

El rol de osterix en la diferenciación osteoblástica: potencial en el tratamiento de afecciones osteoarticulares

Audisio, S.A.¹; Vaquero, P.G.¹; Verna, E.C.¹

1 Cátedra Técnica y Patología Quirúrgica - FCV - UNLPam. Calle 5 y 116, (6360) General Pico, La Pampa, Argentina.

Correo Electrónico: saudisio@vet.unlpam.edu.ar

“En la memoria de nuestro compañero M.V. Edgardo Verna”

RESUMEN

El presente artículo hace revisión de la proteína Osterix y el rol que cumple en la esqueletogénesis, la osificación endocondral y en diversas patologías del sistema osteoarticular de los animales. Osterix es transcriptora de la familia de las proteínas morfogénicas ósea que inducen la formación de hueso. En la esqueletogénesis posibilita la diferenciación de los preosteoblastos en osteoblastos y la maduración y diferenciación de osteoblastos en osteocitos. En la osificación endocondral se expresa en los condrocitos maduros e hipermaduros y contribuye a degradar la matriz del cartílago. En la vida extrauterina colabora en la regulación de la homeostasis ósea e interviene en patologías osteoarticulares, oncología ósea y en la reparación de las fracturas. Conocer la acción de Osterix sobre las células óseas y condrocitos es un punto de partida atractivo para futuras investigaciones con el fin de contribuir con el diagnóstico y tratamiento de afecciones del sistema osteoarticular de los animales.

Palabras claves: Osterix, preosteoblasto, osteoblasto, diferenciación celular, hueso.

The role of osterix in osteoblastic differentiation: Potential in the treatment of osteoarticular affections

SUMMARY

This paper revises the Osterix protein and its role in the skeletogenesis, the endochondral ossification and in various pathological processes of the osteoarticular systems in animals. Osterix is a transcription factor of the family of bone morphogenic proteins, which prompts bone formation. In the skeletogenesis Osterix allows the differentiation of the preosteoblasts into osteoblasts and the maturity and differentiation of osteoblasts into osteocytes. In the endochondral ossification, Osterix expresses in the mature and hypermature chondrocytes and contributes to degrade the cartilage matrix. In the extrauterine life, it collaborates in the regulation of the bone homeostasis and it is involved in osteoarticular pathologies, in bone oncology and in the repair of fractures. Learning about the action of Osterix on the bone cells and chondrocytes is an attractive starting point for further research aiming at contributing to the diagnosis and treatment of diseases of the osteoarticular system in animals.

Key words: Osterix, preosteoblast, osteoblast, cell differentiation, bone.

Fecha de recepción artículo original: 10-03-2018

Fecha de aceptación para su publicación: 01-06-2018

Introducción

La esqueletogénesis embrionaria al igual que la homeostasis ósea post natal se halla controlada por varias vías de señalización genética⁽¹⁾. Las principales vías incluyen a los miembros del factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), la familia de la proteína morfogénica del hueso (BMP) y la vía de señalización de Wnt^(2,1). En correspondencia con esas vías intervienen los factores de transcripción Runx2 y osterix (Osx)^(3,4,5).

El rol de Osx en la esqueletogénesis quedó demostrado cuando se bloqueó su expresión en ratones recién nacidos, los que no registraron diferenciación osteoblástica y consecuente formación de hueso nuevo^(6,5). Así se estableció que Osx diferencia a los preosteoblastos en

osteoblastos para que los continúen con su función en la formación y mineralización ósea^(7,8).

En la columna vertebral la deficiencia de *Osx* provoca deformaciones severas de las vértebras entre las que se mencionan vértebras en cuña, estenosis espinal y escoliosis congénita. La desactivación de *Osx* también genera vértebras acortadas con volumen óseo excesivo y actividad osteoclástica disminuida⁽⁹⁾.

Para que se lleve a cabo la esqueletogénesis embrionaria se requiere que las células mesenquimáticas (CM) se diferencien en distintas líneas celulares a través del accionar coordinado de un conjunto de moléculas. Este proceso posee características similares a la regeneración ósea que acontece durante la reparación de las fracturas⁽¹⁰⁾. Por ese motivo resulta de interés conocer esos acontecimientos bioquímicos y celulares que tienen como resultado la curación de las fracturas y defectos óseos.

