



Universidad
Nacional
de Córdoba



UNIVERSIDAD NACIONAL DE CÓRDOBA

FACULTAD DE ODONTOLOGÍA

ESCUELA DE POSGRADO

**“EVALUACIÓN DEL TRATAMIENTO COMBINADO DE
ALENDRONATO Y MONOFLUOROFOSFATO DE SODIO
EN LA REMODELACIÓN ÓSEA EN RATAS”**

TESISTA:

OD. GUILLERMO JOSÉ ARAMBURÚ

DIRECTOR:

PROF. DRA María Carolina Virga

CÓRDOBA, 2014



Esta obra está bajo una [Licencia Creative Commons Atribución-
NoComercial-CompartirIgual 4.0 Internacional](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/).

UNIVERSIDAD NACIONAL DE CORDOBA

FACULTAD DE ODONTOLOGIA

Escuela de Posgrado

Trabajo de tesis para optar al título de Doctor en Odontología

***Evaluación del tratamiento combinado de Alendronato
y Monofluorofosfato de sodio en la remodelación ósea
en ratas***

Guillermo José Aramburú

Directora: Prof Dra María Carolina Virga

Asesor Científico: Prof Dr Alfredo Rigalli

2014

COMISION DE TESIS

Prof Dra Rosita Lucero

Prof Dra Raquel Gallará

Prof Dra Hilda Montrull

JURADO

Prof Dra Rosita Lucero

Prof Dra Hilda Montrull

Prof Dra Graciela Postiglione

DEDICATORIA

Esta obra está enteramente dedicada a mi abuela Catalina que desde el cielo sigue mis pasos, ruego me guie e ilumine siempre y decirle que aquí se le extraña muchísimo.

AGRADECIMIENTOS

A toda mi familia, que con tanta paciencia me acompañó en todo este camino.

A mis padres, que estuvieron a mi lado en todo momento con su apoyo incondicional.

A Ivana, por su comprensión, su paciencia y como parte inseparable de mi todo.

A mi tribunal de Tesis, las Prof Dras Raquel Gallará, Rosita Lucero e Hilda Montrull, por guiarme y aconsejarme en todo momento.

A la Prof Dra Graciela Postiglione, evaluadora externa e integrante del Jurado.

A mi directora, Prof Dra María Carolina Virga, quien me guió en este camino y me brindó su apoyo y sabiduría.

A mi asesor científico Prof Dr Alfredo Rigalli, quien no solo me brindó las herramientas científicas necesarias para el desarrollo de ésta tesis sino también me enseñó el valor de la humildad y la amistad.

A la familia del Dr Rigalli, su esposa e hijos, que me brindaron su hogar durante tantas horas de estudio.

Al laboratorio de Biología Osea y Metabolismo Mineral de la Facultad de Ciencias Médicas de la Universidad Nacional de Rosario. A todo el personal, a Brenda Fina, Lucas Brun, Maela Lupo, que colaboraron desinteresadamente en mi tesis.

A la Facultad de Odontología de la Universidad Nacional de Córdoba y a su Decana Prof Dra María del Carmen Visvisián, quien me abrió las puertas de la Institución para realizar este trabajo.

A la Cátedra de Diagnóstico por Imágenes y a su Profesor Titular Prof Dr Enrique Giménez, por su colaboración activa.

Al Area de Biología Oral (ABO) y al Ingeniero Luis Crohare, por las horas dedicadas, los oídos prestados y por su amistad.

Al Instituto Viroológico de la Facultad de Ciencias Médicas de la Universidad Nacional de Córdoba y al Dr Javier Aguilar, quien colaboró desinteresadamente en los ensayos de citotoxicidad.

A mis compañeros de Cátedra de Introducción a la Odontología, Farmacología y Terapéutica “B” y “A”, que colaboraron y me acompañaron en todo este camino.

A la Dra Adriana De Leonardi, por su colaboración y dedicación.

Al Dr Sergio Hubert, compañero y amigo incondicional, por su apoyo, colaboración y sobre todo por inculcarme el valor de la humildad.

Al Dr Lucas Sorbera, por su colaboración y sus palabras de aliento.

A mis amigos de toda la vida y a la Prof Marina Parsi por su colaboración en la traducción y comprensión del inglés.

Agradezco infinitamente a toda la gente que de una u otra manera hizo posible la realización de mi tesis doctoral y por sobre todas las cosas agradezco a Dios, fuente de toda sabiduría, que ilumina mis pasos y es quien me sustenta en los momentos más difíciles y me da el valor para seguir siempre adelante.

INDICE

ABREVIATURAS	1
RESUMEN	2
ABSTRACT	3
INTRODUCCION	4
HIPOTESIS	23
OBJETIVOS	23
MATERIALES Y METODOS	24
RESULTADOS	34
DISCUSION	55
CONCLUSIONES	63
BIBLIOGRAFIA	65

ABREVIATURAS

AL: Alendronato de sodio

MFP: Monofluorofosfato de Sodio

FA: Fosfatasa alcalina

FAO: Fosfatasa alcalina ósea

GAGs: Glucosaminoglucanos

BSP I: Osteopontina

GH: Gonodotropina humana

BMP: Proteínas morfogenéticas óseas

TGF β : Factor de transformación de crecimiento

OPG: Osteoprotegerina

TRAP: Fosfatasa ácida tartrato resistente

Dpd: Desoxipiridinolina

CTX: Telopéptido C-terminales del colágeno

NTX: Telopéptido N-terminales del colágeno

IL: Interleucinas

TNF α : Factor de necrosis tumoral α

PTH: Parathormona

M-CSF: Factor estimulador de colonias de macrófagos

URO: Unidad de remodelación ósea

N: Newton

mm: Milímetro

mJ: miliJoule

NaF: Fluoruro de Sodio

μ g: Microgramos

mM: miliMol

KCL: Cloruro de Potasio

OD: Densidad óptica

DMO: Densidad mineral ósea

sd: Standard desviation

RESUMEN

Introducción: Estudios previos han demostrado que los bisfosfonatos, como Alendronato de sodio (AL), son potentes inhibidores de la resorción ósea y aumentan la densidad mineral del hueso. El fluoruro administrado como Monofluorfosfato de Sodio (MFP) estimula la formación e incrementa el volumen del hueso, efecto específicamente debido a la estimulación de la actividad osteoblástica. **Objetivo:** Evaluar el efecto del tratamiento combinado de AL vía subcutánea y de MFP vía oral sobre la regeneración tisular de cavidades óseas neoformadas en tibias de ratas. **Materiales y métodos:** Las fórmulas farmacéuticas se prepararon con una dosificación de 0,5 mg/kg de peso para AL y de 5 mM para MFP. El ensayo de citotoxicidad se realizó por medio del Método de captación de rojo neutro. Este colorante penetra en las membranas celulares y se fija a la matriz lisosomal. Es posible así distinguir entre células viables, dañadas o muertas de acuerdo a la acumulación del rojo neutro dentro del lisosoma. Para este ensayo se utilizó la línea celular VERO cuyas células fueron cultivadas en un Medio Esencial Mínimo (MEM) suplementado con 10% de suero fetal bovino a una densidad celular de 70% a 80% de confluencia. La viabilidad celular se estimó a través de la extracción del colorante presente en vacuolas celulares. Para analizar la toxicidad de MFP se realizaron ensayos "in vivo". Se midió peso corporal, glucosa sanguínea y relación ceniza/matriz. Se emplearon sesenta y cuatro ratas macho de la línea Wistar de peso 160 ± 20 g, y se dividieron en 4 grupos de 16 ratas cada uno. El grupo **C** recibió semanalmente 0,3 ml/100g de peso corporal de solución salina vía subcutánea cercana a la intervención quirúrgica y actuó como grupo control. El grupo **A** recibió semanalmente 0,5 mg de AL/Kg de peso corporal por vía subcutánea profunda en el miembro posterior izquierdo. El grupo **M** fue tratado con MFP en el agua de bebida durante el tiempo que duró el experimento y en las áreas de la cirugía los animales recibieron una inyección subcutánea de solución salina como el grupo control. El grupo **AM** recibió tratamiento combinado con AL subcutáneo y MFP por vía oral en el agua de bebida. Estos animales tuvieron acceso a agua corriente de red "ad libitum". El tiempo total de la experiencia fue de 90 días. En la cirugía se realizó una incisión longitudinal en ambas tibias y a través del decolado se llegó a exponer el hueso, realizando un defecto circular en la parte plana de cada tibia hasta llegar al hueso medular. Dicho defecto no fue rellenado con ningún material. Se tomaron radiografías de cada tibia a 0, 15, 30, 60 y 90 días y fueron analizadas con el Software Image Pro Plus versión 4.1 de Media Cybernetics. También se evaluó fosfatasa alcalina (FA) en sangre mediante métodos colorimétricos en los mismos tiempos. Los animales fueron sacrificados a los 15, 30, 60 y 90 días. Se recolectaron ambas tibias y además los fémures para ser utilizados en ensayos biomecánicos. Se realizaron estudios histopatológicos previa descalcificación de las tibias con EDTA y su inclusión en parafina. Los cortes fueron teñidos con HE y observados con microscopía óptica (MO). Los estudios estadísticos se realizaron a través del análisis de la variancia a dos y tres criterios de clasificación (tratamientos, tiempo, tibia problema/tibia contralateral). El nivel de significación fue $p < 0.01$. **Resultados:** Se observó que a concentraciones menores a 10 $\mu\text{g/ml}$ de AL la viabilidad celular fue cercana al 100 %. A medida que aumentaron las concentraciones por encima de los 10 $\mu\text{g/ml}$ la viabilidad celular comenzó a verse afectada, aunque nunca por debajo del 70%. No se hallaron diferencias significativas entre el grupo tratado con MFP y el grupo control en las variables de toxicidad "in vivo" analizadas. Los estudios radiográficos demostraron que AL desde el día 0 comenzó a aumentar la densidad óptica (OD), siendo el valor más alto a los 60 días, declinando hacia el día 90, donde los valores se estabilizaron. MFP se comportó de manera similar a AL, aunque la OD promedio fue menor. El tratamiento combinado incrementó la OD pero con valores menores al de las drogas por separado. No hubo diferencias significativas entre tibia problema y contralateral. Los estudios de fosfatasa alcalina (FA) revelaron un aumento gradual de este marcador en los grupos problemas con respecto al control. El análisis histológico demostró que AL y MFP presentaron mayor actividad osteogénica observándose trabéculas más gruesas y anastomosadas, con mayor relevancia en el tiempo 60 y estabilizándose al tiempo 90. La histomorfometría reveló un aumento del porcentaje de hueso trabecular a través del tiempo para AL y MFP siendo el más evidente el tiempo 60. El tratamiento combinado no fue estadísticamente diferente al grupo control. Los ensayos biomecánicos demostraron para AL y MFP un aumento en la rigidez a los 60 días. El tratamiento combinado no mostró diferencias significativas para dicho parámetro. En cuanto a la fuerza de fractura y la energía absorbida, no hubo diferencias entre los grupos. **Conclusiones:** AL vía subcutánea a bajas dosis no es citotóxico y MFP por vía oral a dosis de 5 mM no afecta la viabilidad celular. El aumento de FA se corresponde con un aumento de la actividad osteoblástica. AL y MFP aumentaron la OD significativamente como así también el número y grosor de las trabéculas analizadas al MO. La rigidez fue aumentada por AL y MFP. El tratamiento combinado de AL y MFP no demostró sinergismo en los tiempos de la experiencia probablemente debido a un efecto antagónico. Palabras clave: Bisfosfonatos, alendronato, MFP, fluoruro, actividad osteoblástica.

ABSTRACT

Introduction: Previous studies have shown that bisphosphonates, such as Alendronate Sodium (AL), are potent inhibitors of bone resorption and increment bone mineral density. And that fluoride, such as Monofluorophosphate (MFP), stimulates bone formation and increases bone mass. This effect is specifically caused by a proliferation in the osteoblastic activity. **Objective:** In this research the effect of the combined treatment of AL, subcutaneously, and of MFP, supplied orally, over the tissue regeneration of neo-formed bone cavities is studied. **Materials and methods:** The pharmaceutical formulations with a dosage of 0.50 mg/kg of the weight for AL and 5 mM for MFP were prepared. The cytotoxic trial was made by means of the Neutral Red Method. The cellular line VERO was used, its cells were cultivated in a Minimun Essential Medio (MEM) with 10% of fetal bovine serum to a cell density from 70% to 80% of confluence. The cell viability was estimated by measuring enzymes present in cell vacuoles in living cells. To analyse MFP cytotoxicity "in vivo", tests were developed measuring corporal weight, glucose blood and the relationship ashes/matrix. Sixty-four Wistar male rats 160 ± 20 g of weight were used, and the samples were divided into 4 groups of 16 rats each one. A group acted as a group control (**C**). The animals of this group received a subcutaneously dosage of saline solution of 0.3 ml/100g of the corporal weight given weekly, injected near the surgery intervention zone. A second group (**A**) received a deep subcutaneously **AL** dosage of 0.5 mg of the corporal weight in the left leg. A third group (**M**) received a treatment with **MFP** in their drinkable water, during all the research time, and was injected subcutaneously with saline solution near the surgery intervention zone, same as (**C**). A fourth group (**AM**) received a combined treatment of AL injected subcutaneously plus a MFP dosage in their drinkable water. All these animals had access to running water "ad libitum". At surgery a longitudinal incision was made in both tibias and the bones, through taken off were exposed, a circular defect in the flat part of each tibia was done, until the medullar bone was reached. This defect was not filled. Radiographs of each tibia were taken on the 1st, 15th, 30th, 60th and 90th days of the research and were analyzed with the Image Pro Plus Software version 4.1 of the Media Cybernetics. Alkaline Phosphatase (ALP) was also tested in blood, by coloring measured methods, during the time periods mentioned above. The animals were sacrificed on the 15th, 30th, 60th and 90th days of the research. The tibia and the femur were kept to be used in biomechanical trials. Histopathological studies were performed with a preview tibia decalcification with EDTA and embedded in paraffin. The sections were stained with HE and observed with optical microscopy. The comparison of the data was conducted by analysis of variance with two and three criteria of classification (treatment, time and tibia problem/tibia contralateral). The level of significance was $p < 0.01$. **Results:** It was observed for AL that to smaller amount concentration than 10 $\mu\text{g/ml}$, the cell viability was near to 100%. When there was a higher concentration, above 10 $\mu\text{g/ml}$ the cell viability showed a difference, although it was never below 70%. There were no significant differences for the cytotoxicity in the variables "in vivo" for the MFP. AL radiographic studies showed that from day 0, it began increasing the bone mineral density (BMD) average, finding the peak at day 60, declining to day 90, where a plateau level was reached. MFP showed a similar behavior than AL, although BMD average was lower. The combined treatment increased the average BMD but with lower values that the drugs incorporated alone. There was no significant difference between tibia problem and the contra lateral. ALP analysis showed a gradual rise in the groups A, M and AM compared to group C. Histology data revealed an improvement in the osteogenic activity, showing thicker and anastomosed trabecule for AL and MFP, with a higher relevance in day 60 and finding a plateau in day 90. Histomorphometry revealed a rise in the trabecular bone percentage through time for AL and MFP getting the most evident peak on day 60. The combined treatment did not show significant differences to the control. The biomechanical trials found its highest rigid point on day 60. The combined treatment was not significant. There were no differences among the groups who were exposed to a biomechanical load breaking bone point or to the absorbed energy measurement. **Conclusions:** AL placed under skin at a low dosage is not cytotoxic, and MFP via oral under a dosage of 5mM, does not affect the cell viability. An increase in ALP corresponds to an improvement in the osteoblastic activity. AL and MFP rose not only the BMD, but also the number and the thickness of the analyzed trabecules with MO. Bone rigidness was incremented by AL and MFP. This combined treatment did not show synergism during the research due to an antagonic effect. **Key words:** Bisphosphonate, alendronate, MFP, fluoride, osteoblastic activity.

INTRODUCCION

El tejido óseo es uno de los tejidos más resistentes y rígidos del organismo. Es el principal constituyente de los huesos junto a otros tejidos conjuntivos (hematopoyético, cartilaginoso, adiposo, vasos, nervios). El tejido óseo provee soporte mecánico, sirve de sustento y protección de los tejidos blandos y es anclaje muscular y base de los movimientos. Constituye un gran reservorio de minerales, entre ellos el calcio, cuyo equilibrio en sangre es decisivo para la salud y la vida. Además sirve de almacenaje activo de la medula ósea interaccionando con células precursoras de la hematopoyesis. El componente mineral está formado por cristales de hidroxiapatita: $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$. Los depósitos de calcio y fosfato, pueden ser movilizados del tejido óseo a la sangre según sea necesario para mantener la calcemia y la fosfatemia dentro de valores normales. Es un sistema dinámico, ya que mantiene su estructura gracias a un equilibrio entre actividades opuestas (remineralización/desmineralización) sufriendo modificaciones durante toda su vida. Histológicamente es una variedad de tejido conectivo especializado constituido por células y una matriz ósea mineralizada compuesta a su vez por una matriz orgánica y sales minerales, siendo ambas, las responsables de las propiedades biomecánicas del hueso.(1,2)

Estructuralmente, el tejido óseo comprende dos variedades:

1) El tejido óseo esponjoso: está constituido por una red tridimensional de espículas de tejido óseo, ramificadas y anastomosadas, que delimitan un laberinto de espacios intercomunicados ocupados por la medula ósea. Éstas reciben el nombre de trabéculas.(3)

2) El tejido óseo compacto: se presenta como una masa sólida y continua de tejido óseo en la cual los espacios donde se aloja la médula ósea sólo pueden percibirse al microscopio.(4)

En el hombre adulto normal, los tejidos óseos esponjoso y compacto tienen una distribución topográfica precisa en el esqueleto:

A) Huesos largos (fémur, húmero, etc.): se distinguen anatómicamente tres regiones; una parte media, cilíndrica y alargada, llamada **diáfisis**, dos extremidades habitualmente abultadas, llamadas **epífisis** y las zonas de unión entre la diáfisis y las epífisis, llamadas **metáfisis**.(5)
(Figura 1)

La **diáfisis** está constituida por un cilindro hueco de pared densa formada por tejido óseo compacto (cortical) que rodea a una cavidad central en la que se halla la médula ósea (cavidad medular). Este cilindro está formado por unidades estructurales llamadas "**osteones**". Cada

osteón está integrado por hileras circulares de osteocitos alojados en cavidades llamadas lagunas osteocíticas y dispuestas concéntricamente alrededor de vasos que corren paralelos al eje mayor del hueso. Las hileras de osteocitos alternan con la sustancia intercelular que forma las llamadas laminillas óseas, también dispuestas concéntricamente alrededor del conducto longitudinal llamado canal osteónico. El tamaño de los osteones es variable y pueden incluir de 4 a 20 laminillas óseas concéntricas. Los espacios que quedan entre ellas, están llenos de restos de osteones anteriores y constituyen los sistemas de laminillas intersticiales. Un cierto número de laminillas paralelas entre sí de tejido óseo compacto constituyen los sistemas de laminillas circunferenciales internos y externos, que revisten a su vez, las superficies interna y externa del cilindro óseo compacto de la diáfisis. En el seno de este tejido óseo compacto se halla una red anastomótica de conductos que contienen los vasos sanguíneos y nervios rodeados por una pequeña cantidad de tejido conjuntivo laxo. Los canales osteónicos se conectan entre sí y se comunican con la cavidad medular y el periostio mediante los canales transversos, los cuales atraviesan las laminillas óseas de los canales osteónicos y se distinguen de ellos por no presentar laminillas concéntricas. Los canales transversos también poseen vasos sanguíneos, de manera que entre ellos y los canales osteónicos se establece una rica red vascular a través del tejido óseo compacto.(6)

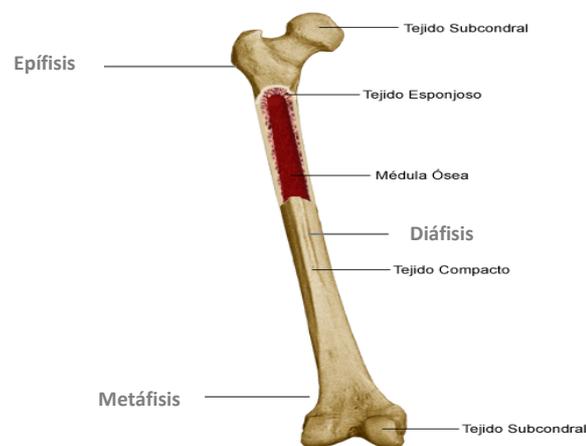


Figura 1: Representación de un hueso largo, en este caso de un fémur con sus partes constitutivas

La epífisis está esencialmente constituida por tejido óseo esponjoso recubierto periféricamente por tejido óseo compacto y por una fina capa de tejido cartilaginoso hialino (cartílagos articulares). Los espacios comprendidos entre las trabéculas del tejido óseo esponjoso de las epífisis comunican directamente con la cavidad medular de la diáfisis.

Las metáfisis unen a cada epífisis con la diáfisis y son zonas constituidas por columnas de tejido óseo esponjoso. Durante el desarrollo del hueso largo, la metáfisis está separada de la epífisis por el cartílago epifisiario que permite el crecimiento en longitud del hueso. Este cartílago pasa a llamarse línea epifisaria en el adulto y no produce más crecimiento en largo.(7)

B) Huesos cortos (vértebras): la estructura es muy parecida a la de las epífisis de los huesos largos.(Figura 2)

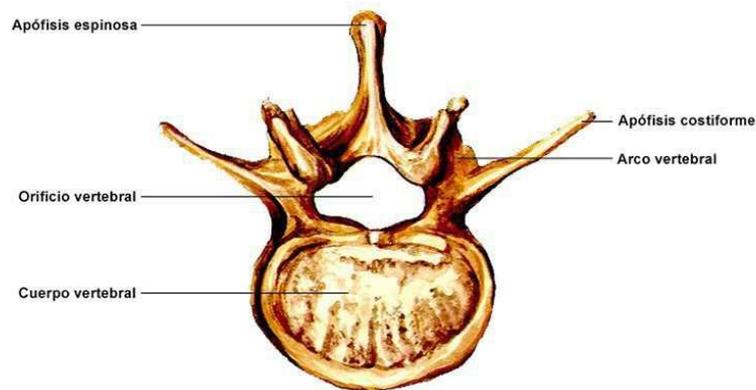


Figura 2: Vértebra lumbar. Descripción de sus partes anatómicas (Extraída del libro de Anatomía Humana de Rouviere. 9ª Edición)

C) Huesos planos (huesos de la bóveda craneal): existe en ellos una tabla interna y una tabla externa de tejido óseo compacto, rodeando a una capa central de tejido esponjoso.(8)(Figura 3)

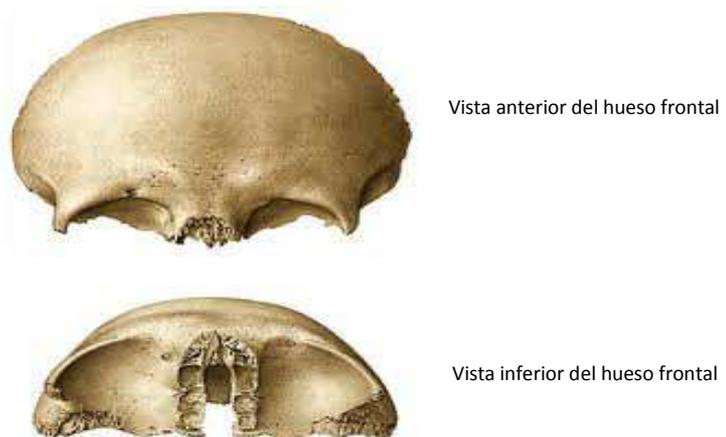


Figura 3: Ilustración de un hueso plano, en este caso el hueso frontal, con su vista anterior e inferior (Extraída del libro de Anatomía Humana de Rouviere. 9ª Edición)

PERIOSTIO Y ENDOSTIO

Ya sea hueso largo, corto o plano y el tejido óseo que lo constituya sea esponjoso o compacto, está revestido exteriormente por el periostio e interiormente por el endostio.

El **periostio** reviste la superficie externa de todos los huesos, excepto a nivel de los cartílagos articulares. Es un tejido especializado organizado en dos capas. La capa interna contiene células conjuntivas, con potencialidad para formar hueso en determinadas circunstancias, adquiriendo entonces el aspecto de osteoblastos. Estas células son denominadas células osteoprogenitoras indiferenciadas. La capa externa es rica en fibras colágenas, que penetran en el tejido óseo subyacente y aseguran la adherencia del periostio al hueso. Estas fibras se calcifican parcialmente y se denominan fascículos colágenos perforantes. La vascularización del periostio y médula ósea asegura la nutrición de las células del tejido óseo. De allí se originan capilares que corren por las cavidades y conductos de este tejido. Las arterias y venas principales penetran y salen de los huesos a través de los agujeros nutricios. La circulación de los vasos menores se continúa con la del periostio.

El **endostio** es una fina capa de tejido conjuntivo que tapiza las paredes de todas las cavidades vascularizadas del tejido óseo, es decir, las trabéculas óseas del tejido esponjoso, los canales osteónicos y transversos del hueso compacto y los espacios medulares de los huesos largos. Consta de células de revestimiento óseo, acompañados de fibras colágenas.(9)

HISTOLOGIA DEL TEJIDO OSEO

Histológicamente, el tejido óseo está constituido por células y por una matriz ósea, siendo ésta última formada por una matriz orgánica y sales minerales.

Se distinguen tres tipos celulares:

- a) **Osteoblastos**, células responsables de la formación del tejido.
- b) **Osteocitos**, células que controlan la actividad osteoblástica/osteoclástica.
- c) **Osteoclastos**, células responsables de la resorción del tejido.

Actualmente, se prefiere hablar de dos familias de células o líneas celulares, la osteoblástica y la osteoclástica, cada una de las cuales contiene células en diferentes estadios de diferenciación.

Dentro de la línea celular osteoblástica se evidencian básicamente cuatro tipos celulares distinguibles de acuerdo a criterios morfológicos e histoquímicos:

1) Células osteoprogenitoras

Son células mesenquimáticas indiferenciadas pero determinadas para dar origen a cierta línea celular. Su capacidad de proliferación, migración y diferenciación estaría estimulada por una sustancia denominada proteína morfogenética del hueso (BMP). Se consideran células bipotenciales, ya que cuando proliferan en un ambiente con apropiado riego sanguíneo originan preosteoblastos y luego osteoblastos, mientras que si lo hacen en una región avascular formarán condroblastos.

Estas células son pequeñas y fusiformes. Su citoplasma aparece muy claro con H/E. Como toda célula no diferenciada presentan relativamente pocas organelas y se ubican en la capa osteogénica interna del periostio, en la médula ósea y en general muy próximas a la superficie del tejido óseo.

