



# UNIVERSIDAD DE MURCIA

Departamento de Dermatología, Estomatología,  
Radiología y Medicina Física

Estudio del efecto de la aplicación sistémica de  
pamidronato disódico y ácido zoledrónico en hueso  
mandibular en un modelo de experimentación animal

**Dña. Susana Martínez Millán**

2015



# Estudio del efecto de la aplicación sistémica de pamidronato disódico y ácido zoledrónico en hueso mandibular en un modelo de experimentación animal

UNIVERSIDAD DE MURCIA

FACULTAD DE MEDICINA

Departamento de Dermatología, Estomatología,  
Radiología y Medicina Física

---

DÑA. SUSANA MARTÍNEZ MILLÁN

2015



UNIVERSIDAD DE  
MURCIA

D. PIA LÓPEZ JORNET , Profesora Titular de Universidad del Área de ESTOMATOLOGÍA en el Departamento de DERMATOLOGÍA, MEDICINA FÍSICA Y RADIOLOGÍA , AUTORIZA:

La presentación de la Tesis Doctoral titulada "ESTUDIO DE LA APLICACIÓN SISTEMICA DE PAMIDRONATO DISÓDICO Y ÁCIDO ZOLEDRÓNICO EN HUESO MANDIBULAR EN UN MODELO EXPERIMENTACIÓN ANIMAL ", realizada por D. SUSANA MARTÍNEZ MILLÁN , bajo mi inmediata dirección y supervisión, y que presenta para la obtención del grado de Doctor por la Universidad de Murcia.

En Murcia, a 28 de OCTUBRE de 2015

Mod:T-20



*Agradecimientos:*

*A mi directora, por su paciencia*  
*A mi familia, por su ayuda*  
*A Óscar, por su apoyo*  
*A Silvia, por compartir las prisas*  
*A Ascensión, Marta y Fabio*

*Dedicado a mi hijo Alejandro, por el tiempo robado,*  
*y a mi futura criatura, por no darle el reposo necesario.*



## ÍNDICE:

<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	<b>5</b>
1.1. Historia de los bisfosfonatos	6
1.2. Características químicas de los bisfosfonatos	8
1.3. Características farmacológicas de los bisfosfonatos	10
1.4. Clasificación de los bisfosfonatos	12
1.5. Mecanismo de acción de los bisfosfonatos	14
1.7. Indicaciones y aplicaciones clínicas	24
1.6. Osteonecrosis maxilar por bisfosfonatos	25
<b>2. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS</b>	<b>43</b>
2.1. Justificación	44
2.2. Objetivos	47
<b>3. METODOLOGÍA</b>	<b>48</b>
3.1. Material	49
3.2. Metodología	54
3.3. Tratamiento estadístico	66
<b>4. RESULTADOS</b>	<b>67</b>
4.1. Análisis morfométrico de las radiografías digitales	<b>68</b>
4.2. Análisis estereológico de la densidad vascular	<b>71</b>
4.3. Análisis estereológico de la densidad ósea	<b>73</b>
4.4. Microanálisis de elementos por microscopía electrónica de barrido	<b>75</b>
<b>5. DISCUSIÓN</b>	<b>79</b>
<b>6. CONCLUSIONES</b>	<b>98</b>
<b>7. BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>100</b>



# 1. INTRODUCCIÓN



## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1. Historia de los bisfosfonatos

La primera síntesis de los bisfosfonatos (BFs) ocurrió en Alemania en 1865. Sus primeros usos fueron industriales, como aceites, inhibidores de la corrosión, en la industria textil, y en los fertilizantes. El posterior descubrimiento de los BFs como agentes terapéuticos dio lugar a la aparición de un importante grupo de fármacos, cuyo uso se ha extendido en las últimas cuatro décadas; por tanto, las características biológicas de los BFs se conocen desde hace unos 40 años. En medicina, originalmente estos fármacos fueron usados como inhibidores de la reabsorción ósea en humanos. El etidronato, que fue el primer bisfosfonato usado para el tratamiento de enfermedades humanas, se había sintetizado un siglo antes. (Gutta & Louis 2007; Fleisch 1998)

En 1968 Fleisch hizo la primera publicación sobre las características biológicas de los BFs. A comienzos de la década de 1960 Fleisch probó que los pirofosfatos inorgánicos (PFI) prevenían la calcificación de los fluidos corporales por la unión con los cristales de hidroxiapatita. En estos estudios sobre el PFI encontraron que el plasma y la orina contienen compuestos que inhiben la precipitación del fosfato cálcico, y que parte de esta actividad inhibitoria era debida a dicho PFI, un compuesto que no se había descrito anteriormente en la literatura científica. Fue entonces cuando se demostró que el PFI afectaba *in vitro* la formación y disolución de los cristales de fosfato de calcio. Este efecto fue similar con el carbonato de calcio y, por esta razón, fueron utilizados en detergentes. Como el PFI era capaz de inhibir la calcificación ectópica *in vivo*, se sugirió que podría



actuar como un regulador fisiológico de la calcificación y descalcificación *in vivo*, estando su concentración local determinada por la actividad de pirofosfatasas locales.

El inconveniente era que las formas orales de estos compuestos eran inactivadas por las fosfatasas secretadas a nivel gastrointestinal. Debido a su falta de acción cuando se administra por vía oral y su rápida hidrólisis cuando se administra por vía parenteral, el pirofosfato se usa de forma terapéutica sólo en la escintigrafía (Fleisch 1998).

Esto llevó a la búsqueda de análogos estables de los pirofosfatos inorgánicos, que mostraran actividades físico-químicas similares, pero resistentes a la hidrólisis enzimática y, por tanto, que no se degraden metabólicamente. Surgieron entonces los difosfonatos [actualmente llamados bisfosfonatos (BFs)]. Los BFs toleraban bien la vía oral sin ser inactivados, y esto fue el elemento clave en su éxito. También inhiben la disolución de los cristales de hidroxiapatita. Estudios posteriores probaron que evitan la reabsorción ósea inhibiendo la actividad osteoclástica (Gutta & Louis 2007).

El valor potencial de los BFs para su uso clínico fue considerado en la década de 1970, centrándose a partir de ahí los esfuerzos de investigación en el desarrollo de compuestos más potentes en la actividad antireabsortiva, pero sin capacidad para inhibir la mineralización. Los BFs han ido evolucionando desde esas primeras formas utilizadas en Medicina. A principios de la década de 1990 eran usados como agente diagnóstico en diversas alteraciones óseas y del metabolismo del calcio (Hewitt & Farah 2007), y actualmente su uso está muy extendido en la terapéutica de estas alteraciones, como metástasis óseas, enfermedad de Paget u osteoporosis.



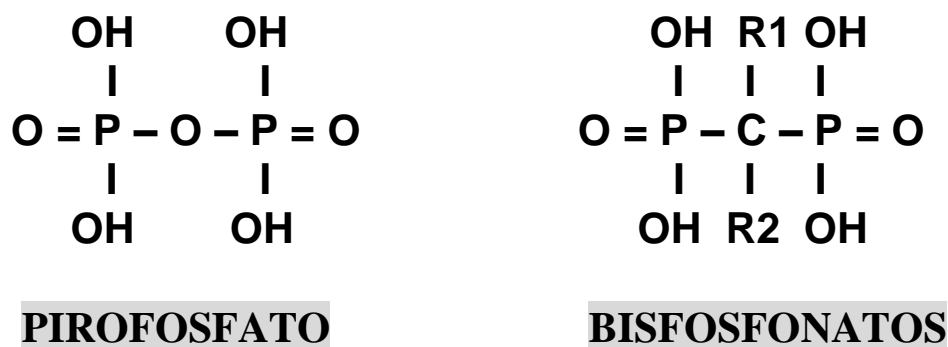


A pesar del tiempo que se llevan empleando estos compuestos como agentes terapéuticos, hoy en día aun no están claros todos los mecanismos de acción a nivel celular y molecular, que siguen siendo investigados.

## 1.2. Características químicas de los bisfosfonatos

Los bisfosfonatos son compuestos químicamente estables derivados del pirofosfato inorgánico (PFI), un compuesto que se produce de manera natural en los organismos, en el cual dos grupos fosfato están unidos por esterificación a una molécula de oxígeno. En el PFI, los dos grupos fosfato están unidos por enlaces fosfoanhidrido, que es extremadamente inestable; sin embargo, en los BFs los dos grupos fosfonato están unidos al átomo de carbono central por enlaces fosfoéster, que son muy resistentes a la hidrólisis. El átomo central de carbono puede formar dos enlaces covalentes adicionales, y las cadenas laterales resultantes se suelen referir como R1 y R2. La parte P-C-P de los BFs es la responsable de su gran afinidad por los iones metálicos divalentes (como los iones de calcio, magnesio o hierro) y por el hueso. Los dos grupos fosfato tienen una doble acción, por un lado se requieren para la unión a los minerales óseos, y por otro a las células mediadoras de la actividad antireabsortiva. Cuando además la cadena R1 es un grupo hidroxilo, estos compuestos son capaces de quelar los iones de calcio con mayor efectividad, por una unión tridentada, en vez de bidentada. A diferencia de los PFIs, casi todos los BFs de uso clínico actualmente tienen un grupo hidroxilo unido al carbono central en esta posición R1 (Santini y cols. 2003; Bäckman y cols. 2008).

**Figura 1.1.** Estructura química del pirofosfato inorgánico y de los bisfosfonatos.



El etidronato fue el primer bisfosfonato utilizado para el tratamiento terapéutico en humanos, y fue sintetizado hace más de 100 años. Consiste en una estructura química simple, donde la cadena R1 es un grupo hidroxilo (-OH), y la cadena R2 es un grupo metilo (-CH3). Cuando la longitud de la cadena lateral R2 es aumentada de un simple grupo metilo a cadenas alquílicas más largas se obtienen compuestos significativamente más potentes. Con la introducción de un grupo amino primario (-NH<sub>2</sub>) en el extremo de la cadena alquílica R2, se obtuvo un incremento de su potencia por 1000, formando así los amino-bisfosfonatos (p.ej. pamidronato, alendronato y neridronato). Los amino-bisfosfonatos con un grupo amino secundario (p.ej. incadronato) y un grupo amino terciario (p.ej. olpadronato) son aún más efectivos, y su potencia alcanza el pico máximo cuando el nitrógeno terciario está incluido en una estructura de anillo en la cadena lateral R2 (como en el risedronato y ácido zoledrónico). Cada BF tiene sus propiedades químicas, bioquímicas y biológicas características, las cuales implican que no es posible extrapolar los resultados de un compuesto a otro con respecto a sus acciones (Santini y cols. 2003; Dunford y cols. 2001).

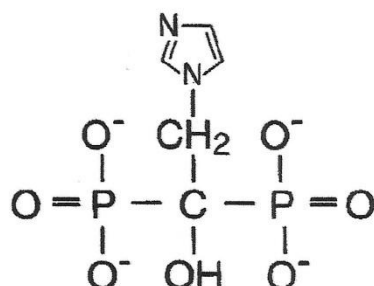


### 1.3. Características farmacológicas de los bisfosfonatos

La farmacología clínica de los BFs se caracteriza por una absorción intestinal baja, pero una altísima localización y aposición selectiva en hueso. Al no ser biodegradables, son absorbidos, almacenados y excretados por el organismo sin metabolizarse. Mientras que la biodisponibilidad de una dosis intravenosa es del 100%, en la administración por vía oral se reduce al 1-5%. La absorción vía oral es realizada por difusión pasiva en el estómago y en el intestino. La vida media en plasma es de 1-2 horas. Aproximadamente el 50-80% del bisfosfonato disponible es rápidamente captado por el hueso. El 20-50% restante se excreta por la orina sin ser metabolizado. Dicha captación por el hueso se aumenta en condiciones de alto remodelado óseo o de menor excreción renal. El recambio óseo en los maxilares es mayor comparado con el resto del esqueleto, especialmente en la cresta alveolar. Tras integrarse en el hueso, los BFs son liberados únicamente cuando el hueso es destruido durante la remodelación. En humanos, la vida media en el esqueleto de los distintos BFs va desde 3 meses hasta los 10 años. La inhibición de la reabsorción ósea alcanza a un nivel estable incluso cuando el compuesto se administra continuamente, como se ha visto en varios estudios en animales (Gutta & Louis 2007; Fleisch 1998; Fleisch 2003; Torregrosa y cols. 2010).

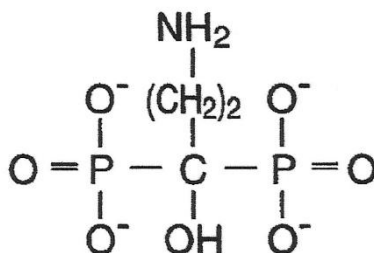
**Figura 1.2.** Estructura química del ácido zoledrónico

[1-hidroxi-2-(1H-imidazol-1-il)etilideno] bis-fosfonato



**Figura 1.3.** Estructura química del pamidronato disódico.

(3-amino-1-hidroxi-propilideno) bis-fosfonato



- Dosificación de los bisfosfonatos:

El pamidronato, BF de la 2º generación, se administra vía intravenosa en periodos de 2 a 24 horas, cada 3 a 4 semanas, a una dosis de 90 mg. El ácido zoledrónico, perteneciente a la tercera generación, es el BF más potente actualmente en el uso clínico. En comparación con el pamidronato, el ácido zoledrónico es significativamente más efectivo en el control de la hipercalcemia maligna y reduciendo el número total de eventos relacionados con los huesos. El ácido zoledrónico se administra por infusión intravenosa mensual en dosis de 4 mg en un período de 15



minutos. Si es tolerado, no es inusual mantener a los pacientes con esta terapia indefinidamente. Las preparaciones orales con BFs (alendronato, risedronato) son también potentes inhibidores de los osteoclastos, pero no son tan eficaces en el tratamiento de enfermedades osteolíticas malignas, y sólo están indicados para el tratamiento de la osteoporosis (Ruggiero y cols. 2004).

Teóricamente, a mayor potencia del fármaco, la dosis y la frecuencia de administración deben ser menores, aunque se incrementa el riesgo de acumulación y la probable toxicidad y efectos secundarios como son fiebre, deterioro de la función renal, supresión excesiva del remodelado óseo, dolor músculo-esquelético severo, respuesta inflamatoria aguda, fibrilación auricular e hipocalcemia entre otros.

#### **1.4. Clasificación de los bisfosfonatos**

Con respecto a la clasificación de los BFs, la diferencia entre ellos viene dada por la unión al carbono de la cadena lateral R2 y la presencia o ausencia de un átomo de nitrógeno o no en dicho grupo.

##### Bisfosfonatos no nitrogenados:

Dentro de este grupo los más conocidos y empleados en clínica son el etidronato, clodronato y el tiludronato. Hoy en día se siguen usando de forma habitual. Son rápidamente metabolizados por los osteoclastos, incorporándose a las moléculas del recién formado adenosín trifosfato (ATP) de las aminoacil-ARNsintetasas clase II después de la transferencia mediada por osteoclastos desde la superficie mineral ósea. Se cree que la

acumulación intracelular de estos análogos de ATP no hidrolizables es citotóxica para los osteoclastos por inhibir la acción de múltiples procesos celulares ATP-dependientes, llevando a los osteoclastos a la apoptosis (Russell 2007).

#### Bisfosfonatos nitrogenados:

Los BFs de nueva generación o BFs nitrogenados (BFs-N) son los BFs que contienen nitrógeno y son mucho más potentes. Por lo tanto se acumulan en el hueso y tienen un efecto continuo cuyo resultado está relacionado posiblemente con las necrosis óseas. Tiene 2 acciones principales, como son la inducción de otro análogo del ATP que induce apoptosis, y la inhibición de la farnesil pirofosfato sintetasa (FPFS), la cual es una enzima que forma parte de la ruta del mevalonato encargada de la síntesis del colesterol. Dentro de este grupo se incluyen el pamidronato, ácido zoledrónico, alendronato, ibandronato y risedronato.

Actualmente se está sustituyendo esta clasificación, y se están comenzando a separar los BFs por generaciones, en las cuales la primera generación estaría formada por los BFs no nitrogenados (BFs-NN), debido a su similitud estructural cercana al PFI. La segunda generación estaría formada por los BFs-N más potentes que los de primera generación, como el pamidronato (que difiere de los de la primera generación en que inhibe la reabsorción ósea a una dosis que no afecta la mineralización), y los de tercera generación, como el ácido zoledrónico, que es el más potente de los BFs-N, y que muestra una fuerte actividad antiosteoclástica similar al pamidronato. (Tabla 1.1)

**Tabla 1.1.** Potencia y vía de administración de los bisfosfonatos

BISFOSFONATO	VIA ADMINISTRACIÓN	GRUPO	POTENCIA
Etidronato	Oral	No Nitrogenado	1
Clodronato	Oral	No Nitrogenado	10
Tiludronato	Oral	No Nitrogenado	50
Alendronato	Oral	Nitrogenado	1.000
Risedronato	Oral	Nitrogenado	1.000
Ibandronato	Oral/Intavenoso	Nitrogenado	1.000
Pamidronato	Intravenoso	Nitrogenado	1.000-5.000
Zoledronato	Intravenoso	Nitrogenado	10.000

### 1.5. Mecanismo de acción de los bisfosfonatos

Estudios pioneros en la década de 1960 demostraron que los BFs eran capaces de inhibir la calcificación por la unión a los cristales de hidroxapatita (HA). Los efectos físico-químicos de la mayoría de los BFs son muy similares a los de sus análogos naturales PFIs. Así pues, inhiben la formación y agregación de cristales de fosfato cálcico, incluso a concentraciones muy bajas, bloquean la transformación de fosfato cálcico amorfo a HA y retrasan la agregación de cristales de apatita. Los BFs también retrasan la disolución de estos cristales de HA, motivo por el cual se investiga la acción de estos compuestos en la reabsorción del hueso *in vivo*.



Todos estos efectos parecen estar relacionados con la marcada afinidad de estos compuestos por la superficie de la fase sólida del fosfato cálcico donde se unen dentro del calcio por quimioabsorción. En consecuencia, la retención esquelética de los BFs depende de la disponibilidad de puentes de unión en la HA. Los BFs son preferentemente incorporados en las localizaciones donde hay una remodelación ósea activa, lo que comúnmente se produce en zonas caracterizadas por recambio esquelético acelerado. Los BFs que no son captados en el esqueleto se eliminan rápidamente de la circulación por excreción renal.

Además de su capacidad de inhibir la calcificación, los BFs inhiben la degradación de HA, lo que suprime la reabsorción de hueso, y estas propiedades de los BFs es lo que ha llevado a su utilidad como agentes clínicos. Más recientemente, se ha sugerido que los BFs también pueden limitar tanto la función de apoptosis de los osteoblastos como la de los osteocitos.

Sin embargo, la osteoclasia normal es vital para el recambio óseo y la viabilidad de los huesos. Los osteocitos se desarrollan a partir de los osteoblastos, los cuales han segregado cristales de HA en una matriz de colágeno mineralizada, conocida como hueso mineralizado, que luego encierra al osteocito. El osteocito es una célula terminal con una esperanza de vida de alrededor de 150 días. Así pues el osteocito, acabado su tiempo de vida normal, ya no puede mantener la matriz mineral que lo rodea, y se desarrollan las microfracturas.

La osteoclasia normal reabsorbe el hueso no vital, y libera citoquinas, como la proteína morfogenética ósea (PMO) y los factores de crecimiento de la insulina 1 y 2 (ILG1 e ILG2), que normalmente inducen a



las células madre mesenquimales, y a los osteoblastos premitóticos, a diferenciarse en hueso activo formando osteoblastos. La interrupción de este ciclo homeostático por la inhibición eficaz en la resorción ósea da como resultado la acumulación de osteocitos no vitales y microfracturas de la antigua matriz mineral.

Los estudios han demostrado que, además de la inhibición de los osteoclastos, los BFs, particularmente los nitrogenados más potentes, también inhiben la metástasis ósea y reducen la carga tumoral de los tumores óseos. Aunque los BFs varían en su potencia, comparten la capacidad de persistir en el hueso durante un periodo prolongado en el que no se aprecia metabolización. En general, parece que los BFs alteran el microambiente del hueso por lo que es menos favorable para la colonización de las células tumorales. Desafortunadamente, estos cambios también alteran los mecanismos homeostáticos normales del hueso y probablemente sean menos favorables para las células óseas normales.