La proteína morfogénica del hueso -2 (BMP-2) es una poderosa citoquina que induce la formación de hueso. Actúa reclutando CM estimulándolas a que proliferen y diferencien para generar hueso. BMP-2 regula la expresión de varios transcriptores específicos sin los cuales no se llevaría a cabo la osteogénesis, entre los que se encuentran *Osx* y *Runx2*⁽¹⁷⁾.

Osterix es un factor de transcripción que pertenece a la familia de las proteínas de especificidad (Sp) y dentro de esta familia también se la conoce como Sp7. Contiene dedos de zinc que le confieren la función esencial de diferenciar osteoblastos y así intervenir en el desarrollo esquelético embrionario. Los ratones deficientes en *Osx* acumulan preosteoblastos detenidos en su diferenciación incapaces de expresar genes osteoblásticos como osteocalcina (OC), sialoproteína ósea (BSP) y osteopontina (OP)⁽³⁾. En ausencia de *Osx* el esqueleto cartilaginoso prenatal de ratones en los que se realizaron los estudios no mostraron evidencias de mineralización y murieron al nacer⁽³⁾. En la osificación *Osx* se expresa en osteoblastos y osteocitos y en menor grado en condrocitos hiper y prehipertróficos⁽⁵⁾.

El objetivo de la presente revisión es examinar el rol que desempeña la proteína *Osx* en la esqueletogénesis embrionaria y en la etapa de desarrollo del individuo en el desarrollo del esqueleto de los animales pues constituye una vía atractiva en la reparación de fracturas y lesiones óseas.

ROL DE OSTERIX EN LA ESQUELETOGÉNESIS

La proteína OSX pertenece a la familia de las proteínas transcriptoras tipo KRUPel que se caracterizan por poseer dedos de zinc para unirse al ADN celular y ejercer su efecto.⁽¹¹⁾ De esta forma *Osx* media la expresión de los genes osteoblásticos como osteocalcina (OC), osteonectina, osteopontina (OP), sialoproteína ósea (BSP) y la metilación del colágeno tipo I⁽¹²⁾. Durante la diferenciación de los osteoblastos la región promotora de *Osx* se hipometila, lo que altera directamente la expresión de los genes de los osteoblastos, que luego ejercen efecto sobre la diferenciación celular⁽¹³⁾.

Osx posee una activa participación en la osteogénesis junto a los transcritores *Runx2* y *Sox9*. *Runx2* es necesaria para la diferenciación de las CM en osteoblastos e inhibe su diferenciación en adipocitos y condrocitos. Es el primer transcriptor que interviene en la diferenciación de las CM. Así lo demostraron estudios realizados en ratones *Runx2*^{-/-} en los que no se registró osificación intramembranosa como así tampoco endocondral debido a la ausencia de la diferenciación de las CM en osteoblastos^(14,15).

En estudios *in vitro* realizados en CM procedentes de los huesos parietales de ratones *Runx2*^{-/-} éstas se diferenciaron espontáneamente en adipocitos y en condrocitos en presencia de BMP-2 pero no en osteoblastos. Por ese motivo las CM de animales *Runx2*^{-/-} tienen el potencial de diferenciarse en adipocitos y condrocitos⁽¹⁶⁾. Los ratones *Osx*^{-/-} también muestran ausencia completa de osificación intramembranosa y endocondral debido a que no se lleva a cabo la diferenciación de osteoblastos. *Runx2* se expresa en las células mesenquimales de ratones *Osx*^{-/-}, aunque *Osx* no se expresa en ratones *Runx2*^{-/-}.

Por lo tanto, *Osx* es un gen que interviene en el proceso de diferenciación con posterioridad a *Runx2*. En ratones *Osx*^{-/-} las CM pericondrales se condensan y diferencian en condrocitos, ello indica que las CM *Osx*^{-/-} mantienen el potencial para diferenciarse en condrocitos⁽³⁾.