2) Células de revestimiento óseo

Son denominadas por algunos autores osteoblastos inactivos. Forman una capa continua que recubre las superficies del tejido óseo en reposo, o sea, no sujeto a formación ni resorción. Son células aplanadas, con una de sus caras en contacto con la matriz calcificada del tejido óseo y ligeramente basófilas, con núcleos prominentes. Poseen pocas organelas.

Tienen la capacidad de transformarse rápidamente en osteoblastos, aunque también cumplen otras funciones. Por estar interconectadas entre sí y con los osteocitos subyacentes, serían intermediarias nutricionales para osteocitos, y a la vez, separarían funcionalmente el líquido tisular óseo del medio extratisular.(10)

3) Osteoblastos

Poseen un cuerpo celular cúbico o prismático del que nacen expansiones citoplásmicas más o menos alargadas. En ciertos casos, se disponen a lo largo de zonas preexistentes de tejido óseo, formando un borde similar a un epitelio denominado "borde osteoide". El núcleo es redondeado y contiene un voluminoso nucléolo. El citoplasma es rico en estructuras que ponen en evidencia su importante función de síntesis proteica y glucoproteica. Dichas estructuras son: numerosos ribosomas libres, retículo endoplasmático granular abundante, aparato de Golgi bien desarrollado, numerosas mitocondrias.(11)

4) Osteocitos

Los osteocitos son osteoblastos que han sido completamente rodeados por la matriz ósea en vías de mineralización. Su cuerpo celular es fusiforme y da nacimiento a numerosas y finas prolongaciones más o menos alargadas. El núcleo es ovalado y el citoplasma contiene las mismas organelas que los osteoblastos, pero en menor abundancia.(12)

Dentro de la línea celular osteoclástica se encuentran los osteoclastos y sus precursores inmediatos.

Osteoclastos

Son células muy voluminosas de forma generalmente redondeada con la particularidad de poseer varios núcleos. El polo celular que se halla en contacto con el tejido óseo ya constituido presenta numerosas microvellosidades irregulares que se observan con aspecto de borde en cepillo y que en la actualidad se denomina borde microvelloso. El citoplasma contiene lisosomas con enzimas hidrolíticas, vesículas, vacuolas, abundantes mitocondrias, ribosomas libres y escaso retículo endoplasmático granular. Tienen capacidad de desplazarse y se los observa adosados a las superficies óseas en resorción, ubicados en depresiones de la matriz excavadas por acción enzimática, llamadas lagunas de resorción.(13)

MATRIZ OSEA

Consta de una matriz orgánica impregnada de sales minerales, principalmente cálcicas. La **matriz orgánica** (osteoide) está formada casi exclusivamente de fibras colágenas tipo I. El colágeno representa aproximadamente el 95 % del peso de la matriz orgánica del hueso seco. La sustancia fundamental en la que se encuentran las fibras es poco abundante, conteniendo glucosaminoglucanos sulfatados y glucoproteínas, además de proteínas diversas, agua y electrolitos. Las **sales minerales** principales del tejido óseo son el carbonato y el fosfato cálcico que se encuentran en forma de fosfato cálcico amorfo y de cristales de hidroxiapatita. En total, el tejido óseo de un adulto contiene el 99% del calcio total del organismo y aproximadamente el 85% del fósforo total del organismo.(14)

HISTOFISIOLOGIA CELULAR Y TISULAR

Las células que le dan la estructura y le proporcionan la función al hueso son los osteoblastos, osteocitos y osteoclastos. Las células osteoprogenitoras dan origen a los osteoblastos, y estos a los osteocitos. Los osteoclastos, por otra parte, derivan del linaje hemato-inmune.

La regulación de la dinámica osteocelular depende de factores intrínsecos autócrinos, parácrinos y sistémicos endocrinos. Todas las rutas que la regulan, van encaminadas a una coordinación fina entre los procesos de proliferación y apoptosis de los osteoblastos y osteoclastos, como así también los procesos de formación y resorción ósea.

Los osteoblastos trabajan coordinadamente con los osteoclastos formando la “unidad remodeladora o de remodelamiento óseo” (URO). También son llamadas células biosintéticas óseas porque fabrican la mayoría de los componentes orgánicos estructurales, es decir las proteínas. La gran mayoría de las proteínas celulares, incluyendo las óseas, están modificadas con carbohidratos, por lo cual podemos definir las como “glucoconjugados”. Estos glucoconjugados dependiendo del tipo de carbohidratos se clasifican en glucoproteínas y proteoglucanos. Estos últimos se caracterizan por su modificación con carbohidratos del tipo ácido siálico, aminoazúcares sulfatados o ambos, denominados como GAGs (glucosaminoglucanos).(15)

Los glucoconjugados conforman el osteoide, la cual tiene capacidad osteogénica y calcificante. Esta matriz posee componentes fibrilares como el colágeno (principalmente del tipo I), y asociados (tipo V y XIII) y componentes amorfos no fibrilares como osteoadherina (osteomodulina), osteoglicina (factor inductor óseo), sialoproteínas óseas: BSP I (osteopontina) y BSP II y osteonectinas.(16) El colágeno tipo I es la estructura donde se depositan las sales minerales de calcio y fósforo (cristales de hidroxapatita). Este depósito de sales se realiza en medio básico, y este proceso es catalizado por la enzima fosfatasa alcalina (isoenzima ósea), la cual es sintetizada por los osteoblastos. El osteoide posee también glucoproteínas como la fibronectina y trombospondinas, y proteoglucanos como decorin, biglycan y la fibromodulina, que son comunes a todos los tejidos conectivos del organismo.(17,18)

REGULACION DE LA FORMACION OSEA

Las células implicadas en la formación ósea, sufren un proceso de diferenciación mediante la interacción de factores locales y sistémicos, con evidente plasticidad en los precursores, que pueden madurar hacia osteoblastos o adipocitos, dependiendo del estímulo a que se ven sometidos. Entre las hormonas que regulan la actividad osteoblástica, las que

representan un papel más importante son la gonadotropina humana (GH) y sus mediadores y las hormonas sexuales.

Las células del linaje osteoblástico segregan diversos factores de crecimiento: unos actúan como mitógenos y otros como modificadores funcionales. Las proteínas morfogenéticas óseas (BMP), miembros de la superfamilia del factor de transformación de crecimiento (TGF β), tienen la función de inducir la diferenciación de las células osteoblásticas, incrementando un pool de células maduras, reguladas a su vez, por factores locales.(19) (Figura 4)

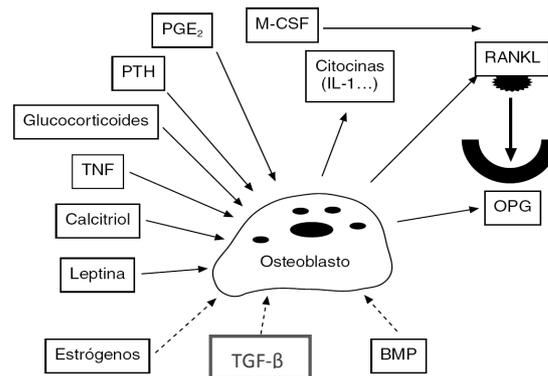


Figura 4: Mecanismos de formación ósea

REGULACION DE LA RESORCION OSEA

El osteoclasto, responsable de la resorción ósea, se encuentra en contacto con la superficie calcificada, en una cavidad creada por él mismo, llamada laguna de resorción. Se encuentra fundamentalmente en la superficie endosteal y en los canales osteónicos, aunque excepcionalmente en la superficie perióstica. Presentan un borde en cepillo orientado hacia el tejido calcificado, delimitando una cavidad entre ellos. Hacia esta cavidad se bombean protones y transportan enzimas como la fosfatasa ácida tartrato resistente (TRAP) que participarán en el proceso de disolución del mineral y degradación de la matriz orgánica, proceso que en conjunto se conoce como resorción ósea. Este proceso libera moléculas como la desoxipiridinolina (Dpd) y los telopéptidos C-terminales (CTX) y N-terminales del colágeno (NTX). Por lo tanto, los niveles de estas moléculas y de TRAP, estiman el proceso de resorción ósea. Los CTX son péptidos de la región no helicoidal del colágeno tipo I, mientras que los NTX son péptidos de la región N-terminal.(20,21,22)

Para ejercer su acción en el proceso de resorción, los osteoclastos se movilizan hacia la zona a resorber y se adhieren a la superficie ósea mineralizada por el ribete en cepillo sellando los bordes del área mediante proteínas llamadas integrinas. Las integrinas del osteoclasto reconocen la secuencia RGD (arginina-glicina-ácido aspártico) existente en el colágeno. A este

nivel el pH ácido y enzimas proteolíticas como colagenasas, metaloproteasas, catepsina K y glucuronidasas, van a producir la resorción del hueso mediante la degradación de la matriz orgánica y solubilización mineral. Se intercambia bicarbonato por cloruro que posteriormente es transportado por un canal de cloruro a la laguna de resorción. La anhidrasa carbónica II genera protones a partir de dióxido de carbono y agua, los protones se liberan hacia la laguna de resorción por intermedio de una bomba generando un entorno ácido que favorece la resorción de la matriz mineralizada.(23,24)

El osteoclasto tiene en su membrana receptores de calcitonina, pero no de parathormona (PTH).(25) Presenta receptores nucleares de estrógenos pero no de vitamina D3. Los precursores de los osteoclastos expresan en su membrana el receptor RANK (receptor activador de factor nuclear kB), que puede interactuar con el ligando RANK (RANKL) producida por el osteoblasto. Esta interacción inicia una cascada de señalización que produce la diferenciación y proliferación de osteoclastos, con la consecuente degradación de la matriz ósea. Además, el osteoblasto produce osteoprotegerina (OPG), una proteína homologa al receptor RANK, actuando como un receptor señuelo y disminuyendo la acción de RANKL sobre el receptor RANK. (26,27) (Figura 5)

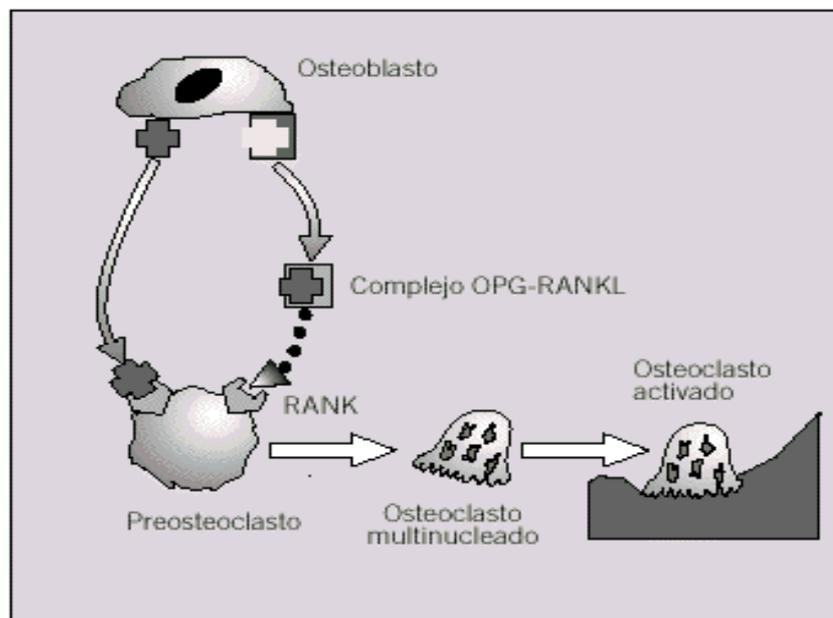


Figura 5: Acople y funcionamiento del Sistema RANK/RANK-L/OPG

Para la osteoclastogénesis también es necesario el factor estimulador de colonias de macrófagos (M-CSF), que puede sintetizar los osteoblastos, que se liga al receptor C-FMS, incrementando la replicación de los osteoclastos. El papel de las citoquinas sigue siendo controvertido; así las interleuquinas IL-1, IL6, el factor de necrosis tumoral α (TNF α) y Pg E2

parecen incrementar la activación osteoclástica; sin embargo el factor de transformación de crecimiento ($TGF\ \beta$) reduciría la pérdida ósea, incrementando la apoptosis de osteoclastos. Las hormonas sistémicas, que estimulan la resorción ósea, generalmente no actúan directamente sobre los precursores de osteoclastos, sino sobre osteoblastos.(28)

Tanto la PTH, 1,25-dihidroxitamina D3 y las hormonas tiroideas, aumentan la expresión de RANKL en osteoblastos, pudiendo en algunos casos inhibir la síntesis de OPG y producir un incremento de la resorción ósea.(29)

El efecto de los estrógenos parece ser indirecto, a través de la regulación de diversos mediadores, ya que su papel de control en el sistema RANKL-RANK, se lleva a cabo exclusivamente incrementando los niveles de OPG, efecto que se potencia con su papel supresor sobre la síntesis de IL1, IL6, Pg E2, GM-CSF y $TNF\alpha$, impidiendo la diferenciación y activación de los preosteoclastos.(30,31,32) También incrementa la apoptosis de osteoclastos activados y la síntesis de $TGF\beta$.

La calcitonina también influye en la resorción, inhibiendo indirectamente al osteoclasto por un fenómeno rápido de regulación (downregulation) de sus receptores.(33)(Figura 6)

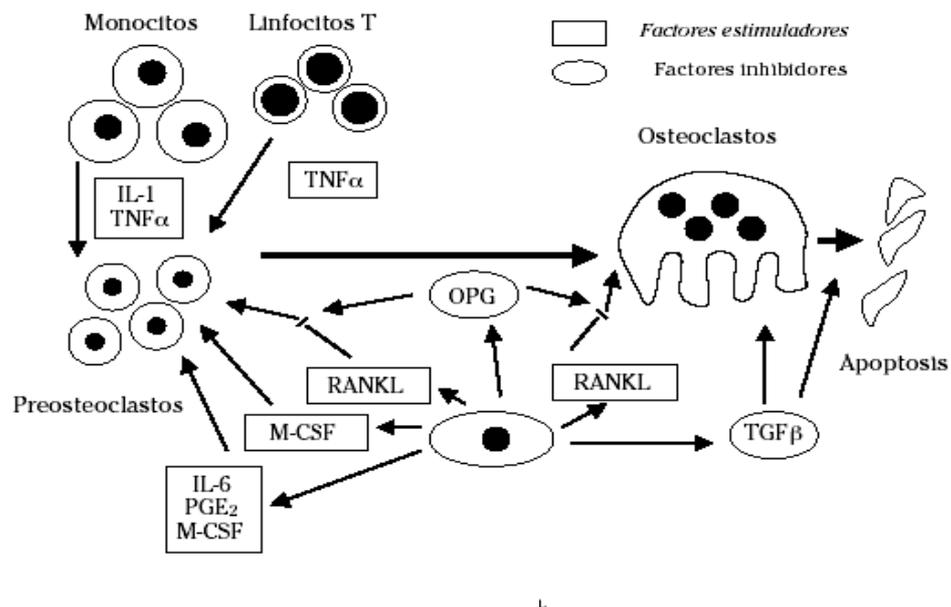


Figura 6: Mecanismos de regulación de la resorción ósea

OSTEOGENESIS

La formación y desarrollo del tejido óseo se produce a través de la sustitución de un tejido conectivo preexistente. Este reemplazo de un tejido por otro se produce por dos procesos, que son la osificación intramembranosa y la osificación endocondral. El lugar donde

se inicia el proceso de histogénesis ósea se denomina centro de osificación.(34)

Osificación intramembranosa: Este proceso se controla por señales de polipéptidos de las familias Wnt, del factor de crecimiento fibroblástico y del factor de crecimiento transformante- β . (TGF β). Posteriormente, se utiliza calcio en el proceso de mineralización y los osteoclastos inician el remodelado del tejido óseo.(35) Muchas trabéculas individuales aumentan de tamaño por aposición y al final se fusionan para formar un centro de osificación primaria. Los osteoblastos quedan atrapados dentro del osteoide calcificado, transformándose en osteocitos. El depósito continuo de osteoide determina la oclusión de los espacios intertrabeculares y se forma el hueso compacto. En otras zonas no se produce el engrosamiento de las trabéculas y el tejido conjuntivo del espacio intertrabecular se diferencia a tejido hematopoyético. Los huesos frontal, parietal, parte de los huesos temporal, occipital, mandibular y maxilar se desarrollan mediante osificación membranosa.(36)

Osificación endocondral: El hueso se forma reemplazando el cartílago hialino preexistente. El mecanismo de deposición de matriz ósea durante la osificación endocondral es esencialmente el mismo que en la intramembranosa. Se establece una red trabecular principal y a continuación, se transforma en hueso maduro. La osificación endocondral es característica de los huesos largos, la columna vertebral y la pelvis. (37,38)

RECAMBIO TISULAR OSEO: Modelado, Remodelado y Regeneración

Modelado óseo

El mecanismo por el cual se forma el tejido óseo y se renueva constantemente antes que cese el crecimiento se denomina modelado óseo. Las alteraciones del modelado pueden causar deformidades óseas. A nivel del hueso, en la zona de la metáfisis, el crecimiento óseo se asocia a fenómenos de resorción en la superficie externa y de formación en la interna, mientras que en las diáfisis, ocurre lo contrario. Este proceso permite que los distintos huesos conserven su forma durante el proceso de crecimiento. El modelado óseo está programado genéticamente pero existen factores mecánicos de carácter local que pueden influir sobre el mismo.(39)

Remodelado óseo

En la génesis del hueso, tanto por osificación intramembranosa u osificación endocondral, ambos procesos conducen a la formación de un mismo tipo de hueso, que luego se mantiene por el proceso de remodelación ósea. Esta remodelación ósea se realiza a partir

de dos procesos básicos que son: la resorción o remoción de tejido óseo y la formación de nuevo tejido en su lugar.

Mediante el remodelado se consigue renovar el hueso entre un 5 y un 15% en un año en condiciones normales. Este proceso es llevado a cabo por los osteoclastos y por los osteoblastos. La actividad conjunta de ambas células se conoce como unidad de remodelado óseo (URO). (40). En el adulto, cerca de un 8% del tejido óseo es renovado anualmente. Esta cifra es superior en el joven e inferior en el anciano. El volumen total de hueso que es renovado por unidad de tiempo mediante remodelado se denomina recambio óseo.(41) La diferencia entre el volumen de hueso formado y el de hueso resorbido por unidad de tiempo, se denomina balance óseo. Si la resorción y la formación son idénticas, el balance es igual a 0 y el volumen total de hueso no variará en función del tiempo. Si la formación y la resorción no son iguales, la masa ósea se modificará en sentido positivo o negativo.

La máxima cantidad de masa ósea se alcanza a los 30 años de edad y depende de factores genéticos y ambientales. De los 30 a 40 años, el balance es igual a cero y la masa permanece estable. A partir de los 40 años el balance comienza a ser negativo y la masa disminuye de manera progresiva. En el hombre la pérdida se realiza a una velocidad constante mientras que en la mujer se acelera durante los años de la menopausia. Esta pérdida fisiológica de masa ósea determina que al inicio de la octava década, los hombres hayan disminuido su masa ósea en un 20% y las mujeres en un 30%. La densidad ósea y el riesgo de fractura a edades avanzadas reflejan el contenido mineral máximo de los huesos durante el periodo de madurez del esqueleto (masa ósea máxima) y la velocidad subsecuente de pérdida de hueso.(42)

Los propósitos fundamentales de la remodelación son fortalecer el tejido óseo mediante la reparación de las microfracturas y mantener la homeostasis del calcio. Normalmente, el hueso resorbido es reemplazado por el mismo volumen de hueso nuevo. Si el volumen de hueso resorbido no es completamente reemplazado por hueso nuevo el tejido se debilita.(43)

Hay dos formas de remodelación ósea: remodelación cortical y remodelación trabecular:

Remodelación del hueso cortical: Implica la resorción de osteones antiguos seguido por la organización de osteones nuevos. Los osteoclastos forman un túnel de resorción centrifuga que es rellenado centrípetamente por osteoblastos. Para que ocurra este fenómeno, los precursores de los osteoclastos son reclutados al canal osteónico y se diferencian a osteoclastos, los cuales, empiezan el proceso de resorción ósea de la laminilla interna y las consecutivas en dirección a la laminilla externa. Luego los osteoblastos invierten el proceso de resorción organizando una capa dentro de la cavidad de resorción y comienzan a secretar osteoide. Finalmente, los osteoblastos continúan depositando osteoide y al final quedan atrapados dentro de la matriz ósea mineralizada para convertirse en osteocitos.(44)

Las líneas de cementación son el marcador del inicio de la remodelación. Las fuerzas externas que actúan sobre los osteones pueden producir microfracturas. Cuando existe un defecto en la arquitectura del osteón, la microfractura se extiende y puede producir una fractura ósea completa. Las microfracturas de los osteones se pueden reparar mediante el proceso de remodelación osteoblasto-osteoclasto.(45)

Remodelación del hueso trabecular: Tiene lugar en la superficie ósea a diferencia de la remodelación del hueso cortical, que se produce en forma de túneles. La superficie endóstica de las trabéculas se remodela por este mecanismo, que es similar al de la remodelación del hueso cortical.

El proceso de resorción puede llegar a incrementar la fragilidad del hueso, más allá de lo esperable, simplemente por la disminución de la densidad mineral. Como el proceso de formación ósea requiere más tiempo que el de resorción, si la remodelación ósea está aumentada, se compromete la mineralización, con posterior incremento de la fragilidad del hueso.(46)

Regeneración ósea

La regeneración tisular es la respuesta que consigue la restitución *ad-integrum* del tejido tras un trauma, diferencia sustancial con la reparación, que es el proceso de formación de un tejido cicatrizal, con características diferentes al original. En este sentido el hueso es un tejido que se regenera tras una lesión. La regeneración ósea origina una respuesta en la que están involucrados los vasos sanguíneos, las células y la matriz extracelular.(47) Luego de un trauma, se produce una respuesta inflamatoria y un hematoma inicial. Las células del coágulo liberan interleukinas y factores de crecimiento, originando la migración de linfocitos, macrófagos, precursores de osteoclastos y células mesenquimales pluripotenciales. Estas señales moleculares promueven la diferenciación hacia células endoteliales, fibroblastos, condroblastos y osteoblastos, dando origen a un nuevo tejido que reemplazará al coágulo. Todo ello está regido por una serie de complejas interacciones entre factores de crecimiento, hormonas y citoquinas. En este proceso va a ser fundamental el aporte vascular, la síntesis proteica y la mineralización.(48)

MARCADORES BIOQUIMICOS DEL PROCESO FORMACION / RESORCION OSEA

En distintas patologías del tejido óseo, por lo general hay un desacople en el proceso de remodelado, bien por incremento de la resorción, disminución de la formación o ambos

procesos simultáneamente. En años recientes se han encontrado componentes celulares y extracelulares que reflejan específicamente tanto la resorción como la formación de hueso.

Marcadores de formación ósea

- 1) Fosfatasa alcalina total (FA): Se determina en suero por método colorimétrico. El 50% procede del tejido óseo, el 40% del tejido hepático y 10 % del tejido intestinal.
- 2) Fosfatasa alcalina específica del hueso (FAO): Se determina en suero mediante inmunoensayo con anticuerpos monoclonales. Presenta importante variabilidad interindividual, pero baja variabilidad intraindividual. No es influida por la dieta.(49)
- 3) Osteocalcina: proteína sintetizada por los osteoblastos maduros, odontoblastos y condrocitos. Se determina por inmunoensayo en plasma. Es un marcador sensible y específico de actividad osteoblástica. Los valores no se influyen con la dieta.(50)
- 4) Propéptidos de procolágeno, amino y carboxiterminales del colágeno tipo 1: Son fragmentos que proceden de la ruptura del colágeno recién formado, a través de endoproteinasas. Reflejan la fase colágena de la formación ósea. Se determinan por inmunoensayo en plasma.(51)

Marcadores de resorción ósea

- 1) Hidroxiprolina: Aminoácido presente en todos los tipos de colágeno liberados tras la ruptura enzimática. No es específico ya que difiere por la ingesta y la excreción en orina.(52)
- 2) Puentes de piridinolina y desoxipiridinolina: Estos puentes unen a las moléculas de colágeno tipo 1. Cuando el colágeno se metaboliza, estos puentes se liberan. Se mide por inmunoensayo y no es modificado por la dieta.(53)
- 3) Puentes de telopéptidos: procedentes de la degradación del colágeno. Pueden determinarse en sangre u orina. Siempre deben medirse en ayunas.(54)
- 4) Fosfatasa ácida tartrato-resistente (TRAP): Sintetizada y secretada por osteoclastos durante la resorción activa del hueso. Se determinan mediante inmunoensayo en plasma.(55)
- 5) β Cross Laps (CTX): Telopéptido carboxilo-terminal del colágeno tipo I. Es uno de los marcadores óseos que presenta mayor sensibilidad y especificidad. Puede evaluarse en suero ó plasma en forma automatizada.(56)

BIOMECANICA DEL TEJIDO OSEO

La responsabilidad prioritaria de los huesos es proveer soporte estructural para el cuerpo. En cuanto a esta función, el esqueleto es la base de la postura, de la locomoción, de la resistencia a la carga diaria y de la protección de los órganos internos. La calidad del tejido depende de múltiples factores como la cantidad, conectividad y orientación de las trabéculas, la estructura del colágeno, la densidad mineral y el contenido mineral principalmente.

Las fuerzas que pueden actuar sobre el tejido óseo son de tres tipos: tensión, compresión y torsión. Además pueden ser aplicadas de forma perpendicular a la superficie ósea (fuerza normal) o de forma oblicua (fuerza de cizallamiento).

Existen dos tipos de parámetros que caracterizan la biomecánica ósea, aquellos que definen la función del hueso y aquellos que describen la calidad del material óseo. Cuando se aplica una fuerza perpendicular, los huesos largos (constituidos mayoritariamente por tejido óseo compacto) responden a las fuerzas aplicadas sobre su superficie siguiendo un patrón característico representado en una curva de fuerza (Newton = N) vs desplazamiento (mm) (Figura 7). La primera fase es elástica y depende de la rigidez del hueso (fase 1). En esta fase, la deformación es temporal y se mantiene solo durante el tiempo de aplicación de la fuerza tras lo cual, el hueso recupera su forma original. Si la fuerza aumenta comienza la fase plástica y el hueso, aunque se recupera parcialmente, queda deformado (fase 2). Por último, cuando la fuerza aplicada es superior a la resistencia del tejido se produce la fractura (fase 3).