#### Mecanismo de acción a nivel molecular

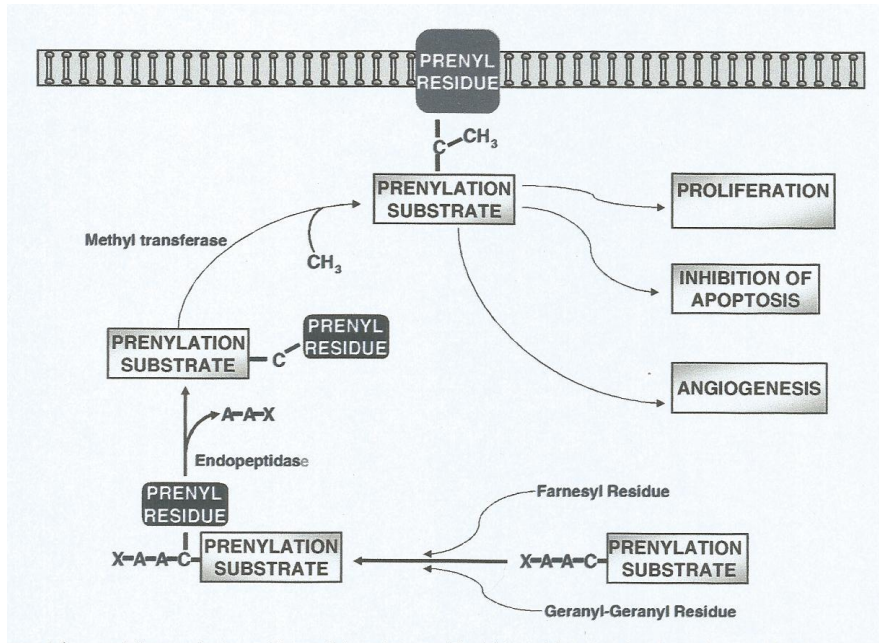
Los BFs-N son potentes inhibidores de la síntesis de los residuos lipídicos farnesil y geranylgeranil y, por tanto, de la isoprenilación. Las consecuencias de esta inhibición son la ruptura de importantes vías de transducción de señales que regulan la proliferación, las propiedades invasivas y la actividad pro-angiogénica de las células tumorales humanas. De hecho, la adición de un residuo lipídico a todas las pequeñas proteínas de unión a GTP es esencial para su correcta localización en la parte interna de la membrana plasmática y para su consecuente activación por señales externas. Se deben co-localizar con sus efectores, que están situados en la parte interna de la membrana plasmática, en cuya localización también se



encuentran los substratos necesarios para mediar en las diferentes funciones de este tipo de moléculas (Caraglia y cols. 2006).

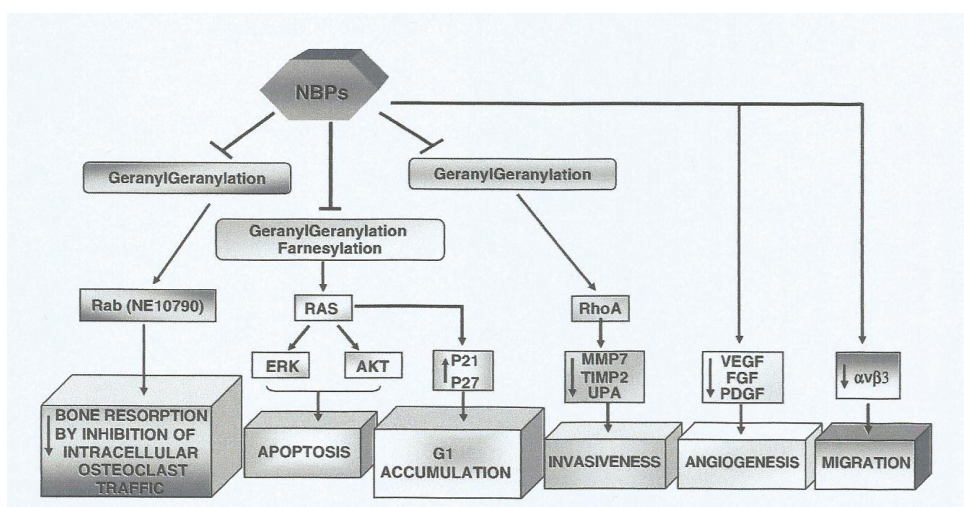
En las células humanas, los isoprenoides se derivan de la ruta del mevalonato, que comienza con una reacción catalizada por la HMGCCoA reductasa (la reacción limitante de la síntesis del colesterol), que cataliza la conversión del HMGCCoA en ácido mevalónico. La ruta arrancada por esta reacción puede llevar a la síntesis de una molécula isoprenoide clave: el farnesil-pirofosfato (FPF), cuya formación es catalizada por la farnesilpirofosfato sintasa (FPFS). El FPF puede ser convertido por una serie de reacciones a colesterol; transferido en proteínas diana celulares como FPF (reacción catalizada por la farnesiltransferasa); o primero convertido en geranilgeranil-pirofosfato y de ahí transferido a las proteínas celulares por la geranilgeraniltransferasa tipo I o tipo II. Los grupos isoprenoides se unen a las cisteínas polipeptídicas a través de uniones tioéster (C-S-C). La conversión del receptor de la proteína-cisteína a proteína-serina en el oncogén H-Ras previene la prenilación y abole su capacidad de transformación maligna. Tras todo el proceso de isoprenilación, finalmente la proteína está lista para ser translocada en las membranas celulares para recibir señales intra o extracelulares. (Caraglia y cols. 2006). (Figuras 1.4 y 1.5)

**Figura 1.4.** Esquema del mecanismo de isoprenilación de sustratos intracelulares



(Tomado de: Caraglia M et al. *Emerging anti-cancer molecular mechanisms of aminobisphosphonates*. *Endocrine-related Cancer* 2006; 13:7-26)

**Figura 1.5.** Esquema de las dianas moleculares intracelulares y mecanismos de acción de los bisfosfonatos nitrogenados



Tomado de: Caraglia M et al. *Emerging anti-cancer molecular mechanisms of aminobisphosphonates*. *Endocrine-related Cancer* 2006; 13:7-26)



### Efectos sobre osteoblastos, osteoclastos y osteocitos

Los BFs-NN pueden acumular intracelularmente análogos del ATP en los osteoclastos, e inducir su apoptosis. Los BFs nitrogenados, más potentes (como pamidronato, risedronato, zoledronato y alendronato), inhiben la síntesis de esteroides vía la ruta del mevalonato, induciendo la apoptosis de los osteoclastos e inhibiendo la reabsorción ósea a través de un mecanismo diferente a los empleados por los BFs no nitrogenados. La farnesil difosfato (FPP) sintasa es la enzima de la ruta del mevalonato inhibida específicamente en los osteoclastos. Concentraciones nanomolares de estos BFs son suficientes para inhibir esta enzima. Los BFs nitrogenados más potentes actúan como análogos del lípido difosfato isoprenoide inhibiendo la FPP sintasa en la ruta del mevalonato. Estos compuestos inhiben lípidos isoprenoides esenciales para la farnesilación post-transaccional y la geranilación de las proteínas de señalización GTPasa. La pérdida de estas proteínas señalizadoras es instrumental en la pérdida de la actividad reabsortiva y la apoptosis de los osteoclastos.

Los BFs actúan a nivel celular en los osteoclastos e interrumpen su función de distintas formas. Inhiben el reclutamiento de los osteoclastos, reduce el periodo vital de éstos, e inhiben la actividad en la superficie ósea de estas células. De esta forma se ve afectada la reabsorción del hueso. En términos moleculares, la función osteoclástica se ve alterada por la interacción de los BFs con receptores de superficie celulares así como de enzimas intracelulares (Hewitt & Farah 2007).

Los BFs también actúan sobre los osteoclastos indirectamente a través de sus efectos sobre los osteoblastos. Esto ocurre por la alteración en

la secreción osteoblástica de factores paracrinos solubles implicados en la regulación de la actividad osteoclastica.

### Efectos sobre la angiogénesis

Se ha descrito el efecto antiangiogénico de los BFs sobre las masas tumorales, aunque su efecto a nivel óseo aún es objeto de estudio. El ácido zoledrónico es el que mayor potencia antiangiogénica presenta.

El factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF) es una potente señal pro-angiogénica para las células endoteliales. El receptor VEGF2 es el receptor principal de las señales VEGF en las células endoteliales. Los efectos del ácido zoledrónico en la migración de las células endoteliales, la expresión de la proteína VEGFR2 y la respuesta al VEGF son atenuadas por el geranilgeranil pirofosfato. El ácido zoledrónico induce una acumulación aberrante de VEGF2. Esto no es por la inducción de la transcripción ARNm, sino por la disrupción de la vía del mevalonato.

El VEGF interactúa con muchos receptores, incluyendo el VEGFR1/fms-like tirosina quinasa (FLT)-1 y el VEGFR2/KDR/FLK-1 (quinasa hepática fetal 1). Las evidencias experimentales muestran al VEGFR2 como el mayor receptor en la mediación de las señales celulares en respuesta al VEGF en células endoteliales. La activación selectiva del VEGFR1 no induce migración celular o liberación de calcio intercelular en células endoteliales; en contraste, la inactivación funcional del VEGFR2 por un anticuerpo de bloqueo interrumpe la angiogénesis. Las células endoteliales estimuladas por el VEGF fosforilan el VEGFR2 y disminuyen la llegada a los objetivos de las señales, como la PLC- $\gamma$ . Esto sugiere que la VEGFR2 es el principal receptor responsable de la transducción de la

señal durante la estimulación por VEGF en células endoteliales (Basi y cols. 2010).

En resumen, los efectos del ácido zoledrónico sobre la angiogénesis son:

- Inhibición de la quimiotaxis de las células endoteliales hacia el VEGF, lo que es contrarrestado por la GGPP.
- Acumulación de VEGFR2 dentro de las células endoteliales
- El VEGFR2 no se altera tras la estimulación con VEGF en células endoteliales tratadas con ácido zoledrónico.

#### Efectos sobre las células epiteliales

Algunos autores creen que el efecto citotóxico de los bisfosfonatos sobre las células epiteliales juega un papel importante en el desarrollo de la osteonecrosis maxilar por bisfosfonatos (ONM) (Reid 2007). Estos efectos aún están por investigar en profundidad. Se sabe de la toxicidad de los BFs sobre distintas estirpes celulares y, aunque en estudios animales se ha descrito una reducción importante de la MMP-9 (metaloproteinasa de la matriz 9, responsable de la migración de las células epiteliales para reepitelización de heridas) en células epiteliales tras la administración de ácido zoledrónico (Allam y cols. 2011), esto no es concluyente para aclarar el papel de los bisfosfonatos en la deficiente cicatrización de las lesiones por ONM.



## Efectos sobre las células tumorales

- Efectos antitumorales directos:

El mecanismo antitumoral primario de los bisfosfonatos es la inducción de la apoptosis en los osteoclastos y las células tumorales. Los BFs han demostrado efectos pro-apoptoicos directos en diferentes líneas celulares cancerosas, en un patrón tiempo- y dosis-dependiente. Tanto los BFs-NN como los BFs-N son efectivos induciendo la apoptosis de las células tumorales, pero los nitrogenados tienen una mayor potencia. Hay que reseñar que la concentración de BFs necesaria para inducir apoptosis en la célula tumoral es mayor (10-100  $\mu\text{mol/L}$ ) que la necesaria para la inducción de la apoptosis del osteoclasto, resaltando la importancia de conseguir niveles farmacocinéticos de BFs para conseguir los efectos anti-tumorales. El ácido zoledrónico induce apoptosis en líneas celulares humanas de cáncer de mama por la liberación mitocondrial del citocromo C e iniciando la vía de la caspasa-3. Además la regulación pro-apoptoica de la proteína bcl-2, y la inhibición de la activación Ras por el bloqueo de enzimas involucradas en la prenilación de proteínas, puede contribuir a los efectos del ácido zoledrónico sobre la apoptosis de las células tumorales. También hay evidencias que sugieren que los BFs nitrogenados tienen efectos anti-apoptoicos aditivos o sinérgicos con agentes citotóxicos estándar (Morgan & Lipton 2010).

Los BFs también están fuertemente implicados en la inhibición de la adhesión e invasión de las células tumorales, que representan pasos clave en el proceso de la metástasis. Los BFs pamidronato, alendronato, clodronato, ibandronato, y ácido zoledrónico llevan a una inhibición específica y dosis- dependiente de la adhesión a la matriz ósea mineralizada y no mineralizada de las células de carcinoma de próstata y de pecho, que



no se extiende a las células normales. Se ha propuesto que a bajas concentraciones en el rango sub-micromolar, los BFs median los efectos de la invasión de las células tumorales vía inhibición de la ruta del mevalonato que lleva a la prenilación de la guanosina trifosfatasa (GTPasa); esta inhibición se revierte parcialmente por la adición de productos intermedios de la ruta del mevalonato, geranilgeraniol y trans-trans-farnesol. A mayores concentraciones los BFs inhiben la actividad de la metaloproteínasa de la matriz, que resulta en la degradación de la matriz extracelular, un paso crítico para la migración y la invasión de las células tumorales.

- Efectos antitumorales indirectos:

La relación bidireccional entre los factores de crecimiento derivados del hueso y el tumor instiga el auto sostenimiento del círculo vicioso del desarrollo y progresión de las metástasis óseas. Numerosos factores de crecimiento encontrados en hueso, como IGF-I, IGF-II y factor FGF-2, se han visto implicados en la promoción de la proliferación de las células tumorales in vitro. El tratamiento con BFs como el clodronato, ibandronato, pamidronato y ácido zoledrónico revierte total o parcialmente los efectos estimulatorios de dichos factores en la proliferación de células de cáncer de mama.

Las evidencias preclínicas indican que los BFs son potentes inhibidores de la angiogénesis, un proceso clave en el crecimiento y la progresión del tumor.

Los BFs-N además tienen propiedades inmunomoduladoras, particularmente en relación con la regulación de la inmunovigilancia del huésped mediada por células T- $\gamma$ - $\delta$  de las células tumorales. Además de



activar la función citolítica de las células T- $\gamma$ - $\delta$ , el ácido zoledrónico induce la maduración de la producción del interferón  $\gamma$  de estas células, y regula la expresión de los receptores de superficie como CD40, CD80 y CD83 (Morgan & Lipton 2010).

### 1.6. Indicaciones y aplicaciones clínicas de los bisfosfonatos

Los BFs poseen una notable eficacia en el tratamiento de procesos asociados a un incremento de la reabsorción ósea, siendo inicialmente utilizados en la enfermedad de Paget, en la hipercalcemia maligna, mieloma, metástasis óseas y osteoporosis. Los BFs intravenosos son usados principalmente en el tratamiento de pacientes oncológicos. Los BFs vía oral están indicados principalmente para el tratamiento de la osteoporosis, la cual puede estar presente en el contexto de otras enfermedades (como enfermedad intestinal inflamatoria o cirrosis biliar primaria), como resultado del uso de otros fármacos (principalmente esteroides), o como consecuencia de la menopausia.

**Tabla 1.2.** Indicaciones clínicas de los bisfosfonatos.

INDICACIONES DE LOS BISFOSFONATOS
Prevención y tratamiento de la osteoporosis en mujeres posmenopáusicas
Aumentar la masa ósea en hombres con osteoporosis
Tratamiento de la osteoporosis inducida por glucocorticoides
Tratamiento de la enfermedad de Paget
Hipercalcemia maligna
Metástasis óseas de tumores sólidos
Lesiones osteolíticas del mieloma

## 1.7. Osteonecrosis maxilar por bisfosfonatos (ONM)

### 1.7.1. Concepto:

La ONM por BFs aparece por primera vez en la literatura científica en 2003, en el artículo publicado por Marx y cols., en el que describen 36 casos de ONM asociados a BFs intravenosos, más concretamente a pamidronato y ácido zoledrónico. Al año siguiente, Ruggiero y cols. presentan otros 63 nuevos casos, entre los que figuran 7 asociados a BFs orales. En 2005 Bagán y cols. publican la primera serie de casos en España y en Europa.

Estos autores descubrieron lesiones similares a la osteorradionecrosis en los maxilares de pacientes que no habían recibido radioterapia en cabeza ni cuello. La característica común a todos estos pacientes era el tratamiento con BFs. Las lesiones recordaban a las producidas en el siglo XIX en los trabajadores de la industria del fósforo (conocida esta enfermedad como *phossy jaw*), y de ahí se intuyó su relación con los BFs (Ruggiero y cols. 2006).

En la actualidad, la ONM es reconocida como una complicación significativa relacionada con el uso de BFs. Estos fármacos son comúnmente utilizados en alteraciones óseas causadas principalmente por metástasis óseas (mayoritariamente de mama, pulmón y próstata), hipercalcemia maligna, enfermedad de Paget y, sobre todo, en la osteoporosis.

Según publicó la AAOMS en 2007, y que ha sido revisado en 2014, las lesiones susceptibles de ser clasificadas como ONM por BFs son las que:

- Se presentan en pacientes en tratamiento o que han recibido fármacos antireabsortivos (BFs) o antiangiogénicos.
- Presentan exposición de hueso necrótico en el territorio maxilofacial de más de 8 semanas de evolución, o fístula intra ó extraoral que llega a hueso, y
- No han recibido radioterapia en los maxilares no presentan metástasis maxilares. (Ruggiero y cols. 2014)

Tomando como referencia lo anterior, el panel de expertos español liderado por el profesor Bagán, publicó en 2008 los criterios:

- Paciente que recibe o ha recibido tratamiento con bisfosfonatos IV.
- Presencia de una o varias lesiones ulceradas en la mucosa de los procesos alveolares, con exposición de hueso maxilar o mandibular. La presencia de dolor o fístulas debe alertar sobre una posible lesión incipiente.
- El hueso expuesto presenta un aspecto necrótico.
- La lesión se presenta de forma espontánea, o más frecuentemente tras una cirugía dento-alveolar (sobre todo tras exodoncias).
- Ausencia de cicatrización durante un periodo de al menos 8 semanas.

### 1.7.2. Epidemiología

La incidencia real de la ONM se desconoce actualmente, y las cifras difieren entre los distintos autores. Esto puede ser debido a que el número de pacientes varía de unas series a otras, y a que faltan estudios prospectivos. Además, hay que tener en cuenta que la vida media de estos fármacos está entre 1 y 10 años, y debe todavía determinarse, su efecto acumulativo en el hueso. Por ello, es importante tener presente que la

incidencia de esta patología puede cambiar en los próximos años (Bocanegra-Perez 2010).

### 1.7.3. Etiopatogenia

La etiopatogenia de la ONM se desconoce. Se han descrito una serie de factores relacionados con esta enfermedad como son alteración de la inmunidad y de los mecanismos reparadores, debidos a la neoplasia.

- Compromiso vascular
- Bajo recambio óseo
- Toxicidad ósea de los bisfosfonatos
- Toxicidad de los bisfosfonatos en los tejidos blandos
- Otros.

Con respecto a los factores de riesgo de la ONM encontramos:

- Relacionados con los fármacos:
  - Potencia del bisfosfonato: los BF-N son los más potentes. Vía de administración.
  - Dosis acumulada
  - Duración de la terapia.
- Relacionados con factores locales:
  - Cirugía dentoalveolar
  - Anatomía: más frecuente en mandíbula.
  - Enfermedades concomitantes.
- Relacionados con factores demográficos y sistémicos:
  - Edad.
  - Raza: Caucásica
  - Cáncer: Mieloma, cáncer de mama, cáncer de próstata, de pulmón
- Otros factores:
  - Terapia con corticoides

- Diabetes
- Tabaco
- Alcohol
- Higiene bucal deficiente
- Otros agentes quimioterápicos: Metotrexato, Tamoxifeno, Vincristina, Ciclofosfamida, 5-Fluorouracilo, Melfalan

#### 1.7.4. Clínica

La ONM por BFs presenta una serie de manifestaciones muy características que la hacen fácilmente reconocible por su clínica, siendo las pruebas complementarias una ayuda, pero no esenciales para el primer diagnóstico en el paciente.