Runx2 intervendría en los primeros estadios de diferenciación de las CM hasta la aparición de células osteocondroprogenitoras, mientras que *Osx* tendría un papel en la segregación de las células osteoprogenitoras⁽¹⁷⁾. Estas vías diferenciales reguladoras sugieren que *Osx* promueve la proliferación de células progenitoras, mientras que *Runx2* tiene un efecto antiproliferativo pues actuaría a nivel del ciclo celular en la fase de transición a G1 relacionada al crecimiento celular de los osteoblastos⁽¹⁸⁾.

Osx posee actividad condrogénica y de osificación post natal de la mandíbula de ratones para lo cual induce la síntesis de metaloproteína-13 (MMP13) durante la osificación endocondral para degradar matrices condrogénicas⁽¹⁹⁾.

Estudios de migración de osteoblastos en el desarrollo del hueso establecieron que interviene una población de células precursoras de osteoblastos que se localizan en el pericondrio y que son Osx positivas. Esas células migran al sitio de osificación primaria junto con los vasos sanguíneos pues esas células precursoras que expresan Osx están íntimamente asociados con células endoteliales de los vasos sanguíneos⁽²⁰⁾.

Si bien la familia de BMP es la única capaz de inducir la generación de hueso, ésta requiere la intervención cooperativa de Wnt^(21,22). La inactivación de la β -catenina citosólica en las CM, vía canónica de activación de Wnt, bloquea por completo la diferenciación de los osteoblastos y CM mesenquimales del pericondrio y se diferencian en condrocitos^(6,23,24). Por lo tanto, β -catenina es esencial para la diferenciación de los osteoblastos donde las CM β -catenina $^{-/-}$ mantienen su potencial para diferenciarse en condrocitos. Como Runx2, pero no Osterix, se expresa en las CM β -catenina $^{-/-}$ ^(23,24). β -catenina es necesaria para la diferenciación de osteoblastos en la etapa de preosteoblastos. Por lo tanto, Runx2 dirige a las CM progenitoras a preosteoblastos, inhibiendo su diferenciación en adipocitos y condrocitos, y β -catenina y Osx dirigen aún más a los preosteoblastos a osteoblastos inmaduros, eliminando por completo el potencial de los preosteoblastos para diferenciar los condrocitos. Las células que expresan Osx co-expresan sus propias Wnts, que a su vez inducen la respuesta de señalización de Wnt, regulando así su proliferación y diferenciación celular⁽²⁵⁾.

OSTERIX INTERVIENE EN LA HOMEOSTASIS ÓSEA

Existe variada evidencia que Osx contribuye a mantener la homeostasis de los huesos en animales adultos. Cuando Osx es anulada en ratones adultos éstos registran microfracturas, disminución de la población de osteoblastos e interfiere en la maduración y función de osteocitos^(7,5).

Estudios realizados en animales a los que se les impidió que cargaran peso sobre uno de los fémures, mostraron que los osteocitos del hueso disminuyeron la expresión de Osx y a su vez en húmero, mostraron incremento de los niveles de Osx. La experiencia sugiere que la sobrecarga de peso compensatoria aumentó los niveles de Osx en osteoblastos en respuesta a la adaptación mecánica⁽²⁶⁾. La

paratohormona (PTH), que es tanto catabólica como anabólica en el tejido óseo, tiene receptores en los osteoblastos para regular tanto la actividad metabólica de los osteoblastos como la diferenciación. La estimulación prolongada con PTH inhibe la expresión de ARNm de la proteína *Osx* en células osteoblásticas *in vitro* que provoca una represión transcripcional⁽²⁷⁾.

El gen que expresa al receptor de la vitamina D (RVD) en la membrana de los osteoblastos es un objetivo de *Osx*. Estudios en ratas mutantes que no expresan osterix (*Osx*^{-/-}) mostraron expresión defectuosa de RVD cuando se los comparó con animales tipo salvaje. En cultivos primarios de osteoblastos tipo salvaje también tuvieron una expresión del gen RVD marcadamente alterada cuando se anuló la expresión de *Osx*. La utilidad terapéutica de estos resultados se puede sumar a una lista creciente de factores y vías osteoblastogénicas regulados por *Osx* en el osteoblasto no solo en el mantenimiento de la homeostasis del hueso, sino también para tratar enfermedades óseas⁽²⁸⁾.

