</sup>. Por esa razón se la suele emplear con el fin de reparar fracturas, resolver no uniones,

---

osteomielitis y rellenar defectos como consecuencia del tratamiento de neoplasias<sup>(2,3,4,5)</sup>.

La MOD se encuentra constituida por los elementos orgánicos que conforman la matriz ósea. Entre ellos se hallan el colágeno Tipo I, la proteína morfogénica del hueso (BMP), osteocalcina (OC), osteopontina (OPN), sialoproteína ósea BSP, (por su sigla en inglés) y osteonectina<sup>(6,7)</sup>.

La proteína Wingless-int (Wnt) conforma una familia de glicoproteínas que se encuentra implicada en el desarrollo embrionario, la inducción de tejido, la polaridad axial<sup>(8,9)</sup> y la tumorigénesis<sup>(10)</sup>. Es reguladora de la formación de hueso junto a la hormona paratiroide, prostaglandinas y BMP. Impulsa la diferenciación de las células mesenquimales (CM) en osteoblastos<sup>(10)</sup>, la diferenciación en osteoblastos<sup>(11)</sup>, en condrocitos<sup>(12)</sup> y regula la masa ósea<sup>(13)</sup>.

Wnt acciona sobre las células a través de las vías canónica y no canónica. La vía canónica es la que mejor se conoce<sup>(14,15,16)</sup> esta proteína actúa impidiendo la degradación de la  $\beta$ -catenina citosólica, evitando así que la misma intervenga sobre el ADN en el núcleo celular e induciendo la proliferación y diferenciación celular. Mientras que la vía no canónica utiliza mediadores diferentes para expresarse<sup>(17)</sup>.

El objetivo del presente artículo, según protocolo previamente informado por autores<sup>(18)</sup>, consistió en establecer y cuantificar la presencia espacial y temporal de Wnt3 en el proceso de reparación de defectos óseos ortopédicos tratados con MOD procesada.

## ***Materiales y métodos***

Se emplearon 30 conejos machos y hembras sexualmente maduros a los que se les brindaron cuidados de manejo según las normas de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional de La Pampa. Los animales fueron mantenidos en jaulas individuales, alimentados con una fórmula balanceada y agua *ad-libitum*. Luego de un período de acostumbramiento a las condiciones de alojamiento se procedió a realizar la experiencia.

Ante la falta en el momento de realizar el trabajo de reglamentación de ética animal para el abordaje experimental, se confeccionó expreso un protocolo siguiendo normas internacionales avaladas por las Facultades de Ciencias Veterinarias de las Universidades de La Plata y Río Cuarto.

Los conejos fueron sedados con 0,1 mg/kg de diazepam (Diazepam®, Lab Zoovet, Arg), 0,01 mg/kg IM de acepromacina (Acedan®, Lab Holliday, Arg) y anestesiados con 40 mg/kg IM de ketamina (ketamina

---

50®, Lab Holliday, Arg). A cada animal le fue acondicionado uno de los miembros torácicos para ser intervenidos en condiciones de asepsia. Se abordaron las diáfisis radiales a través de la cara dorsal del antebrazo donde se creó un defecto que por sus mínimas dimensiones no cura de forma espontánea en la vida del animal<sup>(19)</sup>, equivalente a dos veces el diámetro de la diáfisis<sup>(20)</sup>.

La MOD se obtuvo de procesar diáfisis óseas provenientes de huesos largos de conejos según protocolo previamente informado<sup>(18)</sup>. Brevemente, la técnica consistió en extraer los tejidos blandos de los huesos a 4°C. Las diáfisis se fragmentaron hasta obtener partículas de 100 a 750 µm. Al hueso fragmentado le fueron extraídos los lípidos con una solución de cloroformo:metanol y luego se desmineralizó con ácido clorhídrico (HCl) 0,6N. Una vez estabilizado el pH en 7,0 se conservó en alcohol etílico 95° a 4°C hasta su uso.

Luego de rellenar los defectos con la MOD, se suturaron los músculos extensores con poligalactina (Vicryl®, Ethicon, USA) y el tejido subcutáneo y piel según técnicas de rutina. Luego de las intervenciones los conejos recibieron 1.000.000 IU de bencilpenicilina y dihidroestreptomicina (Dipenisol®, Lab. Bayer, Arg.) y antiinflamatorios no esteroides, (Ketofen 0,1 mg/kg (Kalmavet®, Lab Vetanco, Arg) por 3-5 días.