El inicio suele ser con dolor, supuración o bien manifestándose como una falta de cicatrización en el proceso alveolar.

En los protocolos y consensos sobre ONM por BFs se acepta que el criterio para diagnosticar esta lesión será la presencia de una exposición ósea maxilar o mandibular con la visión de un hueso necrótico. Sin embargo hay algunos casos en los que el paciente antes de producirse la exposición presenta una supuración a través de alguna fístula oral en el proceso alveolar, acompañada o no de dolor.



Los síntomas y signos de la ONM por BFs son:

- Dolor: este es progresivo y mantenido, en ocasiones necesitando importantes dosis de analgésicos para controlarlo. Cabe señalar que en situaciones iniciales el paciente está asintomático.
- Supuración a través de alguna fístula gingival.
- Exposición de hueso necrótico maxilar o mandibular a través de una solución de continuidad de la mucosa.



La exposición ósea suele tener un diámetro entre 0'5 y 2 cm, con la particularidad de que es frecuente que sean varias las zonas expuestas de forma simultánea en un mismo paciente. Con el paso del tiempo las lesiones pueden ir incrementándose en tamaño, sobre todo con los BFs intravenosos, pudiendo producir fistulizaciones a piel, comunicaciones orosinusales e incluso originar de forma más infrecuente fracturas mandibulares. Las lesiones son muy similares a las que suceden en el paciente con osteorradionecrosis.

Con relación a la localización, la ONM es más frecuente en mandíbula que en maxilar; y dentro de la mandíbula sobre todo en las áreas molares.

Existen 3 estadios en la evolución de la ONM por bisfosfonatos, cuya catalogación nos ha de ser de gran ayuda para establecer y planificar el tratamiento:

- Estadio 1: caracterizado por exposición ósea asintomática, sin signos clínicos de inflamación ni de infección.
- Estadio 2: caracterizado por exposición ósea con infección, acompañada de dolor, eritema e inflamación de la mucosa, con o sin supuración.
- Estadio 3: caracterizado por exposición ósea asociada a dolor, inflamación e infección que es difícil de tratar con antibioterapia oral o intravenosa. La presencia de fístula cutánea secundaria a la osteonecrosis o a fractura patológica es frecuente en este estadio.



Bagán y cols. proponen subdividir el estadio 2 en dos apartados:

- Apartado 2a: este primer subapartado debería incluir aquellos pacientes con un hueso expuesto necrótico, o bien aquellos con fístulas y dolor e infección, que responden bien a los tratamientos conservadores. Se trata de pacientes que consideramos “estables” en la progresión de la ONM, ya que no avanza o no se agrava la necrosis ni los signos derivados de ella.
- Apartado 2b: correspondería a los pacientes del apartado 2a que a pesar de los tratamientos conservadores propuestos, sus lesiones progresan y se agravan, bien en la extensión de la zona expuesta o en las complicaciones infecciosas derivadas de ella, pero que todavía no presentan una fractura mandibular, una fístula extraoral, o bien una gran osteolisis que llegue al borde inferior mandibular; es decir, no tiene los datos considerados como para pertenecer al estadio 3.

Esta clasificación nos sirve de guía a la hora de instaurar el tratamiento de estas lesiones. Aún no se ha encontrado un tratamiento realmente efectivo en todos los casos, y estas pautas son recomendaciones, no son definitivas. Muchos de los casos no curan, sólo se consigue atenuación de los síntomas, tomándose en ocasiones esto como éxito del tratamiento.

#### 1.8.5. Diagnostico

En cuanto a las pruebas complementarias, como se indicó anteriormente, solamente con la clínica es suficiente para el diagnóstico, según los protocolos y consensos actuales. Sin embargo, en los casos que





puedan surgir dudas diagnósticas con la metástasis es aconsejable realizar una biopsia.

En la ONM el resultado de una osteomielitis crónica con zonas de secuestro óseo y frecuente infección por *Actinomyces* nos ayudarán a establecer el diagnóstico.

Otra prueba de laboratorio que recomendamos es el cultivo y antibiograma de la zona expuesta, ya que estos pacientes van a requerir prolongados tratamientos con antibióticos, por lo que es de gran utilidad conocer el espectro bacteriano existente y su sensibilidad de estos microorganismos a los diferentes antibióticos disponibles.

Habitualmente, las alteraciones radiográficas no son evidentes hasta que la afectación ósea está muy avanzada, por lo que en los estadios iniciales de ONM no se detectarán cambios. Las manifestaciones radiográficas iniciales pueden simular una enfermedad periodontal, mientras que las avanzadas son compatibles con una osteomielitis, o bien un tumor primario o una metástasis ósea, en el caso de pacientes oncológicos.

Con relación a la ortopantomografía, se hará sistemáticamente en todo paciente, y en ella se apreciará la zona osteolítica y en su caso el secuestro, de márgenes mal definidos, que suele estar inicialmente en el hueso alveolar. Ella nos ayudará a valorar la extensión de la lesión. Sin embargo, en muchas ocasiones en la ortopantomografía no vemos la afectación real de la zona lesional, por lo que recomendamos realizar una tomografía computarizada (TC) siempre que tengamos una ONM. Así por ejemplo, en la zona posterior mandibular es muy frecuente la afectación de la tabla lingual, aspecto que en la ortopantomografía no podemos apreciar bien, y sí en la TC. Esta última nos sirve para ver la proximidad de la lesión

al nervio dentario inferior, posibles fracturas mandibulares, y por supuesto, comunicaciones con los senos maxilares y las fosas nasales (Bagán 2008). En el momento actual, faltan criterios estándar de diagnóstico a través de las imágenes y esto afecta a la toma de decisiones terapéuticas.



Estudio del efecto de la aplicación sistémica de pamidronato disódico y ácido zoledrónico en hueso mandibular en un modelo de experimentación animal

### 1.8.6. Tratamiento

El objetivo del tratamiento en los pacientes diagnosticados de ONM debe estar dirigido a eliminar el dolor, controlar la infección de los tejidos blandos y del hueso, y de evitar o disminuir la progresión de la necrosis ósea.

Según el estadio en que esté incluido el paciente, Ruggiero y cols. y la AAOMS proponen unas pautas de tratamiento:

- Paciente del estadio 1: tratamiento a base de enjuagues de clorhexidina al 0'12 %, no estando indicado ningún tipo de tratamiento quirúrgico.
- Paciente del estadio 2: tratamiento a base de enjuagues de clorhexidina al 0'12 %, analgésicos, y antibioterapia selectiva según el antibiograma. Marx y cols. establecen que la administración del antibiótico debe prolongarse 15 días, o hasta que el dolor esté controlado. La cirugía sólo está indicada para desbridamientos superficiales que alivien la irritación de los tejidos blandos.
- Paciente del estadio 3: tratamiento más exigente, precisa de una terapéutica quirúrgica.

El panel de expertos español, liderado por el profesor Bagán, no da esta pauta por válida hasta que se puedan constatar con resultados claros basados en la evidencia su utilidad o eficacia en la aplicación clínica. Por ello, proponen una modificación, basada en su división en dos subapartados del estadio 2. Para pacientes del subapartado 2a el tratamiento propuesto consiste en colutorios con Clorhexidina, antibioterapia y analgesia. Para los pacientes pertenecientes al subapartado 2b, el tratamiento sería el mismo, pero además con cirugía para la eliminación de la zona de necrosis ósea.

En la literatura no existe un patrón estándar ni directrices claras de protocolos de tratamiento único, con un resultado clínico predecible, porque están determinados por criterios clínicos basados en el consenso de expertos y el tratamiento generalmente se selecciona de forma empírica. Han sido descritas varias opciones de tratamiento. El actual sistema de estadiaje AAOMS (que asigna a los pacientes a diferentes etapas de la enfermedad sobre la base casi exclusivamente de criterios clínicos) se ha modificado, creando un sistema de estadiaje clínico y radiológico combinado con el objetivo de poner en común los pacientes ONM en diferentes grupos. Una vez establecido el estadiaje, la estrategia del tratamiento se basa en tratamientos conservadores como antibióticos y enjuague bucal de clorhexidina 0,12% en estadios iniciales, estando reservado el tratamiento quirúrgico para pacientes en estadios avanzados, aunque en las últimas revisiones se observa una tendencia en realizarlo en estadios más tempranos debido a una mejor respuesta (Ruggiero y cols. 2014, Coviello y cols. 2015, Khan y cols. 2015, Fliefel y cols. 2015).

Con el tratamiento quirúrgico existe un alto riesgo de recidiva, pero es difícil mantener a un paciente con tratamientos analgésicos y antibióticos durante periodos prolongados, cuando eliminando la zona necrótica, los síntomas mejoran o desaparecen al menos durante un tiempo (Carbonel y cols. 2008).

Las lesiones subsidiarias de tratamiento bajo anestesia local serían lesiones menores de 2 cm y que no comprometan estructuras anatómicas vecinas: seno maxilar o fosas nasales en maxilar, y en mandíbula la cortical interna en profundidad (Bocanegra-Pérez 2010).

Las modalidades de tratamiento de menor a mayor agresividad son:

- Curetaje: consiste en la remoción de las esquirlas de hueso necrótico que perforan la mucosa que los cubre y favorecen la aparición de erosiones por el roce continuado.
- Secuestrectomía: el secuestro óseo es un fragmento necrótico que se encuentra total o parcialmente desprendido del hueso adyacente o circundante.
- Desbridamiento: con anestesia local o general en función del tamaño y localización de la lesión.



Los factores clave para el éxito del tratamiento en estos pacientes con ONM establecida aún no se han identificado con claridad, existen diferentes criterios de éxito, para unos se considera éxito pasar de un estadio superior a uno inferior y para otros se trata de resolución definitiva. Los resultados de las diferentes estudios se complica debido a la inclusión de los pacientes que toman diferentes bifosfonatos y hacerlo en una indicación clínica distinta, además de la potencia, y vía de administración y comorbilidad. No hay homogeneidad en el seguimiento y recurrencia (Rupel y cols. 2014; Khan y cols. 2015).



Se están desarrollando nuevos enfoques de tratamiento complementario en pacientes que han desarrollado ONM por BFs, como la terapia con ozono, la bioestimulación con láser de Nd:YAG (Vescovi y cols 2007), el oxígeno hiperbárico (Freiberger y cols 2007), o la administración de parathormona (Harper & Fung 2007), con resultados no homogéneos, con pocos o ningún resultado positivo, y al ser estudios con un número muy pequeño de pacientes no son concluyentes ( Pelaz y cols. 2014).

Durante los últimos años se han empezado a utilizar concentrados autólogos de plaquetas (APC) en el tratamiento de la ONM por BFs. Se ha encontrado que los factores de crecimiento específicos (tales como factor de crecimiento derivado de plaquetas [PDGF], de crecimiento transformante factor b1 [TGF-b1], factor de crecimiento epidérmico [EGF], factor de crecimiento endotelial vascular [VEGF], factor de crecimiento-I similar a la insulina [IGF-I], factor de crecimiento de fibroblastos básico [bFGF], factor de crecimiento de hepatocitos [HGF]) mejoran la angiogénesis. Estos factores podrían estimular la producción de colágeno, producir agentes anti-inflamatorios, iniciar el crecimiento interno vascular, inducir la diferenciación celular, controlar la respuesta inflamatoria local y mejorar el tejido de la herida asociándose a un menor dolor y tumefacción; por eso algunos autores proponen aplicarlo de forma preventiva en las intervenciones quirúrgicas o en la ONM establecida (Bocanegra-Pérez y cols. 2012). El objetivo del tratamiento de los pacientes en riesgo de desarrollar ONM, o para aquellos que tienen la enfermedad activa, es la preservación de la calidad de vida mediante el control del dolor y de la infección, además de prevenir el desarrollo de nuevas áreas de necrosis.



Las limitaciones son muchas: no hay estudios randomizados que puedan ser incluidos, la mayoría son series pequeñas de una serie de casos o de casos control; además hay mucha heterogeneidad en los protocolos para la ONM: presenta gran variedad de factores como tipo de bifosfonato, indicación, administración, duración del tratamiento, factores gatillo, comorbilidad, seguimiento, medidas terapéuticas de éxito... Parece imprescindible desarrollar estudios de mayor calidad para valorar adecuadamente el potencial terapéutico.

Lo que sí se está constatando es la menor incidencia de nuevos casos de ONM en los últimos años, por un lado por la divulgación de la información sobre esta patología a los distintos sectores sanitarios, y la aplicación generalizada de las recomendaciones preventivas en pacientes que van a ser tratados con bisfosfonatos (Fusco y cols. 2013; Rupel y cols. 2014).

En los últimos años, se han descrito lesiones muy similares de ONM relacionadas con la administración de fármacos antiangiogénicos como el Bevacizumab, abriendo nuevas incógnitas sobre la fisiopatología de la ONM (Aragon-Ching & Dahut 2008, Ayllon y cols. 2009, Van Poznak 2010, Magremanne y cols. 2013).

En general el manejo sigue siendo controvertido. El tratamiento conservador conduce a buenos resultados en casos que están en las etapas iniciales. Los tratamientos quirúrgicos se reservan para estadios más avanzados. Sin embargo en la actualidad existe tendencia hacia el tratamiento quirúrgico en las etapas más tempranas con el fin de evitar la progresión de la necrosis.

### 1.8.7 PREVENCIÓN

Las distintas sociedades científicas y comités concluyen que las medidas de prevención son el mejor enfoque ante esta patología, y que la coordinación de la atención médica y dental es importante para prevenir el desarrollo de ONM y promover la salud oral de estos enfermos.

Los objetivos que se pretenden con el documento de revisión bucal son: facilitar la recogida de los datos necesarios para la evaluación del paciente, unificar las revisiones e informes, y las recomendaciones del tratamiento odontológico más adecuado para el paciente. (Ruggiero 2008, Ruggiero y cols. 2014)

Las recomendaciones para realizar la revisión son: exploración dental para detectar posibles focos de infección, tanto ya existentes como potenciales; exploración periodontal y periimplantaria; identificar posibles factores irritativos, que puedan provocar ulceraciones mucosas con exposición ósea, y exploración de las mucosas. Además, se debe registrar la realización de pruebas diagnósticas.

A continuación exponemos las pautas propuestas por la reunión de expertos, que se pueden resumir en los siguientes puntos (Junquera y Martín-Granizo 2008):

- Antes y durante los tres primeros meses de la administración del tratamiento intravenoso (AAOMS, 2007):
- Informar al paciente y su entorno sobre la importancia del mantenimiento de la salud bucal con relación al tratamiento y solicitar una valoración del paciente antes del inicio del mismo.



- Se deberá diagnosticar la existencia de focos infecciosos, tanto dento-alveolares como periodontales, presentes o futuros, y recomendar y proceder a su inmediato tratamiento.
- Se deberán realizar todos los tratamientos no invasivos apropiados para alcanzar un buen nivel de salud oral, informando al paciente y a su entorno sobre la importancia de este objetivo.
- Evaluar y corregir la posible existencia de traumatismos protéticos, especialmente sobre las superficies linguales.
- Informar y concienciar al paciente sobre los riesgos relacionados con la cirugía dentoalveolar una vez que se ha instaurado el tratamiento así como sobre la persistencia del riesgo.
- Durante la administración del tratamiento intravenoso (después de los primeros 3 meses de tratamiento)
  - Deberá evitarse la realización de cualquier tipo de cirugía oral e implantológica.
  - Ante la presencia de un foco infeccioso, el tratamiento de los conductos debe ser la primera indicación, procurando un mínimo trauma periapical y periodontal. Valorar cobertura antibiótica.
  - Controlar periódicamente el estado de salud oral del paciente, manteniendo sus condiciones óptimas. Se recomiendan controles al menos cada seis meses.
- Después del tratamiento intravenoso
  - Deberá evitarse la realización de cualquier tipo de cirugía oral al menos durante un periodo no inferior a los 10 años de la última administración del bisfosfonato. Aunque es cierto que se ha

demostrado la presencia de ácido zoledrónico hasta 12 años después, no hay datos al respecto en la literatura de referencia y este punto permanece controvertido.

- Motivar y mantener un riguroso control de la salud oral del paciente, durante largo tiempo.
- Bisfosfonatos orales o bisfosfonatos intravenosos (Zometa®) a una dosis anual durante tres años:
  - Antes de la administración del tratamiento informar y recomendar a sus pacientes la evaluación de su salud oral antes del inicio del mismo. Los especialistas en salud oral tienen un plazo de 3 años para alcanzar un óptimo estado de salud oral. Durante este periodo se podrá realizar todo tipo de tratamiento quirúrgico y rehabilitador, comenzando por los que requieran un mayor compromiso en el remodelado óseo.
  - Durante la administración del tratamiento oral (debido al escaso nivel de evidencia disponible, las recomendaciones deberán ser actualizadas constantemente): En los pacientes con menos de tres años de tratamiento y sin factores de riesgo, los especialistas de la salud oral podrán realizar cualquier tipo de tratamiento quirúrgico y rehabilitador que requiera el buen cuidado de su paciente. Se deberá obtener un consentimiento informado que añada a los riesgos propios de cada cirugía, la osteonecrosis en relación con la ingesta del bisfosfonato oral. Se deberá controlar periódicamente el estado de salud oral.



- Pacientes con menos de tres años de tratamiento, pero con factores de riesgo (administración concomitante de corticoides, edad superior a 70 años):
  - Sería recomendable, si las condiciones clínicas lo permiten, la suspensión del medicamento durante un periodo de tres meses antes de la realización de cualquier tipo de cirugía oral.
  - La reincorporación del tratamiento con BFs se realizará cuando haya cicatrizado de la cirugía.
  - La determinación sanguínea del telopéptido C-terminal del colágeno tipo I (b-CTx) precisa de mayor evidencia científica para confirmar su validez como parámetro de medición de riesgo de ONM.
  - Se debe obtener un consentimiento informado y controlar periódicamente el estado de salud oral.



## 2. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS



## **2. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS**

### **2.1 JUSTIFICACIÓN**

En los últimos años se ha extendido ampliamente el uso de BFs para el tratamiento de numerosas patologías, tales como enfermedad de Paget, hipercalcemia maligna, osteoporosis, mieloma múltiple, así como metástasis óseas de distintos tipos de cáncer. Están indicados en aquellas patologías que cursan con un aumento de la reabsorción ósea mediada por osteoclastos. La enfermedad de Paget fue la primera enfermedad en la que se emplearon estos fármacos, aunque hoy en día su principal indicación es la osteoporosis postmenopáusica, donde se ha demostrado su eficacia para la prevención de fracturas osteoporóticas. En las guías de tratamiento existentes para la osteoporosis, tanto nacionales como internacionales, los BFs son los fármacos de elección.

Paralelamente, se ha detectado la aparición de ONM asociada al uso de estos fármacos. Dada la relativamente reciente aparición de esta complicación, describiéndose el primer caso hace poco más de una década, aún no están totalmente claros los mecanismos de acción en el desarrollo de estas lesiones, siendo por el momento difícil de controlar y tratar cuando aparece, así como de prevenirla.

En la bibliografía se refieren distintas hipótesis de producción de la lesión, así como variadas propuestas de tratamiento, no siendo aún concluyente ninguno de ellos. Las teorías sobre el mecanismo de producción de la ONM por BFs se centran en tres factores:

- Supresión de la remodelación ósea: la acción directa inhibiendo los osteoclastos es el factor más referido en relación al origen de la ONM. Los BFs actúan sobre estas células responsables del recambio óseo, suprimiendo su función e induciendo su apoptosis. La falta de recambio óseo asociada a otros factores como medicaciones inmunosupresoras, sobreinfección e intervenciones traumáticas a nivel oral serían los desencadenantes de la ONM.

- Inhibición de la angiogénesis: aunque se suele asociar el término avascular a la ONM, hay discrepancias entre los autores si hay una reducción real de la vascularización, y si ésta se debe al efecto directo antiangiogénico de los BFs, o es secundaria a la inhibición de la remodelación ósea mediada por los osteoclastos. Esta falta de aporte sanguíneo causaría la necrosis del tejido y su posterior sobreinfección. Esta teoría está en auge debido a la aparición de lesiones similares de ONM asociadas a otros tratamientos antiangiogénicos del cáncer.