OSTERIX EN LA OSTEOARTRITIS

Como ya se mencionó, MMP13 es esencial para la condrogénesis en la placa de crecimiento⁽²⁹⁾. Sin embargo, MMP13 se encuentra íntimamente ligada a la patogénesis de la osteoartritis. No obstante, contar con mayor conocimiento de esta condición resultará de utilidad en el desarrollo de terapias de la osteoartritis y otros desórdenes del cartílago⁽³⁰⁾.

ONCOLOGÍA

Las anomalías en *Osx* contribuye al desarrollo de osteosarcoma en ratas. La restitución de la expresión de *Osx* en células provenientes de osteosarcoma tiende a reducir la destrucción del hueso y a disminuir la metástasis pulmonar. Por este motivo esta información sugiere que *Osx* puede ser un objetivo en el tratamiento de estas neoplasias⁽³¹⁾. No obstante, en osteosarcomas extra esqueléticos espontáneos que se producen en conejos los estudios inmunohistoquímicos indicaron expresión de *Osx* y Ki67 indicativo de la naturaleza proliferativa osteoblástica del tumor⁽³²⁾.

Las observaciones de Ma *et al.*, 2010⁽³³⁾ señalan que los glucocorticoides inhiben la actividad de ARN mensajero y la expresión de *Runx2* y *Osx*, decrece la actividad osteoblástica y promueve la resorción ósea, la osteoporosis y la necrosis de la cabeza femoral en ratas.

EL ROL DE OSTERIX EN LA REPARACIÓN DE LA FRACTURA

La reparación de las fracturas es un proceso complejo que incluye la expresión e interacción espacial y temporal de múltiples moléculas que intervienen en la formación de hueso nuevo durante la curación. Los estudios realizados en lesiones óseas controladas seguidas de curación demostraron que *Osx* se expresa durante la regeneración de células óseas. La implantación de células de la médula ósea que expresan *Osx* en defectos óseos de huesos temporales en ratas aceleró la cicatrización de las lesiones respecto a los controles⁽³⁴⁾. En ratones con fracturas controladas el callo de fractura y el cartílago comenzaron a formarse hacia el séptimo día post fractura y continuó hacia el día 10 de la curación. *Osx* se expresó en los osteoblastos del callo óseo en el día 10, pero no lo hizo en el hueso cortical, condrocitos hipertróficos y vasos sanguíneos. Hacia el día 14 posterior a la fractura *Osx* se expresó principalmente en los osteoblastos que rodeaban los sitios de curación mientras que el cartílago del callo se osificó⁽³⁵⁾. En el mismo estudio la sobre expresión de *Osx* en las células progenitoras disminuyó el nivel de *Sox9*, lo que sugiere que *Osx* podría inhibir la diferenciación de los condrocitos mientras promueve la diferenciación de los osteoblastos.

El rastreo de las células precursoras de osteoblastos que eran *Osx* positivas estaban presentes en el periostio del hueso cortical, lo que permitió establecer que cuando se produce la fractura éstas se encontraban masivamente en el callo óseo⁽²⁰⁾.

TERAPIAS CON OSX

Como se mencionó, *Osx* expresa las proteínas BSP y OC que intervienen en la biomineralización de la matriz ósea. Esta actividad permitió establecer que las CM de la médula ósea poseen mayor capacidad de diferenciación osteogénica que las CM del tejido adiposo en perros. No obstante, las CM obtenidas del tejido adiposo poseen mayor potencial osteogénico^(36,37).

El ácido zolendrónico es un bifosfonato que contiene nitrógeno⁽³⁸⁾ y un potente inhibidor de la resorción ósea. El ácido zolendrónico muestra gran afinidad en el sitio del recambio óseo y mineral. El tratamiento con ácido zolendrónico con osteoblastos puede mejorar la diferenciación⁽³⁹⁾. El ácido zolendrónico provoca la hipometilación de *Osx* durante la diferenciación osteoblástica y promueve la expresión genética de los osteoblastos⁽³⁸⁾.