Los conejos fueron sacrificados a los 7, 15, 21, 30, 60 y 150 días post-operatorio en grupos de 5 animales. 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 microtomo (Microtom®, USA) y montaron 3-4 cortes sobre cada portaobjeto. Los cortes histológicos se trataron con peróxido de hidrógeno al 3% (v/v), luego se lavaron con PBS y posteriormente se incubaron con el anticuerpo para Wnt3 (H-70): sc-28824 dilución 1/200; Santa Cruz Biotechnology, Inc, USA) durante 1 hora a temperatura ambiente en cámara húmeda. Posteriormente fueron lavados con solución tampón fosfato salino (PBS pH 7,2) e incubados durante 20 minutos con el segundo anticuerpo biotinilado (compuesto por inmunoglobulinas biotiniladas anti-conejo, anti-ratón y anti-cabra). Luego de ser nuevamente lavados con PBS fueron tratados con el complejo de streptavidina conjugada con peroxidasa (LSAB®+Systems HRP, Dako Cytomation). Luego del período de incubación fueron lavados y tratados con la solución de sustrato cromógeno 3,3'-diaminobenzidina (DAB). Con posterioridad los cortes fueron contrastados con hematoxilina de Mayer,

---

lavados con solución de hidróxido de amonio, deshidratados en batería de alcoholes de concentración creciente y montados con Entellan (Merck, Alemania).

La expresión de Wnt3 se estableció positiva cuando se tiñó de color marrón la matriz extracelular y citoplasma de células mesenquimáticas, osteoblastos, osteocitos y osteoclastos.

## **ANÁLISIS DE DENSITOMETRÍA ÓPTICA (DO) Y DENSITOMETRÍA ÓPTICA INTEGRADA (DOI)**

Se capturaron imágenes de los cortes inmunomarcados con aumento 200X con un microscopio óptico Axiophot (Carl Zeis, Alemania) acoplado a una cámara digital Powershot (G6, 7.1 megapíxeles, Canon INC, Japón) que empleó el software AxioVision 4.6.3 (Carl Zeis, Alemania). Las imágenes tomadas correspondieron a las partículas de MOD, tejido osteocondroide, a la fase de osificación y del hueso nuevo trabecular y hueso maduro. Las imágenes se analizaron según metodología previamente informada por Vasconcellos *et al.*<sup>(21)</sup>

La inmunomarcación de Wnt3 se cuantificó calculando la densidad óptica (DO) y densidad óptica integrada (DOI). Para estimar las DO y DOI las imágenes capturadas de los cortes histológicos se introdujeron en el software ImageJ 1.49b (Media Cybernetics, USA). Éste convirtió el color marrón de la expresión de BMP-2 en grises en una escala que se extiende de 0 a 255 (el 0 corresponde al blanco y el número 255 al negro). La densidad óptica se calculó según la fórmula  $DO = \log_{10} (IT/II)$ ; la IT es la intensidad transmitida (equivale a 255) y la II que es la intensidad incidente, que se corresponde a la media de grises en 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 Wnt3, según la fórmula  $DOI = (DO * AREA)$ . El resultado de ambas fórmulas se expresó en unidades arbitrarias (UA).

## **ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

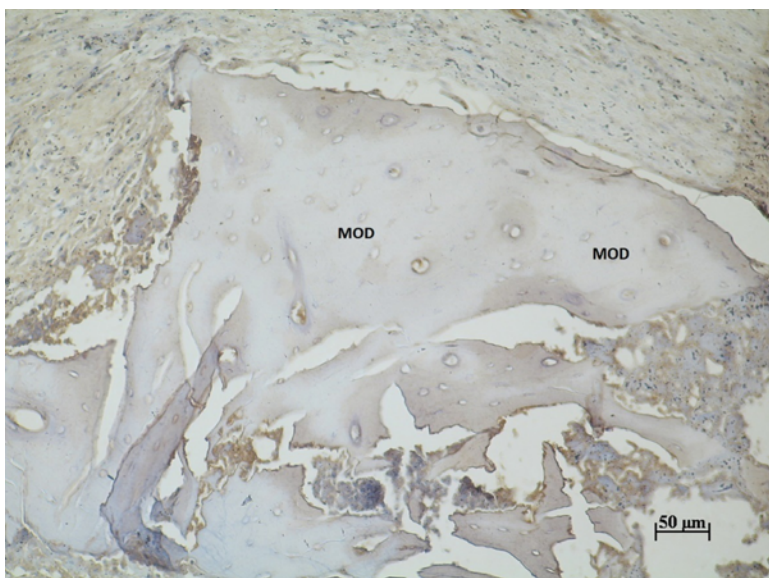
Los datos obtenidos se introdujeron en el software Infostat<sup>(22)</sup> con los cuales se realizó estadística descriptiva. Las medias de cada período de estudio se las analizó con ANOVA y test de LSD de Fisher para comparar múltiples grupos. La significación estadística se definió como  $p < 0,05$ .