- Sobreinfección de la zona expuesta: algunos autores defienden el hecho de que los BFs producen toxicidad en el tejido blando, el tejido óseo expuesto se infecta y se vuelve necrótico, en oposición a la mayoría de autores, que sugieren que el tejido necrótico se sobreinfecta debido a la gran cantidad de bacterias presentes en la cavidad oral. Además, algunos estudios reflejan la acción directa de los BFs sobre algunas células del sistema inmune, alterándose.

Se han realizado diversos estudios experimentales en animales para observar la influencia de los BFs. Los resultados de estos trabajos son heterogéneos, teniendo en cuenta los diferentes modelos animales, tipos de BFs, dosis y métodos usados.



Los modelos animales desempeñan un papel importante para mejorar el conocimiento de la etiología, fisiopatología, diagnóstico, prevención y terapéutica. Los BFs poseen una alta selectividad de acción, requieren estudios de farmacología de seguridad y toxicológicos para definir efectos sobre sistemas esquelético y no esqueléticos, estimar dosis humanas equivalentes seguras, identificar parámetros de monitorización y proveer márgenes de seguridad durante las distintas etapas de investigación clínica (Mondelo 2006).

Los BFs constituyen un grupo de fármacos capaces de modular el recambio óseo y disminuir su remodelado cuando existe una reabsorción excesiva. En la actualidad la investigación clínica en este campo se basa en la búsqueda modificaciones del régimen terapéutico, como la administración intermitente, la utilización de la vía oral o la intravenosa, la duración del tratamiento, la combinación con otros fármacos, así como el uso extendido en el tiempo.

A pesar del aumento de la literatura sobre casos de ONM, aún no se saben con certeza los mecanismos fisiopatológicos de esta entidad. Se están realizando numerosos estudios en modelos animales buscando estos mecanismos, siendo un terreno amplio de investigación, aún con pocas zonas de claridad, y en el cual se encuadra nuestro estudio, realizado en ratas Sprague-Dawley, sobre la acción de dos de estos BFs a nivel de huesos maxilares.

## 2.2 OBJETIVOS

El **objetivo general** fue estudiar el efecto de la administración sistémica los bisfosfonatos pamidronato disódico y ácido zoledrónico sobre el hueso mandibular en ratas Sprague-Dawley tras la realización de exodoncias.

Este objetivo general fue dividido en una serie de objetivos específicos que permiten responder a los diferentes aspectos que plantea nuestro estudio:

### **Objetivos específicos:**

1. Valorar radiológicamente la capacidad de neoformación ósea en alveolos post-extracción tras la administración sistémica de Pamidronato Disódico y de Ácido Zoledrónico.
2. Estudiar el efecto del Pamidronato Disódico y del Ácido Zoledrónico sobre la neogénesis vascular por unidad de volumen de hueso neoformado, tras realizar exodoncias.
3. Estudiar el efecto del Pamidronato Disódico y del Ácido Zoledrónico sobre la neogénesis ósea por unidad de volumen de hueso neoformado, tras realizar exodoncias, mediante análisis esterológico.
4. Analizar la calidad mineral del hueso neoformado en un alveolo postextracción tras la administración sistémica de Pamidronato Disódico y Ácido Zoledrónico.





# 3. METODOLOGÍA



### **3.1 MATERIAL**

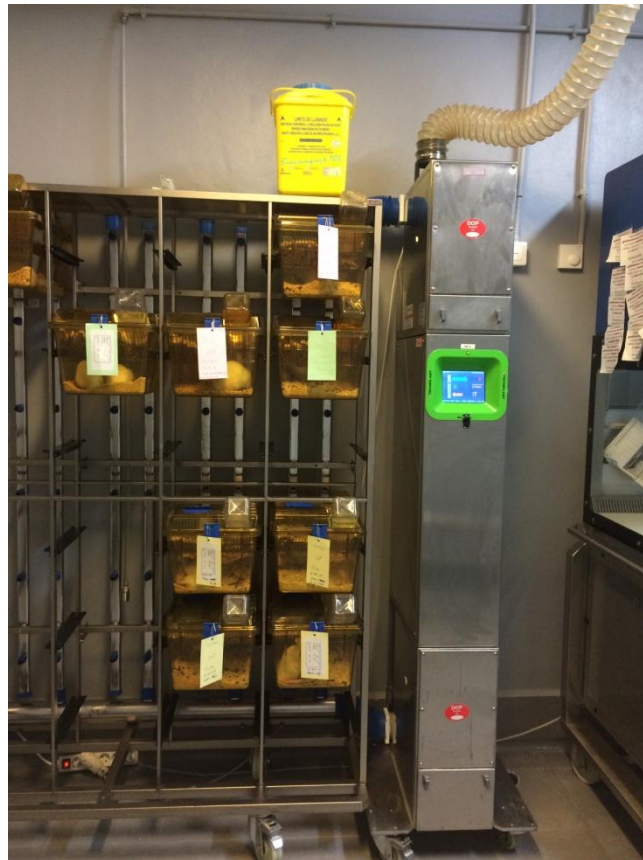
#### **3.1.1. Animales de experimentación**

Los animales de experimentación utilizados en este estudio fueron obtenidos del animalario del Servicio de Apoyo a la Investigación de la Universidad de Murcia. Se emplearon 70 ratas macho adultas Sprague-Dawley con un promedio de peso de 250 gramos (rango 210-382 g). Se realizó el pesaje previo a la preparación de los animales.

Los animales fueron aclimatados una semana antes de iniciar el estudio, con libre acceso al agua potable y al alimento estándar de laboratorio basado en una dieta de pellets (Panlab®, Barcelona). Las ratas fueron alojadas en jaulas de plástico bajo unas condiciones ambientales constantes consistentes en temperatura ambiente de 21° C y ciclos de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad. (Figura 3.1). Tras las exodoncias realizadas según el modelo experimental, la comida fue triturada mediante un triturador de alimento para animales de experimentación, consiguiendo así una dieta blanda. (Figura 3.2).

Los animales fueron tratados siguiendo las normas de la Directiva Europea 2010/63 y el Real Decreto 53/2013 del 1 de Febrero, sobre protección de animales utilizados para experimentación y otros fines científicos B.O.E. nº 34 de 8 de Febrero de 2013.

**Figura 3.1.** Alojamiento de los animales de experimentación



**Figura 3.2.** Triturador de alimentos utilizado

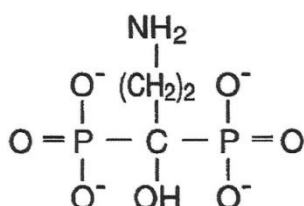


### 3.1.2. Fármacos empleados

Los bisfosfonatos empleados para nuestro estudio fueron:

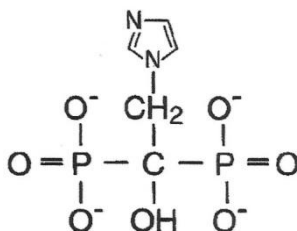
- Pamidronato disódico (Sigma-Aldrich Química SA, Madrid)

**Figura 3.3.** Estructura química del pamidronato disódico



- Ácido zoledrónico (Intatrade Chemical GmbH, Alemania)

**Figura 3.4.** Estructura química del ácido zoledrónico



Para la técnica anestésica para la realización de las exodoncias se administró:

- Ketamina (Imalgene<sup>®</sup> 1000, Laboratorios Merial SA, Lyon, Francia)
- Xilacina (Xilagesic<sup>®</sup> 2% Laboratorios Calier, Barcelona) (Fig. 3.5)
- Clorhidrato de Lidocaína al 2% con 1:100.000 de epinefrina (Ultracaín<sup>®</sup>, Laboratorios Normon SA, Madrid) (Fig. 3.6)

**Figura 3.5.** Anestésicos administrados intraperitonealmente.



**Figura 3.6.** Anestésico local: Ultracain® (Laboratorios Normon)



Para el control del dolor postoperatorio:

- Buprenorfina (Temgesic® 0'3 g/l, Schering-Plough, Levallois-Perret, Francia)

### 3.1.3. Aparatología empleada

Para el estudio radiológico se utilizó un equipo de radiología intraoral Elitys<sup>®</sup> (Trophy Dental, Texas, USA) con un captador digital mediante el sistema RVG 6000 (Kodak Dental System, Madrid, España) (Figura 3.7 y 3.8). Las imágenes obtenidas fueron procesadas mediante un ordenador convencional Pentium IV de 80 Gb de disco duro, a través del software Trophy Windows 5.06 para Windows (Trophy Dental, Texas, USA).

En este estudio se busca determinar la capacidad de neoformación ósea tras la exodoncia, mediante la medición del área radiolúcida en mm<sup>2</sup>. Para ello se utilizó el siguiente equipo de morfometría digital:

- Ordenador de control con monitor color y tarjeta digitalizadora.
- Programa de captación de imágenes MIP4<sup>®</sup> advances v.5.01.02 (Digital Image System S.L., Barcelona).

**Figura 3.7.** Equipo de radiología intraoral



**Figura 3.8.** Captador digital de RVG



## **3.2. METODOLOGÍA**

### **3.2.1. Diseño del estudio**

Este es un estudio prospectivo con casos control y dos grupos de tratamiento con pamidronato disódico y ácido zoledrónico. En él se incluyeron un total de 70 animales. Los animales empleados fueron ratas Sprague-Dawley. El estudio fue llevado a cabo tras haber sido aprobado por la Comisión de Bioética de la Universidad de Murcia.

Estos 70 animales fueron divididos de forma aleatoria en los siguientes grupos de estudio (Tabla 3.1):

- Grupo 1 (n=10): grupo control. A los animales de este grupo se les realizaron las exodoncias de los molares mandibulares derechos tras un período de aclimatación en el laboratorio, para que el resultado de la medición de las variables de estudio en este grupo sirvieran como valores control (sin la administración de ningún fármaco). Los animales de este grupo fueron sacrificados 14 días después de las exodoncias.
- Grupo 2 (n=10): a estos animales se les administró pamidronato disódico, en dosis de 3 mg/kg/día (0'75 mg/250g/día), durante una semana, siendo la dosis acumulada de 5'25 mg.
- Grupo 3 (n=10): misma pauta que el grupo 2, durante 2 semanas, siendo la dosis acumulada de 10'5 mg.
- Grupo 4 (n=10): misma dosificación que grupos 2 y 3, durante 3 semanas, con una dosis acumulada de 15'75 mg.
- Grupo 5 (n=10): estos animales recibieron ácido zoledrónico, en una dosis de 0'80 mg/kg/semana, recibiendo una dosis única de 0'20 mg.

- Grupo 6 (n=10): misma pauta que el grupo 5, durante 2 semanas, con una dosis acumulada de 0'40 mg.
- Grupo 7 (n=10): misma pauta que los grupos 5 y 6, durante 3 semanas, con una dosis acumulada de 0'60 mg.

Los fármacos fueron administrados por vía intraperitoneal, ajustadas las dosis al peso del animal, y en el rango horario de 9 a 12 a.m.

**Tabla 3.1:** Diseño del estudio

		N= 70 ratas Sprague-Dawley						
		Control	Pamidronato Disódico			Ácido Zoledrónico		
Grupos		1 (n=10)	2 (n=10)	3 (n=10)	4 (n=10)	5 (n=10)	6 (n=10)	7 (n=10)
Tiempo admin. BF (en semanas)	x	x	1	2	3	1	2	3
Dosis BF acumulada (mg)	x	x	5,25	10,50	15,75	0,2	0,4	0,6
Exodoncias	Día +1 tras última admisión del BF							
Sacrificio	14 días tras las exodoncias							

### 3.2.2. Técnica quirúrgica

Las exodoncias de molares fueron realizadas al día siguiente de la última administración del fármaco.

-Técnica anestésica: los animales fueron anestesiados con una mezcla de ketamina y xilacina a una concentración del 50%, administrada por inyección intraperitoneal en dosis de 0'1 ml/100 g de peso corporal. Tras la anestesia, los animales fueron colocados en posición supina para proceder a las exodoncias. Cada una de las ratas recibió un suplemento de anestesia



local mediante infiltración de 0'1 ml de Clorhidrato de Lidocaína al 2% con 1:100.000 de epinefrina, para potenciar el efecto anestésico y conseguir una acción hemostática local.

- Exodoncia de los molares: Los molares fueron luxados y extraídos mediante pinzas mosquito rectas dentadas (Hu-Friedy<sup>®</sup>, Chicago, USA). Las heridas fueron suturadas con sutura reabsorbible 5/0 (Lorca Marín<sup>®</sup> SA, Murcia). Finalmente para el manejo del dolor postoperatorio se administró a cada animal 0'15 mg/kg de Buprenorfina de forma subcutánea, cada 12 horas durante las primeras 72 horas.

**Fig 3.10.** Instrumental utilizado para las exodoncias de molares.



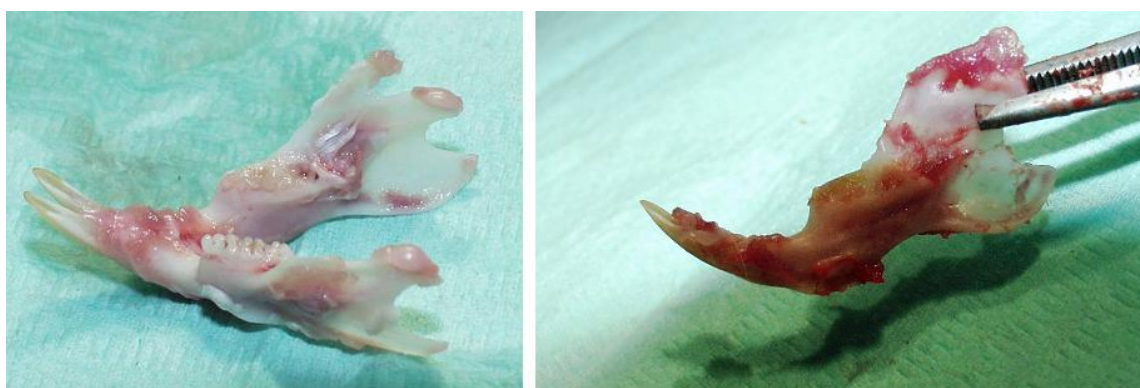
### 3.2.3. Sacrificio de los animales

Las ratas fueron sacrificadas a los 14 días de las exodoncias. El sacrificio se realizó mediante la inhalación de CO<sub>2</sub>, introduciéndolos en una campana de CO<sub>2</sub> y activando el gas durante 1 minuto a 2-3 atmósferas. Una vez desactivado dicho gas, los animales permanecieron en la campana, completamente sellada, durante 2-3 minutos más.

### 3.2.4. Preparación y análisis de las muestras

Inmediatamente después de sacrificar a los animales, cada mandíbula fue disecada y seccionada en la línea media para obtener la hemimandíbula derecha. Posteriormente, realizamos radiografías intraorales digitales para llevar a cabo el estudio morfométrico radiológico de los alveolos postextracción. Finalmente, fijamos las muestras en formol al 10% para su posterior estudio histopatológico con el objetivo de realizar el análisis estereológico vascular y óseo, y el microanálisis de elementos para valorar los niveles de Calcio y Fósforo.

**Figura 3.11.** Disección de la mandíbula de rata, y hemisección de la misma.



### 3.2.5. Métodos de medición

#### 3.2.5.1. Estudio morfométrico de las radiografías digitales

Para el estudio radiológico se utilizó un equipo de radiología intraoral Elitys<sup>®</sup> con un captador digital mediante el sistema RVG 6000. Las imágenes obtenidas fueron procesadas mediante un ordenador

convencional Pentium IV de 80 Gb de disco duro, a través del software Trophy Windows 5.06 para Windows.

Con el objetivo de obtener imágenes radiológicas homogéneas, se realizaron siempre a 60 Kvp, 7 mA y 0,05 s de exposición.

El estudio morfométrico de las radiografías digitales se llevó a cabo en el Servicio de Análisis de Imagen (SAI) de la Universidad de Murcia, sobre radiografías digitales de las muestras mandibulares.

La valoración de la capacidad de neoformación ósea tras la exodoncia se realizó mediante la medición del área radiolúcida en mm<sup>2</sup>. Para la obtención del área radiolúcida en la radiografía digital (RAR) se siguieron estos pasos:

1. Delimitación digital de la imagen radiolúcida (Figura 3.12).
2. Captura de la imagen radiolúcida (Figura 3.13).
3. Determinación del área en mm<sup>2</sup> (Figura 3.14).

**Figura 3.12:** Delimitación digital de la imagen radiolúcida.



Figura 3.13: Captura de la imagen radiolúcida.

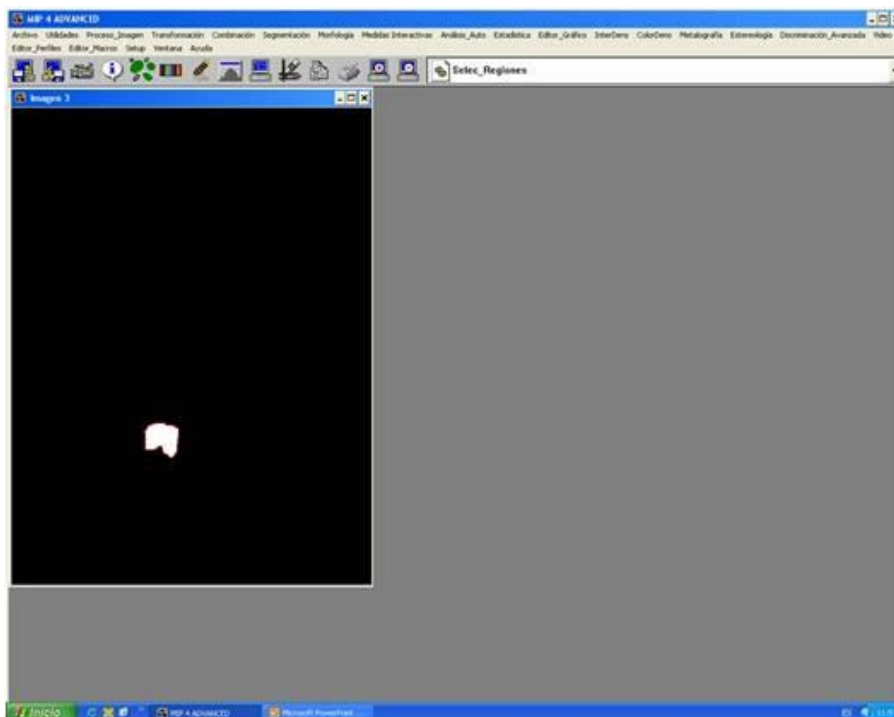
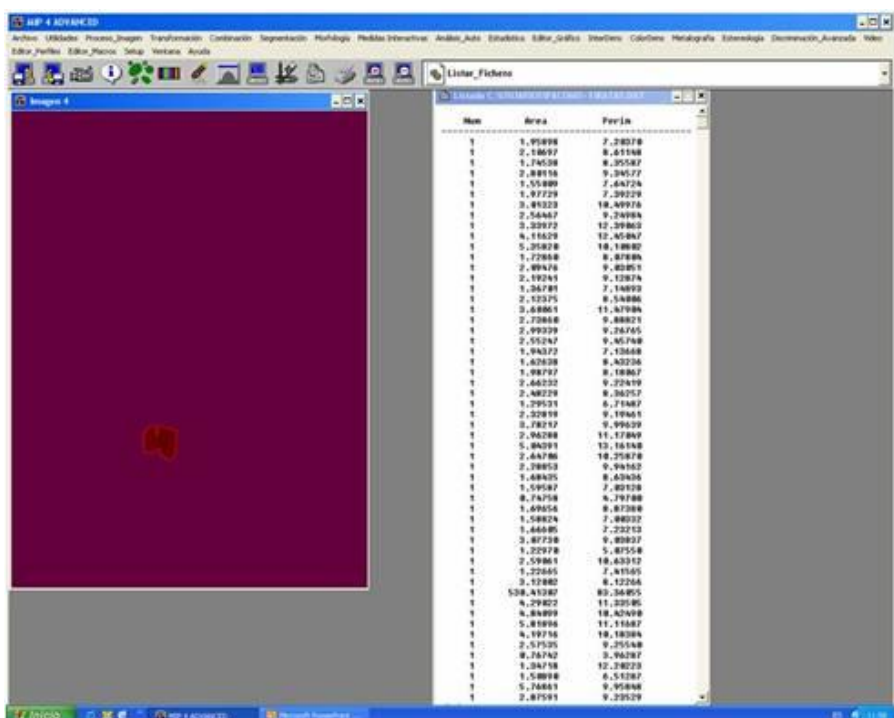


Figura 3.14: Determinación del área en mm<sup>2</sup>.