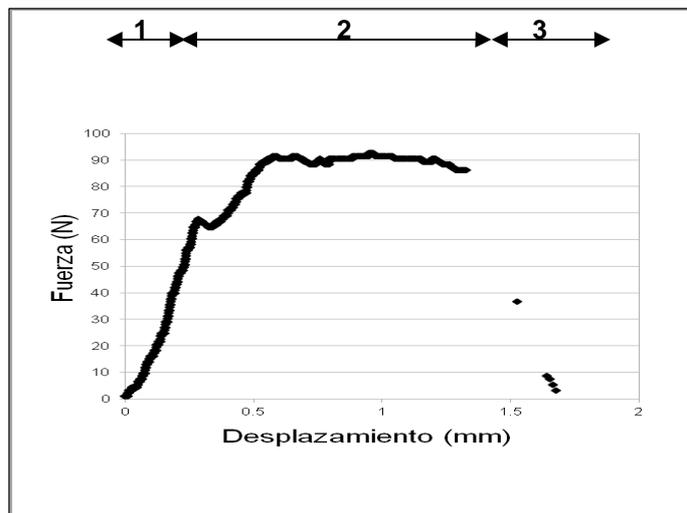


Figura 7: Curva de fuerza (N) vs desplazamiento (mm)

A partir de este gráfico se pueden obtener los parámetros del hueso investigado. La rigidez (N/mm), que es la pendiente de la fase 1 (FASE ELASTICA); la fuerza de fractura (N), que es la fuerza a la cual el daño al tejido es importante, produciendo fallas en su estructura y se

revela este punto por una abrupta caída en la fuerza, y la fuerza máxima (N), que es el valor mayor de esta variable y sería la responsable de un daño irreversible que conduce a la fractura. Por último, la energía absorbida (mJ) es el área debajo de la curva desde el reposo hasta el desplazamiento en el cual el hueso sufre la fractura.(57)(Figura 8)

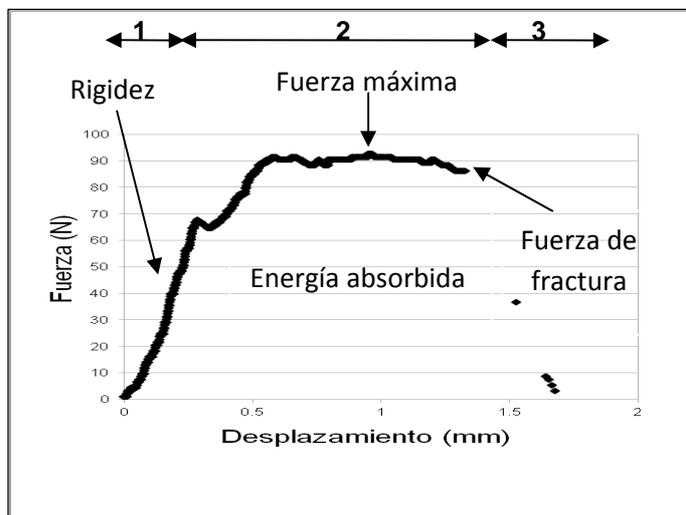


Figura 8: Parámetros obtenidos en una curva de fuerza (N) vs desplazamiento (mm)

FARMACOLOGIA DEL TEJIDO OSEO

Entre las numerosas patologías que afectan el sistema esquelético, las fracturas ocupan un capítulo muy importante, y más aún, cuando el hueso se ve afectado por una patología de base como por ejemplo, el síndrome menopáusico.(58,59,60) En Odontología el hueso constituye, entre otros tejidos, una de las principales estructuras de sostén del elemento dentario y cobra importancia imprescindible cuando se reemplazan estos elementos por implantes o estructuras de titanio.(61,62) Diversas situaciones patológicas, además de las fracturas, llevan a la pérdida de tejido óseo y/o disminución de la calidad o densidad de dicho tejido.(63,64) Tal es el caso de la osteomielitis, resorciones por quistes y tumores, enfermedad periodontal en diferentes estadios y osteoporosis maxilar.(65)

En el campo de la farmacología diversos son los esfuerzos que se llevan a cabo para tratar de detener la pérdida ósea fisiológica gradual por el pasar de los años y de incrementar la masa ósea en las diversas patologías que cursan con balance óseo negativo.(66,67) Entre las acciones llevadas a cabo para mantener la densidad y estructura del esqueleto son variadas las terapéuticas utilizadas con diferentes fármacos que intervienen en la calcificación y el recambio óseo, tal es el caso del calcio, hormona paratiroidea (PTH), vitamina D,(68)

calcitonina, bifosfonatos, fluoruro de sodio (NaF), monofluorofosfato de sodio (MFP) y hormonas sexuales.(69,70)

Los bifosfonatos son una familia de compuestos análogos al pirofosfato en los que se reemplaza el oxígeno de su estructura química por carbono, siendo esta estructura completamente resistente a la destrucción enzimática a nivel de la unión P-C-P.(71) Tienen gran afinidad por los cristales de hidroxiapatita y una vez absorbidos, estos fármacos son incorporados a la matriz ósea. La avidez con que los bifosfonatos se unen a los cristales de hidroxiapatita y previenen su disolución se evidencia cuando el sitio R1 de su estructura química es modificado para introducirle un grupo hidroxilo (etidronato), o un átomo de cloro (clodronato). Estas modificaciones aumentan la afinidad por el calcio, de ahí su poderosa capacidad para quelar iones.(72) La marcada selectividad de los bifosfonatos por el hueso más que por otros tejidos le da mucha importancia en la práctica clínica médica y odontológica.(73) Los bifosfonatos de última generación son más potentes ya que en su estructura química contienen nitrógeno, como alendronato,(74,75) risedronato, ibandronato y ácido zoledrónico.(76,77,78,79) (Figura 9)

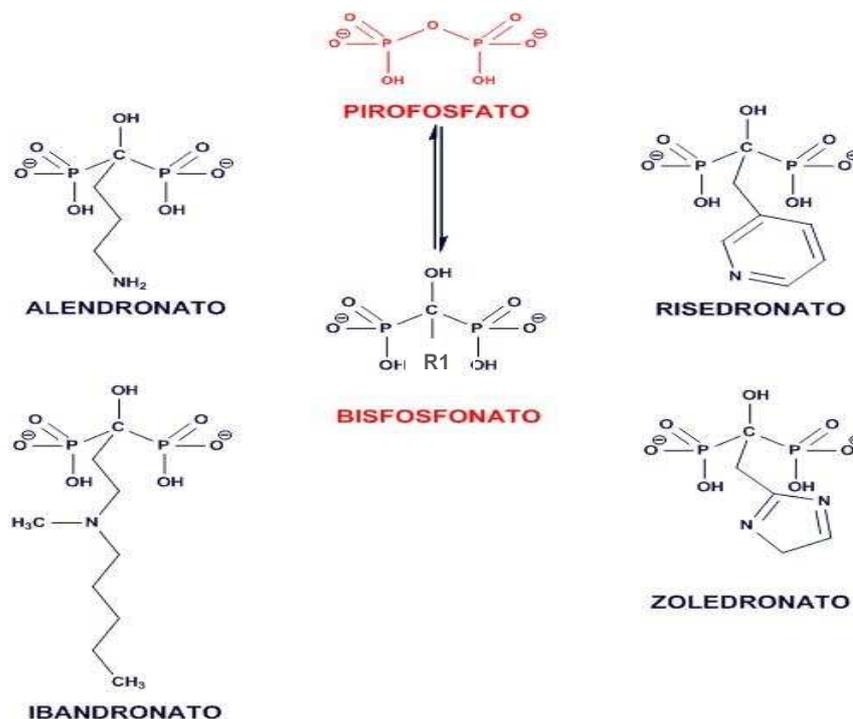


Figura 9: Principales bifosfonatos utilizados en la práctica clínica

A nivel celular actúan de manera preferencial en los sitios de resorción. Tienen efectos directos en el osteoclasto a nivel de su citoesqueleto, al provocar la pérdida del borde en cepillo e inducir la apoptosis en osteoclastos maduros y macrófagos y de esta forma, inhibir

directamente la resorción mediada por los mismos.(80) Diversas hipótesis sugieren que estos fármacos mejorarían la calidad ósea al inhibir la actividad osteoclástica, disminuyendo así la resorción ósea. Dicha situación modificaría el balance óseo que opera con el mecanismo de resorción/formación ósea.(81,82,83,84,85,86)

La osteonecrosis maxilar (ONM) es uno de los efectos adversos más importantes de los bifosfonatos, siendo el maxilar inferior el más afectado entre ambos maxilares.(87) Esta complicación generalmente se produce cuando los pacientes son tratados con altas dosis de bifosfonatos intravenosos por enfermedades metastásicas de tejido óseo.(88,89,90) La incidencia de esta complicación es baja y se presenta con dolor en el maxilar, entumecimiento y disconfort. Como mecanismos patogénicos se han propuesto la marcada inhibición de la resorción osteoclástica con la consecuente menor formación de unidades multicelulares óseas, y el efecto antiangiogénico de los bifosfonatos.(91) El resultado final es la disminución de la celularidad y del flujo sanguíneo óseo llevando a una alteración en la remodelación y en la respuesta ante injurias óseas.(92) La cavidad oral no es aséptica y por lo tanto la necrosis probablemente resulte de la interacción entre el huésped y las bacterias residentes en ella.(93) Los productos bacterianos aumentan a su vez la resorción y disminuyen la formación ósea. Posiblemente, la razón de ello se deba a que los maxilares son los únicos huesos del esqueleto expuestos continuamente a un medio externo séptico (cavidad bucal) a través de los espacios periodontal y periapical. Además, la alta frecuencia de infecciones óseas de etiología dentaria hace necesario un recambio celular mayor en los maxilares del que se requiere en cualquier otra localización. La vascularización terminal de los maxilares podría ser otro factor favorecedor para que se den este tipo de complicaciones, al no existir ningún vaso de gran calibre que garantice un correcto aporte sanguíneo colateral.(94,95,96).

La osteonecrosis maxilar ha sido también descrita en pacientes con osteoporosis que reciben bifosfonatos por vía oral.(97,98,99,100) Como se dijo anteriormente, esta complicación es más frecuente en la maxilar inferior y en un alto porcentaje de los casos existe un factor desencadenante.(101,102) Los procedimientos quirúrgicos odontológicos tales como exodoncias, tratamientos periodontales, regularizaciones óseas, cirugía implantológica, etc. suelen ser la principal causa en pacientes tratados con bifosfonatos por vía oral.(103) Sin embargo, no hay datos sobre la incidencia de osteonecrosis maxilar y el uso de bifosfonatos a bajas dosis por vía subcutánea.(104)

Alendronato es un potente inhibidor de la resorción ósea que incrementa la densidad mineral del hueso cuando se administra por vía subcutánea. Estudios in vitro en cuanto a citotoxicidad celular demuestran que a dosis normales la viabilidad celular es del 98%, inclusive a dosis altas y excesivas, la viabilidad nunca es inferior al 70%.(105). Estudios radiográficos de tibias de

ratas a distintos tiempos de administración subcutánea de Alendronato muestran un aumento de la radiopacidad notable a lo largo del tratamiento.(106)

Cuando alendronato se administra por vía subcutánea se observan cambios en la morfología de osteoclastos, lagunas de resorción y actividad osteoclástica. Se observa tejido óseo en remodelación con trabéculas conteniendo osteoblastos y osteocitos viables. Los niveles de fosfatasa alcalina medidos cuando se administra alendronato en forma subcutánea son significativamente mayores con respecto al grupo que no se administro alendronato.(107)

Por otra parte, el fluoruro de sodio (NaF) y monofluorofosfato de sodio (MFP) han sido las sales con flúor más investigadas en lo referente a su metabolismo. El NaF al ser administrado por vía oral se absorbe en estómago e intestino, en plasma se encuentra libre y es depurado por riñón y hueso. En este último, el fluoruro reemplaza al oxhidrilo del cristal de hidroxiapatita formando fluorapatita. (cristal con un pH crítico de 4,5; más resistente que el cristal de hidroxiapatita).

El MFP se comenzó a utilizar por las ventajas sobre el NaF por su mejor tolerancia gástrica y compatibilidad con la coadministración con calcio.(108) Rigalli y col demostraron que la farmacocinética del MFP muestra gran diferencia con NaF.(109,110,111,112,113,114) El MFP se absorbe en estómago e intestino, uniéndose a la alfa-2-macroglobulina plasmática, la que se inactiva y es depurada por receptores del hueso e hígado. Esta proteína se deposita en hueso, la que es luego metabolizada a péptidos de menor peso molecular y finalmente a fluoruro, determinando una mayor vida media del flúor en el organismo y un efecto sostenido sobre el incremento de la masa ósea.(115,116)

El fluoruro es un mitógeno para los osteoblastos (117), estimula la formación e incrementa el volumen del hueso, efecto específicamente debido al incremento de la actividad osteoblástica.(118) En estudios a cerca de la liberación sostenida de fluoruro, se mostraron resultados favorables sobre la incidencia de fracturas. El mecanismo de acción del fluoruro se traduce en la inhibición de la fosfatasa ácida del osteoblasto involucrada en la transmisión de señales mediadas por factores de crecimiento y receptores de tirosin-kinasa. La acción del fluoruro produciría un aumento de la vida media de los intermediarios fosforilados de las cascadas de señalización mediadas por las kinasas (ERK).(119)

La diferenciación y proliferación de osteoblastos a partir de células pluripotentes del estroma de la médula ósea involucra a las cascadas de señalización del sistema Wnt/beta-catenin.(120) Los osteoblastos poseen expresión del receptor LRP en sus isoformas LRP5 y LRP6.(121) La acción de Wnt sobre el osteoblasto requiere la heterodimerización del receptor LRP5/6 y el receptor Frizzled. La dimerización produce señales intracelulares que inhiben a la enzima glucógeno kinasa sintetasa (GSK3) que fosforila a beta-catenina, haciéndola sensible a ubiquitina ligasas que determinan su posterior degradación por proteosomas. En consecuencia

la inhibición de GSK3 produce un estado no fosforilado de beta-catenina que se acumularía y sería traslocada al núcleo donde interactúa con coactivadores produciendo la expresión de genes que determinan la diferenciación y proliferación del osteoblasto. El complejo formado por la alfa-macroglobulina y el MFP es depurado por receptores de la familia LRP, por lo tanto aunque no está aun demostrado, se postula que el MFP podría estar realizando su efecto sobre el tejido óseo a través de interacción con este sistema de señalización. También podría atribuirse el efecto del MFP sobre el hueso, al fluoruro liberado por su hidrólisis.(122)

Aunque ha sido planteada la hipótesis del uso de drogas que permitan disociar la formación de la resorción ósea (123), no hay información disponible sobre el uso de alendronato administrado en forma subcutánea ni del tratamiento combinado de alendronato y MFP para utilización en patologías a nivel óseo. De esta manera, el uso concomitante de bifosfonatos y MFP podría ser una alternativa terapéutica para dar respuesta a muchas situaciones clínicas en Odontología.(124)

El modelo que se utilizará en este proyecto permitirá verificar si el uso de bisfosfonatos tiene efecto local al ser administrado próximo a la zona de regeneración ósea y si la co-administración con MFP tiene efecto diferente a los hallados con ambas drogas por separado.

HIPOTESIS

“Los bisfosfonatos tienen afinidad por el tejido calcificado y producen disminución de la actividad osteoclástica. Por otro lado el Monofluorofosfato de sodio tiene efecto osteoformador al estimular la acción osteoblástica. Por lo tanto, Alendronato inyectado en forma subcutánea en la zona experimental y Monofluorofosfato de sodio administrado por vía oral, ejercen efecto sinérgico en la regeneración tisular de cavidades óseas neoformadas”

OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto de la administración combinada de Alendronato por vía subcutánea y de Monofluorofosfato de sodio por vía oral sobre la regeneración tisular de cavidades óseas neoformadas en ratas.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Determinar la citotoxicidad de las formulaciones de Alendronato y MFP.

2. Obtener las dosis adecuadas de Alendronato y de MFP.
3. Evaluar el efecto del tratamiento combinado de Alendronato y MFP en el proceso de regeneración ósea
4. Comparar los efectos de la administración de las drogas por separado y los resultados del tratamiento combinado.
5. Investigar si la inyección subcutánea de Alendronato cercana al sitio de la lesión tiene efecto local o sistémico.

MATERIALES Y METODOS

ANALISIS DE TOXICIDAD

a) Alendronato

El análisis de toxicidad se realizó a través del método de captación de rojo neutro (125,126), basado en la capacidad de células viables (fibroblastos) de incorporar y de fijar el rojo neutro.

El rojo neutro es un colorante catiónico débil que penetra fácilmente las membranas de las células por difusión pasiva, acumulándose a nivel intracelular en los lisosomas, donde se fija a los sitios aniónicos en la matriz lisosomal. Las alteraciones a nivel de la membrana celular, la membrana lisosomal o el metabolismo celular pueden producir cambios en el pH lisosomal que llegan a ser gradualmente irreversibles. Es posible así distinguir entre células viables, dañadas o muertas de acuerdo a la acumulación del rojo neutro dentro del lisosoma. Las células se observaron con un microscopio de contraste de fase para verificar la incorporación del rojo neutro. La viabilidad celular se estimó mediante la extracción del colorante presente en las vacuolas celulares. El rojo neutro fue extraído con una solución de agua/etanol/ácido acético y leído a 545 nm.

Para este ensayo se utilizó la línea celular VERO (células derivadas de fibroblastos de riñón de mono africano) cultivadas en un Medio Esencial Mínimo (MEM) suplementado con 10% de suero fetal bovino a una densidad celular entre 70 a 80 de confluencia. Este ensayo se realizó por triplicado.

b) Monofluorofosfato de sodio

Se preparó una solución conteniendo 900 partes por millón de MFP como solución madre para usarla en los ensayos de citotoxicidad. Se diluyó la solución madre en el medio de cultivo

(Medio esencial mínimo) de manera seriada factor 10 para realizar un Screening. Luego de este procedimiento se observó la presencia de un precipitado cristalino en todas las diluciones, motivo por el cual no se continuó con el ensayo.

No se pudieron realizar los experimentos de citotoxicidad con rojo neutro porque se produjo precipitación en el medio de cultivo al agregar el MFP. Por esta razón se realizaron estudios de toxicidad “*in vivo*” y se incluyeron parámetros que ponen de manifiesto la toxicidad en animales, teniendo en cuenta tres variables que expresan el estado de salud general, alteraciones endocrinológicas y nutricionales y la mineralización ósea del animal y cuyos datos son fácilmente inferibles a toxicidad celular.

El estudio se realizó en ratas de 21 días y se prolongó el tratamiento durante 90 días. El MFP fue administrado en el agua de bebida en una concentración de 5 mmoles/L y el acceso al agua fue ilimitado. Simultáneamente los animales recibieron una dieta estándar para roedores (Gepsa, Argentina) y fueron mantenidos en jaulas colectivas durante el tiempo que duró la experiencia.

Al finalizar el período de tratamiento se realizó la eutanasia del animal mediante anestesia general con una solución de ketamina/xilazina (80 y 12,8 mg/kg de peso corporal respectivamente) y la administración de una inyección intracardíaca de KCl saturado que produjo un paro cardiorespiratorio instantáneo. Se obtuvo el fémur, se desgrasó con acetona y se secó a 60°C durante 3 días. Pasado este período se pesó con una balanza de sensibilidad 0.1 mg obteniéndose el peso seco del mismo. Luego se calcinó en una mufla a 550°C durante 6 hs para eliminar la materia orgánica, obteniéndose de esta manera el peso de cenizas.

Se determinaron durante 90 días de tratamiento con MFP en agua de bebida las siguientes variables:

- Glucosa sanguínea: por método colorimétrico. La glucosa plasmática es una variable controlada por múltiples hormonas y sus alteraciones se asocian principalmente a alteraciones del metabolismo glucídico y/o lipídico, alteraciones endocrinológicas y nutricionales.
- Peso corporal: con balanza sensibilidad ± 1 g. El peso corporal es una medida global del estado de salud del animal y sus alteraciones son indicadoras inespecíficas de malestar o enfermedad. Se justifica la medición solo para conocer si la ingestión de agua con MFP puede alterar la ingesta de alimento.
- Relación ceniza-matriz: se calcula como el cociente entre el peso de las cenizas óseas, luego de calcinar el hueso a 560°C y el peso de la matriz ósea, calculada como la

diferencia entre el peso del hueso y el peso de las cenizas. Es un indicador del proceso de mineralización ósea, y es indicador de alteraciones nutricionales relacionadas al calcio y fosfato o disturbios hormonales relacionados principalmente a funciones de la hormona paratiroidea y el calcitriol.

PREPARACIÓN DE LAS FORMULACIONES

Se preparó una solución de AL para ser aplicado por vía subcutánea. La fórmula farmacéutica con AL se preparó con una dosificación de 0.5 mg/kg de peso corporal. El MFP se administró en el agua de bebida. Se prepararon tubos marcados con 0,72 g de MFP en polvo y se disolvió el contenido de cada tubo en 1 litro de agua para obtener una solución 5 mM. Esta solución se preparó en el momento de su utilización.(127) Teniendo en cuenta que un animal consume aproximadamente entre 20 y 30 ml de agua por día, se producirá una ingesta de aproximadamente 40 micromoles de MFP/100 g de peso corporal / día.

ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN

Los animales que se utilizaron en esta experiencia se mantuvieron en el bioterio de la Cátedra de Fisiología de la Facultad de Odontología UNC y fueron alojados en jaulas (4 animales por jaula) con alimento balanceado y agua de bebida “*ad libitum*”, a una temperatura de 22-26°C, con un ciclo luz-oscuridad de 12hs-12hs durante el tiempo que duró el experimento. El manejo de los animales se realizó siguiendo los lineamientos del National Institute of Health (NIH) para el uso y cuidado de animales de experimentación (Publication N. 85-23, Rev 1985) y del Comité para el cuidado y uso de animales de experimentación. Secretaría de Ciencia y Técnica, Facultades de Ciencias Médicas y Odontología, UNC.

Se emplearon sesenta y cuatro ratas macho de 50 días de edad de la línea Wistar de 160±20 g de peso corporal y se dividieron en 4 grupos de 16 ratas cada uno. El tiempo total de la experiencia fue de 90 días. En el grupo Control (**C**) los animales recibieron semanalmente 0,3 ml/100 g de peso corporal de solución salina por vía subcutánea en el miembro posterior izquierdo cercano a la intervención quirúrgica y agua corriente de red como agua de bebida. El grupo Alendronato (**A**) recibió semanalmente 0,5 mg de alendronato/kg de peso corporal por vía subcutánea profunda en el miembro posterior izquierdo. Estos animales tuvieron acceso a agua corriente de red *ad libitum*. El grupo Monofluorofosfato de sodio (**M**) recibió MFP 5 mM en el agua de bebida durante toda la experiencia y en el miembro posterior izquierdo se administró una inyección subcutánea de solución salina como el grupo control. El grupo Alendronato/Monofluorofosfato de sodio (**AM**) recibió tratamiento combinado con AL subcutáneo y MFP por vía oral en el agua de bebida.

Al finalizar el experimento se realizó la eutanasia de los animales mediante inyección intracardiaca de cloruro de potasio bajo anestesia general.(128,129)

PROCEDIMIENTO QUIRURGICO

Al inicio del experimento los animales fueron anestesiados con una solución de ketamina/xilazina en relación 8mg/1.28mg respectivamente por cada 100 g de peso corporal. (130,131) (Figura 10)

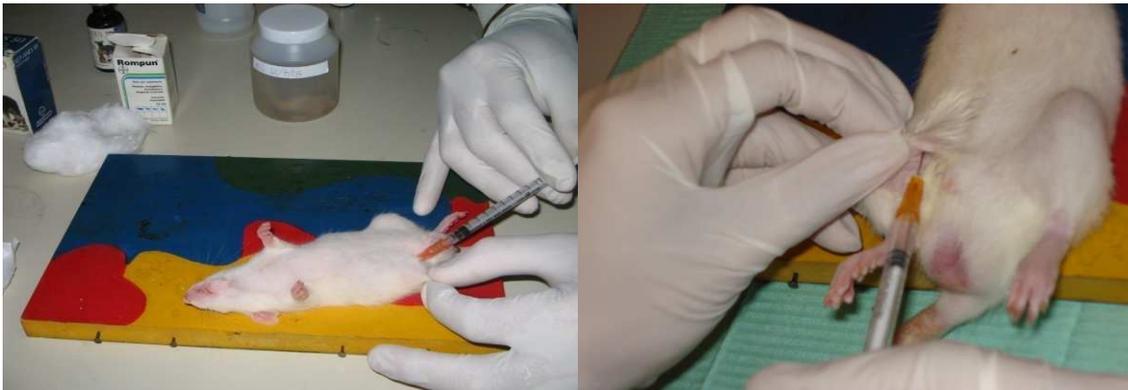


Figura 10: Anestesia general con solución de ketamina/xilazina

Previa asepsia del campo quirúrgico con yodopovidona y rasurado de la tibia (Figura 11) se realizó con bisturí Bard Parker y hoja N° 15 una incisión longitudinal en ambas tibias y se decoló la fascia muscular hasta llegar a exponer el hueso.(Figura 12) Con una fresa número 6 y a rotación manual para no producir necrosis ósea, se realizó una cavidad en la parte plana de cada tibia hasta llegar al hueso medular.(Figura 13) Dicha cavidad no fue rellenada con ningún material y su regeneración fue llevada a cabo por su propio coágulo. Luego de realizada la intervención quirúrgica, se recolocaron los planos en posición y se suturó la herida con hilo reabsorbible.(Figura 14)



Figura 11: Aseptización y rasurado de la tibia



Figura 12: Incisión y decolado de planos quirúrgicos



Figura 13: Osteotomía de ambas tibias



Figura 14: Sutura con hilo reabsorbible

Los sacrificios para la toma de muestras fueron a los 15, 30, 60 y 90 días. En todos los tiempos incluidos el momento 0, se realizaron radiografías de ambas tibias. Además, se extrajo sangre por punción cardíaca para determinación de fosfatasa alcalina. La punción se realizó previa asepsia de la región torácica con solución de yodopovidona y con aguja 25 x 0,8 mm se

extrajo 1 ml de sangre utilizando heparina como anticoagulante. La sangre se centrifugó para eliminar las células rojas y blancas y el plasma fue guardado a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. (Figura 15)

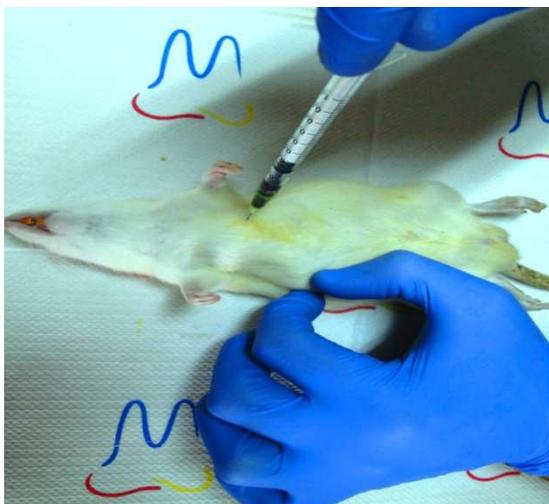


Figura 15: Extracción de sangre por punción cardíaca

La Tabla 1 muestra los grupos experimentales, los días de tratamiento, las muestras obtenidas y los tiempos en que se realizó la eutanasia.