## Resultados

A los 7 días post-operatorio la proteína Wnt3 se inmunodetectó en las células mesenquimáticas (CM) ocupando los espacios entre las partículas de MOD (Figura N°1). La DO para Wnt3 fue 0,10 ( $\pm 0,05$ ; min:0,04-máx:0,21) y la DOI 3,15 ( $\pm 4,66$ ; min: 0,09-máx: 21,07) (Tabla N°1).

**Tabla N°1.** Densidad óptica (DO) y densidad óptica integrada (DOI) de Wnt3 en los períodos estudiados

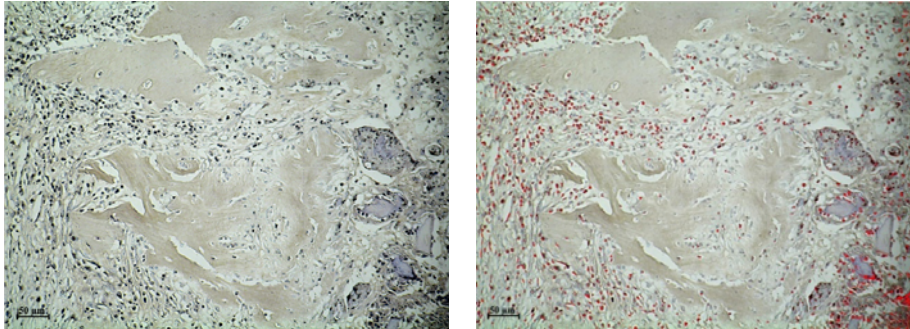
	DO	DOI
7 días	0,10 ( $\pm 0,05$ ) (min:0,04-máx:0,21)	3,15 ( $\pm 4,66$ ) (min :0,09-máx: 21,07)
15 días	0,31 ( $\pm 0,12$ ) (min: 0,07-máx: 0,46)	5,27 ( $\pm 5,98$ ) (min: 0,06-máx: 23,17)
21 días	0,14 ( $\pm 0,05$ ) (min: 0,11-máx: 0,27)	1,77 ( $\pm 2,01$ ) (min: 0,25-máx: 6,17)
30 días	0,19 ( $\pm 0,06$ ) (min: 0,11-máx: 0,26)	6,45 ( $\pm 7,42$ ) (min:0,06-máx:21,76)
60 días	0,39 ( $\pm 0,17$ ) (min: 0,17-máx: 0,57)	0,97 ( $\pm 2,07$ ) (min: 0,001-máx:5,20)
150 días	0,36 ( $\pm 0,12$ ) (min: 0,26-máx: 0,55)	0,27 ( $\pm 0,23$ ) (min: 0,03-máx: 0,62)



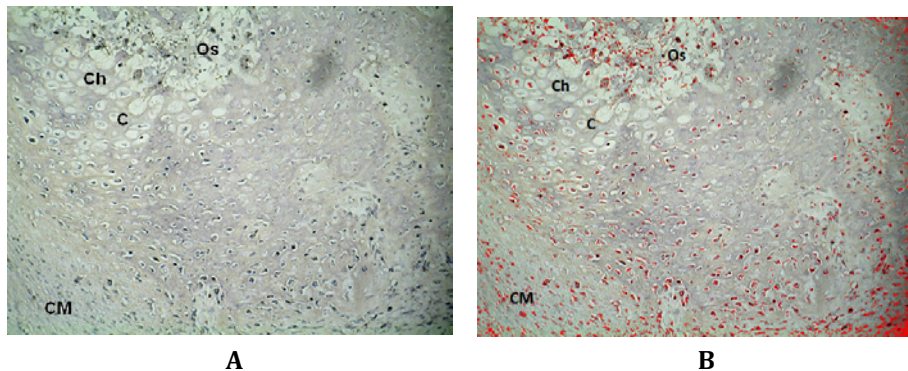
**Figura N°1.** Inmunodetección de Wnt3 en las partículas de MOD a los 7 días post-tratamiento. 200X.



Luego de 15 días de tratamiento Wnt3 inmunomarcó en las CM que rodeaban a las partículas de MOD (Figura N°2), en los sitios donde se llevaba a cabo la condrogénesis, en los condrocitos y en los sitios de osificación (Figura N°3).