### 3.2.5.2. Análisis estereológico: cuantificación de la densidad vascular y ósea

Tras realizar el estudio radiológico, las muestras fueron incluidas en formalina neutra tamponada al 10%. El cuerpo mandibular de las hemimandíbulas derechas fue seccionado sagitalmente mediante una fresa de disco (Komet<sup>®</sup>, Brasseler Group, Darmstadt, Alemania). La porción alveolar fue usada para el análisis estereológico y el microanálisis de elementos (cuantificación de Calcio y Fósforo).

Para el análisis estereológico, los segmentos óseos alveolares fueron descalcificados durante 10 días con 10% de ácido clorhídrico y el 4% de formaldehído (Osteomol<sup>®</sup>, Merck, Darmstadt, Alemania), reducido a la mitad y procesados para inclusión en parafina. Se utilizó un microtomo para obtener cortes semi-serie de 3 $\mu$ m de espesor. Las secciones fueron teñidas con hematoxilina- eosina.

El resultado fue de 5 secciones por muestra separadas por una distancia de 15  $\mu$ m (lo que suponía una distancia total de estudio estereológico de 60  $\mu$ m).

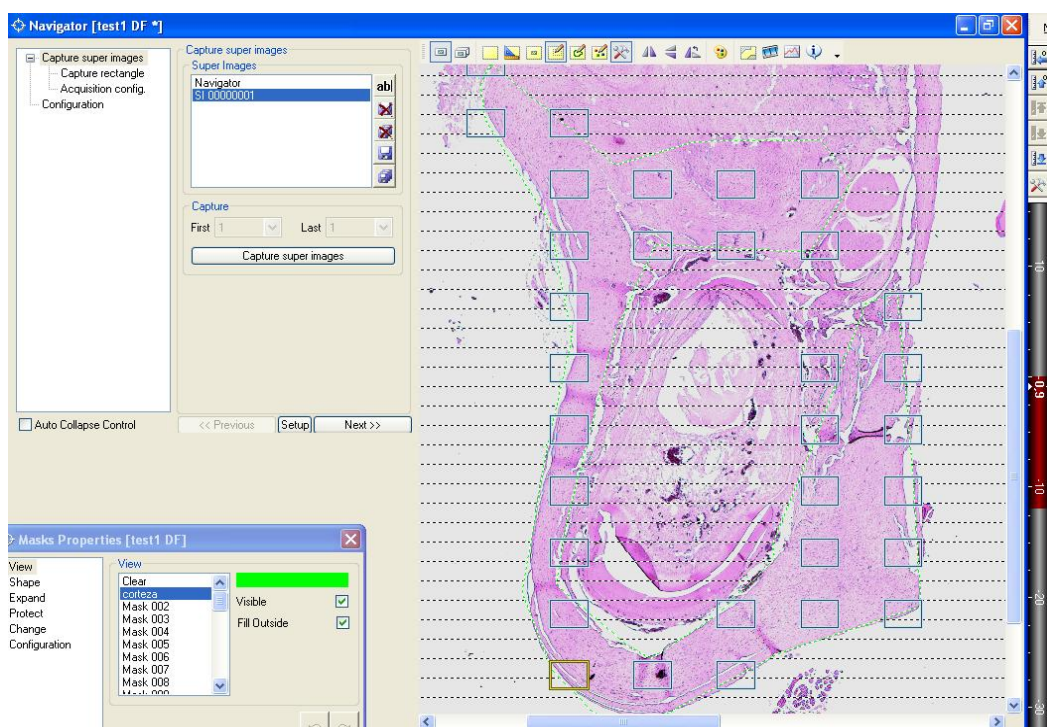
Todas las cuantificaciones vasculares se realizaron en un volumen de referencia, definido fácilmente por las estructuras anatómicas y las fronteras creadas artificialmente. El hueso alveolar distal del incisivo central constituye el límite anterior. El hueso alveolar distal del primer molar constituye el límite posterior, el estrato basal del epitelio gingival constituye el límite superior, y una línea imaginaria que une los ápices de la raíz del incisivo central y los primeros molares constituye el límite inferior.

Las mediciones fueron realizadas, por un examinador previamente entrenado y cegado para desconocer el grupo de estudio que observaba en cada momento, sobre las imágenes de las secciones de la muestra,

observadas a través del monitor de una cámara a color conectada a un microscopio (New Cast Olympus Bx61), que a su vez estaba conectado a un software estereológico (Visiopharm Integrate System versión 3.2.4.0).

Se realizó una estimación del número de vasos sanguíneos por unidad de área de forma sistemática en todas las muestras como indicador de la angiogénesis. La selección del área de estudio se realizó a 2x, mientras que el muestreo selectivo se hizo a 10x. El valor medio para cada animal fue utilizado para el análisis estadístico (Fig. 3.15 y 3.16).

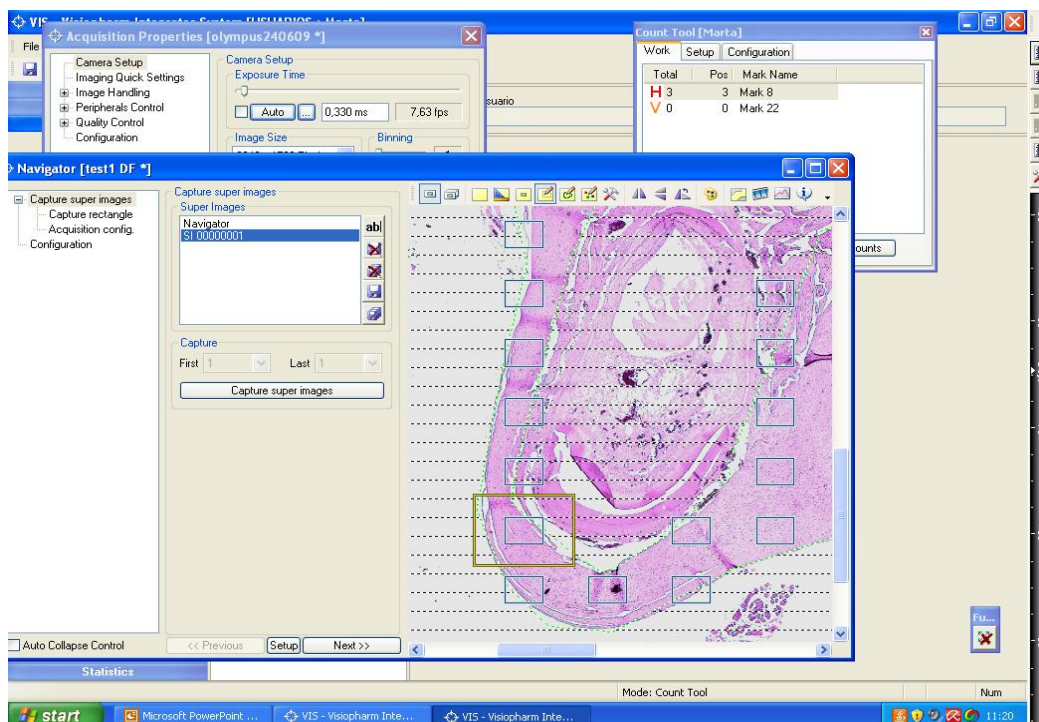
**Figura 3.15.** Selección del área de estudio a 2x y muestreo selectivo.



La evaluación de la angiogénesis y la formación de nuevo hueso alveolar se realizó mediante la estimación de sus respectivas fracciones en volumen, un método básico y ampliamente utilizado en ciencias biomédicas. Éstas se determinan como la proporción de cada de volumen

para el volumen de referencia, y considera la densidad volumétrica de cada parámetro estereológico. Las densidades volumétricas se expresan generalmente en porcentajes sin unidades.

**Figura 3.16.** Estudio detallado de cada una de las zonas seleccionadas.

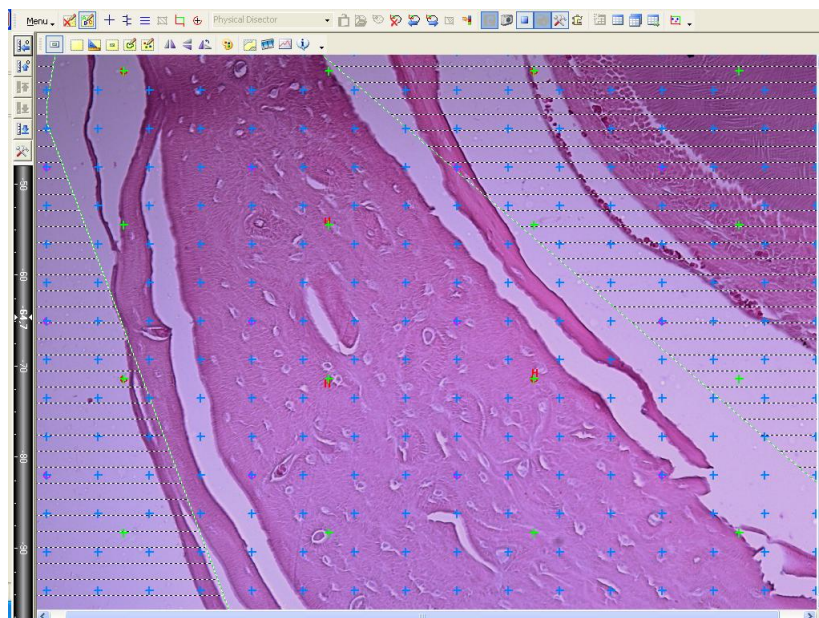


De acuerdo con estos principios, la densidad volumétrica de los vasos sanguíneos por unidad de volumen del hueso alveolar se estimó y se utilizó como indicador de angiogénesis para la comparación de los grupos en el presente estudio.

El proceso de estimación se realizó en un monitor de ordenador mediante el aprovechamiento de un sistema de adquisición de imágenes utilizado en nuestro laboratorio (Figura 3.17). En resumen, las muestras se colocaron directamente en un escáner a color de alta resolución (Leica SCN 400) y se almacenaron como documentos JPEG. Esto dio lugar a imágenes ampliadas en nuestra región de interés que podrían observarse con

resolución suficiente (40x) para distinguir los límites del volumen de referencia y los márgenes de los huesos. Debido a que la resolución de las imágenes no era suficiente para la estimación de los vasos sanguíneos, las fracciones volumétricas se midieron sobre las imágenes observadas a través del microscopio. Esto se llevó a cabo fácilmente mediante la búsqueda y ampliación de las áreas en las muestras histológicas.

**Figura 3.17.** Estimación del número de vasos sanguíneos por unidad de área a 10x.



### 3.2.5.3. Microanálisis de elementos por microscopía electrónica de barrido: niveles de Calcio y Fósforo

Para estudiar estos parámetros se emplearon las secciones sagitales correspondientes a la región posterior de la zona alveolar del cuerpo mandibular. Estos cortes no fueron descalcificados, con el objetivo de medir los niveles de Ca y P mediante un sistema de microanálisis de elementos. El microanálisis de elementos fue realizado en el Servicio de

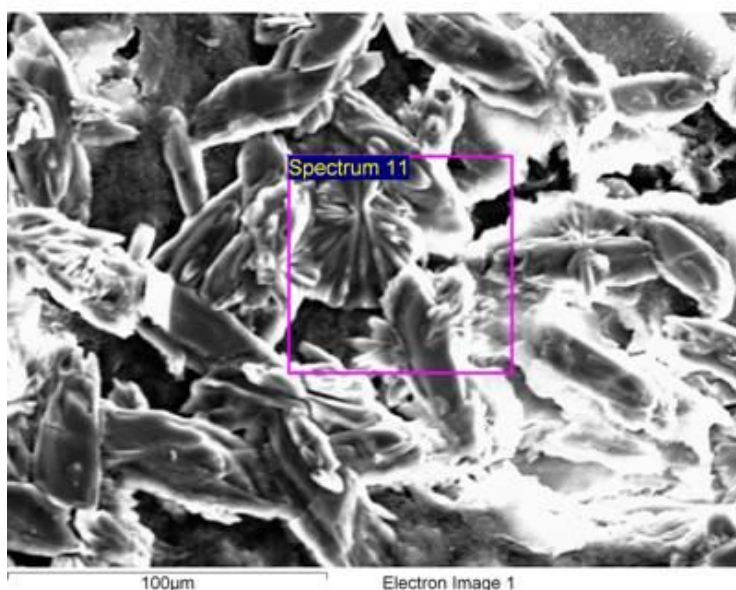


Microscopía de la Universidad de Murcia (perteneciente al Servicio de Apoyo a la Investigación).

La cuantificación de los niveles de Ca y P fue obtenida mediante los siguientes cinco pasos:

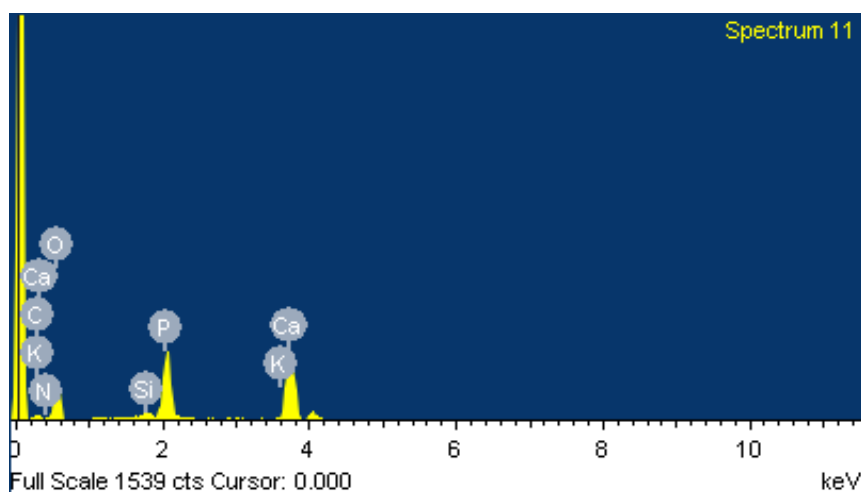
1. Las muestras fueron embebidas en un gel de ácido fosfórico al 37% (Dentaflux<sup>®</sup>, Algete, Madrid) durante 15 segundos, y posteriormente lavadas con abundante agua para retirar cualquier resto de ácido.
2. Montaje de las muestras en platinas para microscopio electrónico de barrido, en las que recibieron un baño de carbono.
3. Visualización de las muestras en el microscopio electrónico de barrido (MEB) con electrones secundarios o retrodispersados (backscattered) (MEB-ES) Jeol<sup>®</sup> JSM-6100 (Scanning electron microscopes, Tokio, Japón). Todas las muestras fueron estudiadas a 500 $\mu$ m de aumento (Figura 3.18).

**Figura 3.18.** Visualización del hueso en el MEB.



4. Digitalización de las imágenes.
5. Medición de los niveles de Ca y P mediante el software Inca Microanalysis Systems<sup>®</sup> (Oxford Instruments S.A., Madrid) (Figura 3.19).

**Figura 3.19.** Espectro de elementos obtenido mediante el microanálisis.



Realizamos un análisis químico de la composición mineral del hueso mediante un sistema microanalítico basado en energía dispersa y espectrometría de rayos X (EDX). Este sistema permite evaluar la concentración relativa de todos los elementos químicos presentes en el hueso, usando un análisis puntual y un mapeo elemental para determinar la distribución mineral. La concentración relativa de cada elemento se indica mediante una escala de color donde, para cada elemento, el color azul oscuro indica el cero absoluto y el blanco indica la concentración 100% absoluta de ese elemento.



### **3.3. Tratamiento estadístico**

Analizamos los datos estadísticos con el paquete de software SPSS<sup>®</sup> versión 12.0 (SPSS<sup>®</sup> Inc, Chicago, USA) para Windows, en el cual hemos efectuado los siguientes procedimientos estadísticos:

#### **Estadística descriptiva:**

En primer lugar, para el análisis descriptivo de la distribución general de la muestra, así como para el análisis de cada una de las variables (tanto en conjunto como para cada uno de los subgrupos), se han hallado valores tales como: media, desviación típica y los valores máximos y mínimos (rango).

#### **Estadística inferencial:**

En segundo lugar, para el análisis comparativo de las variables se consideró que la hipótesis nula (existencia de una relación de independencia entre las variables), se debería rechazar (cuando esta se rechaza, se considera que la relación entre las variables es de dependencia), cuando la probabilidad mínima de rechazo (el llamado “p-valor”) no sea superior al nivel crítico estándar de 0.05.

Para ello, se ha realizado el estudio de las asociaciones entre las variables cuantitativas continuas: comprobamos la normalidad en la distribución de la muestra mediante el test de normalidad de Kolmogorov-Smirnov y el test de homogeneidad de la varianza de Levene, y como los datos no mostraban una distribución normal fueron analizados mediante test no paramétricos. El test no paramétrico utilizado fue el test U-de Mann-Whitney (para comparar dos muestras).



# 4. RESULTADOS

## 4. RESULTADOS

Nuestra muestra estaba formada por 70 ratas Sprague-Dawley macho adultas, con un peso medio de 250 gramos (rango 210-382 g). Los 70 animales fueron divididos en los 7 grupos de estudio de 10 ratas cada grupo. Al realizar la disección mandibular tras el sacrificio de los animales, las variables de estudio se analizaron sobre un total de 10 hemimandíbulas derechas por cada grupo.

### 4.1 Análisis morfométrico de las radiografías digitales

Al estudiar la regeneración ósea del alveolo post-extracción 14 días después de las exodoncias, mediante el análisis morfométrico de las radiografías digitales, observamos que el grupo con una menor área radiolúcida y, por tanto, una mayor regeneración del alveolo post-extracción fue el grupo 6 (0,40 mg de dosis acumulada de Ácido Zoledrónico) con 1,41 (1,22-1,57) mm<sup>2</sup>, mostrando diferencias estadísticamente significativas con los grupos 1 ( $p=0,008$ ), 4 ( $p=0,047$ ), 5 ( $p=0,016$ ) y 7 ( $p=0,075$ ). Debemos destacar que el grupo en el que no se administró ningún fármaco bisfosfonato (grupo control), presentó una regeneración del alveolo post-extracción mucho más lenta, con un área radiolúcida de 3,27 (2,06-3,56) mm<sup>2</sup>, con diferencias estadísticamente significativas respecto a todos los grupos de estudio [grupo 3 ( $p=0,028$ ), grupo 4 ( $p=0,028$ ), grupo 5 ( $p=0,016$ ), grupo 6 ( $p=0,008$ ) y grupo 7 ( $p=0,016$ )], excepto con el grupo que recibió la menor dosis acumulada de Pamidronato Disódico: grupo 2 ( $p=0,095$ ) (Tabla 4.1).

**Tabla 4.1.** Comparación del area radiolúcida en las radiografías digitales a los 14 días de las exodoncias (test U de Mann- Whitney).