Rx: obtención de radiografías, PC: obtención de muestra de sangre por punción cardíaca, +: eutanasia					
<i>Grupos</i>	<i>0 días</i>	<i>15 días</i>	<i>30 días</i>	<i>60 días</i>	<i>90 días</i>
Control (C)	Rx	+PC/Rx	+PC/Rx	+PC/Rx	+PC/Rx
Alendronato (A)	Rx	+PC/Rx	+PC/Rx	+PC/Rx	+PC/Rx
MFP (M)	Rx	+PC/Rx	+PC/Rx	+PC/Rx	+PC/Rx
Alendronato+MFP (AM)	Rx	+PC/Rx	+PC/Rx	+PC/Rx	+PC/Rx

Tabla 1: Protocolo de trabajo

Luego de la eutanasia se realizó la amputación de ambas tibias y fueron colocadas en frascos estériles y fijadas en formaldehído al 10 %. Posteriormente fueron descalcificadas en EDTA (10g/100ml) durante 30 días a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ para luego ser incluidas en parafina. Se realizaron cortes histológicos paralelos al eje largo de las tibias a nivel de la epífisis proximal, los que fueron coloreados con Hematoxilina/Eosina (H/E) para el análisis histopatológico e histomorfométrico correspondiente. Al momento de la amputación de las tibias se obtuvo además el fémur izquierdo, que fue conservado en solución fisiológica a -20°C , para la realización de ensayos biomecánicos.

ESTUDIOS RADIOGRAFICOS

Se tomaron radiografías Kodak de ambas tibias inmediatamente posterior a la cirugía y en cada uno de los tiempos experimentales por técnica de cono corto con tiempo de exposición de 0.4 segundos con equipo de rayos X Denimed. Se incluyó un patrón de aluminio o escala testigo en la toma radiográfica, para calibrar posteriormente las imágenes. Las muestras fueron analizadas con el Software Image Pro-Plus v. 4,52 (Media Cybernetics), diseñado para procesamiento de imágenes y morfometría. Las radiografías se escanearon con un escáner HP G-3110 a una resolución de 1200 dpi y a 8 bits de profundidad en la escala de grises. Se calibraron las imágenes radiográficas midiendo la densidad óptica (OD) de cada escalón del patrón testigo, ajustando las curvas de densidad óptica radiográficas mediante procedimientos matemáticos, con el objetivo de que coincidan las referencias relativas de la escala de todas las radiografías. Luego se midió la OD de un área elíptica y centrada dentro de la zona del defecto quirúrgico como así también del área circundante a ella (zona peridefecto), sin exceder los 2 mm de distancia entre las áreas medidas, evitando el hueso cortical y demás artefactos ópticos. (Figura 16a)

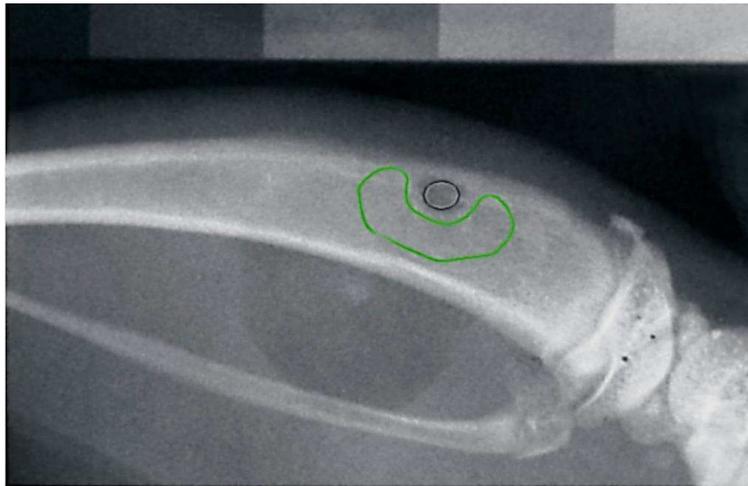


Figura 16a: Imagen radiográfica de una tibia donde se delimitan la zona del defecto y la zona peridefecto

Se obtuvieron 5 medidas de OD de la zona del defecto quirúrgico y 5 medidas de OD de la zona peridefecto. Se obtuvo la diferencia de densidad óptica (OD defecto – OD peridefecto). Los datos fueron tabulados en planillas Excel para su posterior análisis estadístico.

Se observan en este caso, las imágenes radiográficas correspondientes a 0 días, donde se evidencia claramente cómo se delimitaron las zonas del defecto quirúrgico y las zonas peridefecto.(Figura 16b)

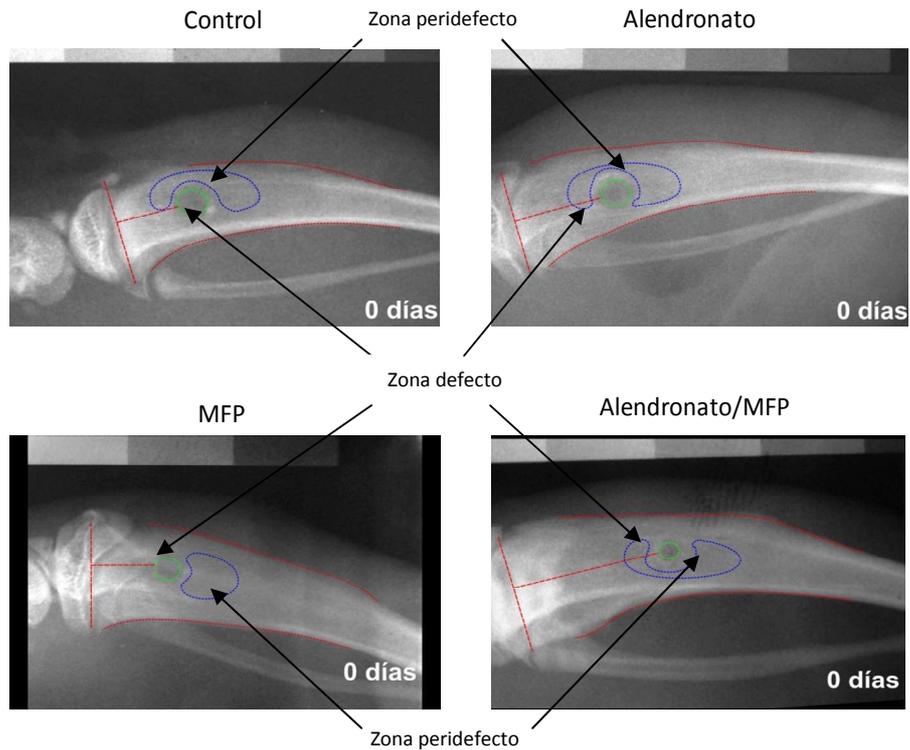


Figura 16b: Imágenes radiográficas de los distintos grupos a 0 días

ESTUDIOS BIOQUIMICOS

Se realizó la determinación de fosfatasa alcalina sobre muestras de sangre obtenidas por punción cardíaca en diferentes tiempos. La determinación bioquímica de la enzima fue por método colorimétrico.

ESTUDIOS HISTOMORFOMETRICOS

Este estudio se realizó sobre cortes histológicos de hueso desmineralizado con EDTA a pH 7 y 4°C durante 30 días con control radiográfico respectivo.

Método de medición: mediante el software para morfometría Image Pro Plus se delimitaron las áreas ocupadas por hueso trabecular y se calcularon los porcentajes respecto al área total de la imagen. Se analizaron al menos 5 imágenes de las epífisis proximales de las tibias.(Figura 17). Este procedimiento se llevó a cabo en cada grupo y etapa (15, 30, 60 y 90 días) y en ambas tibias.(132,133)

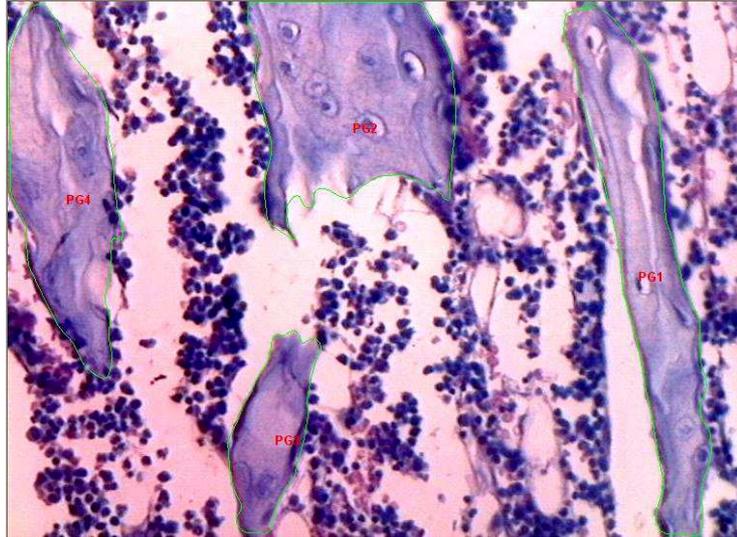


Figura 17: Corte histológico de hueso donde se observan las trabéculas delimitadas para el análisis (H/E 60X)

ESTUDIOS BIOMECAÑICOS

Los estudios biomecánicos fueron realizados con apoyo del personal del Laboratorio de Biología Ósea y Metabolismo Mineral de la Facultad de Ciencias Médicas de la Universidad Nacional de Rosario. Se utilizó un equipo diseñado por el departamento de Ingeniería del mismo laboratorio, el cual consta de una celda de carga que genera un voltaje proporcional a la fuerza aplicada sobre el hueso y el desplazamiento ocasionado por un pistón que tiene un avance de 10 micras por segundo. Los datos de voltaje (Volt) y los datos de desplazamiento (mm) son adquiridos por un conversor analógico digital y convertidos a Fuerza (Newton) con un software específico (Biomedical data acquisition suite 1.0). (Figura 18) Las muestras de fémures conservadas en solución fisiológica a -20°C fueron descongeladas para su utilización. Se cortaron las epífisis de los huesos con cierra para realizar los ensayos de flexión a tres puntos. (Figura 19) Además se cortaron rodajas de hueso de 2 mm de espesor para realizar los ensayos de compresión. (Figura 20) Estos parámetros biomecánicos serán utilizados como medida del efecto sistémico producido por las drogas utilizadas.



Figura 18 Equipo de biomecánica ósea

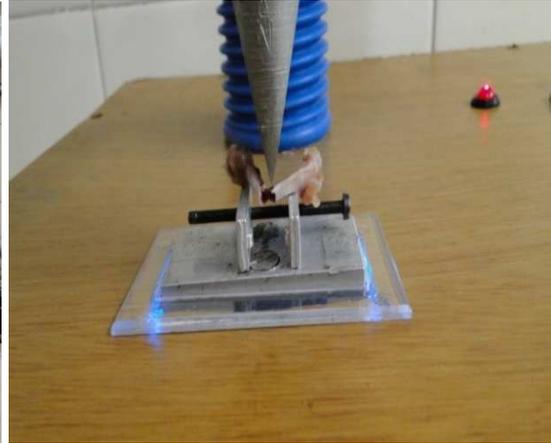


Figura 19: Hueso fracturado en ensayo de flexión

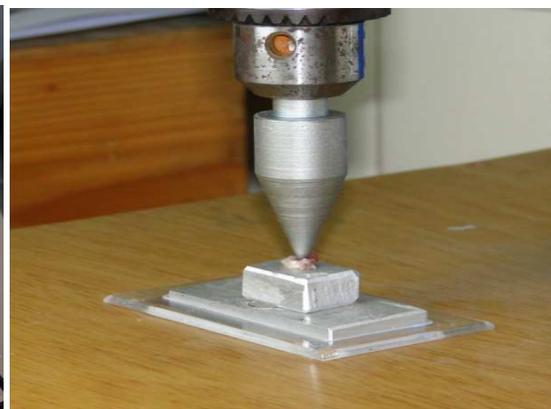
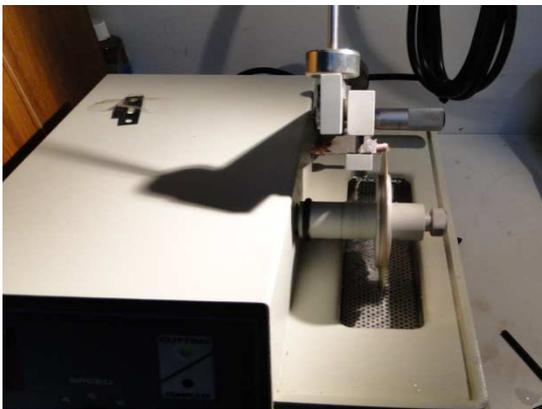


Figura 20: Obtención de rodajas de hueso y ensayo de compresión

ESTUDIOS ESTADISTICOS

Previa verificación de la distribución normal de las variables utilizadas (Test de Kolmorow Smirnov), la comparación de los datos se realizó a través del análisis de la variancia (ANOVA) a dos y tres criterios de clasificación (**tratamientos**: control, AL, MFP, AL+MFP, **tiempos de tratamiento**: 0, 15, 30 60 y 90 días y **tibias**: problema y contralateral). Se utilizaron test post-hoc como el test de Bonferroni y el test de Tukey cuando el análisis de la variancia detectó diferencias significativas. Se consideraron diferencias significativas cuando $p < 0,01$. Tanto para el análisis de datos como para construcción de gráficas y análisis estadísticos se utilizó el software estadístico R. (Software libre de dominio público). R Development Core Team (2011). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL <http://www.R-project.org/>.

RESULTADOS

CITOTOXICIDAD

a) Alendronato

Las concentraciones crecientes de AL desde 0 a 90 $\mu\text{g/ml}$ y sus respectivas captaciones de rojo neutro expresado en porcentajes demostraron que a concentraciones menores a 10 $\mu\text{g/ml}$ la viabilidad celular es cercana a 100 % y a medida que aumentaron dichas concentraciones por encima de los 10 $\mu\text{g/ml}$ la viabilidad celular comenzó a verse afectada, teniendo un descenso significativo a un 70%. (Figura 21)

concentración ($\mu\text{g/ml}$)	% captación (rojo neutro)
0	100
0,1	97,6
5	97,9
10	98,9
20	87,9
40	81,5
60	76,5
80	67,9
90	66,6

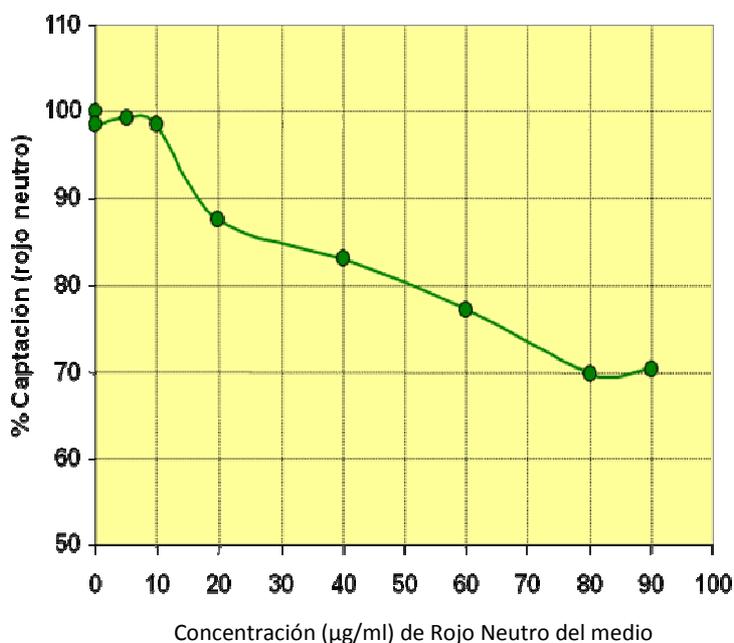


Figura 21: Citotoxicidad (Rojo Neutro)

La concentración de AL afectó el porcentaje de captación de rojo neutro (ANOVA a un criterio $p < 0.01$). No se observó diferencias en la captación hasta 10 $\mu\text{g/ml}$. Para concentraciones de 20 $\mu\text{g/ml}$ o mayores se observó un descenso significativo (HSD Tukey $p < 0.01$).

La dosis sugerida por la bibliografía es de 0,5 mg/kg aplicada semanalmente, la cual distribuida de manera uniforme en todo el organismo equivaldría a 0,5 mg/1000ml, equivalente a 0,5 $\mu\text{g/ml}$. Si se diera la posibilidad que solo se distribuya en plasma, la dosis de 0,5 mg/kg sería

equivalente a 0,5/100ml, equivalente a 5µg/ml. Tanto en una u otra posibilidad, ambas dosis se encuentran en el primer rango de citotoxicidad.(Figura 22)

	alendronato µg/ml	% captación
Concentración que alcanzaría si alendronato se distribuyera uniformemente en todo el organismo	0	100±1
	0,1	97,6±2,1
	5	97,9±1,9
	10	98,9±1,4
Concentración que alcanzaría si alendronato se distribuyera solo en el espacio plasmático	20	87,9±5,1
	40	81,5±1,3
	60	76,5±3,1
	80	67,9±2,1
	90	66,6±7,2

Figura 22: Porcentaje de captación de Rojo Neutro de Alendronato.

b) Monofluorofosfato de Sodio

Se administró Monofluorofosfato de Sodio (MFP) en el agua de bebida en una concentración de 5 mmoles/l durante 90 días de tratamiento.

No se hallaron diferencias significativas entre el grupo tratado con MFP y el grupo control en las variables glucosa sanguínea (Gráfico 1), peso corporal (Gráfico 2) y relación ceniza-matriz hasta 90 días (Gráfico 3). (ANOVA a 2 criterios $p > 0.01$)

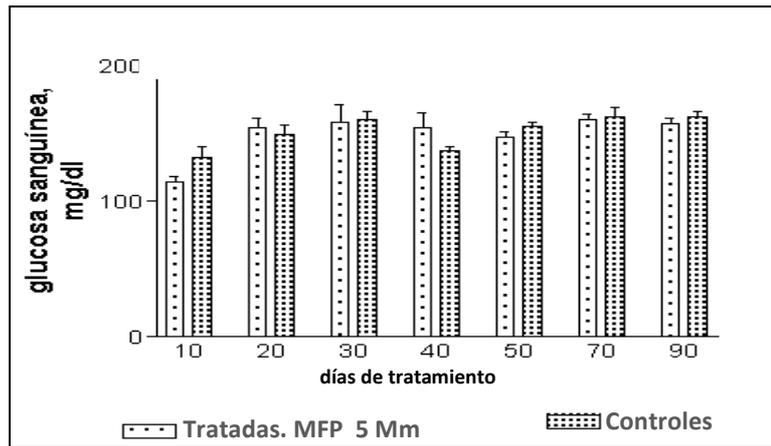


Gráfico 1: Glucosa sanguínea

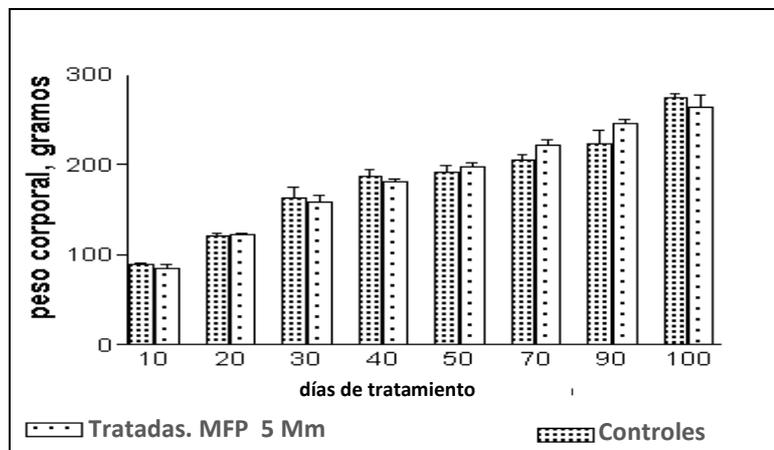


Gráfico 2: Medida general de crecimiento

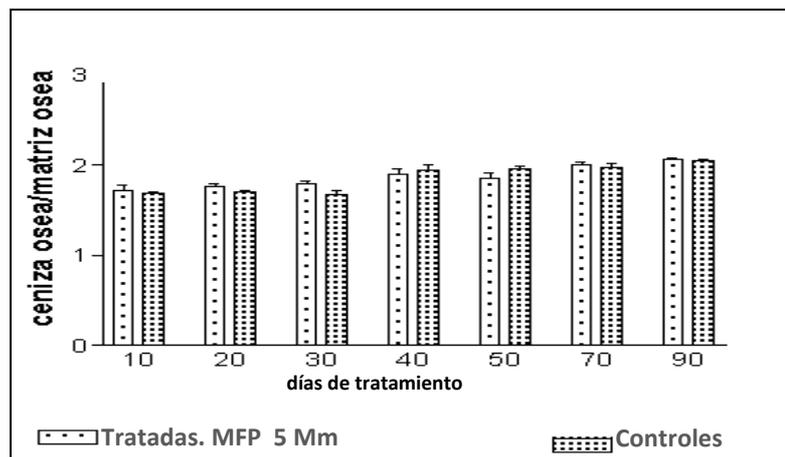


Gráfico 3: Relación ceniza-matriz

Los ensayos de citotoxicidad “*in vivo*” para MFP, demostraron que las dosis empleadas fueron adecuadas y no citotóxicas.

ESTUDIOS RADIOGRAFICOS

Se determinaron las medias con sus desvíos estándar respectivos para Densidad Optica (OD) tanto de la tibia problema como la contralateral para todos los grupos en todos los tiempos.(Tabla 2)

Tiempo	Tratamiento	n	Diferencias de OD Media ± sd	
			T. Contralateral	T. Problema
15	C	4	-0.038 ± 0.026	-0.032 ± 0.016
	M	4	-0.036 ± 0.007	-0.034 ± 0.010
	A	4	-0.025 ± 0.014	-0.019 ± 0.009
	AM	4	-0.029 ± 0.009	-0.024 ± 0.008
30	C	4	-0.023 ± 0.006	-0.023 ± 0.001
	M	4	-0.020 ± 0.006	-0.019 ± 0.010
	A	4	-0.013 ± 0.002	-0.003 ± 0.011
	AM	4	-0.010 ± 0.023	-0.015 ± 0.021
60	C	4	-0.012 ± 0.004	-0.016 ± 0.004
	M	4	0.010 ± 0.003	0.007 ± 0.004
	A	4	0.010 ± 0.004	0.017 ± 0.006
	AM	4	0.011 ± 0.008	0.005 ± 0.005
90	C	4	-0.004 ± 0.003	-0.004 ± 0.002
	M	4	-0.003 ± 0.004	0.004 ± 0.004
	A	4	0.001 ± 0.004	0.002 ± 0.003
	AM	4	-0.007 ± 0.006	-0.003 ± 0.005

Tabla 2: Estadística descriptiva. Diferencias de OD

Se observó a partir del tiempo 0 que a medida que pasó el tiempo, las diferencias de OD entre la zona defecto y peridefecto fueron menores y en forma regular entre los grupos experimentales y el grupo control. En los tiempos 15 y 30 si bien las diferencias fueron menores, por el paso del tiempo, no tomaron valores positivos.(Gráfico 4, 5 y 6).

En el tiempo 60 las diferencias de OD entre la zona defecto y la zona peridefecto tomaron valores positivos para los grupos A, M y AM, quedando el grupo C con valores negativos (Gráfico 7)

En el tiempo 90 los valores se estabilizaron tanto en los grupos experimentales como en el grupo control.(Gráfico 8)

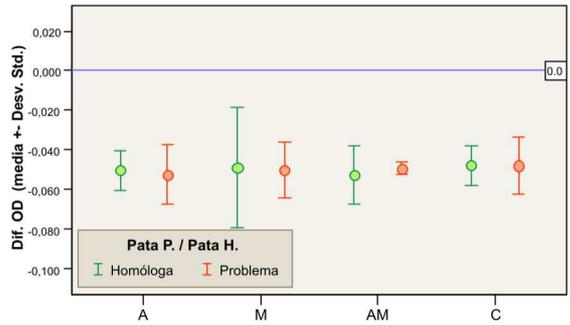


Gráfico 4: OD a los 0 días

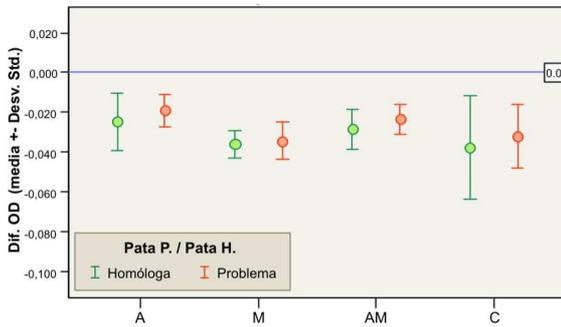


Gráfico 5: OD a los 15 días

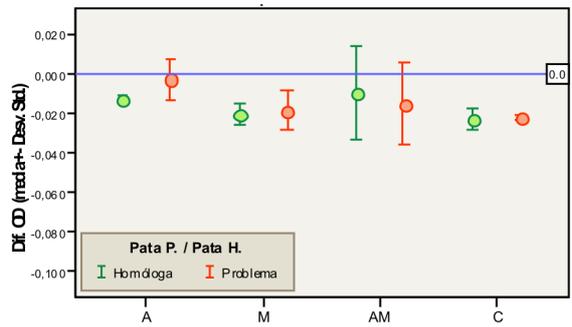


Gráfico 6: OD a los 30 días

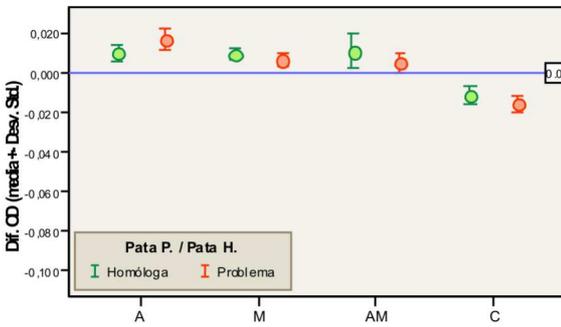


Gráfico 7: OD a los 60 días

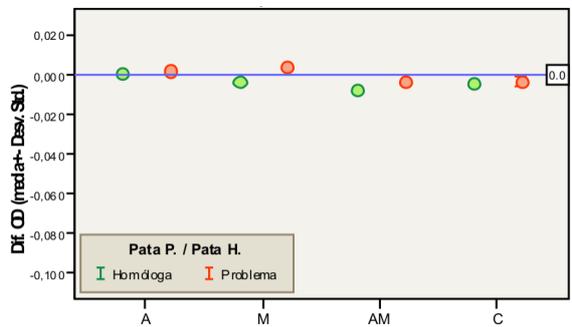


Gráfico 8: OD a los 90 días

Para determinar si hubo diferencias significativas se realizó un análisis de la variancia a tres criterios de clasificación (tiempo, tratamientos y tibias). Las diferencias fueron significativas para el tiempo como era de esperar y para los tratamientos, no así para las tibias, ni tampoco para la interacción entre las variables.(Tabla 3)

Origen	P Valor
Tiempo	p<0.01
Tratamiento	p<0.01
Tibias	p>0.01
Tratamiento*Tibias	p>0.01
Tratamiento*Tiempo	p>0.01
Tibias*Tiempo	p>0.01

Tabla 3: Análisis de la variancia a tres criterios de clasificación

Para poder observar cual de los tratamientos fueron significativos se realizó el test de Bonferroni ($p<0.01$) donde A fue diferente al resto a los 15 días y A, M y AM diferentes a C a los 60 días. (Tabla 4)

Tiempo	Tratamiento	Diferencias OD Media \pm sd
		Pata
15	C	-0.035 \pm 0.020
	M	-0.035 \pm 0.008
	A	-0.022 \pm 0.011
	AM	-0.026 \pm 0.009
30	C	-0.023 \pm 0.004
	M	-0.019 \pm 0.008
	A	-0.008 \pm 0.009
	AM	-0.013 \pm 0.019
60	C	-0.014 \pm 0.005
	M	0.014 \pm 0.003
	A	0.009 \pm 0.006
	AM	0.018 \pm 0.007
90	C	-0.004 \pm 0.002
	M	0.001 \pm 0.005
	A	0.002 \pm 0.001
	AM	0.005 \pm 0.003

Tabla 4: Test de Bonferroni

ESTUDIOS BIOQUIMICOS

La Fosfatasa alcalina (FA) es una enzima expresada en la membrana celular de osteoblastos y el aumento de dicho marcador se condice con un aumento en la formación ósea. Se determinaron los niveles de FA en ratas púberes y adultas, con el objetivo de comprender como se comportaba este marcador con el crecimiento del animal. (Tabla 5)

Fosfatasa alcalina (U/l)	
Ratas Adultas	Ratas Púberes
48,80	1080
58,56	1680
55,10	1440
54,90	1500
37,80	1360
51,03 ± 8,19	1425 ± 196,70

Tabla 5: Comparación del marcador FA en ratas adultas y púberes

La extracción de sangre mediante punción cardíaca se realizó en todos los grupos y en tiempos 15, 30, 60 y 90 días. A continuación los valores descriptivos para el comportamiento de FA en los distintos tiempos.