Conclusión

La revisión establece que *Osx* cumple funciones clave en la diferenciación de los preosteoblastos y osteoblastos como así también para que se realice osificación endocondral. La presente puede constituir un punto de partida para futuras investigaciones que conduzcan a aplicaciones clínica a los fines de resolver afecciones óseas como y contribuir en el diagnóstico y estrategias terapéuticas de la enfermedades como osteoartritis.

Bibliografía

1. Lin, G.L.; Hankenson, K.D. Integration of BMP, Wnt, and notch signaling pathways in osteoblast differentiation. *J Cel Biochem.*2011; 112:3491–501
2. Javed, A.; Chen, H.; Ghorri, F.Y. Genetic and transcriptional control of bone formation. *Oral Max Surg Clinics North Am.* 2010; 22:283–293.
3. Nakashima, K.; Zhou, X.; Kunkel, G.; Zhang, Z.; Deng, J.M.; Behringer, R.R.; de Crombrughe, B. The novel zinc finger-containing transcription factor osterix is required for osteoblast differentiation and bone formation. *Cell.* 2002; 108:17-29
4. Yagi, K.; Tsuji, K.; Nifuji, A.; Shinomiya, K.; Nakashima, K.; deCrombrughe, B.; Noda, M. Bone morphogenetic protein-2 enhances osterix gene expression in chondrocytes. *J. Cell. Biochem.* 2003; 88:1077–1083
5. Zhou, X.; Zhang, Z.; Feng, J.Q.; Dusevich, V.M.; Sinha, K.; Zhang, H.; Darnay, B.G.; deCrombrughe, B. Multiple functions of Osterix are required for bone growth and homeostasis in postnatal mice. *Proc Nat Ac Sc.*2010; 107:12919–12924.
6. Day, T.F.; Guo, X.; Garrett-Beal, L.; Yang, Y. Wnt/b-catenin signaling in mesenchymal progenitors controls osteoblast and chondrocyte differentiation during vertebrate skeletogenesis. *Dev Cell.* 2005; 8:739–750.
7. Baek, W.Y.; Lee, M.A.; Jung, J.W.; Kim, S.Y.; Akiyama, H.; Crombrughe, B.; Kim, J.E. Positive regulation of adult bone formation by osteoblast-specific transcription factor osterix. *J Bone Min Res.* 2009; 24:1055-1065.
8. Baek WY, de Crombrughe B, Kim JE. Postnatally induced inactivation of Osterix in osteoblasts results in the reduction of bone formation and maintenance. *Bone.*2010; 46(4):920–928
9. Chen, S.X.; Feng, J.Q.; Zhang, H.; Jia, M.; Shen, Y.; Zong, Z.W. Key role for the transcriptional factor, osterix, in spine development. *Spine J.*2014; 14:683-694
10. Smok, C.; Rojas, M. Similitudes entre ontogenia y regeneración ósea post-fractura. *Int. J Morph.*.2016 34(4):1293-129
11. Black, A.R.; Black, J.D.; Azizkhan-Clifford, J. Sp1 and krüppel-like factor family of transcription factors in cell growth regulation and cancer. *J Cell Physiol.*2001; 188:143-160.
12. Zhang, C. Transcriptional regulation of bone formation by the osteoblast-specific transcription factor *Osx*. *J Ortho Surg Res.*2010; 5:37-45.
13. Hagh, M.F.; Noruzinia, M.; Mortazavi, Y.; Soleimani, M.; Kaviani, S.; Maymand, M.M. Zoledronic acid induces osteoblastic differentiation of mesenchymal stem cells without change in hypomethylation status of osterix promoter. *Cell J.* 2012; 14:90-97
14. Komori, T.; Yagi, H.; Nomura, S.; Yamaguchi, A.; Sasaki, K.; Deguchi, K.; Shimizu, Y.; Bronson, R.T.; Gao, Y.H.; Inada, M.; Sato, M.; Okamoto, R.; Kitamura, Y.; Yoshiki, S.; Kishimoto, T. Targeted disruption of *Cbfa1* results in a complete lack of bone formation owing to maturational arrest of osteoblasts. *Cell.* 1997; 89: 755–764.
15. Otto, F.; Thornell, A.P.; Crompton, T.; Denzel, A.; Gilmour, K.C.; Rosewell, I.R.; Stamp, G.W.; Beddington, R.S.; Mundlos, S.; Olsen, B.R.; Selby, P.B.; Owen, M.J. *Cbfa1*, a