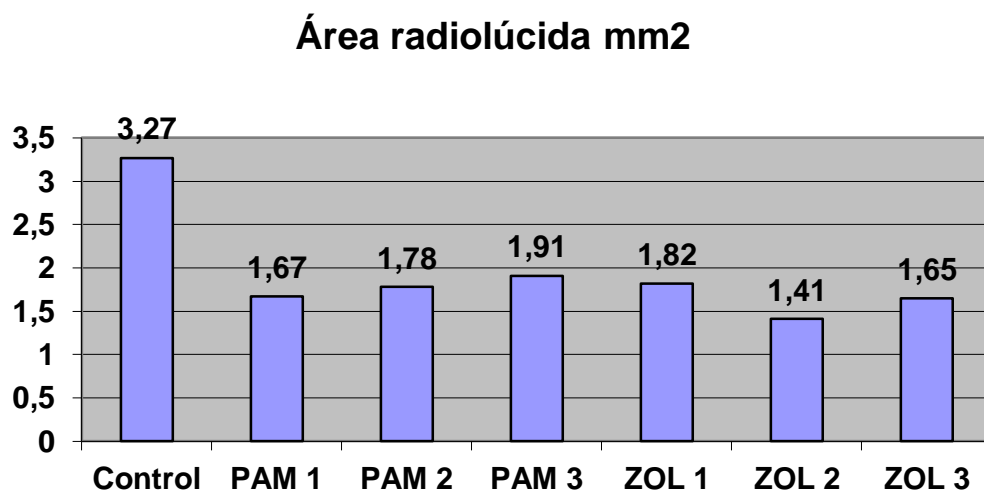
Grupo	Mandíbula: AR* (mm <sup>2</sup> ) Mediana (rango)
Grupo 1 (control)	3,27 (2,06-3,56) <sup>a</sup>
Grupo 2 (5,25 mg DA** Pamidronato disodico)	1,67 (1,23-2,60)
Grupo 3 (10,50 mg DA Pamidronato disódico)	1,78 (1,58-2,56) <sup>b,c</sup>
Grupo 4 (15,75 mg DA Pamidronato disódico)	1,91 (1,25-2,64) <sup>b</sup>
Grupo 5 (0,20 mg DA Ácido Zoledrónico)	1,82 (1,48-2,16) <sup>b,d</sup>
Grupo 6 (0,40 mg DA Ácido Zoledrónico)	1,41 (1,22-1,57) <sup>b,c</sup>
Grupo 7 (0,60 mg DA Ácido Zoledrónico)	1,65 (1,32-2,26) <sup>b</sup>

\* AR = Área Radiolúcida; \*\* DA = Dosis Acumulada.  
Los grupos marcados con diferentes letras superescritas mostraron diferencias significativas. Los grupos sin letras superescritas no tenían diferencias significativas con ningún otro grupo

**Figura 4.1.** Radiografía digital de mandíbula de rata Sprague-Dawley.



**Figura 4.2.** Medianas de los valores de área radiolúcida en las radiografía digitales 14 días post-extracción en los distintos grupos.



**Tabla 4.2.** Valor de *p* entre cada uno de los grupos de estudio con respecto al área radiolúcida.

RAR	GRUPO 2	GRUPO 3	GRUPO 4	GRUPO 5	GRUPO 6	GRUPO 7
GRUPO 1	0,095	0,028	0,028	0,016	0,008	0,016
GRUPO 2		0,841	0,600	0,917	0,117	0,602
GRUPO 3			0,841	0,754	0,009	0,251
GRUPO 4				0,600	0,047	0,346
GRUPO 5					0,016	0,347
GRUPO 6						0,175

## 4.2 Análisis estereológico de la densidad vascular

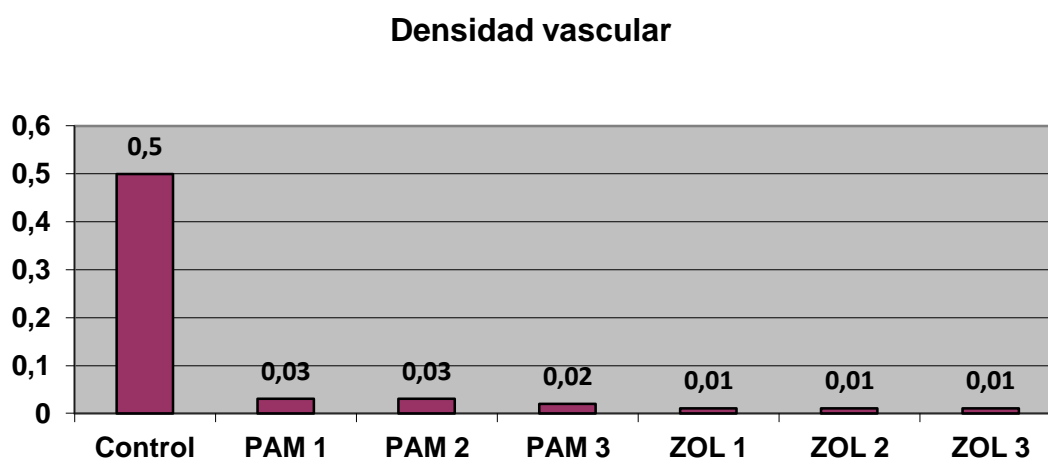
El análisis estereológico para la cuantificación de la densidad vascular de los alveolos post-extracción mostró que en el grupo en el que no se administró ningún fármaco bisfosfonato (grupo control), aparecía un mayor porcentaje de densidad vascular por  $\mu\text{m}^3$  [0,50 (0,03-0,07)], con diferencias estadísticamente significativas respecto a los grupos en los que se administró Ácido Zoledrónico [grupo 5 ( $p=0,014$ ), grupo 6 ( $p=0,014$ ) y grupo 7 ( $p=0,014$ )]; y sin diferencias significativas respecto a aquellos en los que administramos Pamidronato Disódico [grupo 2 ( $p=0,086$ ), grupo 3 ( $p=0,219$ ) y grupo 4 ( $p=0,057$ )] (Tabla 4.3).

**Tabla 4.3.** Comparación de la densidad vascular por  $\mu\text{m}^3$  entre los grupos de estudio (test U de Mann-Whitney).

Grupo	Densidad de vasos (%) por $\mu\text{m}^3$ Mediana (rango)
Grupo 1 (control)	0,50 (0,03-0,07) <sup>a</sup>
Grupo 2 (5,25 mg DA** Pamidronato disodico)	0,03 (0,02-0,04) <sup>a</sup>
Grupo 3 (10,50 mg DA Pamidronato disódico)	0,03 (0,01-0,04) <sup>a</sup>
Grupo 4 (15,75 mg DA Pamidronato disódico)	0,02 (0,01-0,04) <sup>a</sup>
Grupo 5 (0,20 mg DA Ácido Zoledrónico)	0,01 (0,01-0,02) <sup>b</sup>
Grupo 6 (0,40 mg DA Ácido Zoledrónico)	0,01 (0,01-0,01) <sup>b</sup>
Grupo 7 (0,60 mg DA Ácido Zoledrónico)	0,01 (0,01-0,02) <sup>b</sup>
* DA = Dosis Acumulada. Los grupos marcados con diferentes letras superescritas mostraron diferencias significativas	



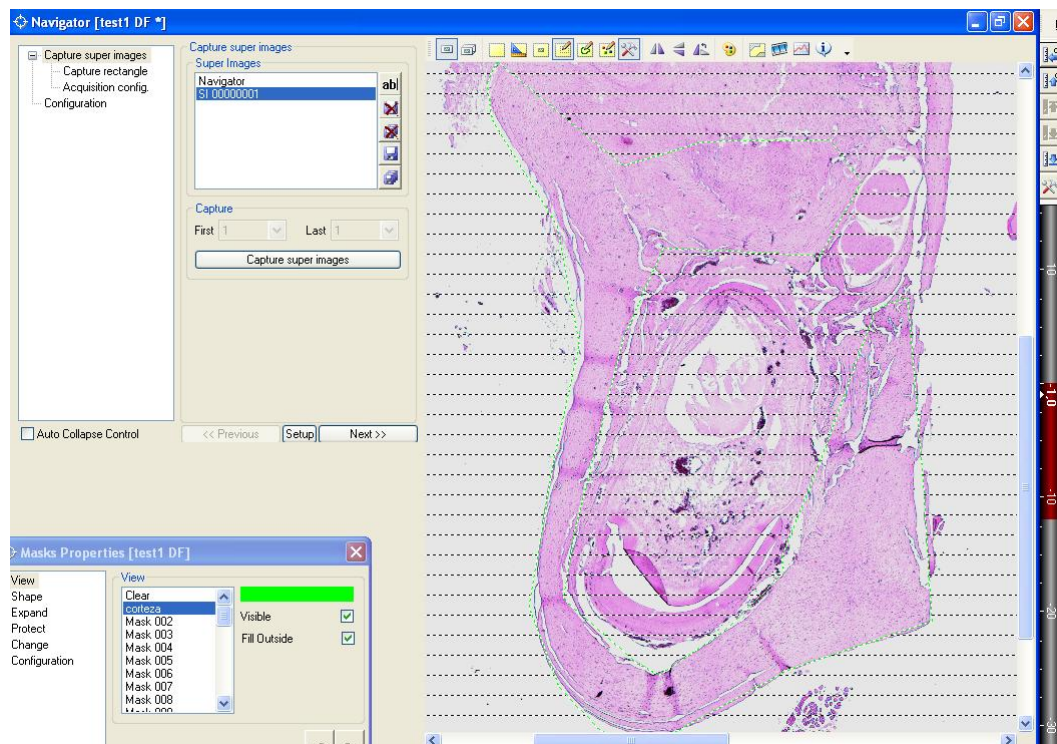
**Figura 4.3.** Medianas de los valores de la densidad vascular por  $\mu\text{m}^3$  en los distintos grupos de estudio.



**Tabla 4.4.** Valor de  $p$  entre cada uno de los grupos de estudio con respecto a la densidad vascular.

Dens vasc	GRUPO 2	GRUPO 3	GRUPO 4	GRUPO 5	GRUPO 6	GRUPO 7
GRUPO 1	0,086	0,219	0,057	0,014	0,014	0,014
GRUPO 2		0,346	0,465	0,016	0,009	0,016
GRUPO 3			0,249	0,028	0,009	0,016
GRUPO 4				0,017	0,028	0,016
GRUPO 5					0,249	0,347
GRUPO 6						0,116

**Figura 4.4.** Imagen histológica para medición estereológica.



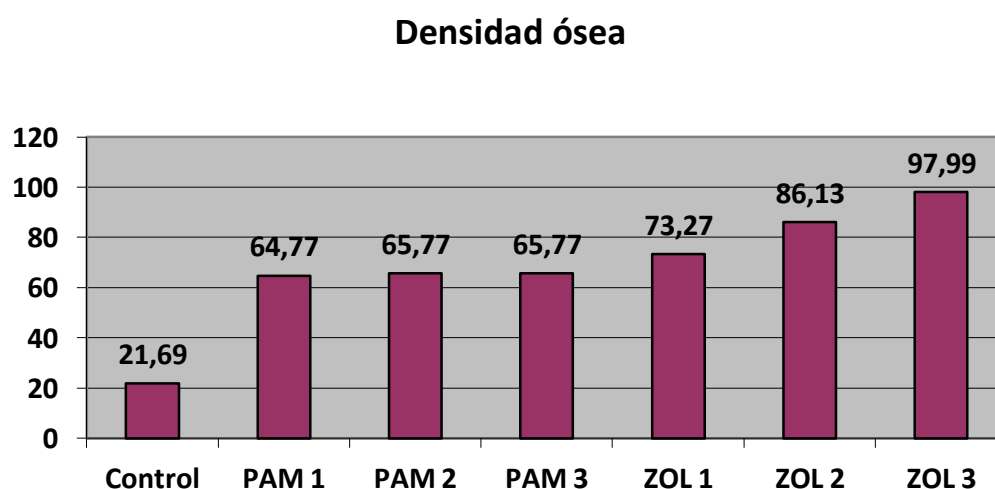
### 4.3 Análisis estereológico de la densidad ósea

Al cuantificar la densidad ósea mediante análisis estereológico observamos que los grupos donde se administraron fármacos bisfosfonatos (Pamidronato Disódico: grupos 2, 3 y 4 y Ácido Zoledrónico: grupos 5, 6 y 7) presentaban un mayor porcentaje de densidad ósea en el alveolo post-extracción, con diferencias estadísticamente significativas respecto al grupo control. Además, los grupos donde administramos ácido zoledrónico mostraron una mayor densidad ósea que los grupos donde se administró pamidronato disódico, con diferencias significativas (Tabla 4.5).

**Tabla 4.5.** Comparación de la densidad ósea por  $\mu\text{m}^3$  entre los grupos de estudio (test U de Mann-Whitney).

Grupo	Densidad de hueso (%) por $\mu\text{m}^3$ Mediana (rango)
Grupo 1 (control)	21,69 (20,48-35,78) <sup>a</sup>
Grupo 2 (5,25 mg DA** Pamidronato disodico)	64,77 (45,89-65,77) <sup>b</sup>
Grupo 3 (10,50 mg DA Pamidronato disódico)	65,77 (61,33-67,99) <sup>b</sup>
Grupo 4 (15,75 mg DA Pamidronato disódico)	67,77 (37,28-175,99) <sup>b</sup>
Grupo 5 (0,20 mg DA Ácido Zoledrónico)	73,27 (41,95-146,66) <sup>c</sup>
Grupo 6 (0,40 mg DA Ácido Zoledrónico)	86,13 (60,13-112,85) <sup>c</sup>
Grupo 7 (0,60 mg DA Ácido Zoledrónico)	97,99 (84,66-147,55) <sup>c</sup>
* DA = Dosis Acumulada. Los grupos marcados con diferentes letras superescribas mostraron diferencias significativas	

**Figura 4.5.** Medianas de los valores de la densidad ósea por  $\mu\text{m}^3$  en los distintos grupos de estudio.



**Tabla 4.6.** Valor de  $p$  entre cada uno de los grupos de estudio con respecto a la densidad ósea.

Dens ósea	GRUPO 2	GRUPO 3	GRUPO 4	GRUPO 5	GRUPO 6	GRUPO 7
GRUPO 1	0,014	0,014	0,014	0,014	0,014	0,014
GRUPO 2		0,056	0,117	0,065	0,047	0,009
GRUPO 3			0,596	0,099	0,015	0,009
GRUPO 4				0,050	0,047	0,017
GRUPO 5					0,602	0,251
GRUPO 6						0,251

#### 4.4. Microanálisis de elementos por microscopía electrónica de barrido

Finalmente, al valorar la calidad mineral del hueso neoformado en el alveolo post-extracción mediante el microanálisis de los elementos Ca y P, observamos que los grupos donde se administró el ácido zoledrónico (grupos 5, 6 y 7) presentaron mayores porcentajes de Ca y P que el grupo control y que los grupos donde se administró pamidronato disódico (grupos 3, 4 y 5), con diferencias estadísticamente significativas (Tabla 4.7).

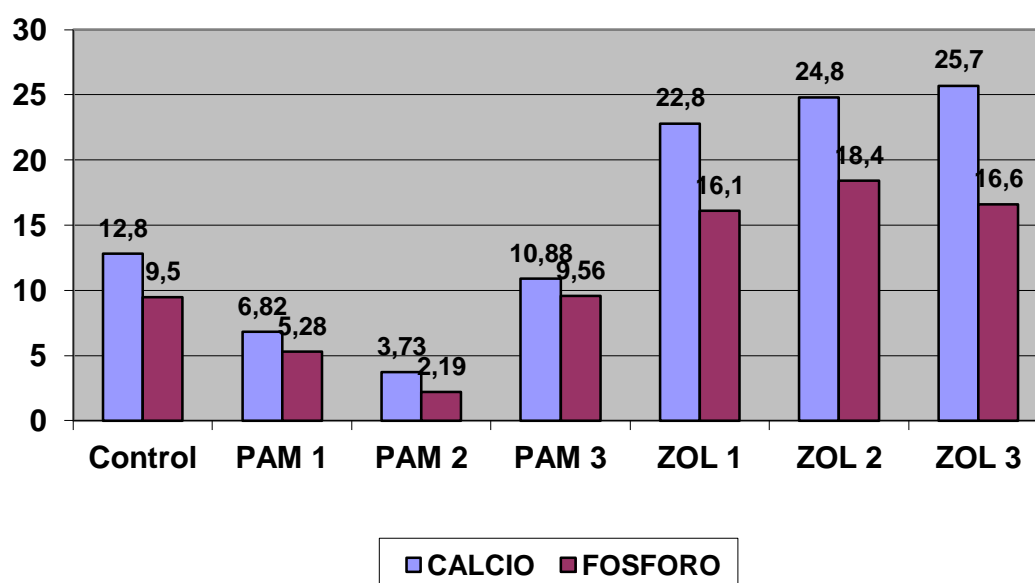
**Tabla 4.7.** Comparación de la concentración relativa de Calcio y Fósforo entre los grupos de estudio (test U de Mann-Whitney).

Grupo	Calcio (%) Mediana (rango)	Fósforo (%) Mediana (rango)
Grupo 1 (control)	12,80 (0,30-35,30) <sup>a</sup>	9,50 (1,40-30,30) <sup>a</sup>
Grupo 2 (5,25 mg DA <sup>**</sup> PAM)	6,82 (4,65-10,41) <sup>a</sup>	5,28 (2,68-6,28) <sup>a</sup>
Grupo 3 (10,50 mg DA PAM)	3,73 (0,56-12,43) <sup>a</sup>	2,19 (0,55-9,19) <sup>a</sup>
Grupo 4 (15,75 mg DA PAM)	10,88 (1,73-34,89) <sup>a</sup>	9,56 (1,53-34,35) <sup>a</sup>
Grupo 5 (0,20 mg DA ZOL)	22,80 (1,60-33,60) <sup>b</sup>	16,10 (2,10-21,30) <sup>b</sup>
Grupo 6 (0,40 mg DA ZOL)	24,80 (10,60-34,10) <sup>b</sup>	18,40 (11,60-20,60) <sup>b</sup>
Grupo 7 (0,60 mg DA ZOL)	25,70 (9,50-39,40) <sup>b</sup>	16,60 (4,50-19,90) <sup>b</sup>

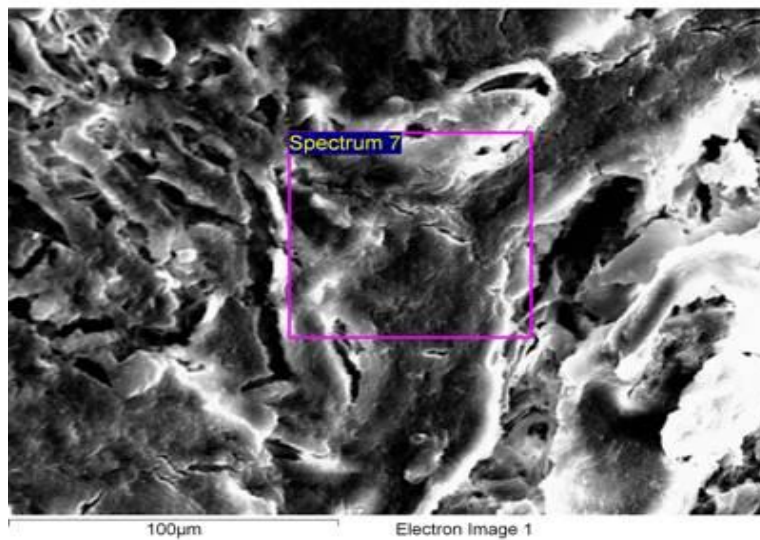
\* DA = Dosis Acumulada. Los grupos marcados con diferentes letras superescritas mostraron diferencias significativas  
PAM= Pamidronato disódico. ZOL= Ácido zoledrónico.

**Figura 4.6.** Medianas de los valores de calcio y fósforo en los grupos del estudio.

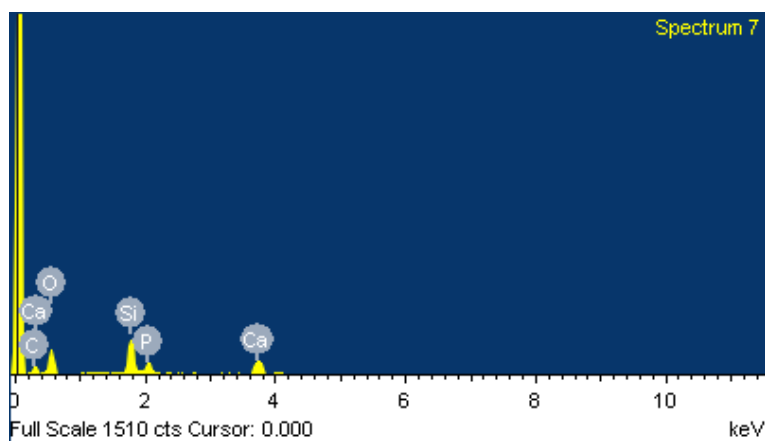
### Microanálisis de elementos



**Figura 4.7.** Visualización del hueso en el MEB.



**Figura 4.8.** Espectro de elementos obtenido mediante microanálisis.



**Tabla 4.8.** Valor de  $p$  entre cada uno de los grupos de estudio con respecto a la concentración relativa de calcio.