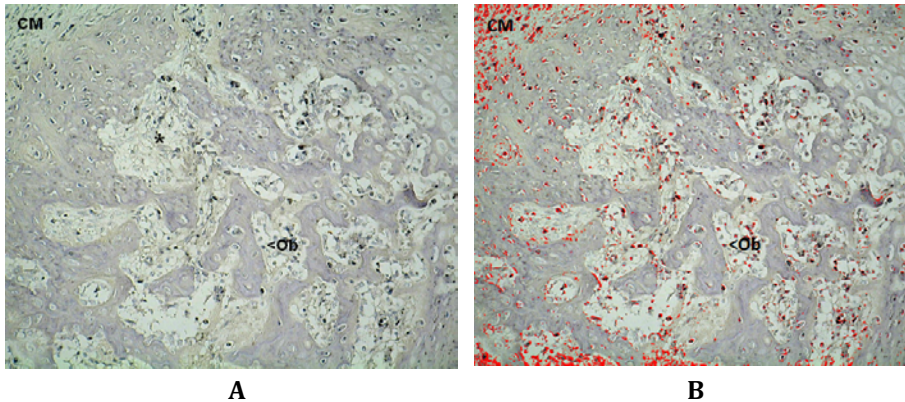


**Figura N°2.** IHQ Wnt3 de tejido de reparación de defectos óseos tratados con MOD. Las partículas de MOD se hallan rodeadas por células mesenquimáticas inmunomarcadas (izquierda). Análisis digital de la misma imagen muestra en color rojo las células marcadas (derecha) IHQ 200X.



**Figura N°3.** Inmunodetección de Wnt3. A) de tejido de reparación de defectos óseos tratados con MOD. En la micro fotografía superior se manifiesta la inmunomarcación de Wnt3 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 Wnt3. 200X.

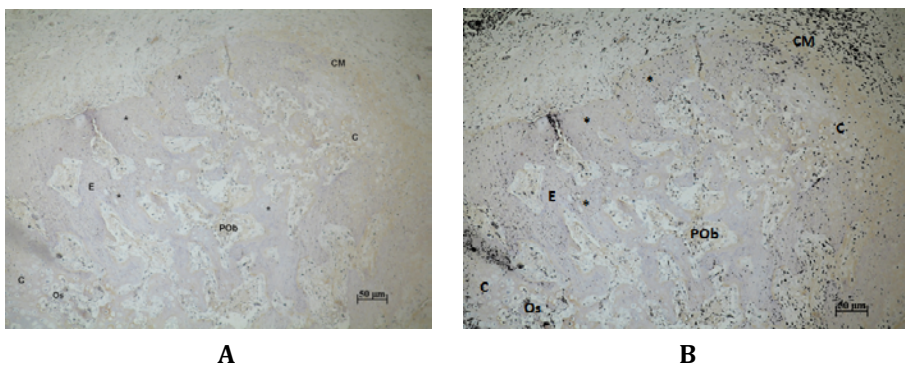
En sectores donde predominaban espículas óseas nuevas inmunoseñaló en las células osteoprogenitoras, condrocitos hipertróficos, preosteoblastos, osteoblastos y osteocitos (Figura N°4).



**Figura N°4.** Inmunomarcación de Wnt3 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.

La DO para Wnt3 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°1).

Hacia los 21 días post-tratamiento la proteína Wnt3 inmunoprecipitó en las 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°5).

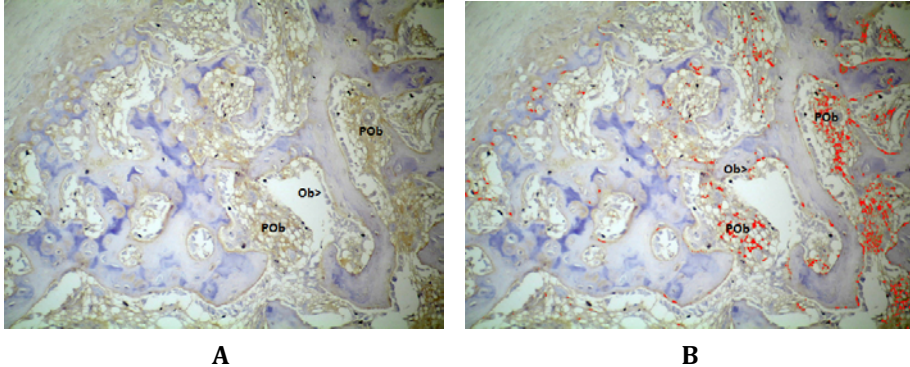


**Figura N°5.** Inmunodetección de Wnt3 a los 21 días. A) En sector de espículas óseas nuevas. Wnt3 inmunoseñala en las CM, tejido cartilaginoso (C), condrocitos (Co), condrocitos hipertróficos próximos a los sitios de osificación (Os), preosteoblastos (POB) que se encontraban entre las trabéculas (E), y en osteocitos (Oc) trabeculares. B) Análisis digital de la misma microfotografía, en negro se destaca la presencia de Wnt3. 200X.