-
- candidate gene for cleidocranial dysplasia syndrome, is essential for osteoblast differentiation and bone development. *Cell*. 1997; 89:765–771.
16. Kobayashi H, Gao Y, Ueta C, Yamaguchi A, Komori T. Multilineage differentiation of Cbfa1-deficient calvarial cells in vitro. *Biochem Biophys Res Commun*. 2000; 273:630–636.
 17. Nakashima, K.; deCrombrughe, B. Transcriptional mechanisms in osteoblast differentiation and bone formation. *Trends Genetics*. 2003; 19:458–66.
 18. Galindo, M.; Pratap, J.; Young, D.W.; Hovhannisyan, H.; Im, H.J.; Choi, J.Y.; Lian, J.B.; Stein, J.L.; Stein, G.S.; vanWijnen, A.J. The bone-specific expression of Runx2 oscillates during the cell cycle to support a G1-related antiproliferative function in osteoblasts. *J Biol Chem*. 2005; 280:20274–20285
 19. Jing J, Hinton RJ, Jing Y, Liu Y, Zhou X, Feng JQ. Osterix couples chondrogenesis and osteogenesis in post-natal condylar growth. *J Dental Res*. 2014; 93:1014–1021.
 20. Maes, C.; Kobayashi, T.; Selig, M.K.; Torrekens, S.; Roth, S.I.; Mackem, S.; Carmeliet, G.; Kronenberg, H.M. Osteoblast precursors, but not mature osteoblasts, move into developing and fractured bones along with invading blood vessels. *Developmental cell*. 2010; 19:329–344.
 21. Tsuji, K.; Bandyopadhyay, A.; Harfe, B.D.; Cox, K.; Kakar, S.; Gerstenfeld, L.; Einhorn, T.; Tabin, C.J.; Rosen, V. BMP2 activity, although dispensable for bone formation, is required for the initiation of fracture healing. *Nature Gen*. 2006; 38:1424–1429.
 22. Nelson, W.J. Regulation of cell-cell adhesion by the cadherin-catenin complex. *Biochem Soc Trans*. 2008; 36:149–155.
 23. Hill, T.P.; Spater, D.; Taketo, M.M.; Birchmeier, W.; Hartmann, C. Canonical Wnt/b-catenin signaling prevents osteoblasts from differentiating into chondrocytes. *Dev Cell*. 2005; 8:727–738.
 24. Hu, H.; Hilton, M.J.; Tu, X.; Yu, K.; Ornitz, D.M.; Long, F. Sequential roles of Hedgehog and Wnt signaling in osteoblast development. *Development*. 2005; 132:49–60.
 25. Tan, S.H.; Senarath-Yapac, K.; Chungc, M.T.; Longaker, M.T.; Wud, J.Y.; Nusseb, R. Wnts produced by Osterix-expressing osteolineage cells regulate their proliferation and differentiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2014; 5262–5271. DOI: 10.1073/pnas.1420463111
 26. Metzger, C.E.; Brezicha, J.E.; Elizondo, J.P.; Narayanan, S.A.; Hogan, H.A.; Bloomfield, S.A. Differential responses of mechanosensitive osteocyte proteins in fore- and hindlimbs of hindlimb-unloaded rats. *Bone*. 2017; 105:26–34.
 27. Barbutto, R.; Mitchell, J. Regulation of the osterix (Ox, Sp7) promoter by osterix and its inhibition by parathyroid hormone. *J Mol Endocrinol*. 2013; 51:99–108.
 28. Zhang, C.; Tang, W.; Li, Y.; Yang, F.; Dowd, D.R.; MacDonald, P.N. Osteoblast-Specific Transcription Factor Osterix Increases Vitamin D Receptor Gene Expression in Osteoblasts. *PLoS ONE*. 2011. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0026504>
 29. Inada, M.; Wang, Y.; Byrne, M.H.; Rahman, M.U.; Miyaura, C.; López-Otín, C.; Krane, S.M. Critical roles for collagenase-3 (Mmp13) in development of growth plate cartilage and in endochondral ossification. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2004; 101:17192–17197