Ca	GRUPO 2	GRUPO 3	GRUPO 4	GRUPO 5	GRUPO 6	GRUPO 7
GRUPO 1	0,917	0,251	0,347	0,017	0,016	0,075
GRUPO 2		0,228	0,347	0,009	0,009	0,047
GRUPO 3			0,116	0,009	0,009	0,047
GRUPO 4				0,917	0,047	0,045
GRUPO 5					0,175	0,602
GRUPO 6						0,600

**Tabla 4.9.** Valor de  $p$  entre cada uno de los grupos de estudio con respecto a la concentración relativa de fósforo.

P	GRUPO 2	GRUPO 3	GRUPO 4	GRUPO 5	GRUPO 6	GRUPO 7
GRUPO 1	0,251	0,175	0,251	0,046	0,016	0,050
GRUPO 2		0,119	0,251	0,046	0,028	0,042
GRUPO 3			0,216	0,009	0,009	0,046
GRUPO 4				0,602	0,045	0,017
GRUPO 5					0,116	0,917
GRUPO 6						0,147



# 5. DISCUSIÓN



## 5. DISCUSIÓN

Con el presente estudio nos propusimos estudiar el efecto de la administración sistémica los bisfosfonatos pamidronato disódico y ácido zoledrónico sobre el hueso mandibular en ratas Sprague-Dawley tras la realización de exodoncias, en el proceso de cicatrización de alveolos post extracción a los 14 días de la administración de la última dosis.

Los modelos animales son indispensables para el estudio de nuevos fármacos y estrategias de investigación. El motivo de optar por la realización del estudio en ratas es debido a que son animales económicos, de fácil manejo, y adecuados para diferenciar las distintas etapas (Senel 2010, Soltau 2008, Yamashita 2011, Yang 2015).

Todos los animales de nuestro estudio fueron macho, porque los estrógenos de las hembras podían producir alteraciones en los resultados, ya que éstos influyen en el remodelado óseo. Los estrógenos tienen un doble efecto sobre el metabolismo óseo: por un lado favorecen la formación ósea al aumentar el número y función de los osteoblastos y por otro, disminuyen la reabsorción osteoclástica (Mondelo 2006).

La importancia de esta investigación de la aplicación sistémica de dos bifosfonatos se debe a que cada vez se publican más estudios que tratan de investigar los efectos secundarios a nivel de los huesos mandibulares de estos fármacos, ya que aún no se han esclarecido completamente sus mecanismos de acción.

El hueso es un tejido en constante remodelación, con continua aposición y reabsorción, y manteniendo así el volumen óseo, reparando el

daño tisular, y regulando la homeostasis del metabolismo fosfocálcico. Este proceso de remodelación permite la renovación de un 5% del hueso cortical, y un 20% del hueso trabecular al año. El hueso cortical supone un 75 % del total, pero su actividad metabólica es 10 veces menor que la del hueso trabecular; por esto, la renovación del hueso total al año es de un 5-10% (Fernández-Tresguerres y cols. 2006).

El remodelado óseo se divide en 5 fases:

1. Fase quiescente: Hueso en reposo. Los factores que inician el proceso de remodelado aún no son bien conocidos.
2. Fase de activación: El primer fenómeno que tiene lugar es la activación de la superficie ósea previa a la reabsorción, mediante la retracción de las células limitantes (osteoblastos maduros elongados existentes en la superficie endóstica) y la digestión de la membrana endóstica por la acción de las colagenasas. Al quedar expuesta la superficie mineralizada se produce la atracción de osteoclastos circulantes procedentes de los vasos próximos.
3. Fase de reabsorción: Los osteoclastos comienzan a disolver la matriz mineral y a descomponer la matriz osteoide. Este proceso es terminado por los macrófagos y permite la liberación de los factores de crecimiento contenidos en la matriz, fundamentalmente TGF- $\beta$  (factor transformante del crecimiento  $\beta$ ), PDGF (factor de crecimiento derivado de las plaquetas), IGF-I y II (factor análogo a la insulina I y II).
4. Fase de formación: Simultáneamente en las zonas de reabsorción se produce el agrupamiento de preosteoblastos, atraídos por los factores



de crecimiento que se liberaron de la matriz que actúan como quimiotácticos, y además estimulan su proliferación. Los preosteoblastos sintetizan una sustancia cementante sobre la que se va a adherir el nuevo tejido, y expresan BMPs (proteínas morfogenéticas óseas) responsables de la diferenciación. A los pocos días, los osteoblastos ya diferenciados van a sintetizar la sustancia osteoide que rellenará las zonas horadadas.

5. Fase de mineralización: A los 30 días del depósito de osteoide comienza la mineralización, que finalizará a los 130 días en el hueso cortical, y a los 90 días en el hueso trabecular.

Y de ahí entra de nuevo en fase quiescente o de reposo. (Fernández-Tresguerres y cols. 2006)

En la regulación fisiológica de la remodelación ósea intervienen numerosos factores: genéticos, mecánicos, hormonales, nutricionales, vasculonerviosos y locales (factores de crecimiento, proteínas de la matriz y citoquinas). Este proceso de remodelación también se ve afectado por factores externos, como la administración de los BFs, alterando el proceso de renovación, y dando lugar a un hueso envejecido. Aún se investigan los mecanismos de acción de estos fármacos sobre el tejido óseo, sobre todo intentando dilucidar los mecanismos patogénicos de la ONM por BFs.

En este estudio comparamos la acción de dos de estos BFs sobre el hueso mandibular en ratas Sprague-Dawley, analizando las diferencias en la regeneración en el alveolo post-extracción.

### 5.1. Sobre el diseño del estudio:

Se decidió realizar este estudio con ácido zoledrónico y pamidronato disódico por ser dos de los BFs intravenosos más utilizados clínicamente. El pamidronato disódico se incluye en los BFs de segunda generación, con una potencia moderada, y el ácido zoledrónico, perteneciente a la tercera generación, es actualmente el BF más potente en el mercado. Además, los primeros casos de osteoquimionerosis maxilar fueron descritos en pacientes tratados con estos dos BFs (Marx 2003).

En cuanto al modelo animal utilizado en este estudio, se optó por ratas Sprague-Dawley, ya que la mayoría de publicaciones encontradas sobre investigación de los efectos de los BFs con modelos animales han sido realizadas con distintas especies de ratas y ratones (Aghaloo 2011, Aguirre 2012, Ali-Erdem 2011, Astrand 2006, Back 2012, Bäckman 2008, Belfrage 2012, Bi 2010, Camacho-Alonso 2013, Cetinkaya 2008, Conte-Neto 2013, Conte-Neto 2012, Croucher 2003, Cruz 2011, Fournier 2002, Giraud 2004, Howie 2015, Jabbour 2014, Jee 2010, Kang 2013, Kuiper 2012, Little 2005, López-Jornet 2010, López-Jornet 2011, Maahs 2010, Marino 2012, Mayahara 2003, Palacio 2012, Park 2013, Pataki 1997, Sahni 1993, Senel 2010, Soltau 2008, Yamashita 2011, Yang 2015, Yu 2012). Otros autores sin embargo prefieren utilizar perros como modelo animal en estos estudios (Allam 2011, Allen 2007, 2009 y 2011). Allen en concreto defiende el uso de estos animales y no el de roedores para investigar los efectos de los BFs a nivel esquelético, alegando que el recambio óseo en perros Beagles es muy similar al de los humanos (Tabla 5.1)

**Tabla 5.1.** Comparación entre distintos estudios con BFs en modelos de experimentación animal: animales y dosis de BFs.

Autor	Animal	BF	Pauta fármaco
Nuestro estudio	70 ratas Sprague-Dawley	ZOL PAM	0,80 mg/kg/semana 3 mg/kg/día
Aghaloo y cols. 2011	38 ratas Sprague-Dawley	ZOL	66 µg/kg, 3 veces/semana 3 semanas
Aguirre y cols. 2012	38 ratas del arroz (Oryzomys palustris)	ALE ZOL	15 µg/kg cada 2 semanas 8 µg/kg y 80 µg/kg, 1 vez al mes
Ali-Erdem y cols. 2011	80 ratas Wistar	ZOL	7,5 µg/kg semanal – 3 semanas Dexametasona 1 mg/kg semanal
Allam y cols. 2011	12 perros Beagle	ZOL	0,06 mg/kg cada 2 semanas 3 meses
Allen y cols. 2011	12 perros Beagle	ZOL	0,06 mg/kg cada 2 semanas 3 meses
Bi y cols. 2010	Ratón tipo salvaje C57BL6	ZOL	125 µg/kg-2 veces/semana Dexametasona 5 mg/kg semanal Docetaxel 25 mg/kg semanal
Camacho-Alonso y cols 2013	80 ratas Sprague-Dawley	ZOL	0'8 mg/kg semanal 1, 2 y 3 semanas
Cetinkaya y cols. 2008	35 ratas Wistar	RIS	0,1 ó 1 mg/kg/día 3 u 8 semanas
Conte-Neto y cols. 2013	20 ratas Holtzman	ALE	1 mg/ kg /día 60 días
Conte-Neto y cols. 2012	60 ratas Holtzman	ALE	1 ó 3 mg/kg/día 60 días
Cruz y cols. 2011	60 ratas Lewis	PAM ZOL	1 mg/kg, días 21 y 38 0,04 mg/kg, días 21 y 55
Howie y cols. 2015	80 ratas Sprague-Dawley	ZOL	80 µg/kg/semana 13 semanas
Jabbour y cols. 2014	44 ratas Sprague-Dawley	ZOL	0,13 mg/kg/semanal Dexametasona 3,8 mg/kg/semanal Dexametasona + ZOL combinados
Jee y cols. 2010	20 ratas Sprague-Dawley	ALE	1 mg/kg/día 1 semana

Kang y cols. 2013	35 ratones C57BL/6J	ZOL	200 µg/kg – 3 veces/semana 8 semanas
Lopez-Jornet y cols. 2011	120 ratas Sprague-Dawley	PAM	3 mg/kg /dia Dexametasona 1 ó 3 mg/kg/dia Bencilpenicilina 0,1 ml/kg/dia
Lopez-Jornet y cols. 2010	200 ratas Sprague-Dawley	PAM	3 mg/kg /dia Dexametasona 1 mg/kg/dia
Maahs y cols. 2011	31 ratas Wistar	ALE ZOL	0,05 mg/kg/semana-28 semanas 0,6 mg/kg/28 dias-140 dias
Marino y cols. 2012	34 ratas Sprague-Dawley	ZOL	20 µg/kg – 2 dosis en 3 semanas
Senel y cols. 2010	60 ratas Sprague-Dawley	ZOL PAM	0,1 mg/kg - 3 veces/semana 3 mg/kg – 3 veces/semana 6 u 8 semanas
Yamashita y cols. 2011	40 ratas Sprague-Dawley	ZOL	0,1 ó 0,3 mg/kg/semana 14 semanas
<b>ZOL: ACIDO ZOLEDRONICO. PAM: PAMIDRONATO DISÓDICO. RIS: RISEDRONATO. ALE: ALENDRONATO.</b>			

Resumiendo según Amler (1996), en la cronología de la cicatrización del alveolo post- extracción existen 5 estadíos:

- Estadío 1: se forma inmediatamente un coágulo de células blancas y rojas, produciéndose hemostasia.
- Estadío 2: el tejido de granulación reemplaza al coágulo sobre el 4º o 5º día. Se inicia la angiogénesis a través de la cadena de células endoteliales y formación de capilares.
- Estadío 3: el tejido conectivo reemplaza gradualmente al tejido de granulación en 14-16 días. Recubrimiento epitelial completo.
- Estadío 4: inicio de calcificación de tejido osteoide, comenzando en la base y periferia del alveolo (7-10 días). A las 6 semanas, el hueso trabecular rellena casi al completo al alveolo. Máxima actividad osteoblástica, proliferación de elementos celulares y de

tejido conectivo con osteoblastos debajo de tejido osteoide alrededor de lagunas inmaduras de hueso (4<sup>a</sup>-6<sup>a</sup> semana post-extracción). Tras la 8<sup>a</sup> semana, la osteogénesis parece disminuir.

- Estadío 5: tras 4 ó 5 semanas hay epitelización completa del alveolo. Relleno óseo completo entre 5<sup>a</sup> y 10<sup>a</sup> semana. A las 16 semanas se completa relleno óseo, con poca actividad osteogénica.

Cardaropoli y *cols.* en 2003 en su modelo experimental animal, establecen diferentes fases en la cicatrización: la secuencia empieza por matriz de tejido conectivo, seguida de formación de hueso reticular y luego de hueso lamelar y médula ósea. Mientras que Chen y *cols.*(2004) hacen referencia a los cambios internos y externos del alveolo post-extracción.

Con respecto a la comparación de nuestros resultados con otros estudios, a pesar de la cantidad de publicaciones que se están realizando sobre los efectos de los BFs en modelos animales (ya que es un tema de actualidad), hay numerosas diferencias entre ellos, ya sea por el modelo animal elegido, el BF a estudiar, la asociación o no con otros fármacos, la dosificación del BF, el tiempo de administración, la realización o no de exodoncias, los parámetros a analizar o la metodología para la obtención de datos. Por consiguiente, hay pocos estudios sobre la calidad y cantidad del hueso neoformado tras la exodoncia en ratas tratadas con pamidronato disódico y ácido zoledrónico, a través de la medición del calcio y el fósforo y del área radiolúcida del alveolo post-extracción, así como de la valoración de las variaciones en la densidad vascular y ósea (Tabla 5.2).

**Tabla 5.2.** Comparación entre distintos estudios de BFs en modelos de experimentación animal: métodos y objetivos del estudio.

Autor	BF	Estudio	Análisis de muestras
Nuestro estudio	ZOL PAM	Neoformación ósea y vascular post-extracción Calidad mineral ósea	Radiología – Estereología Microanálisis de elementos (Microscopio electrónico barrido)
Aghaloo y cols. 2011	ZOL	Afectación periodontal y ONM	MicroTC Histología
Aguirre y cols. 2012	ALE ZOL	Periodontitis y ONM	MicroTC Histología Inmunohistoquímica
Ali-Erdem y cols. 2011	ZOL	Alveolo post-extracción	Histología
Allam y cols. 2011	ZOL	Epitelio post-extracción	Histología Inmunohistoquímica
Allen y cols. 2011	ZOL	Hueso post-extracción y ONM	Aspecto macroscópico Micro TC - Histología
Bi y cols. 2010	ZOL	ONM en alveolo post-extracción	MicroTC – Histología Inmunohistoquímica
Camacho-Alonso y cols 2013	ZOL	Resistencia ósea a la fractura	Test biomecánico Microanálisis elementos (MEB)
Cetinkaya y cols. 2008	RIS	Afectación periodontal	Morfometría (Rx) Estereología (Histología)
Conte-Neto y cols. 2013	ALE	ONM post-extracción	Estereología (Histología) Marcadores sanguíneos
Conte-Neto y cols. 2012	ALE	Dificultad exodoncias	Tiempo operatorio Fracturas dentales
Cruz y cols. 2011	PAM ZOL	Densidad ósea	Densitometría ósea Histomorfometría
Howie y cols. 2015	ZOL	ONM post-extracción	Aspecto macroscópico MicroTC - Histología
Jabbour y cols.	ZOL	Cicatrización alveolo	Aspecto macroscópico



2014		post-extracción	MicroTC
Jee y cols. 2010	ALE	Hueso post-extracción	MicroTC <i>in vivo</i>
Kang y cols. 2013	ZOL	ONM tras infección periapical	MicroTC Histología
Lopez-Jornet y cols. 2011	PAM	ONM post-extracción	Histología
Lopez-Jornet y cols. 2010	PAM	ONM post-extracción	Histología
Maahs y cols. 2011	ALE ZOL	ONM post-extracción	Aspecto macroscópico Histología
Marino y cols. 2012	ZOL	ONM post-extracción	Histología MicroTC
Senel y cols. 2010	ZOL PAM	Efectos BFs en hueso	Histología
Yamashita y cols. 2011	ZOL	Cicatrización en paladar	Histomorfometría Inmunohistoquímica
<b>ZOL: ACIDO ZOLEDRONICO. PAM: PAMIDRONATO DISÓDICO. RIS: RISEDRONATO. ALE: ALENDRONATO.</b>			

## 5.2. Sobre el estudio morfométrico radiológico

En el análisis morfométrico de las radiografías digitales del alveolo post-extracción, en nuestro estudio hallamos que el grupo tratado con ácido zoledrónico durante 2 semanas fue en el que mayor regeneración ósea se encontró, siendo esta diferencia significativa con respecto al grupo control, con los otros dos grupos tratados con ácido zoledrónico, y con el grupo que recibió pamidronato disódico durante 3 semanas.

*Cetinkaya y cols.*, en su modelo experimental de periodontitis en ratas Wistar, miden mediante radiografía convencional la pérdida ósea alveolar, obteniendo diferencias significativas de menor pérdida de hueso

en ratas a las que se les administró risedronato durante un corto período de tiempo (3 semanas), con respecto al grupo control. Sin embargo, no hay diferencias significativas en las mediciones de las ratas que recibieron el fármaco durante un periodo de tiempo mayor (8 semanas). En nuestro estudio, todos los grupos de animales que recibieron BFs, a excepción del que recibió la menor dosis acumulada de pamidronato disódico, presentan una mayor regeneración del alveolo post-extracción que el grupo control.

*Allen y cols.* estudiaron en perros beagle el efecto del ácido zoledrónico en el alveolo post-extracción vs grupo control, midiendo el área de regeneración ósea mediante tomografía computarizada. La dosis utilizada de ácido zoledrónico fue de 0,06mg/kg, en infusión cada 2 semanas, durante 3 meses. Esto da una dosis acumulada en mg/kg inferior a la administrada en nuestro estudio, con la salvedad de que el modelo animal es distinto. Realizaron exodoncias de molares en las semanas 4 y 8 tras el inicio del tratamiento con el ácido zoledrónico, realizando las mediciones en las semanas 4 y 8 post-extracción. En sus resultados no encontraron diferencias significativas en la neoformación de hueso a las 4 semanas de la extracción, pero sí a las 8 semanas, siendo significativamente mayor en los animales tratados con ácido zoledrónico que en el grupo control. En nuestro estudio, con un modelo animal distinto, con una dosis acumulada superior de ácido zoledrónico, y realizando las mediciones 14 días tras las exodoncias, encontramos que la regeneración del alveolo post-extracción es mayor en los grupos que recibieron ácido zoledrónico que en el grupo control.

*Jee y cols.* estudiaron el efecto del alendronato sobre los alveolos post-extracción en ratas ovariectomizadas, mediante TC *in vivo*, no encontrando diferencias significativas entre los tres grupos del estudio



(control, ovariectomizadas, ovariectomizadas recibiendo alendronato) con respecto a la neoformación ósea a nivel radiológico 2, 4 y 6 semanas después de las exodoncias. En nuestro estudio todos los grupos que recibieron BFs (a excepción del de menor dosis acumulada de pamidronato disódico) presentaron una mayor regeneración del alveolo que el grupo control.

*Conte-Neto y cols.*, en su estudio sobre alveolos post-extracción también con alendronato en ratas Holtzmann, observan mediante cortes histológicos que el volumen de hueso neoformado en las ratas tratadas con el bisfosfonato presentan una menor formación de hueso post-exodoncia que en el grupo control, siendo estadísticamente significativa esta diferencia sólo en el tercio medio del alveolo de la raíz distal del 1º molar, zona del estudio. A diferencia de este trabajo, en nuestro estudio sí hay una mayor neoformación ósea en todos los grupos a los que se les administró BFs, excepto el de menor dosis de pamodronato disódico.