La DO y DOI a en este período de reparación fue  $0,14 (\pm 0,05; \text{min: } 0,11\text{-máx: } 0,27)$  y  $1,77 (\pm 2,01; \text{min: } 0,25\text{-máx: } 6,17)$  respectivamente (Tabla N°1)

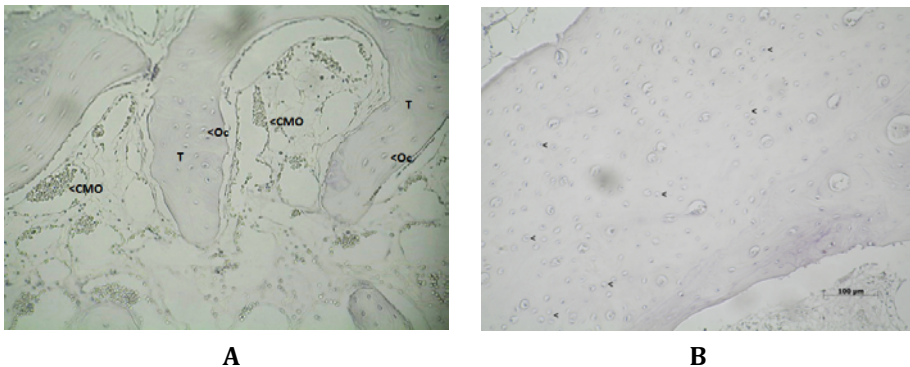
Luego de 30 días, Wnt3 se halló en los osteoblastos y preosteoblastos (Figura N°6).



**Figura N°6.** Inmunomarcación de Wnt3. A) Inmunolocalización de Wnt3 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 Wnt3. 200X.

El análisis de las densidades fue DO  $0,19 (\pm 0,06; \text{min: } 0,11\text{-máx: } 0,26)$  y DOI  $6,45 (\pm 7,42; \text{min: } 0,06\text{-máx: } 21,76)$  (Tabla N°1).

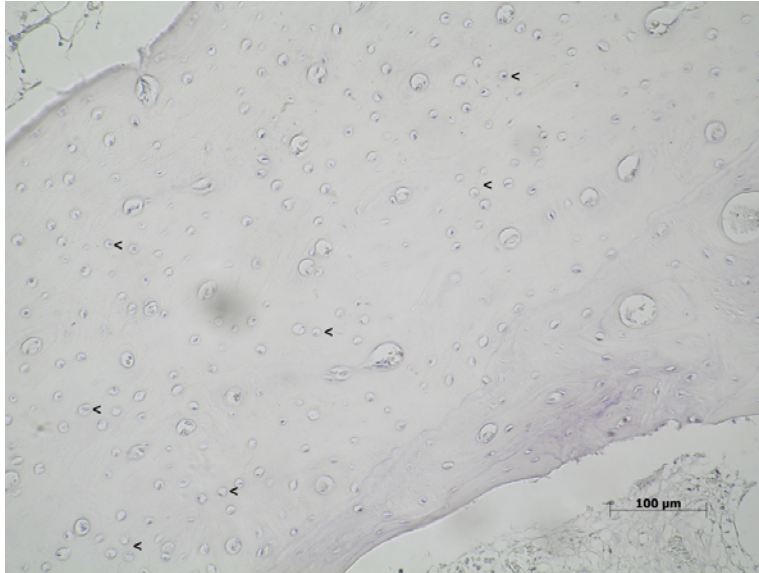
A los 60 días post-operatorio, Wnt3 se inmunomanifestó en los osteocitos y células de la médula ósea presente entre los espacios trabeculares (Figura N°7).



**Figura N°7.** A) Inmunomarcación de Wnt3 en las trabéculas (T) óseas, osteocitos (Oc) y células de la médula ósea a los 60 días post-operatorio. 100X. B) Inmunomarcación para Wnt3 luego de 150 días post-tratamiento. Wnt3 se encuentra en ciertos osteocitos y células de la médula ósea. 200X.

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°1).

Luego de 150 días Wnt3 se encontró en escasos osteocitos y en las células de la médula ósea presente en los espacios trabeculares (Figura N°8).



**Figura N°8.** Inmunomarcación para Wnt3 luego de 150 días post-tratamiento. Wnt3 se encuentra en ciertos osteocitos y células de la médula ósea. 200X.

La DO fue 0,36 ( $\pm 0,12$ ; min: 0,26-máx: 0,55) y DOI 0,27 ( $\pm 0,23$ ; min: 0,03-máx: 0,62) (Tabla N°1).