Se hallaron diferencias significativas en las medias de FA a los 15 días. (ANOVA $p < 0.01$). Se halló diferencia significativa entre C y los demás grupos experimentales (Test Bonferroni $p < 0.01$) (Tabla 6)

Tratamientos	N	Media ± sd	p-valor
A	4	651 ± 23	p<0.01
M	4	535 ± 11	
AM	4	660 ± 27	
C	4	134 ± 5	

Tabla 6: FA a los 15 días

Se hallaron diferencias significativas en las medias de FA a los 30 días. (ANOVA $p < 0.01$). Se halló diferencia significativa entre C y los demás grupos experimentales (Test Bonferroni $p < 0.01$) (Tabla 7)

Tratamientos	N	Media ± sd	p-valor
A	4	853.3 ± 25.7	p<0.01
M	4	629.6 ± 21.3	
AM	4	873.3 ± 23.0	
C	4	160.0 ± 4.0	

Tabla 7: FA a los 30 días

Se hallaron diferencias significativas en las medias de FA a los 60 días. (ANOVA $p < 0.01$). Se halló diferencia significativa entre C y los demás grupos experimentales (Test Bonferroni $p < 0.01$) (Tabla 8)

Tratamientos	N	Media \pm sd	p-valor
A	4	857.0 \pm 29.5	p<0.01
M	4	785.3 \pm 21.4	
AM	4	912.0 \pm 13.0	
C	4	90.6 \pm 6.6	

Tabla 8: FA a los 60 días

Se hallaron diferencias significativas en las medias de FA a los 90 días. (ANOVA $p < 0.01$). Se halló diferencia significativa entre C y los demás grupos experimentales (Test Bonferroni $p < 0.01$) (Tabla 9)

Tratamientos	N	Media \pm sd	p-valor
A	4	900.6 \pm 12.1	p<0.01
M	4	841.6 \pm 20.2	
AM	4	926.6 \pm 9.8	
C	4	71.0 \pm 3.6	

Tabla 9: FA a los 90 días

Podemos observar claramente las diferencia significativa de C con respecto a los demás grupos para la variable FA (U/l) en función del tiempo.(Figura 24)

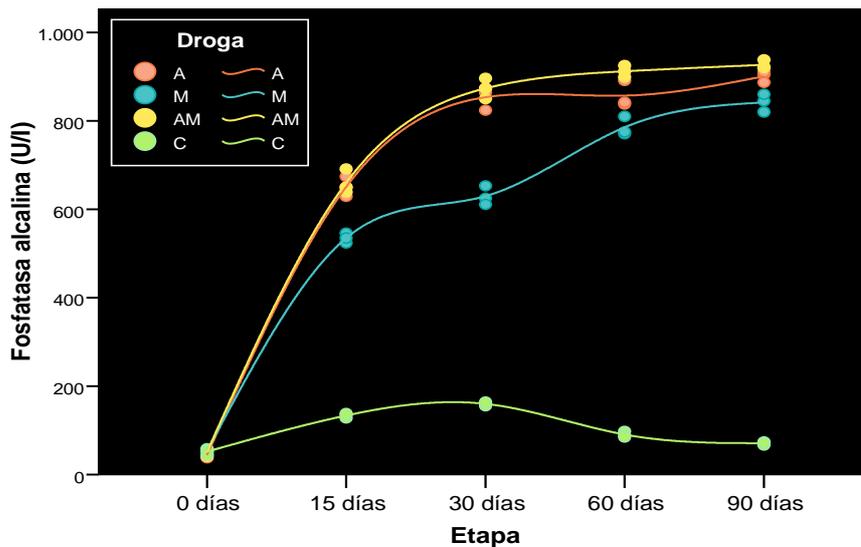


Figura 24: FA en función del tiempo

HISTOLOGIA

Se realizaron cortes histológicos de las tibias obtenidas de todos los grupos en los distintos tiempos de la experiencia y se tomaron fotos a través del microscopio óptico para analizar el comportamiento óseo.

A continuación se observan las características de un hueso normal a distintos aumentos, con un trabeculado homogéneo en cuanto a número y forma, con osteocitos en el interior de las trabéculas y osteoblastos recubriéndolas. Los espacios medulares se observan con células hemáticas, células blancas y adipocitos. (Figura 25)

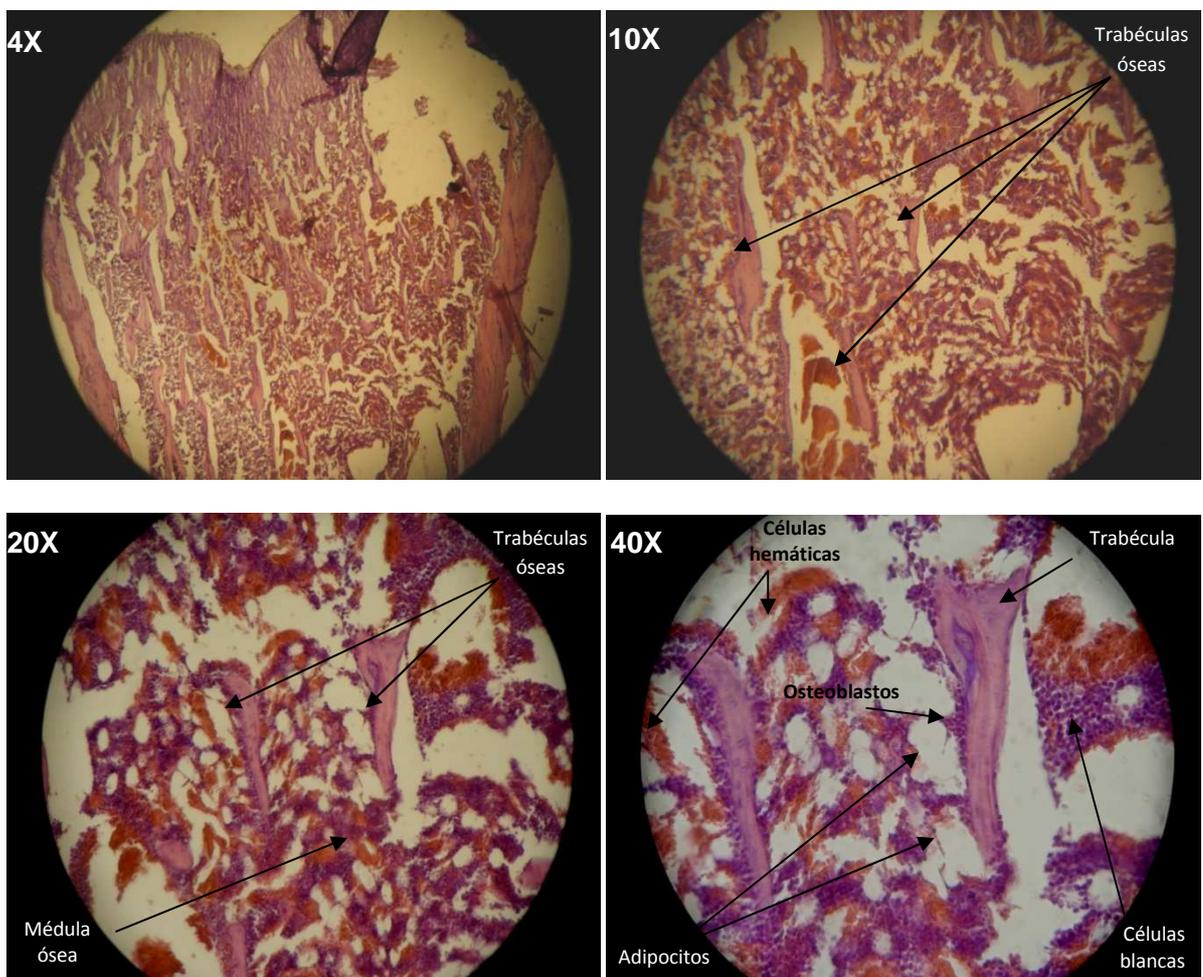


Figura 25: Hueso normal a distintos aumentos

Análisis histológico

El aspecto del hueso a los 15 días no difiere al de un hueso normal. Se observan las trabéculas de aspecto normal con osteocitos en su interior y un leve infiltrado celular en la médula ósea. No se observan diferencias histológicas entre los grupos.(Figura 26)

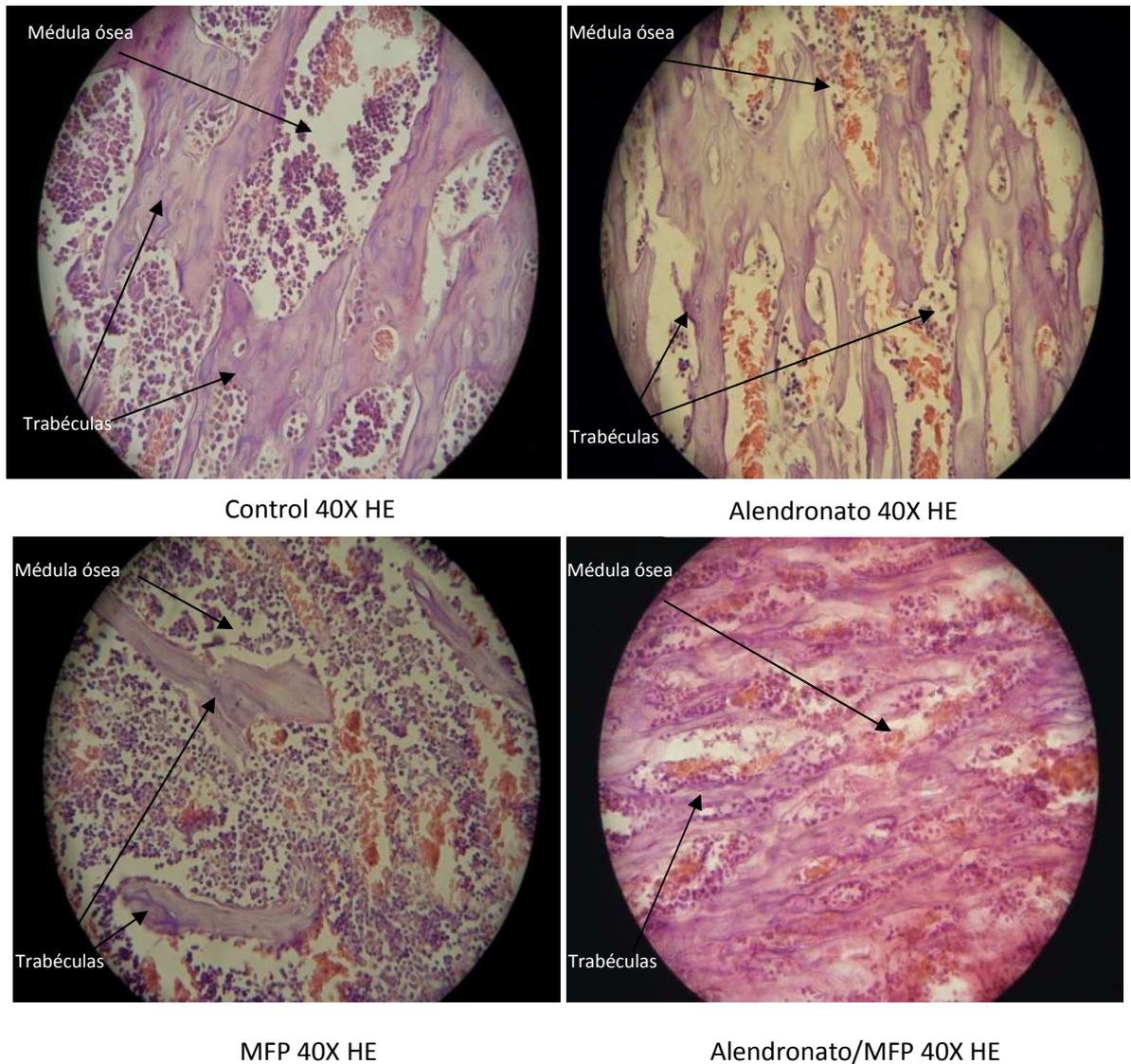


Figura 26: Imágenes histológicas a los 15 días

A los 30 días se observan algunas diferencias para con respecto al grupo control. Se observa tanto para A y MFP un incremento en el grosor de las trabéculas y algunas anastomosis entre ellas. Se observa también una mayor cantidad de osteoblastos revistiendo las trabéculas. AM también muestra un incremento en el grosor de las trabéculas.(Figura 27)

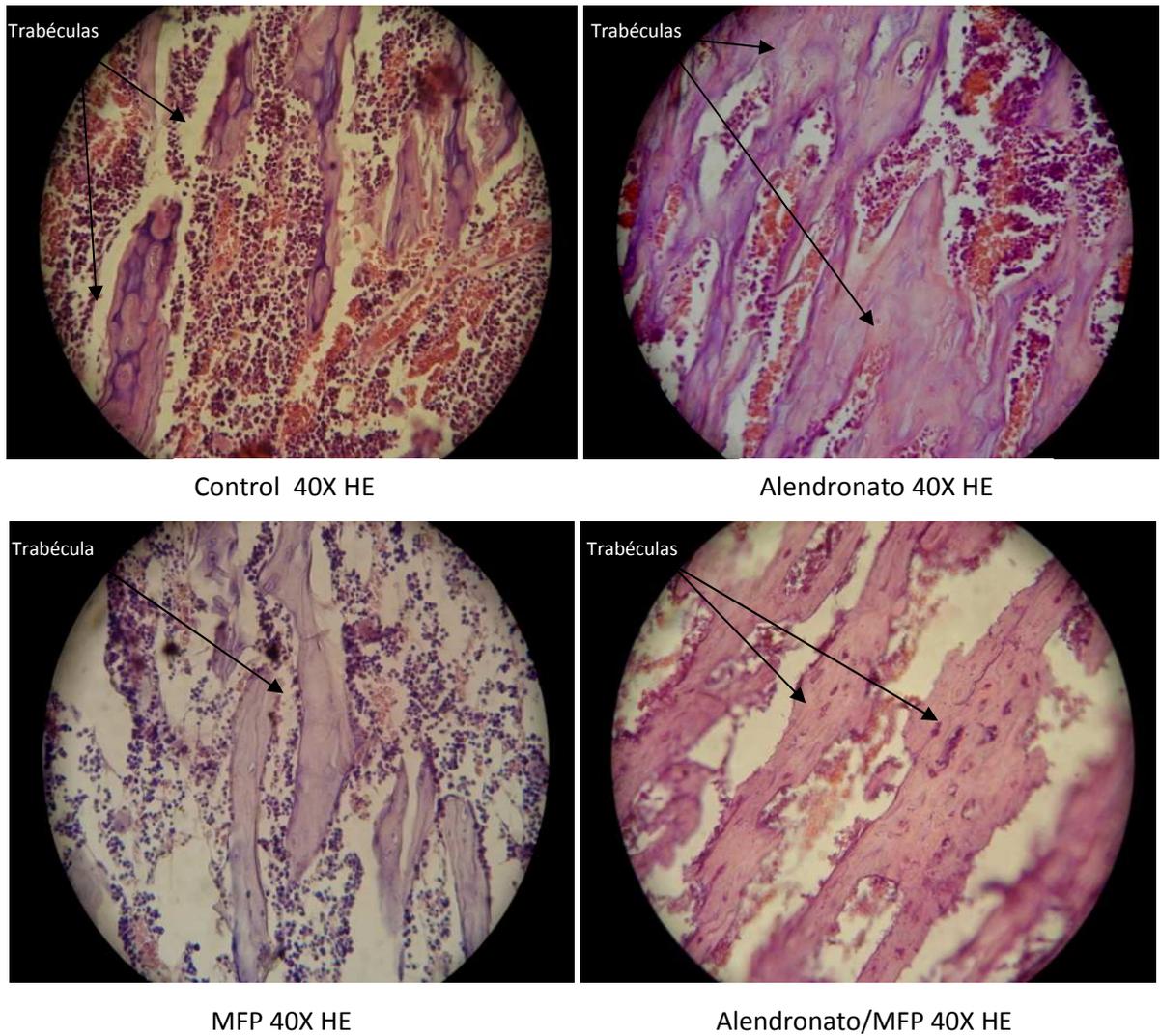


Figura 27: Imágenes histológicas a los 30 días

En el tiempo 60 se mantienen las diferencias entre los grupos y se evidencia un mayor incremento en el grosor y número de las trabéculas para el grupo A y M con respecto a los demás. El grupo AM mantiene la morfología de sus trabéculas como en el tiempo 30.(Figura 28)

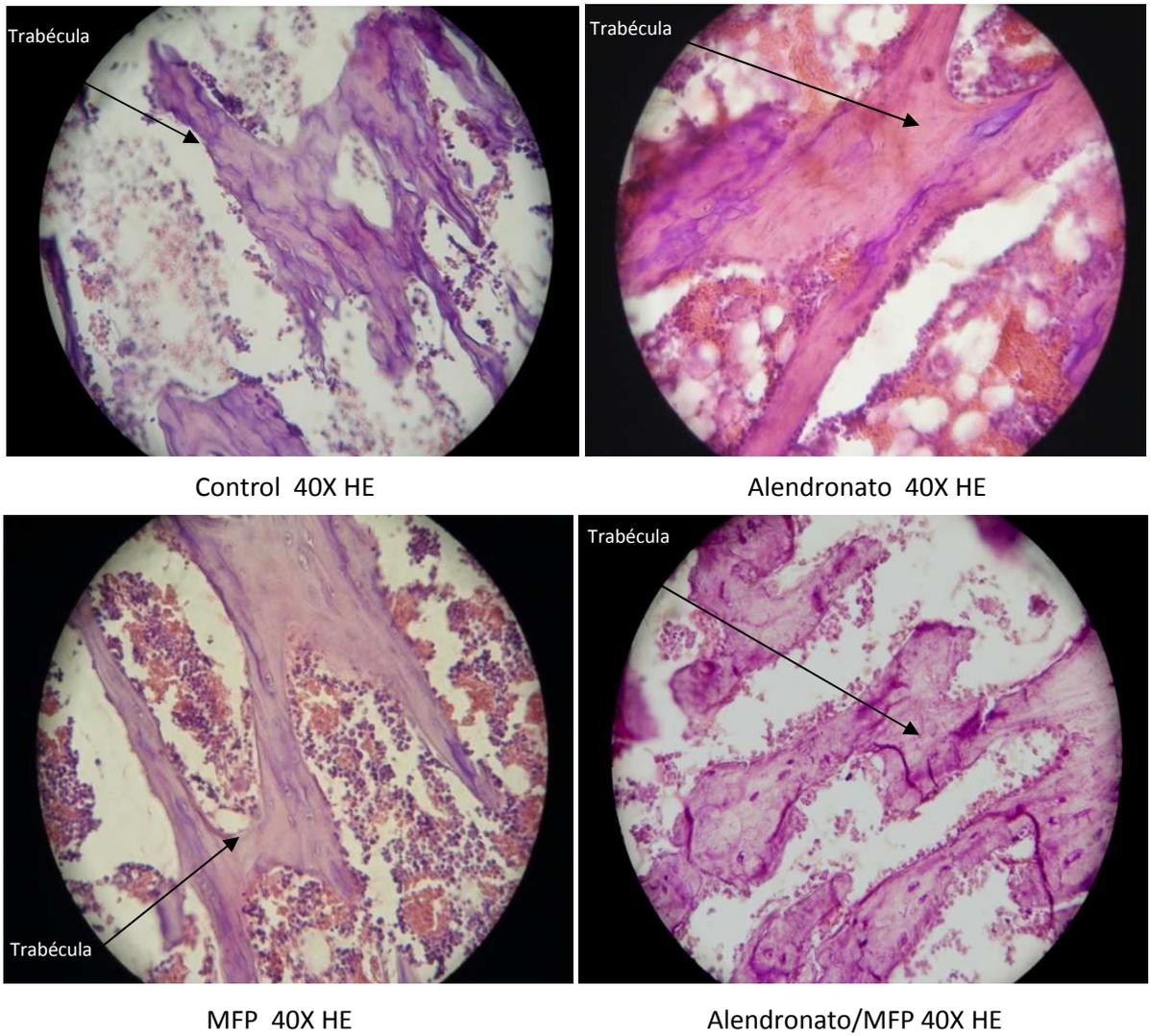
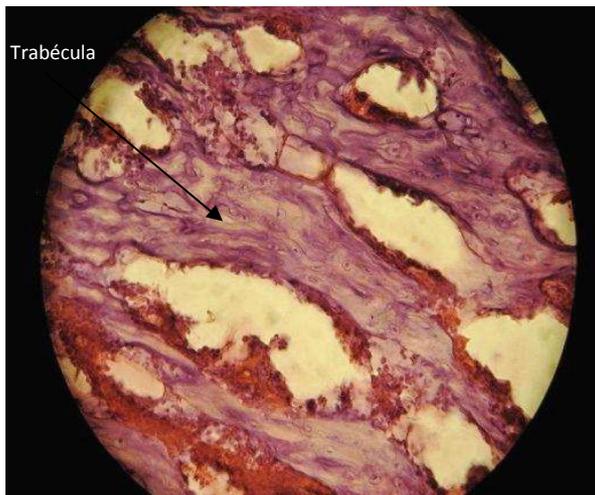
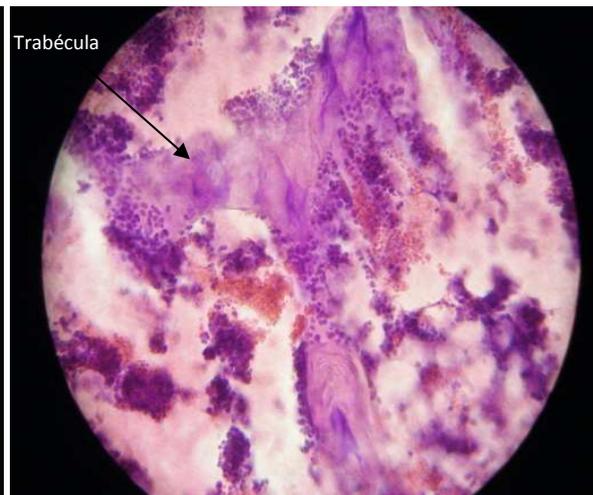


Figura 28: Imágenes histológicas a los 60 días

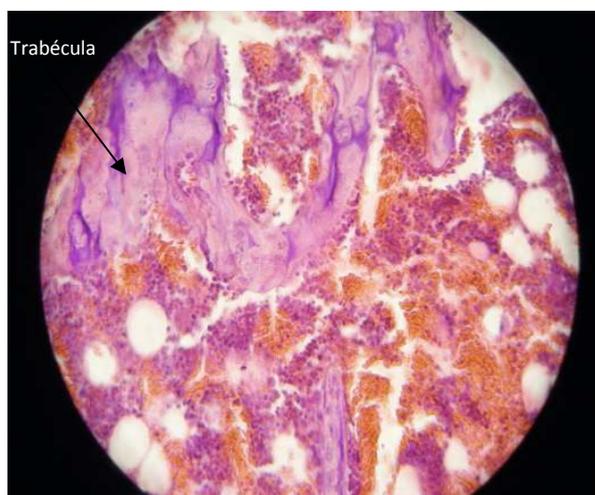
Al tiempo 90 las imágenes muestran en todos los grupos trabéculas de aspecto y tamaño normal.(Figura 29)



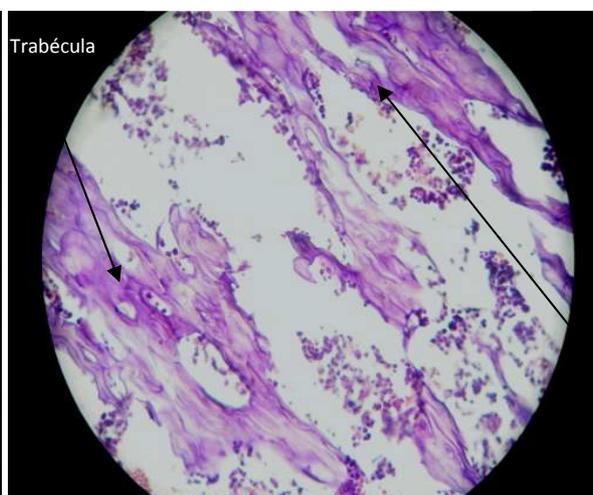
Control 40X HE



Alendronato 40X HE



MFP 40X HE



Alendronato/MFP 40X HE

Figura 29: Imágenes histológicas a los 90 días

HISTOMORFOMETRIA

Se realizó el análisis histomorfométrico de acuerdo a la descripción en materiales y métodos. Se obtuvieron las medias \pm sd de todos los grupos experimentales en todos los tiempos tanto para la tibia problema como la contralateral.(Tabla 10)

Tiempo	Tratamiento	Porcentaje de hueso trabecular Media \pm sd	
		T. Contralateral	T. Problema
15	C	25.0 \pm 14.0	28.6 \pm 10.7
	M	27.2 \pm 10.9	28.0 \pm 8.5
	A	28.2 \pm 5.8	28.5 \pm 3.8
	AM	28.8 \pm 8.9	28.4 \pm 10.0
30	C	27.6 \pm 9.8	32.7 \pm 6.5
	M	34.4 \pm 6.2	34.3 \pm 6.2
	A	35.2 \pm 6.2	34.7 \pm 5.5
	AM	31.3 \pm 8.3	31.5 \pm 2.2
60	C	33.8 \pm 5.3	33.4 \pm 7.0
	M	40.3 \pm 9.8	41.6 \pm 6.6
	A	40.0 \pm 9.6	39.8 \pm 11.8
	AM	34.4 \pm 7.0	37.6 \pm 11.3
90	C	36.5 \pm 9.5	36.1 \pm 8.4
	M	41.1 \pm 11.2	43.5 \pm 12.9
	A	42.5 \pm 11.7	42.7 \pm 11.4
	AM	37.6 \pm 10.5	38.8 \pm 10.5

Tabla 10: Estadística descriptiva. Porcentaje de hueso trabecular

El análisis de la variancia para el porcentaje de hueso trabecular determinó que tanto el tiempo, como era de prever de acuerdo con el crecimiento de los animales y los distintos tratamientos tuvieron diferencias significativas ($p < 0.01$). No hubo diferencias significativas para las tibias ni para la interacción de las variables.(Tabla 11)

Factor	p-valor
Tiempo	$p < 0.01$
Tratamiento	$p < 0.01$
Tibia	$p > 0.01$
Tratamiento*Tibia	$p > 0.01$
Tratamiento*Tiempo	$p > 0.01$
Tibia*Tiempo	$p > 0.01$

Tabla 11: ANOVA a tres criterios de clasificación

Para determinar cuáles de los tratamientos fueron significativos se realizó el test post-hoc de Bonferroni ($p < 0.01$) (Tabla 12), donde se determinó que el grupo A y M fueron diferentes al resto a los 60 días.