-
30. Nishimura, R.; Wakabayashi, M.; Hata, K.; Matsubara, T.; Honma, S.; Wakisaka, S.; Kiyonari, H.; Shioi, G.; Yamaguchi, A.; Tsumaki, N.; Akiyama, H.; Yoneda, T. Osterix regulates calcification and degradation of chondrogenic matrices through matrix metalloproteinase 13 (MMP13) expression in association with transcription factor Runx2 during endochondral ossification. *J Biol Chem.* 2012; 287:33179-33190.
 31. Cao, Y.; Zhou, Z.; deCrombrughe, B.; Nakashima, K.; Guan, H.; Duan, X.; Jia, S.F.; Kleinerman, E.S. Osterix, a transcription factor for osteoblast differentiation, mediates antitumor activity in murine osteosarcoma. *Cancer Res.* 2005; 65:1124-1128.
 32. Wijesundera, K.K.; Izawa, T.; Fujita, D.; Denda, Y.; Seto, E.; Sasai, H.; Kuwamura, M.; Yamate, J. Spontaneous extraskeletal osteosarcoma in a rabbit (*Oryctolagus cuniculus*): histopathological and immunohistochemical findings. *J Toxicol Pathol.* 2013; 26:309-312.
 33. Ma, X.L.; Liu, Z.P.; Ma, J.X.; Han, C.; Zang, J.C. Dynamic expression of Runx2, Osterix and Aj18 in the femoral head of steroid-induced osteonecrosis in rats. *Chinese Journal of Orthopaedics.* 2010; 30:67-72.
 34. Tu, Q.; Valverde, P.; Li, S.; Zhang, J.; Yang, P.; Chen, J. Osterix overexpression in mesenchymal stem cells stimulates healing of critical-sized defects in murine calvarial bone. *Tissue Eng.* 2007; 13:2431-2440.
 35. Kaback, L.A.; Soung do, Y.; Naik, A.; Smith, N.; Schwarz, E.M.; O'Keefe, R.J.; Drissi, H. Osterix/Sp7 regulates mesenchymal stem cell mediated endochondral ossification. *J Cell Physiol.* 2008; 214:173-182.
 36. Alves, E.G.L.; Serakides, R.; Boeloni, J.N.; Rosado, I.R.; Ocarino, N.M.; Oliveira, H.P.; Góes, A.M.; Rezende, C.M.F. Comparison of the osteogenic potential of mesenchymal stem cells from the bone marrow and adipose tissue of young dogs. *Bio Med Central Vet Re.* 2014; 10:190-199.
 37. Alves, E.G.L.; Serakides, R.; Boeloni, J.N.; Rosado, I.R.; Ocarino, N.M.; Oliveira, H.P.; Góes, A.M.; Rezende, C.M.F. Comparative study of the osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells from bone marrow and adipose tissue of adult dogs. *Pesquisa Vet Brasil.* 2016. 36Supl. 1:21-32.
 38. Green, J.J. Chemical and biological prerequisites for novel bisphosphonate molecules: results of comparative preclinical studies. *Semin Oncol.* 2001; 28:4-10.
 39. Reinholz, G.G.; Getz, B.; Pederson, L.; Sanders, E.S.; Subramaniam, M.; Ingle J.N. Bisphosphonates directly regulate cell proliferation, differentiation, and gene expression in human osteoblasts. *Cancer Res.* 2000; 60:6001-6007.