El análisis ANOVA y test comparativo LSD de Fisher para las DO, generó tres grupos de clasificación, el primero incluyó a las medias obtenidas de los 15, 60 y 150 días; 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 DO tuvo diferencia estadísticamente significativa ( $p < 0,05$ ) entre el grupo de clasificación 1 (15, 60 y 150 días) con el grupo de clasificación 2 (21 y 30 días), en tanto que la DO a los 7 días poseía diferencia significativa ( $p < 0,05$ ) con las medias los grupos 1 y 2 (a excepción de los 21 días). El mismo análisis estadístico para DOI señaló que hubo diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ) a los 30 días respecto a los 60 y 150 días.

---

## Discusión

Si bien los mecanismos y vías de señalización de Wnt3 durante la esquelotogénesis en la vida embrionaria se encuentran ampliamente estudiados<sup>(18)</sup>, poco se conoce del rol que cumple en la reparación de fracturas. Se sabe que las isoformas Wnt4, Wnt5a, Wnt5b, Wnt10b, Wnt11, Wnt13 se expresan en la reparación de las fracturas a través de la vía canónica de  $\beta$ -catenina<sup>(23,24)</sup>.

La expresión de Wnt3 a los siete días post-implante es un resultado que era previsible pues ocurre de forma similar tal como ocurre en la esquelotogénesis embrionaria<sup>(25)</sup>. En la reparación de los defectos óseos tratados con MOD se inmunomanifestó en las CM sobre las que actuó promoviendo la proliferación y diferenciación de esas células.

La expresión de Wnt3 habría respondido a la activación de sus vías de señalización no canónicas que induce BMP-2<sup>(26)</sup>. Así, ambas proteínas operan reclutando a las CM mediante el factor de crecimiento del tejido conectivo (CTFG)<sup>(27, 11)</sup>. La acción conjunta de BMP-2 y Wnt3 influyó en la condensación, agregación, proliferación y diferenciación celular observados en esta experiencia y que fueran descritos en la embriogénesis, en estudios *in vitro* y en la reparación de las fracturas<sup>(28,29,30,24,31,25)</sup>.

En concordancia con Fischer *et al.*, (2002)<sup>(27)</sup> observamos que la isoforma Wnt3 intervino en la condrogénesis, aunque no se expresó en la fase de maduración de los condrocitos. Avanzada la diferenciación de los condrocitos, Wnt3 nuevamente se inmunoexpresó en los condrocitos hipertróficos. Esta nueva expresión, respondería a la activación del factor de transcripción Runx2<sup>(32)</sup>.

Las características de la osificación observada, se corresponderían con el modelo de osificación transcondral y no con el modelo de osificación endocondral reportado en la reparación de las fracturas<sup>(33,34)</sup>. En la osificación transcondral los condrocitos hipertróficos se transdiferencian en células osteo progenitoras sin que se produzca la apoptosis de las mismas como sucede en la osificación endocondral<sup>(35,36)</sup>.

La inmunomarcación de Wnt3 en los osteoblastos revela el rol que posee en la proliferación y diferenciación de las células que integran el linaje osteogénico. La expresión de Wnt3 en los osteoblastos responde al rol que tienen de prevenir la desdiferenciación en condrocitos<sup>(37)</sup> ya que ésta es una forma también de transdiferenciación<sup>(38)</sup>.

Wnt3 demostró una variada expresión en la reparación de defectos óseos ortopédicos tratados con MOD, semejante a lo que sucede durante la esquelotogénesis en la vida embrionaria<sup>(39,40,41)</sup>.

---

El estudio de la DO y DOI permitió establecer la presencia y/o ausencia de Wnt3 y a la vez cuantificar el grado de expresión en las distintas fases estudiadas. Las cuantificaciones contribuyeron a establecer el grado de participación de cada proteína en el momento analizado.

Por otra parte, la expresión de Wnt3 inducida por la vía canónica y por BMP-2 en las CM pluripotentes señaló el inicio de la cascada de eventos de proliferación y diferenciación celular que concluyó en la reparación de los defectos.

### ***Conclusión***

En el presente trabajo quedó demostrado que Wnt3 se inmunomarcó en estadios de reparación cruciales como en la proliferación y diferenciación de las células mesenquimáticas pluripotentes, en la condrogénesis, en la diferenciación de preosteoblastos y osteoblastos como así también en los sitios donde se llevó a cabo la osificación. La evidencia expuesta mostró los sitios histológicos como así también la cronología de expresión de Wnt3 en la reparación de defectos óseos ortopédicos tratados con matriz ósea desmineralizada.