Tiempo	Tratamiento	Porcentaje hueso trabecular Media \pm sd
15	C	27.0 \pm 11.8
	M	27.6 \pm 9.5
	A	28.4 \pm 4.7
	AM	28.6 \pm 9.0
30	C	30.4 \pm 8.0
	M	34.4 \pm 5.9
	A	35.0 \pm 5.6
	AM	31.4 \pm 6.7
60	C	33.6 \pm 5.9
	M	40.9 \pm 8.1
	A	39.9 \pm 10.6
	AM	33.3 \pm 12.2
90	C	36.3 \pm 8.6
	M	42.5 \pm 11.8
	A	42.6 \pm 11.1
	AM	38.2 \pm 10.1

Tabla 12: Test de Bonferroni

En el siguiente gráfico se observa un incremento del hueso trabecular en función del tiempo siendo significativos A y M a los 60 días. (Gráfico 9)

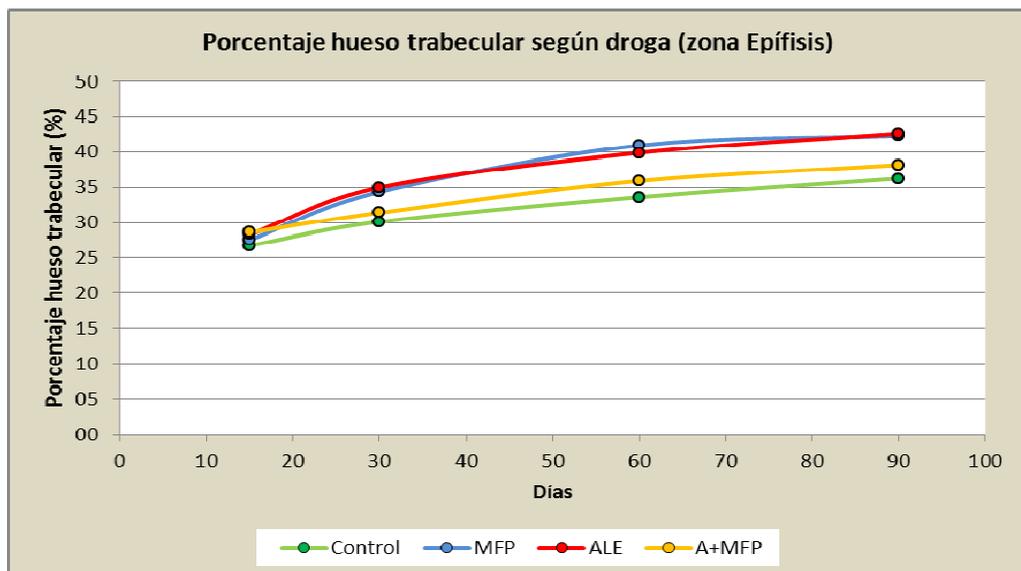


Gráfico 9: Porcentaje de hueso trabecular en función del tiempo

ESTUDIOS BIOMECANICOS

Ensayo de flexión

Se evaluó en un ensayo de flexión a tres puntos la resistencia del hueso cortical en la parte media de la diáfisis del fémur (Figura 30), donde se determinó:

Energía absorbida hasta el punto de fractura (mJoule)

Fuerza máxima soportada (Newton)

Fuerza de fractura (Newton)

Rigidez (Newton/mm)

Estas variables se evaluaron en los diferentes tratamientos y a lo largo del tiempo (15, 30, 60 y 90 días).



Figura 30: Ensayo de flexión a tres puntos

En los ensayos de flexión con la variable energía absorbida, se aprecia que el avance del tiempo como era de esperar fue significativo y se debe al crecimiento del animal (ANOVA $p < 0.01$), aunque los tratamientos no modificaron ésta variable (ANOVA $p > 0.01$). (Tabla 13)

Tiempo	Tratamiento	Media ± sd	n
15	C	55,2 ± 10.6	4
	M	49,2 ± 11.3	4
	A	58,6 ± 13.1	4
	AM	54,6 ± 14.3	4
30	C	74,8 ± 15.2	4
	M	62,4 ± 12.3	4
	A	74,0 ± 14.1	4
	AM	70,0 ± 20.4	4
60	C	86,2 ± 19.9	4
	M	68,0 ± 11.8	4
	A	76,6 ± 16.3	4
	AM	68,4 ± 23.8	4
90	C	90,6 ± 14.7	4
	M	78,0 ± 20.8	4
	A	98,2 ± 22.7	4
	AM	108,2 ± 22.6	4

Factores	p-valor
Tiempo	0,000
Tratamiento	0,071
Tiempo * Tratamiento	0,624

Tabla 13: Análisis de la variancia para la variable energía absorbida

En los ensayos de flexión con la variable fuerza máxima, se aprecia que el avance del tiempo como en la variable anterior fue significativo (ANOVA $p < 0.01$), aunque los tratamientos no modificaron ésta variable (ANOVA $p > 0.01$). (Tabla 14)

Tiempo	Tratamiento	Media ± sd	n
15	C	68,6 ± 15.2	4
	M	56,2 ± 13.1	4
	A	74,2 ± 16.6	4
	AM	71,4 ± 12.7	4
30	C	81,2 ± 9.1	4
	M	79,4 ± 11.7	4
	A	84,2 ± 12.1	4
	AM	78,6 ± 23.4	4
60	C	118,8 ± 17.9	4
	M	100,4 ± 18.8	4
	A	106,6 ± 19.3	4
	AM	108,4 ± 14.8	4
90	C	137,0 ± 16.7	4
	M	145,6 ± 32.8	4
	A	140,8 ± 20.7	4
	AM	150,4 ± 24.6	4

Factores	p-valor
Tiempo	0,000
Tratamiento	0,617
Tiempo * Tratamiento	0,786

Tabla 14: Análisis de la variancia para la variable fuerza máxima

En los ensayos con la variable fuerza de fractura, se aprecia que el tiempo como en las anteriores variables fue significativo (ANOVA $p < 0.01$), aunque los tratamientos no modificaron ésta variable (ANOVA $p > 0.01$) (Figura 31). (Tabla 15)

Tiempo	Tratamiento	Media ± sd	n
15	C	68,2 ± 14.3	4
	M	55,8 ± 13.1	4
	A	78,8 ± 16.7	4
	AM	71,0 ± 13.2	4
30	C	80,0 ± 11.2	4
	M	78,2 ± 12.2	4
	A	83,0 ± 12.3	4
	AM	77,4 ± 25.4	4
60	C	118,4 ± 17.9	4
	M	100,0 ± 19.8	4
	A	106,2 ± 17.3	4
	AM	108,0 ± 14.3	4
90	C	135,8 ± 16.7	4
	M	144,4 ± 34.8	4
	A	139,6 ± 21.7	4
	AM	149,2 ± 25.8	4

Factores	p-valor
Tiempo	0,000
Tratamiento	0,653
Tiempo * Tratamiento	0,831

Tabla 15: Análisis de la variancia para la variable fuerza de fractura

En cuanto a la variable rigidez, se determinó que las variables tiempo y tratamientos fueron significativas.(ANOVA $p < 0.01$). (Tabla 16)

Tiempo	Tratamiento	Media ± sd	n
15	C	111,8 ± 19.0	4
	M	107,2 ± 20.4	4
	A	117,8 ± 19.1	4
	AM	134,2 ± 30.2	4
30	C	119,2 ± 23.2	4
	M	169,2 ± 27.4	4
	A	139,0 ± 39.3	4
	AM	162,6 ± 23.4	4
60	C	171,2 ± 43.9	4
	M	219,4 ± 68.8	4
	A	199,2 ± 23.3	4
	AM	183,4 ± 46.3	4
90	C	170,8 ± 41.7	4
	M	255,8 ± 71.8	4
	A	268,6 ± 88.7	4
	AM	189,8 ± 21.8	4

Factores	p-valor
Tiempo	0,008
Tratamiento	0,001
Tiempo * Tratamiento	0,107

Tabla 16: Análisis de la variancia y Test de Bonferroni para la variable rigidez

El test post-hoc determinó q la rigidez en el grupo A y M fue significativamente mayor que en el grupo C y AM a los 60 y 90 días.(Test de Bonferroni $p < 0.01$)

Ensayo de compresión

Se evaluó en un ensayo de compresión la resistencia del hueso trabecular en rodajas de epífisis (Figura 31), donde se determinó:

Fuerza de fractura (newton)

Energía absorbida hasta el punto de fractura (mJoule)

Rigidez (newton/mm)

Las variables mencionadas se evaluaron en los diferentes tratamientos y a lo largo del tiempo (15, 30, 60 y 90 días).



Figura 31: Ensayo de compresión

En los ensayos de compresión de la variable fuerza de fractura se determinó que tanto el tiempo, los tratamientos y la interacción de las variables fueron significativas (ANOVA $p < 0.01$) El grupo M fue significativamente mayor que el grupo C a los 15, 30, 60 y 90 días. El grupo AM fue significativamente mayor que C a los 15 y 30 días y el grupo A lo fue con respecto a C a los 90 días. (Test de Bonferroni $p < 0.01$) (Tabla 17)

Tiempo	Tratamiento	Media ± sd	n
15	C	3,3 ± 1.5	4
	M	45,5 ± 6.4	4
	A	31,8 ± 2.7	4
	AM	46,8 ± 4.7	4
30	C	8,8 ± 2.2	4
	M	131,5 ± 20.4	4
	A	38,8 ± 5.3	4
	AM	75,5 ± 5.4	4
60	C	2,3 ± 1.5	4
	M	140,0 ± 18.8	4
	A	8,8 ± 1.3	4
	AM	14,5 ± 2.0	4
90	C	6,0 ± 1.6	4
	M	94,3 ± 17.5	4
	A	67,3 ± 3.8	4
	AM	22,3 ± 3.7	4

Factores	p-valor
Tiempo	0,001
Tratamiento	0,000
Tiempo * Tratamiento	0,000

Tabla 17: Análisis de la variancia y Test de Bonferroni para la variable fuerza de fractura

Para la variable energía absorbida se determinó que tanto el tiempo, los tratamientos y la interacción de las variables fueron significativas (ANOVA $p < 0.01$) La energía absorbida en los grupos A, M y AM fue significativamente mayor que el grupo C a los 30 días. El grupo M lo fue con respecto a C a los 30,60 y 90 días (Test de Bonferroni $p < 0.01$) (Tabla 18)

Tiempo	Tratamiento	Media ± sd	n
15	C	0.6 ± 0.4	4
	M	4.3 ± 0.4	4
	A	1.7 ± 0.4	4
	AM	4.7 ± 0.4	4
30	C	0.7 ± 0.3	4
	M	11.0 ± 0.1	4
	A	18.2 ± 0.6	4
	AM	7.5 ± 0.6	4
60	C	0.6 ± 0.4	4
	M	13.1 ± 0.1	4
	A	1.8 ± 2.2	4
	AM	0.9 ± 0.2	4
90	C	0.7 ± 0.3	4
	M	11.0 ± 0.1	4
	A	5.3 ± 0.5	4
	AM	1.9 ± 0.3	4

Factores	p-valor
Tiempo	0,000
Tratamiento	0,000
Tiempo * Tratamiento	0,000

Tabla 18: Análisis de la variancia y Test de Bonferroni para la variable energía absorbida

La rigidez en el grupo M fue significativamente mayor que C a los 30, 60 y 90 días. El grupo AM fue diferente a C a los 15 días mientras que A lo fue con respecto a C a los 30, 60 y 90 días.(Tabla 19)

Tiempo	Tratamiento	Media \pm sd	n
15	C	120,0 \pm 21.5	4
	M	202,5 \pm 9.4	4
	A	119,3 \pm 21.7	4
	AM	213,0 \pm 12.3	4
30	C	100,8 \pm 17.6	4
	M	232,5 \pm 17.0	4
	A	224,8 \pm 7.0	4
	AM	177,3 \pm 22.4	4
60	C	28,3 \pm 16.5	4
	M	277,5 \pm 21.8	4
	A	289,3 \pm 31.3	4
	AM	95,8 \pm 12.0	4
90	C	26,3 \pm 7.6	4
	M	388,5 \pm 5.5	4
	A	208,3 \pm 22.8	4
	AM	84,5 \pm 13.7	4

Factores	p-valor
Tiempo	0,000
Tratamiento	0,000
Tiempo * Tratamiento	0,000

Tabla 19: Análisis de la variancia y Test de Bonferroni para la variable rigidez

DISCUSION

El objetivo de esta investigación fue estudiar el efecto de la administración combinada de Alendronato (AL) por vía subcutánea y de Monofluorofosfato de Sodio (MFP) por vía oral sobre la regeneración tisular de cavidades óseas neoformadas, a través de distintas variables: citotoxicidad, análisis radiográfico, niveles plasmáticos de fosfatasa alcalina, histología e histomorfometría y ensayos biomecánicos.

Es importante destacar que esta investigación se realizó en animales sanos para así poder transferir los resultados a la investigación clínica para el tratamiento de patologías óseas en cavidad oral en todo tipo de pacientes, a diferencia de otros autores que dirigen sus modelos experimentales a animales con patologías de base como osteoporosis, enfermedad de Paget, etc.(134,135)

Entre los bifosfonatos, AL es uno de los fármacos con mayor potencia en la inhibición de la actividad osteoclástica. Cuando el metabolismo óseo es más alto, en las regiones de elevada actividad fisiológica, los bisfosfonatos se concentran en forma selectiva y después de ser absorbidos, se vinculan a la hidroxiapatita ósea expuesta en las regiones de resorción.(136) El mecanismo de inhibición de los osteoclastos se ha atribuido a una disminución de la actividad celular, a la interferencia de receptores para las proteínas específicas de la matriz ósea y a la producción del factor inhibidor de osteoclastos por los osteoblastos. Todo esto reduce la vida útil y/o el número de osteoclastos diferenciados, y por tal motivo, la reducción de la resorción ósea.(137,138,139)

Los resultados de citotoxicidad de ésta experiencia demostraron que la concentración de AL modifica el porcentaje de captación de rojo neutro. No se observó diferencia en la captación hasta 10 µg/ml aunque para concentraciones de 20 µg/ml o mayores se observó un descenso significativo. Se pudo determinar entonces dos rangos de concentración: Uno (0 a 10 µg/ml) en el que la viabilidad celular no fue afectada y otro (10 a 20 µg/ml) donde comenzó a afectarse dicha viabilidad. Esta variable permitió determinar la dosificación de droga a utilizar de manera óptima para no producir toxicidad en animales.

Para preparar la formulación subcutánea de AL, se utilizó la dosis de 0,5mg/kg, concordante a la sugerida por la literatura.(140) Esta dosis distribuida en todo el organismo es equivalente a 0,5mg/l, equivalente a su vez a 0,5µg/ml (2 µmol/litro), la cual está inmersa en el rango de concentración que no afectó la viabilidad celular.

Vera de Fatima Padrao Correia y col (2006), en sus trabajos de citotoxicidad en fibroblastos de ligamento periodontal en humanos emplean tres diferentes concentraciones de alendronato sódico: 10^{-5} , 10^{-6} , y 10^{-7} M. Estas concentraciones se basan en los resultados

observados en un estudio piloto donde las concentraciones superiores a 10^{-5} M mostraron citotoxicidad extrema. Estos resultados demostraron que la formación de osteoclastos se inhibió de manera significativa en la concentración de AL de 10^{-5} M, poniendo de manifiesto que la citotoxicidad es directamente proporcional a la concentración de AL, en concordancia con este trabajo.(141)

Estos resultados concuerdan también, con los de estudios anteriores llevados a cabo por Sommercorn y col (2000), quien demostró que un nivel de concentración de 10^{-5} M es citotóxico para los osteoblastos.(142)

Parra J y col (2007) concuerdan con los resultados de este trabajo, donde la curva dosis-respuesta para la viabilidad celular relativa de tres bifosfonatos, permitió calcular la concentración IC50. Los valores de concentración IC50 obtenidos a partir de ella indican que el APBP (ácido 1-hidroxi-2-[4-aminofenil]etano-1,1-difosfónico) resulta ser el menos tóxico (IC50=15,56 mmol/l), a continuación se sitúa AL (IC50=9,86 mmol/l) y por último el IBP (ácido 1-hidroxi-2-[3-indolil]etano-1,1-difosfónico)(IC50=6,25 mmol/l). Los niveles de citotoxicidad mostrados por estos tres Bifosfonatos se consideran bajos.(143)

El fluoruro administrado como MFP, es una de las sales con flúor más investigada. El MFP se comenzó a utilizar por las ventajas sobre el Fluoruro de Sodio (NaF) por su mejor tolerancia gástrica y compatibilidad con la coadministración con calcio.

Rigalli y col (1994) demostraron que la farmacocinética del MFP muestra gran diferencia con NaF. El MFP se absorbe en estómago e intestino, uniéndose a la alfa-2-macroglobulina plasmática, la que se inactiva y es depurada por receptores del hueso e hígado. Esta proteína se deposita en hueso, la que es luego metabolizada a péptidos de menor peso molecular y finalmente a fluoruro, determinando una mayor vida media del flúor en el organismo y un efecto sostenido sobre el incremento de la masa ósea. Sobre esta última, el fluoruro reemplaza al oxhidrilo del cristal de hidroxapatita formando fluorapatita. (cristal más resistente que el de hidroxapatita).También demostraron que el fluoruro es un mitógeno para los osteoblastos ya que estimula la formación e incrementa el volumen del hueso.(144,145)

En los ensayos de citotoxicidad de éste trabajo, MFP precipitó en el medio de cultivo y se realizó un ensayo “*in vivo*” administrando MFP en dosis de 5mM en forma crónica, estudiando tres variables que expresan el estado general del animal: glucosa plasmática, peso corporal y la mineralización ósea de dicho animal. No se hallaron diferencias significativas en ninguna de las tres variables entre los grupos tratados con MFP y los controles que recibieron agua de red.

La dosis equivalente a 5mM de MFP demostró tener efecto a nivel óseo produciendo aumento de la masa ósea, el número y el grosor de las trabéculas del hueso esponjoso. La misma dosis produce un aumento de los diámetros internos y externos de la diáfisis de los huesos largos. Por otra parte no ha mostrado efectos adversos como los observados con el fluoruro de sodio (NaF). Mientras que la misma dosis de NaF produce hiperglucemia asociada a hipoinsulinemia, el MFP no presenta dicho efecto.(146) La menor cantidad de efectos adversos del MFP respecto del fluoruro de sodio se atribuye a la menor concentración plasmática de fluoruro luego de su administración, mientras que el mayor efecto a nivel óseo se atribuye a su unión a alfa-macroglobulina y su captación por receptores presentes en células de dicho tejido.(147)

Roy I Holland (1983), demostró que MFP fue citotóxico para las células sensibles al fluoruro en cultivo, pero no a las células resistentes al fluoruro, lo que indica que la citotoxicidad de MFP es debido a los iones de flúor, producto de la hidrólisis de MFP. En su experiencia demostró que MFP no tuvo ningún efecto en el crecimiento celular.(148)

Si trazamos una analogía entre crecimiento celular y crecimiento corporal, estos resultados concuerdan con este trabajo, donde los tratamientos con MFP en forma crónica no afectaron el crecimiento de los animales.

Rigalli A y col (1995), concuerdan también con los resultados obtenidos, al demostrar que el consumo crónico (90 días) de MFP en dosis similares a los de éste trabajo, no modificaron el valor de la glucosa sanguínea en ayunas.(149)

La fosfatasa alcalina (FA) es una enzima clasificada dentro de las hidrolasas, que se encuentran presentes en casi todos los tejidos del organismo, siendo particularmente alta en huesos, hígado, placenta, intestinos y riñón. Tanto el aumento como la disminución de esta enzima en plasma tienen significado clínico. FA libera fosfato inorgánico a partir de ésteres fosfóricos, necesario para la mineralización del hueso. Es considerada un buen marcador de la actividad osteoblástica.(150,151)

Los resultados de los estudios de FA se utilizaron como marcador de formación ósea y resultaron estadísticamente significativos en función del tiempo para los grupos problema con respecto al control. FA aumentó gradualmente en los tratamientos con AL, MFP y la combinación de ambos, incrementado su valor desde el día 15 con valores promedios a 615 U/l llegando al día 90 con valores de 889 U/l. El grupo control se mantuvo estable con valores promedio de 113 U/l desde los 15 a los 90 días.

Ingarashi K y col (1997) demostraron en sus estudios que 3 aminobifosfonatos, entre ellos AL, no produjeron efectos inhibitorios en el crecimiento celular y todos provocaron un aumento de FA en concordancia también con este trabajo.(152)

Por el contrario, Goes P y col (2012), demostraron que AL en dosis de 0,01; 0,05; 0,25 y 0,5 mg/kg no alteró la actividad de transaminasas pero si disminuyó los niveles de FA.(153)

La determinación de FA en sangre es un marcador útil para cuantificar la actividad ósea. Estos resultados concuerdan con los de Walsh y col (2000), quienes concluyen que la actividad de FA se estabilizó al 90 días en tratamientos con AL.(154)

Sandra Megía Delgado y Alfredo Rigalli (2013) demostraron en concordancia con esta experiencia que FA se incrementó significativamente a lo largo del tiempo (90 días) en ratas tratadas con MFP en dosis de 80µmol de MFP en 1ml de MFP 80mmol/l.(155)

La causa más importante de fracturas óseas, susceptibles de prevención, es una masa ósea reducida. Diversos estudios evaluaron la masa ósea en los sitios de fractura, y demuestran un aumento del riesgo de fracturas, que se relaciona con la densidad mineral.(156)

En este trabajo, el análisis de la densidad óptica (OD), permitió establecer la calidad de hueso formado en el defecto logrado quirúrgicamente, a través de un aumento de la radiopacidad de esta zona conforme al avance del tiempo.

Radiográficamente, se determinó un aumento en la OD en los grupos problema comenzando al día 15 y estabilizándose al día 90. El valor más significativo fue para AL a los 60 días. MFP aumentó la OD pero con menor significación. La combinación de las drogas también aumento la OD aunque con menor significación que AL y MFP por separado.

No hubo diferencia entre las medias, cuando se analizó OD en la tibia problema y contralateral. Esto sugiere que AL tiene efectos sistémicos y no locales, aún cuando se administró AL subcutáneo cercano al defecto quirúrgico.

Pacífico Lucisano M y col (2013) analizaron la OD en ratas, después de la administración sistémica de AL, utilizando dosis de 1 mg/kg por semana. En su trabajo demostraron una OD significativamente mayor que el grupo control después de 8 semanas de tratamiento (60 días). La comparación de los grupos con y sin tratamiento con AL reveló un aumento de un 14,9% y 26% en la OD.(157)

Este trabajo demostró un aumento de la OD en forma significativa, aún utilizando dosis menores a 1mg/kg de AL, lo cual disminuye potencialmente la aparición de efectos adversos.

Sandra Mejía Delgado y Alfredo Rigalli (2013) también demostraron efectos de MFP en la OD, en similitud con este trabajo. Observaron que la OD del hueso circundante al defecto no crítico no se modificó a lo largo del tratamiento en ninguno de los grupos experimentales, aunque si demostraron un aumento significativo la OD del hueso formado en el defecto, en

el grupo tratado con MFP respecto al control a los 10 días de tratamiento. Esa diferencia no fue significativa a los 20 y 30 días de tratamiento.

El estudio histológico del hueso nos permitió analizar la actividad celular osteoblástica y osteoclástica, presencia de trabéculas con zonas maduras e inmaduras e infiltrado medular. Esto permitió determinar cómo se fue remodelando el tejido óseo en función del tiempo. En cuanto a morfología trabecular, reveló diferencias a los 30 días para todos los grupos problema con respecto al control. AL y MFP a los 60 días evidenciaron mayor incremento en el número, grosor y tamaño de las trabéculas, aumento de la actividad osteoblástica y trabéculas anastomosadas en red. El tratamiento combinado en el tiempo 60 no fue estadísticamente significativo con respecto al control. No hubo diferencias estadísticas a los 90 días entre todos los grupos.

Los parámetros histomorfométricos de remodelación ósea se dividen en: estructurales (tamaño y cantidad de hueso), de resorción (porcentaje de osteoclastos, erosión ósea y fibrosis peritrabecular), estáticos de formación ósea (porcentaje de osteoblastos, grosor y cantidad de osteoide peritrabecular) y dinámicos de formación ósea, que indican función celular ósea "*in vivo*" (superficie trabecular mineralizada y velocidad de agregación del mineral). Estos parámetros nos permiten cuantificar y cualificar la estructura ósea.(158)

El análisis histomorfométrico de éste trabajo, reveló un aumento del porcentaje del hueso trabecular en función del tiempo, siendo los más significativos AL y MFP a los 60 días. No hubo diferencias estadísticas entre la combinación de las drogas y el grupo control. No hubo diferencias entre las medias de la tibia problema y tibia contralateral.

Virga y col (2009) demostraron los efectos de AL sobre el tejido óseo al producir una marcada actividad osteoblástica acompañada de una disminución del número de osteoclastos, lo que se tradujo en una mejora en la neoformación ósea.(159)

De la misma manera, hay estudios que determinaron que los bifosfonatos, a nivel del osteoclasto, se unen a los cristales de apatita del hueso y que hay una acumulación de éstos debajo del osteoclasto, haciendo que se reduzca la actividad cuando se altera el borde rizado, disminuyendo su superficie de resorción, de esta manera decreciendo la descalcificación focal realizada por los ácidos orgánicos. Al final del proceso se reduce el número de osteoclastos ya que se produce la apoptosis.(160)

Jaime AP y col (2005) no demostraron diferencias significativas histológicas entre grupos tratados con AL de sodio tóxico embebido en una esponja de colágeno a razón de 20 mg/ml y el grupo control. En cuanto al análisis histomorfométrico tampoco observaron diferencias entre los grupos.(161)

En concordancia con este trabajo, Da Paz L. y col (2001) demostraron en su experiencia de tratar ratas ovariectomizadas con estradiol y AL, que éste último a dosis subcutáneas de 0,1 mg/kg aumentó el volumen, grosor y número de las trabéculas con respecto a las tratadas con estradiol y los controles. La experiencia fue medida a 60 y 90 días.(162)

Brun LR y col (2010) demostraron que ratas tratadas con 80µmol/día de MFP por 30 días incrementaron significativamente la masa ósea en comparación con el grupo control.(163)

Diversas condiciones como el trauma, cirugía de resección de quistes o tumores, retiro de material de osteosíntesis, tratamiento de fracturas o la pérdida de porciones de hueso debido a infecciones, producen defectos de tamaños desiguales. Tanto en los defectos óseos críticos como no críticos se busca estimular la reparación completa del defecto de forma más activa que siguiendo el curso normal de la consolidación, mediante la estimulación del tejido óseo por medio de materiales, factores de crecimiento, drogas o trasplantes.

Los modelos animales son indispensables para el estudio de nuevos materiales y estrategias de regeneración ósea. En particular, los modelos en rata son económicos, de fácil manejo y adecuados para diferenciar etapas durante el proceso de regeneración ósea desde el punto de vista biomecánico.(164)

Para valorar el comportamiento biomecánico del hueso existen diferentes tipos de ensayos (tracción, compresión, torsión, flexión a tres y cuatro puntos), pero el ensayo de flexión a tres puntos es el más adecuado para animales pequeños. Aunque el comportamiento mecánico del hueso es complejo, se ha simplificado de diferentes maneras con la finalidad de proponer modelos que se aproximen a su comportamiento "in vivo".

Las propiedades biomecánicas del hueso, no son valores homogéneos que se puedan definir de forma precisa, ello depende de la distribución mineral, características estructurales, variaciones entre individuos y la función del hueso a estudiar.(165)

Las zonas ideales del esqueleto del animal donde se realizan los ensayos biomecánicos son los cuerpos vertebrales, huesos largos (fémur ó tibia) y cuello femoral.

Los huesos largos son importantes porque se componen de hueso cortical puro y están cubiertos de periostio, pudiendo reaccionar por aposición perióstica como el hueso humano. Además el fémur de rata tiene la ventaja, como el del ser humano, de ser gran portador de cargas, por lo cual se lo puede someter a análisis con fuerzas más pesadas.(166) Este modelo en fémur de rata Wistar es económico, de fácil manipulación y bajo costo. Se analizó en este tipo de hueso largo los posibles efectos sistémicos que tuvieran las drogas, para prevenir efectos adversos en futuros estudios clínicos.

En este trabajo, los ensayos biomecánicos determinaron un aumento de la rigidez para AL a los 60 días así como también para AL y MFP a los 90 días. En cuanto a la combinación de las drogas, los datos obtenidos no fueron estadísticamente significativos en éste parámetro.

Tanto los tratamientos con AL, MFP y la combinación de ambos no resultaron estadísticamente significativos cuando se analizaron las variables biomecánicas de fuerza de fractura, energía absorbida y fuerza máxima soportada.

Lauritzen DB y col (/1993) demostraron que no hubo diferencias significativas en cuanto a fuerza y rigidez en los animales tratados con AL con respecto al control. Si hubo diferencias cuando se combinó AL con Pg E2.(167)

Yoshiaki A y col (2013) demostraron que AL administrado en dosis de 1 mg/kg, impidió la disminución de la densidad mineral ósea y mantiene las propiedades mecánicas del hueso después de la ovariectomía.(168)

Giavaresi G y col (1999) demostraron en sus experimentos con MFP en ratas con osteopenia se logró una mayor resistencia a la carga de compresión pero una mayor fragilidad a la carga de flexión. Además, la terapia de fluoruro provocó un aumento de la rigidez del hueso debido a la presencia de fluorapatita.(169)

Todas las variables estudiadas en éste trabajo demuestran que Al fue la droga con mayor efecto. MFP también demostró diferencias significativas en muchas de las variables analizadas.

Si bien está demostrado que AL es un potente inhibidor de la resorción osteoclástica y MFP aumenta notablemente la actividad osteoblástica, en éste trabajo no hubo evidencia de sinergia en el tratamiento combinado de ambas drogas. No obstante, es necesario concentrar esfuerzos y continuar trabajando en la combinación de estas drogas en tiempos diferentes como así también de bifosfonatos con otras drogas, de manera tal que puedan ser útiles en regeneración ósea y en diferentes patologías de la cavidad oral. Este tipo de investigaciones abrirán el horizonte para el diseño de nuevos sistemas de fármacos y así poder incorporarlos al arsenal terapéutico en la práctica odontológica y sus distintas especialidades.

CONCLUSIONES

1. A concentraciones menores a 10 µg/ml de AL, se demostró que la viabilidad celular no difiere del 100%. A medida que aumentan las concentraciones por encima de los 10 µg/ml la viabilidad celular se vio afectada, aunque nunca por debajo del 70%, por lo que la dosis a emplear de AL fue de 0,5 mg/kg de peso correspondido con la concentración de 0,5 µg/ml en el ensayo.
2. Los parámetros in vivo de MFP, tales como peso corporal, glucosa sanguínea y relación ceniza matriz demostraron que no hubo alteraciones cuando se usaron concentraciones de 5mM. Dicha concentración fue utilizada en ésta experiencia.
3. Radiográficamente se observó un incremento en la densidad óptica de todos los grupos problemas con respecto al control conforme avanza el tiempo, siendo más evidentes los tratamientos con AL a los 60 días. No hubo diferencias entre las tibias problema y contralateral.
4. El marcador bioquímico FA mostró diferencias significativas de los grupos problema con respecto al control conforme al avance del tiempo, lo cual expresó un aumento de la actividad osteoblástica en los grupos tratados con AL, MFP, y la combinación de ambos.
5. Histológicamente se observó a los 30 días tanto para AL como para MFP un aumento de la calidad ósea a través aumento del grosor de las trabéculas y algunas anastomosis entre ellas. Se observó también un incremento de osteoblastos revistiendo las trabéculas. AM también muestra un aumento en el grosor de las trabéculas.
6. Histológicamente el tiempo 60 fue el más significativo donde se observó el mayor incremento en el grosor y número de las trabéculas para el grupo A y M con respecto a los demás. El grupo AM a los 60 días mantuvo la morfología de sus trabéculas como en el tiempo 30.
7. La histomorfometría reveló un aumento del porcentaje del hueso trabecular de AI y MFP a los 60 días con respecto al control. No hubo diferencias entre la tibia problema y la contralateral.
8. El análisis de flexión, determinó diferencias significativas de AL a los 60 días en cuanto a la rigidez, como así también de AL y MFP a los 90 días. Este parámetro permite interpretar que un hueso mientras más rígido es, menor deformación elástica tiene, por lo tanto la deformación de éste ante la aplicación de una fuerza será menor y la resistencia mayor.

9. Los análisis de compresión son mas variables que los de flexión y tuvieron resultados similares en cuanto a la rigidez siendo Al y MFP diferentes al resto.
10. Existe una correlación directa entre los análisis radiográficos, bioquímicos, histológicos, histomorfométricos y biomecánicos donde las diferencias mayores fueron observadas para AL Y MFP a los 60 días
11. El hecho de que se hayan encontrado diferencias significativas en los ensayos biomecánicos, pone de manifiesto la acción sistémica de los fármacos y no localizada. También se puede inferir que estas acciones no fueron deletéreas sino benéficas al aumentar la rigidez.
12. El análisis del tratamiento combinado demuestra que no hay sinergia ni de suma ni de potenciación, ya que los efectos no fueron superiores a los hallados utilizando las drogas por separado.
13. Probablemente AL antagonizaría al MFP ya que éste último para actuar necesita de la presencia de factores de crecimiento liberados localmente en el tejido óseo (TGF- β) que estimulan la activación de osteoblastos. Esta citoquina se libera por la acción de los osteoclastos en su proceso resortivo. Al combinar ambas drogas, AL impediría la liberación de estos factores de crecimiento y el efecto del MFP no podría llevarse a cabo.
14. La Osteonecrosis maxilar (ONM) es una complicación frecuente en el campo odontológico y aun más frecuente cuando el bifosfonato es administrado por vía endovenosa y en altas dosis para el tratamiento de la enfermedad de Paget, hipercalcemias, metástasis óseas, etc., complicación que guarda una menor incidencia cuando se utilizan bajas dosis de este fármaco y la vía utilizada es la oral. En ninguna de las muestras analizadas en esta experiencia se observó osteonecrosis, lo cual pone de manifiesto la menor incidencia de este efecto adverso con la utilización de dosis adecuadas de AL.
16. Los resultados obtenidos demuestran que Al y MFP poseen efectos antiresortivos y osteoformadores respectivamente y que dichos efectos son netamente benéficos en la práctica odontológica, donde el hueso constituye el principal sostén de los elementos dentarios y de estructuras de titanio cuando aquellos se pierden por distintas patologías y también formando parte esencial del sistema estomatognático, para que este pueda cumplir con eficiencia todas sus funciones.

BIBLIOGRAFIA

- ¹ Ross M, Gordon I, Wojciech P. Huesos y tejido óseo. En: Histología. Texto y atlas color con biología celular molecular. 5ta Ed; Buenos Aires: Ed. Panamericana 2010; 188-210.
- ² Hanks LJ, Casazza K, Ashraf A, Fernandez JR. Calcium homeostasis may influence resting energy expenditure with effects most apparent in early pubertal girls. *Acta Pediat.* 2012; 101(8): 363-68.
- ³ Von Meyer GH. The classic: The architecture of the trabecular bone (Tenth contribution on the mechanics of the human skeletal framework). *Clin Orthop Relat Res.* 2011; 469(11): 3079-84.
- ⁴ Cherraf-Schweyer C, Maurice G, Taghite M, Taous K. An experimental and theoretical approach of elasticity and viscoelasticity of compact and spongy bone with periodic homogenization. *Comput Methods Biomech Biomed Engin.* 2007; 10(3): 195-207.
- ⁵ Wolff J. The classic: On the significance of the architecture of the spongy substance for the question of bone growth: a preliminary publication. *Clin Orthop Relat Res.* 2011; 469(11): 3077-78.
- ⁶ Gomez de Ferraris ME, Campos Muñoz A. Histología y Embriología e Ingeniería Tisular Bucodental. 3ra Ed. México: Editorial Médica Panamericana. 2009; 90-98.
- ⁷ Baron R. Anatomy and ultrastructure of bone. En: *Primer on the Metabolic Bone Diseases and Disorders of Mineral Metabolism.* ASBMR (Washington DC). 2006; 3-9.
- ⁸ Guyton A. C., Hall J. E. Endocrinología y Reproducción. En: *Tratado de Fisiología Médica* 10 Ed. México DF: Mc Graw-Hill Editorial Interamericana. 2001; 1005-99.
- ⁹ Kierszenbaum A. Histología y biología celular. Introducción a la patología. 2da Ed. Madrid: Elsevier. 2008; 135-64.

¹⁰ Samar ME, Avila R. Tejido óseo. En: Histología Humana clínicamente orientada: tejidos y sistemas. 4ta Ed. Córdoba: Samar ediciones. 2013; 199-219.

¹¹ Zhong Z, Zylstra-Diegel CR, Schumacher CA, Baker JJ, Carpenter AC, Rao S, Yao W, Guan M, Helms JA, Lane NE, Lang RA, Williams BO. Wntless functions in mature osteoblasts to regulate bone mass. Proc Natl Acad Sci (U S A). 2012; 109(33): 2197-204.

¹² Zhang K, Barragan-Adjemian C, Ye L, Kotha S, Dallas M, Lu Y, Zhao S, Harris M, Harris SE, Feng JQ, Bonewald LF. E11/gp38 selective expression in osteocytes: regulation by mechanical strain and role in dendrite elongation. Mol Cell Biol. 2006; 26: 4539–52.

¹³ Fernandez I, Tresguerres Hernandez Gil A G M A, Canto Pingarrón M, Blanco Jerez L. Physiological bases of bone regeneration I. Histology and Physiology of bone tissue. Med Oral Patol oral Cir Bucal. 2006; 11: 47-51.

¹⁴ Ganong W. Control hormonal, metabolismo del calcio y fisiología del hueso. En: Fisiología Médica. 19 Ed. México DF: Editorial El manual moderno. 2004; 417-31.

¹⁵ Geneser, Finn, Tejido Oseo. En: Histología. Sobre bases moleculares. 3 Edición. Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires: 2000; 290-292.

¹⁶ Hagihara M, Endo M, Hata K, Higuchi C, Takaoka K, Yoshikawa H, Yamashita T. Neogenin, a receptor for bone morphogenetic proteins. J Biol Chem. 2011; 286(7): 5157-65.

¹⁷ Burkitt HG, Young B, Heath JW . Tejido óseo. En: Histología funcional Wheater. 3ra Ed; Madrid: Churchill Livingstone España. 1998; 950-56.

¹⁸ Topolinski T, Mazurkiewicz A, Jung S, Cichanski A. Nowicki K. Microarchitecture parameters describe bone structure and its strength better than BMD. ScientificWorldJournal. 2012; 502-81.

¹⁹ Zhong Z, Zylstra-Diegel CR, Schumacher CA, Baker JJ, Carpenter AC, Rao S, Yao W, Guan M, Helms JA, Lane NE, Lang RA, Williams BO. Wntless functions in mature osteoblasts to regulate bone mass. Proc Natl Acad Sci (U S A). 2012; 109(33): 2197-204.

²⁰ Tuan RS, Lee FY, T Konttinen Y, Wilkinson JM, Smith RL. J Am Acad Orthop Surg. 2008; 16(1): 42-8.

-
- ²¹ Rumpler M, Würger T, Roschger P, Zwettler E, Peterlik H, Fratzl P, Klaushofer K. Microcracks and osteoclast resorption activity in vitro. *Calcif Tissue Int.* 2012; 90(3): 230-8.
- ²² Beck GR, Ha SW, Camalier CE, Yamaguchi M, Li Y, Lee JK, Weitzmann MN. Bioactive silica-based nanoparticles stimulate bone-forming osteoblasts, suppress bone-resorbing osteoclasts, and enhance bone mineral density in vivo. *Nanomedicine.* 2012; 8(6): 793-803.
- ²³ Xu d, Wang S, Liu W, Liu J, Feng X. A novel Rank cytoplasmic motif play an essential role in osteoclastogenesis by committing macrophages to the osteoclast lineage. *J Biol. Chem.* 2006; 281: 4678-90.
- ²⁴ Boyce BF; Yao Z; Xing L. Osteoclasts have multiple roles in bone in addition to bone resorption. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr.* 2009; 19(3): 171-80.
- ²⁵ Daniel Lozano, Luis F. de Castro, Sonia Dapía, Irene Andrade-Zapata, Félix Manzarbeitia, M. Victoria Alvarez-Arroyo, Enrique Gómez-Barrena and Pedro Esbrit. Role of Parathyroid Hormone-Related Protein in the Decreased Osteoblast Function in Diabetes-Related Osteopenia. *Endocrinology.* 2009; 150(5): 2027-35.
- ²⁶ Olsen BR, Reginato AM y Wang W. Bone development. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2000; 16: 191-220.
- ²⁷ Pierroz DD, Bonnet N, Baldock PA, Ominsky MS, Stolina M, Kostenuik PJ, Ferrari SL. Are osteoclasts needed for the bone anabolic response to parathyroid hormone? A study of intermittent parathyroid hormone with denosumab or alendronate in knock-in mice expressing humanized RANKL. *J Biol Chem.* 2010; 285(36): 28164-73.
- ²⁸ Liu W, Xu D, Yang H, et al. Functional identification of three RANK cytoplasmic motifs mediating osteoclast differentiation and function. *J Biol.Chem.* 2004; 279: 54759-69.
- ²⁹ Dobnig H, Hofbauer LC, Viereck V, Obermayer-Pietsch B, Fahrleitner-Pammer A. Changes in the RANK ligand/osteoprotegerin system are correlated to changes in bone mineral density in bisphosphonate-treated osteoporotic patients. *Osteoporos Int.* 2006; 25: 1-11.
- ³⁰ Cooper C, Harvey N, Cole Z, Hanson M, Dennison E. Developmental origins of osteoporosis: the role of maternal nutrition. *Adv Exp Med Biol.* 2009; 646: 31-9.

³¹ Jin W, Chang M, Paul EM, Babu G, Lee AJ, Reiley W, Wright A, Zhang M, You J, Sun SC. Deubiquitinating enzyme CYLD negatively regulates RANK signaling and osteoclastogenesis in mice. *J Clin Invest*. 2008; 118(5): 1858-66.

³² Roshandel D; Holliday KL, Pye SR, Ward KA, Boonen Vanderschueren D, Borghs H, Huhtaniemi IT, Adams JE, Bartfai G, Casanueva FF, Finn JD, Forti G, Giwercman A, Han TS, Kula K, Lean ME, Pendleton N, Punab M, Silman AJ, Wu FC, Thomson W, O'Neill TW. Influence of polymorphisms in the RANKL/RANK/OPG signaling pathway on volumetric bone mineral density and bone geometry at the forearm in men. *Calcif Tissue Int*. 2011 89(6): 446-55.

³³ Lafita, J. Physiology and bone Physiopathology *An. Sist. Sanit. Navar*. 2003; 26(3): 7-15.

³⁴ Kohn A, Dong Y, Mirando AJ, Jesse AM, Honjo T, Zuscik MJ, O'Keefe RJ, Hilton MJ. Cartilage-specific RBP-dependent and -independent Notch signals regulate cartilage and bone development. *Development*. 2012; 139(6): 1198-212.

³⁵ Wang X, Liao S, Nelson ER, Schmalzigaug R, Spurney RF, Guilak F, Premont RT, Gesty-Palmer D. The cytoskeletal regulatory scaffold protein GIT2 modulates mesenchymal stem cell differentiation and osteoblastogenesis. *Biochem Biophys Res Commun*. 2012; 425(2): 407-12.

³⁶ Bilousova G, Jun du H, King KB, De Langhe S, Chick WS, Torchia EC, Chow KS, Klemm DJ, Roop DR, Majka SM. Osteoblasts derived from induced pluripotent stem cells form calcified structures in scaffolds both in vitro and in vivo. *Stem Cells*. 2011; 29(2): 206-16.

³⁷ Scotti C; Piccinini E; Takizawa H; Todorov A; Bourguine P; Papadimitropoulos A; Barbero A; Manz MG; Martin I. Engineering of a functional bone organ through endochondral ossification. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013; 110(10): 3997-4002.

³⁸ Chan CK, Chen CC, Luppen CA, Kim JB, DeBoer AT, Wei K, Helms JA, Kuo CJ, Kraft DL, Weissman IL. Endochondral ossification is required for haematopoietic stem-cell niche formation. *Nature*. 2009; 457(7228): 490-4.

³⁹ Herrero-Beaumont G, Castañeda Sanz S. Importancia del Hueso Subcondral y la Membrana Sinovial en la Patogenia y Tratamiento de la Artrosis. *Reumatología* 2006; 22(3): 79-80.

-
- ⁴⁰ Aversa R, Apicella D, Perillo L, Sorrentino R, Zarone F, Ferrari M, Apicella A. Non-linear elastic three-dimensional finite element analysis on the effect of endocrown material rigidity on alveolar bone remodeling process. *Dent Mater.* 2009; 25(5): 678-90.
- ⁴¹ Andersen TL, Sondergaard TE, Skorzynska KE, Dagnaes-Hansen F, Plesner TL, Hauge EM, Plesner T, Delaisse JM. A physical mechanism for coupling bone resorption and formation in adult human bone. *Am J Pathol.* 2009; 174(1): 239-47.
- ⁴² Johnell O, Kanis JA, Oden A. Predictive value of BMD for hip and other fractures. *J Bone Miner Res.* 2005; 20: 1185–94.
- ⁴³ Gourlay ML, Fine JP, Preisser JS, May RC, Li C, Lui LY, Ransohoff DF, Cauley JA, Ensrud KE. Bone-density testing interval and transition to osteoporosis in older women. *N Engl J Med.* 2012; 366(3): 225-33.
- ⁴⁴ Eekman DA, Bultink IE, Heijboer AC, Dijkmans BA, Lems WF. Bone turnover is adequately suppressed in osteoporotic patients treated with bisphosphonates in daily practice. *BMC Musculoskelet Disord.* 2011; 12: 167-176.
- ⁴⁵ Sroga GE, Vashishth D. Effects of bone matrix proteins on fracture and fragility in osteoporosis. *Curr Osteoporos Rep.* 2012; 10(2): 141-50.
- ⁴⁶ Kim SW, Lee HA, Cho EH. Low handgrip strength is associated with low bone mineral density and fragility fractures in postmenopausal healthy Korean women. *J Korean Med Sci.* 2012; 27(7): 744-7.
- ⁴⁷ Trueta J. The role of blood vessels in osteogenesis. *J Bone Joint Surg Br.* 1963; 45:402.
- ⁴⁸ Canalis E, Economides AN, Gazzerro E. Bone morphogenetic protein, their antagonist, and the skeleton. *Endocr Rev.* 2003; 24: 218-35.
- ⁴⁹ Van Loo B, Jonas S, Babbie AC, Benjdia A, Berteau O, Hyvönen M, Hollfelder F. An efficient, multiply promiscuous hydrolase in the alkaline phosphatase superfamily. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010; 107(7): 274.

-
- ⁵⁰ Jang WG, Kim EJ, Kim DK, Ryoo HM, Lee KB, Kim SH, Choi HS, Koh JT. BMP2 protein regulates osteocalcin expression via Runx2-mediated Atf6 gene transcription. *J Biol Chem.* 2012; 287(2): 905-15.
- ⁵¹ Jablonka F, Schindler F, Lajolo P, Pinczowski H, Fonseca F, Barbieri A, Massonetto L, Katto F, del Giglio A. Serum cross-linked n-telopeptides of type 1 collagen (NTx) in patients with solid tumors / Dosagem sérica do N-telopeptídeo do colágeno tipo I (NTx) em pacientes com tumores sólidos. *Sao Paulo Med J.* 2009; 127(1): 19-22.
- ⁵² González-Techera A, Umpiérrez-Failache M, Cardozo S, Obal G, Pritsch O, Last JA, Gee SJ, Hammock BD, González-Sapienza G. High-throughput method for ranking the affinity of peptide ligands selected from phage display libraries. *Bioconjug Chem.* 2008; 19(5):993-1000.
- ⁵³ Payne JB, Stoner JA, Lee HM, Nummikoski PV, Reinhardt RA, Golub LM. Serum bone biomarkers and oral/systemic bone loss in humans. *J Dent Res.* 2011; 90(6): 747-51.
- ⁵⁴ Wu XY; Li HL; Xie H; Luo XH; Peng YQ; Yuan LQ; Sheng ZF; Dai RC; Wu XP; Liao EY. Age-related bone turnover markers and osteoporotic risk in native Chinese women. *BMC Endocr Disord.* 2014; 14(1): 8.
- ⁵⁵ Lenora J, Ivaska KK, Obrant KJ et al. Prediction of bone loss using biochemical markers of bone turnover. *Osteoporos Int.* 2007; 18: 1297–305.
- ⁵⁶ Seibel MJ. Biochemical markers of bone remodeling. *Endocrinol Metab Clin N Am.* 2003; 32: 83-113.
- ⁵⁷ Brun LR, Roma SM, Perez F, Rigalli A. Inflamación en el tejido óseo de ratas inducida por fluoruro de sodio. *Actual osteol;* 8(1): 19-28.
- ⁵⁸ De Laet C, Odén A, Johansson H, Johnell O, Jönsson B, Kanis JA. The impact of the use of multiple risk indicators for fracture on case-finding strategies: a mathematical approach. *Osteoporos Int.* 2005; 16: 313–8.
- ⁵⁹ Robbins J, Aragaki AK, Kooperberg C. Factors associated with 5-year risk of hip fracture in postmenopausal women. *JAMA.* 2007; 298: 2389–98.
- ⁶⁰ Savoca S, D'Agosta S, Lombardo G. Evaluation of the hematochemical parameters and bone mineral density of women in physiological menopause treated with hormone

replacement therapy with noregestrol acetate and surgical menopause treated with estrogen replacement. Part II. *Minerva Ginecol.* 2007; 59: 215–222.

⁶¹ Otomo-Corgel J. Implants and oral bisphosphonates: risky business? *J Periodont.* 2007; 78 (3): 373-6.

⁶² McLeod NM. Oral bisphosphonates and dental implants. *J Oral Maxillofac Surg.* 2009; 67 (6): 1355.

⁶³ Kanis JA, Johnell O, Oden A. FRAX and the assessment of fracture probability in men and women from the UK. *Osteoporos Int.* 2008; 19: 385–97.

⁶⁴ Felsenberg D, Boonen S. The bone quality framework: determinants of bone strength and their interrelationships, and implications for osteoporosis management. *Clin Ther.* 2005; 27: 1-11.

⁶⁵ Vázquez M, López A, Isasi C. Fractura osteoporótica: valoración del riesgo en la práctica clínica. *Med Clin (Barc).* 2007; 29: 418–23.

⁶⁶ Lindhe J, Karring T, Lang N, Oseointegración: Antecedentes históricos y conceptos actuales. Formación de hueso alveolar. En: *Periodontología Clínica e Implantología Odontológica*, 1 Edición Editorial Médica Panamericana. España: 2005; 907-936.

⁶⁷ Foster SA, Shi N, Curkendall S, Stock J, Chu BC, Burge R, Diakun DR, Krege JH. Fractures in women treated with raloxifene or alendronate: a retrospective database analysis *BMC Womens Health.* 2013; 13: 15.

⁶⁸ Tanzy ME, Camacho PM. Effect of vitamin D therapy on bone turnover markers in postmenopausal women with osteoporosis and osteopenia. *Endocr Pract.* 2011; 17(6): 873-9.