---

## Bibliografía

1. Urist, M.R. Bone formation by autoinduction. *Science*. 1965; 150: 893-899.
2. Ganesh, T.N. Comparative studies on bone grafting for radial fracture using autogenic cancellous bone, allogeneic demineralized bone matrix and xenogeneic demineralized bone matrix for better osteogenesis in canines. *Indian Journal of Veterinary Surgery*. 1992; 14:1-48.
3. Kumar, R.V.S.; Ramakrishna, O. Femoral fracture repair by demineralized bone matrix combinations in canines. *Indian Journal of Animal Sciences*. 2001; 71:749-751.
4. Hoffer, M.J.; Griffon, D.J.; Schaeffer, D.J.; Johnson, A.L.; Thomas, MW. Clinical applications of demineralized bone matrix: a retrospective and case-matched study of seventy-five dogs. *Veterinary Surgery*. 2008; 37:639-647.
5. da Silva, S.W.G.; de Castro, R.P.; deViana, G.A.; dos Santos, F.R.; de Moraes, R.S.; do Oriente, V.N. Estenose de pelve em felino tratado com anel de matriz ósea desmineralizada (MOD) - relato de caso. *Clínica Veterinária*. 2012; 17:46-50.
6. Colnot, C.; Romero, D.M.; Huang, S.; Helms, J. Mechanism of action of demineralized bone matrix in the repair of cortical bone defects. *Clinical Orthopaedic Related Research*. 2005; 435:69-78.
7. Eppley, B.L.; Pietrzak, W.S.; Blanton, M.W. Allograft and alloplastic bone substitutes: a review of science and technology for the craniomaxillofacial surgeon. *Journal of Craniofacial Surgery*. 2005; 16:981-989.
8. Gavin, B.J.; McMahon, J.A.; McMahon, A.P. Expression of multiple novel Wnt-1/int-1-related genes during fetal and adult mouse development. *Genes Development*. 1990; 4:2319-2332.
9. Cadigan, K.M.; Nusse, R. Wnt signaling: a common theme in animal development. *Genes Development*. 1997; 11:3286-3305.
10. Miller, J.R. The Wnts. *Genome biology*. 2002; 3:3001-3015.
11. Luo, Q.; Kang, Q.; Si, W.; Jiang, W.; Park, J.K.; Peng, Y.; Li, X.; Luu, H.H.; Luo, J.; Montag, A.G.; Haydon, R.C.; He, T.C. Connective tissue growth factor (CTGF) is regulated by Wnt and bone morphogenetic proteins signaling in osteoblast differentiation of mesenchymal stem cells. *Journal Biology Chemistry*. 2004; 279:55958-55968.
12. Rodda, S.J.; McMahon, A.P. Distinct roles for Hedgehog and canonical Wnt signaling in specification, differentiation and maintenance of osteoblast progenitors. *Development*. 2006; 133:3231-3244.
13. Hartmann, C. A Wnt canon orchestrating osteoblastogenesis. *Trends in Cell Biology*. 2006; 16:151-158.
14. He, X.; Semenov, M.; Tamai, K.; Zheng, X. LDL receptor related proteins 5 and 6 in Wnt/b-catenin signaling: arrows point the way. *Development*. 2004; 131:1663-1677.
15. Kelly, O.G.; Pinson, K.I.; Skarnes, W.C. The Wnt co-receptors Lrp5 and Lrp6 are essential for gastrulation in mice. *Development*. 2004; 131:2803-2815.
16. Huang, H.; He, X. Wnt/beta-catenin signaling: new (and old) players and new insights. *Current Opinion in Cell Biology*. 2008; 20:119-125.