⁶⁹ Canalis E, Giustina MD, Bilezikian JP. Mechanism of anabolic therapies for osteoporosis. *N Eng J Med.* 2007; 357: 905-16.

⁷⁰ Jee JSS. Anabolic Agents and Osteoporosis: Quo Vadis. *J Musculoskel Neuron Interact.* 2000; 1(2): 107-11.

⁷¹ Drake MT, Clarke BL, Khosla S. Bisphosphonates: Mechanism of action and role in clinical practice. *Mayo Clin Proc.* 2008; 83(9): 1032-45.

-
- ⁷² Leu CT, Luegmayer Eva, Freedman LP, Rodan GA, Reszka AA. Relative binding affinities of bisphosphonates for human bone and in relationship to antiresorptive efficacy. *Bone*. 2006; 38: 628-36.
- ⁷³ Licata AA. Discovery. Clinical Development and therapeutic uses of Bisphosphonates. *Ann Pharmacother*. 2005; 39: 668-77.
- ⁷⁴ Lainesse A, Ozalp Y, Wong H, Alpan RS. Bioequivalence studies on bisphosphonates: The example of alendronate. *Drug Res*. 2004; 54: 569-72.
- ⁷⁵ Karamustafa F, Celebi N, Degim Z, Unal N. Transport evaluation of alendronate across Caco-2 cell monolayers. *Pharmazie*. 2009; 64(2): 98-103.
- ⁷⁶ Leu C-T, Luegmayer Eva, Freedman LP, Rodan GA, Reszka AA. Relative binding affinities of bisphosphonates for human bone and relationship to antiresorptive efficacy. *Bone*. 2006; 38: 628-36.
- ⁷⁷ Nancollas GH, Tang R, Phipps RJ, Henneman Z, Gulde S, Wu W, Mangood A, Russell RGG, Ebetino FH. Novel insights into actions of bisphosphonates on bone: differences in interactions with hydroxyapatite. *Bone*. 2006; 38: 617-627.
- ⁷⁸ Goodman Gilman A. Fármacos que afectan la calcificación y recambio óseo, calcio, fosfato, hormona paratiroidea, vitamina D y otros compuestos. En: *Las Bases Farmacológicas de la Terapéutica*. 11 Ed. Volumen II. México DF: Hardman, Limbird Mc Graw-Hill Editorial Interamericana. 2003; 1735-1760.
- ⁷⁹ Lorenzo P, Moreno A, Leza JC, Lisasoain I, Moro MA, Sistema Endócrino. Farmacología del calcio y del hueso. En: Velásquez. *Farmacología Básica y Clínica*. Madrid: Editorial Médica Panamericana. 2005; 683-92.
- ⁸⁰ Idris AI, Rojas J, Greig IR, Van't Hof RJ, Ralston SH. Aminobisphosphonates cause osteoblast apoptosis and inhibit bone nodule formation in vitro. *Calcif Tissue Int*. 2008; 82(3): 191-201.

-
- ⁸¹ Mínguez-Serra MP, Salort-Llorca C, Silvestre-Donat FJ. Oral implants in patients receiving bisphosphonates: A review and update. *Med Oral Patol Oral Cir Buccal*. 2008; 13: 755-60.
- ⁸² Xue QY, Ji Q, Li HS, Zou XN, Egund N, Lind M, Christensen FB, Bünger C. Alendronate treatment does not inhibit bone formation within biphasic calcium phosphate ceramics in posterolateral spinal fusion: an experimental study in porcine model. *Chin Med J (Engl)*. 2009; 122(22): 2770-74.
- ⁸³ Hernandez C. Alendronato de NA. Un nuevo bifosfonato en el tratamiento de osteoporosis. *Revista Médica*. 2000; 1: 18-20.
- ⁸⁴ Kaynak D, Meffert R, et al. A histopathological investigation on the effects of the bisphosphonate Alendronate on resorptive phase following mucoperiosteal flap surgery in the mandible of rats. *J Periodontol*. 2000; 70: 790-96.
- ⁸⁵ Cheng YY, Huang L, Lee KM, Xu JK, Zheng MH, Kumta SM. Bisphosphonates induce apoptosis of stromal tumor cells in giant cell tumor of bone. *Calcif Tissue Int*. 2004; 75(1): 71-7.
- ⁸⁶ Naidu A, Dechow PC, Spears R, Wright JM, Kessler HP, Opperman LA. The effects of bisphosphonates on osteoblasts in vitro. *Oral Surg Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol Endod*. 2008; 106 (1): 5-13.
- ⁸⁷ Merigo E, Manfredi M, Meletios M, Guidotti R, Ripasarti A Zanzucchi E, Dale P, Corradi D, Corcione L, Sesenna E, Ferrari S, Poli T, Bonaninil M, Vescovi P. Bone necrosis of the jaws associated with bisphosphonate treatment: a report of twenty-nine cases. *Acta Biomed*. 2006; 77: 109-17.
- ⁸⁸ Chiandussi S, Biasotto M, Dore F, Cavalli F, Cova MA, Di Lenardo R. Clinical and diagnostic imaging of bisphosphonate-associated osteonecrosis of the jaws. *Dentomaxillofac Radial*. 2006; 35: 236-43.
- ⁸⁹ Ruggiero SL, Mehrotra B, Rosenberg TJ, Engroff SL. Osteonecrosis of the jaws associated with the use of bisphosphonates: a review of 63 cases. *J Oral Maxillofac Surg*. 2004; 62: 527-34.

⁹⁰ Nistala H, Lee-Arteaga S, Carta L, Cook JR, Smaldone S, Siciliano G, Rifkin AN, Dietz HC, Rifkin DB, Ramirez F. Differential effects of alendronate and losartan therapy on osteopenia and aortic aneurysm in mice with severe Marfan syndrome. *Hum Mol Genet.* 2010; 19(24): 4790-8.

⁹¹ Orriss IR, Key ML, Colston KW, Arnett TR. Inhibition of osteoblast function in vitro by aminobisphosphonates. *J Cell Biochem.* 2009; 106 (1): 109-18.

⁹² Hoefert S., Wierich W., Eufinger H. and Krempien B. BP-associated avascular necrosis (AN) of the jaws: Histological findings. *Bone.* 2006; 38(3): 76.

⁹³ Diniz-Freitas M, López-Cedrún JL, Fernández-Sanromán J, García-García A, Fernández-Feijoo J, Diz-Dios P. Oral bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws: Clinical characteristics of a series of 20 cases in Spain. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* 2012; 17(5): 751-8.

⁹⁴ Migliorati CA, Schubert MM, Peterson DE, Seneda LM. Bisphosphonate-associated osteonecrosis of mandibular and maxillary bone. *Cancer.* 2005; 104: 83-93.

⁹⁵ Durie BG, Katz M, Crowley J. Osteonecrosis of the jaw and bisphosphonates. *N Engl J Med.* 2005; 353: 99-102.

⁹⁶ Denture-related osteonecrosis of the maxilla associated with oral bisphosphonate Treatment, *J Am Dent Assoc.* 2007; 138(9): 1218-20.

⁹⁷ M. Stránský, I. Ryšavá Nutrition as Prevention and Treatment of Osteoporosis. *Physiol Res.* 2009; 58(1): 7-11.

⁹⁸ Woo SB, Hellstein JW, Kalmar JR. Systematic review: Bisphosphonates and osteonecrosis of the jaws. *Ann Intern Med.* 2006; 144: 753-61.

⁹⁹ Malden NJ, Pai AY. Oral bisphosphonate associated osteonecrosis of the jaws: three case reports. *Br Dent J,* 2007; 203: 93-7.

¹⁰⁰ Mavrokokki T, Cheng A, Stein B, Goss A. Nature and frequency of bisphosphonate-associated osteonecrosis of the jaws in Australia. *J Oral Maxillofac Surg.* 2007; 65(3): 415-423.

-
- ¹⁰¹ Conte Neto N, Spolidorio LC, Andrade CR, S Bastos A, Guimarães M, Marcantonio E. Experimental development of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws in rodents. *Int J Exp Pathol*. 2013; 94(1): 65-73.
- ¹⁰² Brozoski, Mariana Aparecida; Traina, Andreia Aparecida; Deboni, Maria Cristina Zindel; Marques, Márcia Martins; Naclério-Homem, Maria da Graça. Osteonecrose maxilar associada ao uso de bisfosfonatos / Bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw *Rev. bras. reumatol*, 2012; 52(2): 265-70.
- ¹⁰³ Ruggiero SL, Fantasia J, Carlson E. Bisphosphonates-related osteonecrosis of the jaw. Background and guidelines for diagnosis, staging and management. *Oral Surg Oral Med Oral Pth Oral Radiol Endod*. 2006; 102: 433-38.
- ¹⁰⁴ Denture-related osteonecrosis of the maxilla associated with oral bisphosphonate Treatment, *J Am Dent Assoc*. 2007; 138(9): 1218-20.
- ¹⁰⁵ Aramburú G, Aguzzi A, Ricco V, Hubert S, Aguilar J, Konigheim B, Virga C. Estudio de una formulación subcutánea en base a Alendronato. *Acta odontológica Venezolana*. 2008; 46(4): 11-13.
- ¹⁰⁶ Aramburú G, Aguzzi A, Ricco V, Aguilar J, Konigheim B, Virga C. Study about a Subcutaneous Formulation based on alendronato. *J Den Res*. 2004; 83: 11-13.
- ¹⁰⁷ Aramburú G, Aguzzi A, Ricco V, Hubert S, Virga C. Study of a Subcutaneous Formulation on the Basis of Alendronato. *J Den Res*. 2005; 84: 13-15.
- ¹⁰⁸ Rigalli A, Ballina TC, Beinlich A, Alloatti R y Puche RC. Pharmacokinetics differences between sodium fluoride and sodium monofluorophosphate and comparative mass increasing activity of both compounds in the rat. *Arzneimittel-Forschung*. 1994; 44: 762-66.
- ¹⁰⁹ Brun LR, Roma SM, Pérez F y Rigalli A. Histological differences in bones of rats treated with sodium fluoride (NaF) and sodium monofluorophosphate (MFP). *Bone*. 2009; 45:153.
- ¹¹⁰ Hardy R, Cooper MS. Bone loss in inflammatory disorders. *Journal of Endocrinology*. 2009; 201: 309–20.
- ¹¹¹ Lee JH, Jung JY, Jeong YJ, Park JH, Yang KH, Choi NK, Kim SH, Kim WJ. Involvement of both mitochondrial- and death receptor-dependent apoptotic pathways regulated by Bcl-2

family in sodium fluoride-induced apoptosis of the human gingival fibroblasts. *Toxicol.* 2008; 243: 340-7.

¹¹² Gutowska I, Baranowska-Bosiacka I, Bańkiewicz M, Milo B, Siennicka A, Marchlewicz M, Wiszniewska B, Machaliński B, Stachowska E. Fluoride as a pro-inflammatory factor and inhibitor of ATP bioavailability in differentiated human THP1 monocytic cells. *Toxicol Lett.* 2010 196: 74-9.

¹¹³ Yan X, Feng C, Chen Q, Li W, Wang H, Lv L, Smith GW, Wang J. Effects of sodium fluoride treatment in vitro on cell proliferation, apoptosis and caspase-3 and caspase-9 mRNA expression by neonatal rat osteoblasts. *Arch Toxicol.* 2009; 83: 451-8.

¹¹⁴ Xu H, Wang CH, Zhao ZT, Zhang WB, Li GS. Role of oxidative stress in osteoblasts exposed to sodium fluoride. *Biol Trace Elem.* 2008; 123: 109-15.

¹¹⁵ Rigalli A, Puche RC. Farmacocinética de diferentes compuestos con Flúor y preparaciones farmacéuticas. *Actualizaciones en Osteología.* 2007; 3(1): 46-48.

¹¹⁶ Esteban L, Rigalli A, Puche RC. Metabolism of the complex Monofluorophosphate - alpha 2-macroglobulin in the rat. *Medicina.* 1999; 59(2): 151-6.

¹¹⁷ Caverzasio J, Palmer G, Bonjour JP. Fluoride: mode of action. *Bone* 1998; 22: 585-89.

¹¹⁸ Farley, J.R; Tarbaux, N; Hall, S and Baylink, D.J. Mitogenic Action(s) Of Fluoride On Osteoblast Line Cells; Determinants Of The Response In Vitro. *J Bone Miner Res.* 1990; 5(1): 107-113.

¹¹⁹ Lau KH, Farley JR, Freeman TK, Baylink DJA. Proposed mechanism of the mitogenic action of fluoride on bone cells inhibition of the activity of an osteoblastic acid phosphatase. *Metabolism.* 1989; 38: 858-68.

-
- ¹²⁰ Zheng HF, Tobias JH, Duncan E, Evans DM, Eriksson J, Paternoster L, Yerges-Armstrong LM, Lehtimäki T, Bergström U, Kähönen M, Leo PJ, Raitakari O, Laaksonen M, Nicholson GC, Viikari J, Ladouceur M, Lyytikäinen LP, Medina-Gomez C, Rivadeneira F, Prince RL, Sievanen H, Leslie WD, Mellström D, Eisman JA, Movérare-Skrtic S, Goltzman D, Hanley DA, Jones G, St Pourcain B, Xiao Y, Timpson NJ, Smith GD, Reid IR, Ring SM, Sambrook PN, Karlsson M, Dennison EM, Kemp JP, Danoy P, Sayers A, Wilson SG, Nethander M, McCloskey E, Vandenput L, Eastell R, Liu J, Spector T, Mitchell BD, Streeten EA, Brommage R, Pettersson-Kymmer U, Brown MA, Ohlsson C, Richards JB, Lorentzon M. WNT16 influences bone mineral density, cortical bone thickness, bone strength, and osteoporotic fracture risk. *PLoS Genet.* 2012; 8(7): 10027-45.
- ¹²¹ Yadav VK, Ryu JH, Suda N, Tanaka KF, Gingrich JA, Schütz G, Glorieux FH, Chiang CY, Zajac JD, Insogna KL, Mann JJ, Hen R, Ducy P, Karsenty G. Lrp5 controls bone formation by inhibiting serotonin synthesis in the duodenum. *Cell.* 2008; 135(5): 825-37.
- ¹²² Krishnan V, Bryant HU, MacDougald A. Regulation of bone mass by Wnt signaling. *J. Clin. Invest.* 2006; 226(5): 1202-09.
- ¹²³ Riggs BL, Seeman E, Hodgson SF, Taves DR, O'Fallon WM. Effect of the fluoride/calcium regimen on vertebral fracture occurrence in postmenopausal women. Comparison with conventional therapy. *N Engl J Med.* 1982; 306: 446-50.
- ¹²⁴ Proff P, Bayerlein T, Rottner K, Mai R, Fanghänel J, Gedrange T. Effect of bone conditioning on primary stability of FRIALIT-2 implants. *Clin Oral Implants Res.* 2008; 19(1): 42-7.
- ¹²⁵ Repetto G, del Peso A, Zurita JL. Neutral red uptake assay for the estimation of cell viability/cytotoxicity. *Nat Protoc.* 2008; 3(7): 1125-31.
- ¹²⁶ Stokes WS, Casati S, Strickland J, Paris M. Neutral red uptake cytotoxicity tests for estimating starting doses for acute oral toxicity tests. *Curr Protoc Toxicol.* 2008; 20: 20-4.
- ¹²⁷ Rigalli A, Iglesias AM, Puche RC. Long term stability of sodium monofluorophosphate. *Drug.Dev. and Ind. Pharm.* 1995; 21(4): 517-21.

¹²⁸ Rigalli A, Di Loreto V. Experimental Surgical Models in the Laboratory Rat Taylor and Francis Group. CRC Press. Boca Ratón. USA. In press.

¹²⁹ Di Loreto V, Pera L, Rigalli A. Samples. En Experimental Surgical Models in the Laboratory rat. Rigalli A, Di Loreto V Eds. CRC Press. Taylor & Francis Group. Boca Ratón (USA). 2009; 63-72.

¹³⁰ De Candia F, Rigalli A, Di Loreto V. Anesthesia and Analgesia. En Experimental Surgical Models in the Laboratory rat. Rigalli A, Di Loreto V Eds. CRC Press. Taylor & Francis Group. Boca Ratón. (USA). 2009; 21-30.

¹³¹ Lupo M, Di Loreto V, Rigalli A. Substances administration. En Experimental Surgical Models in the Laboratory rat. Rigalli A, Di Loreto V Eds. CRC Press. Taylor & Francis Group. Boca Ratón. (USA). 2009; 55-61.

¹³² Parfitt AM, Drezner MK, Glorieux FH, Kanis JA, Malluche H, Meunier PJ, Ott SM, Recker RR. Bone histomorphometry: standardization of nomenclature, symbols, and units. Report of the ASBMR. Journal of bone and mineral research.1987; 2(7): 595-610.

¹³³ Kulak, Carolina A. Moreira; Dempster, David W. Bone histomorphometry: a concise review for endocrinologists and clinicians Arq Bras Endocrinol Metabol. 2010; 54(2): 87-98.

¹³⁴ Pytlik M, Cegiela U, Nowinska B, Folwarczna J, Sliwinski L, Kaczmarczyk-Sedlak I, Pytlik M, Bolek D, Korzeniowska H. Bone remodeling after administration of proton pump (H⁺/K⁺-ATPase) inhibitors and alendronate in ovariectomized rats. Acta Pol Pharm. 2012; 69(1): 113-20.

¹³⁵ Anbinder, Ana Lia; Prado, Fernanda de Almeida; Prado, Marcela de Almeida; Balducci, Ivan; Rocha, Rosilene Fernandes da. The influence of ovariectomy, simvastatin and sodium alendronate on alveolar bone in rats Braz oral res. 2007; 21(3): 247-52.

¹³⁶ Norton JT, Hayashi T, Crain B, Cho JS, Miller LS, Corr M, Carson DA. Cutting edge: nitrogen bisphosphonate-induced inflammation is dependent upon mast cells and IL-1. J Immunol. 2012; 188(7): 2977-80.

-
- ¹³⁷ Weinstein RS, Roberson PK, Manolagas SC. Giant osteoclast formation and long-term oral bisphosphonate therapy. *N Engl J Med.* 2009; 360(1): 53-62.
- ¹³⁸ Pierroz DD, Bonnet N, Baldock PA, Ominsky MS, Stolina M, Kostenuik PJ, Ferrari SL. Are osteoclasts needed for the bone anabolic response to parathyroid hormone? A study of intermittent parathyroid hormone with denosumab or alendronate in knock-in mice expressing humanized RANKL. *J Biol Chem.* 2010; 285(36): 28164-73.
- ¹³⁹ Allen MR, Erickson AM, Wang X, Burr DB, Martin RB, Hazelwood SJ. Morphological assessment of basic multicellular unit resorption parameters in dogs shows additional mechanisms of bisphosphonate effects on bone. *Calcif Tissue Int.* 2010; 86(1): 67-71.
- ¹⁴⁰ Rigalli A, Di Loreto V. Eds. *Experimental Surgical Models in the Laboratory Rat* Taylor and Francis Group. CRC Press. Boca Ratón. USA. ISBN 978-1-4200-9326-1. 2009; 77-81.
- ¹⁴¹ Vera de Fátima Padrão Correia, Celso L. Caldeira, Márcia Martins Marques. Cytotoxicity evaluation of sodium alendronate on cultured human periodontal ligament fibroblasts. *Dental Traumatology.* 2006; 22(6): 312-17.
- ¹⁴² Sommercorn L, Di Fiore P, Dixit S, Koerber A, Lingen M, Veis A, Effect of Alendronate on Immature Human Dental Root Explants *Journal of Endodontics.* 2000; 26(3): 133-37.
- ¹⁴³ Parra J, Fernández M, Rodríguez Lorenzo L, Vázquez B, López Bravo A, San Román J. Estudio de la biocompatibilidad in vitro de formulaciones acrílicas autocurables portador de bisfosfonatos de nueva síntesis *Biomecánica.* 2007; 15 (1): 49-62.
- ¹⁴⁴ Rigalli A, Ballina JC, Beinlich AD, Alloatti R, Puche RC. Pharmacokinetic differences between sodium fluoride and sodium monofluorophosphate and comparative bone mass increasing activity of both compounds in the rat. *Arzneim Forsch.* 1994; 44: 762-6.
- ¹⁴⁵ Rigalli A, Cabrerizo MA, Beinlich AD, Puche RC. Gastric and intestinal absorption of monofluorophosphate and fluoride in the rat. *Arzneim Forsch.* 1994; 44: 651-5.
- ¹⁴⁶ Rigalli A, Alloatti R, Menoyo I, Puche RC. Comparative study of the effect of sodium fluoride and sodium monofluorophosphate on glucose homeostasis in the rat. *Arzneimittelforschung,* 1995; 45(1): 289-92.

-
- ¹⁴⁷ Rigalli A, Pera L, Morosano M, Masoni A, Bocanera R, Tozzini R, Puche RC. In postmenopausal osteoporosis the bone increasing effect of monofluorophosphate is not dependent on serum fluoride. *Medicina*: 1999; 59: 157-61.
- ¹⁴⁸ Roy I Holland. Cytotoxicity of Sodium Monofluorophosphate *Acta Pharmacol Toxicol*. 1983; 53: 410-12.
- ¹⁴⁹ Rigalli A, Alloati R, Menoyo I, Puche RC. Comparative study on the effect of sodium fluoride and sodium monofluorophosphate on glucose homeostasis in the rat. *Arzneimittel – Forschung Drug Research*. 1995; 45(1): 289-92.
- ¹⁵⁰ Tresguerres Hernández Gil I, Alobera Gracia MA, del Canto Pingarrón M, Blanco Jerez L Bases fisiológicas de la regeneración ósea I. *Histología y fisiología del tejido óseo. Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2006; 11(1): 213-20.
- ¹⁵¹ Torres E, Mezquita P, De La Higuera M, Fernández D Muñoz M. Determinación de marcadores de remodelado óseo: una actualización. *Endocrinología y Nutrición*. 2003; 50(6): 237-43.
- ¹⁵² Igarashi K, Hirafuji M, Adachi H, Shinoda H, Mitani H Effect of bisphosphonates on alkaline phosphatase activity, mineralization, and prostaglandin E2 synthesis in the clonal osteoblast-like cell line MC3T3-E1 *Original Research Article Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*. 1997; 56(2): 121-25.
- ¹⁵³ Goes P, Melo I, Dutra C, Lima AP, Lima V Effect of alendronate on bone-specific alkaline phosphatase on periodontal bone loss in rats. *Archives of Oral Biology*. 2012; 57(11): 1537-44.
- ¹⁵⁴ Downs RW, Bell NH, Ettinger MP, Walsh B, Favus MJ, Mako B, et al. Comparison of alendronate and intranasal calcitonin for treatment in osteoporosis in postmenopausal women. *J Clin Endocrinol Metab*. 2000; 85: 1783-88.
- ¹⁵⁵ Mejía Delgado SP, Rigalli A. Comparación de los efectos del tratamiento con monofluorofosfato de sodio o fluoruro de sodio sobre el proceso de reparación ósea en ratas. *Actual Oseol*. 2013; 9(1): 28-35.

-
- ¹⁵⁶ Vega E, Bagur A, Mautalen CA Densidad mineral ósea en mujeres osteoporóticas y normales de Buenos Aires- Medicina. 1993; 53: 211-16.
- ¹⁵⁷ Pacífico Lucisano M, Filho Nelson P, Morse L, Battaglino R, Aranha Watanabe P, Bezerra Da Silva R, Bezerra Da Silva L. Radiodensitometric and DXA analyses for the measurement of bone mineral density after systemic alendronate therapy. *Braz Oral Res.* 2013; 27(3) 214-34.
- ¹⁵⁸ Velásquez FFH. Histomorfometría de la biopsia ósea previo marcaje y procesada sin descalcificar. *Patol Rev Latinoam.* 2009; 47(2): 112-19.
- ¹⁵⁹ Aramburú G, Aguzzi A, Hubert S, Virga C Estudio histopatológico sobre el efecto de una nueva formulación de alendronato administrado por vía subcutánea. *Acta Odontológica Venezolana.* 2009; 47(3) 1-14.
- ¹⁶⁰ D'Amelio P, Grimaldi A, Cristofaro MA, Ravazzoli M, Molinatti PA, Pescarmona GP, Isaia GC. Alendronate reduces osteoclast precursors in osteoporosis. *Osteoporos Int.* 2010; 21(10): 1741-50.
- ¹⁶¹ Jaime A, Anbinder A, Lima AP, Balducci I, Rocha R. The influence of local delivery of alendronate sodium on regeneration of calvarial defects in ovariectomized rats. *Cienc Odontol Bras.* 2005; 8(2):70-79.
- ¹⁶² Da Paz L. et al. Effect of 17 β -estradiol or alendronate on the bone densitometry bone histomorphometry and bone metabolism of ovariectomized rats. *Braz J Med Biol Res* 2001; 34(8): 1015-22.
- ¹⁶³ Brun LR, Pera LI, Rigalli A. Bone morphometry and differences in bone fluorine containing compounds in rats treated with Naf and MFP. *Biomedicine&Pharcotherapy.* 2010; 64: 1-6.
- ¹⁶⁴ Hernández-Flores C, Delgado A, Domínguez-Hernández VM. Evaluación biomecánica de un modelo de defecto óseo en tibia de rata. *Rev Mex de Ing Biomed.* 2011; 32(1): 12-19.
- ¹⁶⁵ Ferretti JL, Capozza R, Cointry G, Bozzini C, Alippi RM, Bozzini CE. Additive effects of dietary protein and energy deficiencies on diaphysis and bone tissue of rat femurs as determined by bending tests. *Acta Physiol Pharmacol Ther. Latinoam.* 1991; 41(2): 253-62.

¹⁶⁶ Zanchetta JR, Talbot JR. Osteoporosis: Fisiopatología, Diagnóstico, Prevención y tratamiento. Editorial Panamericana..Buenos Aires 2000; 57.

¹⁶⁷ Lauritzen DB, Balena R, Shea M, Seedor JG, Markatos A, Le HM, Toolan BC, Myers ER, Rodan GA, Hayes WC. Effects of combined prostaglandin and alendronate treatment on the histomorphometry and biomechanical properties of bone in ovariectomized rats J Bone Min Res. 1993; 8(7): 871–79.

¹⁶⁸ Yoshiaki A, Yasuhiro O, Hiroshi Ki, Tomohiro O, Mamoru K, Keiji K. Effects of Continuous Alendronate Treatment on Bone Mass and Mechanical Properties in Ovariectomized Rats: Comparison with Pamidronate and Etidronate in Growing Rats. The J Pharm. 2013; 1: 347.

¹⁶⁹ Giavaresi G, Fini M, Gnudi S, Mongiorgi R, Ripamonti C, Zati A, Giardino R The Mechanical Properties of Fluoride-Treated Bone in the Ovariectomized Rat. Calcified Tissue Int. 1999; 65(3): 237-41.