- 
17. Sugimura, R.; Li, L. Noncanonical Wnt signaling in vertebrate development, stem cells, and diseases. *Birth Defects Research. Part C. Embryo Today*. 2010; 90:243-256.
  18. Audisio, S.A.; Vaquero, P.G.; Torres, P.A.; Verna, E.C.; Ocampo, L.N.; Ratusnu, V.; Cristofolini, A.L.; Merkis, C.I. Obtención, caracterización y almacenamiento de matriz ósea desmineralizada. *Revista de Medicina Veterinaria*. 2014; 95:27-34.
  19. Schmitz, J.P.; Hollinger, J.O. The critical size defect as an experimental model for craniomandibulofacial nonunions. *Clinical Orthopaedic Related Research*. 1986; 205:299-308.
  20. Hollinger, J.O.; Kleinschmidt, J.C. The critical size defect as an experimental model to test bone repair methods. *Journal of Craniofacial Surgery*. 1990; 1:60-68.
  21. Vasconcellos, A.; Cisternas, C.; Paredes, M. Estudio inmunohistoquímico comparativo del receptor de estrógeno en tejido endometrial de ovejas razas Texel y Araucana. *Int. J. Morphol.* 2014; 32:1120-1124.
  22. Di Rienzo, J.A.; Casanoves, F.; Balzarini, M.G.; Gonzalez, L.; Tablada, M.; Robledo, C.W. InfoStat versión 2010 Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.
  23. Zhong, N.; Gersch, R.P.; Hadjiargyrou, M. Wnt signaling activation during bone regeneration and the role of dishevelled. in chondrocyte proliferation and differentiation. *Bone*. 2006; 39:5-16.
  24. Chen, Y.; Whetstone, H.C.; Youn, A.; Nadesan, P.; Chow, E.C.Y.; Lin, A.C.; Alman, B.A.  $\beta$ -catenin signaling pathway is crucial for bone morphogenetic protein 2 to induce new bone formation. *Journal Biological Chemistry*. 2007; 282:526-533.
  25. Monroe, D.G.; McGee-Lawrence, M.E.; Oursler, M.J.; Westendorf, J.J. Update on Wnt signaling in bone cell biology and bone disease. *Gene*. 2011; 492:1-18.
  26. Tu, X.; Joeng, K.S.; Nakayama, K.I.; Nakayama, K.; Rajagopal, J.; Carroll, T.J.; McMahon, A.P.; Long, F. Noncanonical Wnt signaling through G protein-linked PKCdelta activation promotes bone formation. *Developmental Cell*. 2007; 12:113-127.
  27. Fischer, L.; Boland, G.; Tuan, R.S. Wnt-3A Enhances bone morphogenetic protein-2-mediated chondrogenesis of murine C3H10T1/2 mesenchymal cells. *The Journal of Biological Chemistry*. 2002; 277:30870-30878.
  28. Rawadi, G.; Vayssière, B.; Dunn, F.; Baron, R.; Roman-Roman, S. BMP-2 controls alkaline phosphatase expression and osteoblast mineralization by a Wnt autocrine loop. *Journal of Bone and Mineral Research*. 2003; 18:1842-1853.
  29. Fujita, T.; Azuma, Y.; Fukuyama, R.; Hattori, Y.; Yoshida, C.; Koida, M.; Ogita, K.; Komori, T. Runx2 induces osteoblast and chondrocyte differentiation and enhances their migration by coupling with PI3K-Akt signaling. *Journal of Cell Biolgy*. 2004; 166:85-95.
  30. Phimpilai, M.; Zhao, Z.; Boules, H.; Roca, H.; Franceschi, R.T. BMP signaling is required for RUNX2-dependent induction of the osteoblast phenotype. *J Bone and Mineral Research*. 2006; 21:637-646.
  31. Nelson, W.J. Regulation of cell-cell adhesion by the cadherin-catenin complex. *Biochemical Society Transactions*. 2008; 36:149-155.

- 
32. Dong, Y.F.; Song do, Y.; Schwarz, E.M.; O'Keefe, R.J.; Drissi, H. Wnt induction of chondrocyte hypertrophy through the Runx2 transcription factor. *Journal of Cellular Physiology*. 2006; 208:77-86.
  33. Marsell, R.; Einhorn, T.A. The biology of fracture healing. *Injury*. 2011; 42:551-555.
  34. Bigham-Sadegh, A.; Oryan, A. Basic concepts regarding fracture healing and the current options and future directions in managing bone fractures. *Internal Wound Journal*. 2015; 12:238-247.
  35. Gibson, G.J.; Kohler, W.J.; Schaffler, M.B. Chondrocyte apoptosis in endochondral ossification of chick sterna. *Developmental Dynamics*. 1995; 203:468-476.
  36. Scammell, B.E.; Roach, H.I. A new role for the chondrocyte in fracture repair: Endochondral ossification includes direct bone formation by former chondrocytes. *Journal of Bone and Mineral Research*. 1996; 11:737-745
  37. Hill, T.P.; Spater, D.; Taketo, M.M.; Birchmeier, W.; Hartmann, C. Canonical Wnt/ $\beta$ -catenin signaling prevents osteoblasts from differentiating into chondrocytes. *Dev. Cell*. 2005; 8:727-738.
  38. Zhou, X.; von der Mark, K.; Henry, S.; Norton, W.; Adams, H.; de Crombrughe, B. 2014. Chondrocytes transdifferentiate into osteoblasts in endochondral bone during development, postnatal growth and fracture healing in mice. *PLoS Genet*. 10, e1004820.
  39. Moon, R.T.; Brown, J.D.; Torres, M. WNTs modulate cell fate and behavior during vertebrate development. *Trends in Genetics*. 1997; 13:157-162.
  40. Hartmann C.; Tabin C.J. Dual roles of Wnt signaling during chondrogenesis in the chicken limb. *Development*. 2000; 127:3141-3159.
  41. Church, V.; Nohno, T.; Linker, C.; Marcelle, C.; Francis-West, P. Wnt regulation of chondrocyte differentiation. *Journal of Cell Science*. 2002; 115:4809-4818.