*Howie y cols.*, en su estudio de ONM post-extracción en ratas Sprague-Dawley tratadas con dosis de ácido zoledrónico de 0,80 µg/kg/semana, calcula la aposición de nuevo hueso mediante análisis dinámico del hueso, hallando como resultado que en el grupo tratado con BFs presenta una menor aposición ósea y menor nivel de formación mineral que el grupo control. En nuestro estudio, sin embargo, la administración de los fármacos aumenta la formación ósea post-extracción en 5 de los 6 grupos tratados con BFs.

**Tabla 5.3.** Comparación de resultados en el estudio morfométrico radiológico

Autor	Estudio	Resultados
Nuestro estudio	Rx para valorar neoformación ósea post-extracción, ratas Sprague-Dawley	Mayor hueso formado en todos los grupos de PAM y ZOL excepto grupo 2
Allen y cols. 2011	MicroTC para valorar neoformación ósea post-extracción, perros Beagle	Mayor hueso formado en el grupo de ZOL tras 8 semanas post-extracción
Cetinkaya y cols. 2008	Rx para valorar pérdida ósea periodontal, ratas Wistar	Menor pérdida ósea con dosis de RIS a corto plazo
Conte-Neto y cols. 2013	Medición de superficie de hueso neoformado en cortes histológicos, ratas Holtzmann	Menor hueso neoformado en los grupos que recibieron ALE
Howie y cols. 2015	Medición de parámetros dinámicos del hueso post-extracción, ratas Sprague-Dawley	Menor aposición ósea en grupo tratado con ZOL
Jee y cols. 2010	Neoformación ósea en alveolo post-extracción con micro TC, ratas Sprague-Dawley	No diferencias significativas entre tratadas con ALE y controles
<b>ZOL: ACIDO ZOLEDRONICO. PAM: PAMIDRONATO DISÓDICO. RIS: RISEDRONATO. ALE: ALENDRONATO.</b>		

### 5.3. Sobre el análisis de la densidad vascular

El siguiente parámetro a analizar en nuestro estudio fue la densidad vascular en el hueso de neoformado, mediante estereología. Elegimos este método y no medición por inmunohistoquímica por su mayor sencillez y menor coste. Se observó una menor densidad vascular en los grupos que recibieron ácido zoledrónico, siendo esta diferencia significativa con respecto a los grupos que recibieron pamidronato disódico y al grupo control.

*Conte-Neto y cols.* en su estudio de alveolos post-extracción en ratas tratadas con alendronato, no encontraron diferencias significativas en la



vascularización a los 3 días de las exodoncias entre el grupo control y el que recibió BFs, pero si hubo una disminución significativa en la vascularización en el grupo tratado con alendronato con respecto al grupo control a los 28 días de la extracción. En nuestro estudio, todos los grupos que recibieron ácido zoledrónico tenían una disminución significativa de la densidad vascular con respecto al grupo control y a los que recibieron pamidronato disódico.

*Cetinkaya y cols.*, en su estudio del efecto del risedronato en un modelo de periodontitis experimental en ratas, miden mediante estereología la densidad vascular, hallando únicamente diferencias significativas sobre la disminución de la angiogénesis en el grupo con una mayor dosis y duración de administración del fármaco (1 mg/kg, 8 semanas) con respecto al resto de grupos del estudio. En nuestro estudio, los grupos tratados con pamidronato disódico no presentaron diferencias significativas en cuanto a la densidad vascular con respecto al grupo control; sin embargo, los grupos que recibieron ácido zoledrónico sí presentaron una reducción estadísticamente significativa en la vascularización con respecto al resto de grupos.

*Bi y cols.* en su modelo experimental con ratas de ONM post-extracción causada por BFs, administraron ácido zoledrónico (125 µg/kg/semana), concomitante o no con dexametasona y doxetacel, evaluando la angiogénesis ósea mediante inmunohistoquímica, y hallando que los grupos que habían recibido ácido zoledrónico presentaban una fuerte supresión de la angiogénesis en las zonas de las extracción. En nuestro estudio también hallamos que el ácido zoledrónico reduce la angiogénesis en hueso, no así el pamidronato, en las dosis empeladas en nuestra investigación.

Maahs y cols., estudian la aparición de ONM post-extracción en ratas tras la administración de alendronato ó ácido zoledrónico, midiendo entre otros parámetros mediante inmunohistoquímica la presencia de VEGF como indicador de la angiogénesis, no encontrando diferencias significativas entre el grupo control y los grupos que recibieron BFs. Sin embargo en nuestro estudio si hay una reducción significativa de la densidad vascular en los grupos tratados con ácido zoledrónico.

**Tabla 5.4.** Comparación de resultados en el análisis de la densidad vascular

Autor	Estudio	Resultados
Nuestro estudio	Esterología de densidad vascular post-extracción, ratas sprague-Dawley	Grupos tratados con ZOL presentan menor vascularización
Bi y cols. 2010	Inmunohistoquímica y recuento de vasos sanguíneos, ratones C57BL6	Grupos tratados con ZOL presentan reducción de angiogénesis
Cetinkaya y cols. 2008	Estereología de densidad vascular en periodontitis, ratas Wistar	Menor vascularización sólo en grupo de mayor dosis y tiempo de RIS
Conte-Neto y cols. 2013	Estereometría de cortes histológicos post-extracción, ratas Holtzmann	Menor vascularización en grupo ALE a los 28 días post-exodoncia
Maahs y cols. 2010	Inmunohistoquímica para medir VEGF post extracción, ratas Wistar	No encuentra diferencias significativas entre grupos control, ALE y ZOL
<b>ZOL: ACIDO ZOLEDRONICO. PAM: PAMIDRONATO DISÓDICO. RIS: RISEDRONATO. ALE: ALENDRONATO</b>		

#### 5.4. Sobre el análisis de la densidad ósea

En el análisis en nuestro estudio de la densidad ósea en el hueso de neoformado mediante estereología, hallamos diferencias significativas entre el grupo control y todos los grupos en que se administraron bisfosfonatos, siendo mayor la densidad ósea en estos últimos. Además, en los grupos que recibieron ácido zoledrónico durante 2 y 3 semanas, la

densidad ósea fue significativamente mayor que en los 3 grupos tratados con pamidronato disódico.

*Jee y cols.* midieron mediante tomografía computerizada la densidad ósea de los alveolos post-extracción en ratas ovariectomizadas tras la administración de alendronato, hallando diferencias significativas en el aumento de la densidad ósea entre los grupos control y el de administración del fármaco a las 4 semanas tras la extracción; la diferencia también fue significativa entre los grupos ovariectomizados tratados con y sin alendronato en el mismo periodo. En nuestra investigación también hallamos que los grupos a los cuales se administró BFs tenían un aumento significativo de la densidad ósea con respecto al control, siendo más relevante en los grupos que recibieron ácido zoledrónico.

*Cetinkaya y cols.*, en su estudio del efecto del risedronato en un modelo de periodontitis experimental en ratas, encontraron diferencias significativas en su medición mediante estereología en el aumento de la densidad ósea entre los dos grupos con un periodo de administración corto del BF, y los dos grupos que recibieron el fármaco en un plazo más largo, así como el grupo con periodontitis pero sin administración de BF. También hubo diferencias significativas entre los grupos que recibieron BF (excepto el de menor dosis y duración) y los grupos control sin periodontitis, teniendo estos últimos una mayor densidad ósea. En nuestro estudio la administración de BFs supone un aumento de la densidad ósea con respecto al grupo control.

En su estudio de la ONM por BFs en ratas, *Marino y cols.* miden mediante microTC la densidad mineral ósea de los alveolos post-extracción, siendo esta mayor en los grupos que recibieron ácido



zoledrónico que en el grupo control. Nuestros resultados coinciden con este estudio en el aumento de la densidad ósea en los grupos tratados tanto con pamidronato disódico como con ácido zoledrónico.

**Tabla 5.5.** Comparación de resultados en el análisis de la densidad ósea

Autor	Estudio	Resultados
Nuestro estudio	Estereología de densidad ósea post-extracción, ratas Sprague-Dawley	Mayor densidad en BFs que control Mayor densidad con ZOL que PAM
Cetinkaya y cols. 2008	Esterología de densidad ósea en periodontitis con BFs, ratas Wistar	Menor densidad en RIS que control
Jee y cols. 2010	Densidad radiográfica con micro TC en alveolo post-extracción, ratas Sprague-Dawley	Diferencias significativas entre tratadas con ALE y controles
Marino y cols. 2012	Densidad mineral ósea con microTC en alveolo post-extracción, ratas Sprague-Dawley	Mayor densidad ósea en ZOL vs control

**ZOL: ACIDO ZOLEDRONICO. PAM: PAMIDRONATO DISÓDICO. RIS: RISEDONATO. ALE: ALENDRONATO.**

### 5.5 Sobre el microanálisis de elementos

Por último, el microanálisis de elementos en nuestro estudio reveló diferencias significativas entre los grupos que recibieron ácido zoledrónico con respecto a los grupos control y tratados con pamidronato, siendo mayor el porcentaje de calcio y fósforo en los primeros.

*Camacho-Alonso y cols.* estudian el efecto del ácido zoledrónico en hueso mandibular y fémur de ratas, haciendo microanálisis de elementos con el microscopio electrónico de barrido. En sus resultados encuentran también una mayor cantidad de calcio y fósforo en las mandíbulas provenientes de los grupos que recibieron ácido zoledrónico con respecto al grupo control, con diferencias significativas, pero sin embargo no lo son en



las mediciones en fémur. En nuestro estudio también hallamos un mayor porcentaje de Ca y P en los grupos tratados con ácido zoledrónico.

Mayahara y *cols.* estudian el efecto del pamidronato disódico en la concentración de calcio y fósforo en húmero de rata, no hallando diferencias significativas con los grupos no tratados con BFs. En nuestro estudio, en mandíbula de rata, no encontramos diferencias significativas entre los grupos que recibieron pamidronato disódico y el grupo control, pero sí mayor concentración de Ca y P en los grupos que recibieron ácido zoledrónico.

**Tabla 5.6.** Comparación de resultados en el microanálisis de elementos

Autor	Estudio	Resultados
Nuestro estudio	Microanálisis de elementos con MEB, ratas Sprague-Dawley	Mayor concentración de Ca y P en grupo ZOL
Camacho-Alonso y <i>cols.</i> 2013	Microanálisis de elementos con MEB, ratas Sprague-Dawley	Mayor concentración de Ca y P en grupo ZOL
Mayahara y <i>cols.</i> 2003	Microanálisis de elementos con MEB en húmero, ratas Wistar	No diferencias significativas entre PAM y resto de grupos
<b>ZOL: ACIDO ZOLEDRONICO. PAM: PAMIDRONATO DISÓDICO. RIS: RISEDRONATO. ALE: ALENDRONATO.</b>		

## 5.6 Sobre otros elementos del nuestro estudio

Cabe destacar en nuestro estudio la no aparición de osteonecrosis maxilar en ninguno de los animales de nuestra muestra, a diferencia de otros estudios que si registran lesiones de este tipo.

También señalar la limitación de nuestro estudio, al valorar únicamente la zona de hueso post-extracción, ya que no analizamos el resto del hueso mandibular.



No podemos establecer resultados concluyentes debido fundamentalmente a la escasez de estudios y heterogeneidad de los mismos. No obstante, nuestros resultados corresponden al análisis de un número de muestras a distintas concentraciones farmacológicas, pero limitado en el tiempo a los 14 días, no pudiendo ofrecer resultados a más largo plazo. Son necesarias nuevas investigaciones en las que los tratamientos sean más prolongados en el tiempo, y aplicar nuevos métodos que nos permitan identificar en último término a los pacientes que presenten un riesgo más elevado de desarrollar ONM para tomar las medidas preventivas oportunas y poder identificar mejor estos procesos.

Como podemos observar, hay una gran disparidad en los estudios sobre los efectos de los bisfosfonatos, utilizándose diferentes métodos y estudiando diversos parámetros, siendo necesarios muchos más estudios para poder llegar a averiguar los mecanismos últimos de acción de los bisfosfonatos.

Debería estandarizarse el estudio de los mismos para poder comparar los distintos resultados, y así extrapolarlos a su efecto en humanos. Se deberían consensuar modelos de experimentación teniendo en cuenta los siguientes factores:

- modelo animal a emplear
- BFs a estudiar, dosificación y tiempo de administración del fármaco
- administración concomitante de otros fármacos
- manipulaciones a realizar (exodoncias, fracturas, periodontitis)
- parámetros a analizar, y métodos para la medición de los mismos.



# 6. CONCLUSIONES



## 6. CONCLUSIONES

Una vez analizados los resultados de nuestro estudio en hueso mandibular de ratas Sprague-Dawley, llegamos a las siguientes conclusiones:

1. Radiológicamente, la administración sistémica de Pamidronato Disódico o Ácido Zoledrónico aumenta la neoformación ósea tras la extracción dental con respecto al grupo control, siendo mayor la formación de hueso al administrar Ácido Zoledrónico.
2. La densidad vascular en el hueso neoformado del alveolo postextracción no se ve alterada por la administración sistémica de Pamidronato Disódico; sin embargo, esta densidad vascular si disminuye al administrar Ácido Zoledrónico de forma sistémica.
3. La densidad de hueso neoformado medida por unidad de volumen en el alveolo postextracción mediante estereología es mayor tras administrar Pamidronato Disódico o Ácido Zoledrónico de forma sistémica con respecto al grupo control, obteniendo mayor densidad ósea con Ácido Zoledrónico.
4. Al cuantificar la cantidad de calcio y fósforo mediante microanálisis EDX (espectrometría por dispersión de energía de rayos X), encontramos que los porcentajes de los mismos eran mayores en los grupos a los que se administró de forma sistémica Ácido Zoledrónico.



# 7. BIBLIOGRAFÍA



## 7. BIBLIOGRAFÍA

**Aghaloo TL**, Kang B, Sung EC, et al. Periodontal disease and bisphosphonates induce osteonecrosis of the jaw in the rat. *J Bone Miner Res* 2011; 26:1871-82.

**Aguirre JI**, Akhter MP, Kimmel DB, et al. Oncologic Doses Of Zoledronic Acid Induce Osteonecrosis Of The Jaw-Like Lesions In Rice Rats (*Oryzomys palustris*) With Periodontitis. *J Bone Miner Res* 2012; 27:2130-43.

**Ali-Erdem M**, Burak-Cankaya A, Cemil-Isler S, et al. Extraction socket healing in rats treated with bisphosphonate: Animal model for bisphosphonate related osteonecrosis of jaws in multiple myeloma patients. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 2011; 16:e879-83.

**Allam E**, Allen MR, Chu TM, Ghoneima A, Windsor LJ. In vivo effects of zoledronic acid on oral mucosa epithelial cells. *Oral Dis* 2011; 17:291-7.

**Allen MR**, Kubek DJ, Burr DB, Ruggiero SL, Chu TMG. Compromised osseous healing of dental extraction sites in zoledronic acid-treated dogs. *Osteoporos Int* 2011; 22:693–702.

**Allen MR**. Bisphosphonates and osteonecrosis of the jaw: moving from the bedside to the bench. *Cell Tissues Organs* 2009; 189: 289-94.

**Allen MR**. Animal models of osteonecrosis of the jaw. *J Musculoskelet Neuronal interact* 2007; 7:358-60.



**Allen MR**, Chu TMG, Ruggiero SL. Absence of exposed bone following dental extraction in beagle dogs treated with nine-months of high dose zoledronic acid combined with dexamethasone. *J Oral Maxillofac Surg* 2013; 71:1017-26.

**American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons.** AAOMS position paper on bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws. *J Oral Maxillofac Surg* 2007; 65:369-76.

**Amler MH.** The time sequence of tissue regeneration in human extraction wounds. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1969; 27:309-18.

**Aragon-Ching JB**, Dahut WL. Osteonecrosis of the jaw and the use of antiangiogenic agents: just an association? *Oncologist* 2008; 13: 1314.

**Åstrand J**, Harding AK, Aspenberg P, Tägil M. Systemic zoledronate treatment both prevents resorption of allograft bone and increases the retention of new formed bone during revascularization and remodeling. A bone chamber study in rats. *BMC Musculoskelet Disord* 2006; 7:63-9.

**Atanes-Bonome P**, Atanes-Bonome A, Rios-Lage P, Atanes-Sandoval AD. Osteonecrosis de los maxilares relacionada con el tratamiento con bisfosfonatos. *Semergen* 2013; 40:143-8.

**Ayllon J**, Launay-Vacher V, Medioni J, Cros C, Spano JP, Oudard S. Osteonecrosis of the jaw under bisphosphonate and antiangiogenic therapies: cumulative toxicity profile? *Ann Oncol* 2009; 20:600-1.

**Back DA**, Pauly S, Rommel L, et al. Effects of local zoledronate on implant osseointegration in a rat model. *BMC Musculoskelet Disord* 2012; 13:42.



**Bäckman U**, Svensson A, Christofferson RH, Azarbayjani F. The bisphosphonate, zoledronic acid reduces experimental neuroblastoma growth by interfering with tumor angiogenesis. *Anticancer Res* 2008; 28:1551-8.

**Badros A**, Weikel D, Salama A, et al. Osteonecrosis of the jaw in multiple myeloma patients: clinical features and risk factors. *J Clin Oncol* 2006; 24:945-52.

**Bagán JV**, Blade J, Cózar JM, y cols. Recomendaciones para la prevención, diagnóstico y tratamiento de osteonecrosis de los maxilares (ONM) en pacientes con cáncer tratados con bisfosfonatos. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 2007; 12:279-83.

**Bagán JV**, Diz-Dios P, Gallego L, y cols. Recomendaciones para la prevención de la osteonecrosis de los maxilares (ONM) en pacientes con cáncer tratados con bisfosfonatos intravenosos. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 2008; 13:161-7.

**Bagan JV**, Jiménez Y, Hernández S, et al. Osteonecrosis of the jaws by intravenous bisphosphonates and osteoradionecrosis: A comparative study. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 2009; 14:e616-9.

**Bagán JV**, Murillo J, Jiménez Y, et al. Avascular jaw osteonecrosis in association with cancer chemotherapy: series of 10 cases. *J Oral Pathol Med* 2005; 34:120-3.

**Bagan J**, Scully C, Sabater V, Jimenez Y. Osteonecrosis of the jaws in patients treated with intravenous bisphosphonates (BRONJ): A concise update. *Oral Oncol* 2009; 45:551-4.





**Bagán-Sebastián JV.** Osteonecrosis de los maxilares por bisfosfonatos. Valencia: Medicina Oral S.L.; 2008.

**Barba-Recreo P,** del Castillo Pardo de Vera JL, García-Arranz M, Yébenes L, Burgueño M. Zoledronic acid-related osteonecrosis of the jaws. Experimental model with dental extractions in rats. *Journal of Cranio-Maxillo-Facial Surgery* 2014; 42:744-50.

**Basi DL,** Lee SW, Helfman S, Mariash A, Lunos SA. Accumulation of VEGFR2 in zoledronic acid-treated endothelial cells. *Mol Med Rep* 2010; 3:399-403.

**Bäuerle T,** Merz M, Komijenovic D, Zwick S, Semmler W. Drug-induced vessel remodeling in bone metastases as assessed by dynamic contrast enhanced magnetic resonance imaging and vessel size imaging: a longitudinal in vivo study. *Clin Cancer Res* 2010; 16:3215-25.

**Belfrage O,** Isaksson H, Tägil M. Local treatment of a bone graft by soaking in zoledronic acid inhibits bone resorption and bone formation. A bone chamber study in rats. *BMC Musculoskeletal Disorders* 2012; 13:240.

**Bezzi M,** Hasmim M, Bieler G, Dormond O, Rüegg C. Zoledronate sensitizes endothelial cells to tumor necrosis factor-induced programmed cell death. *J Biol Chem* 2003; 278:43603-14.

**Bi Y,** Gao Y, Ehrchiou D, et al. Bisphosphonates cause osteonecrosis of the jaw-like disease in mice. *Am J Pathol* 2010; 177: 280-90.

**Bocanegra-Perez S.** Osteonecrosis de los maxilares asociada a bisfosfonatos. Tesis Doctoral. Las Palmas de Gran Canaria 2010.



**Bocanegra-Pérez S**, Vicente-Barrero M, Knezevic M, et al. Use of platelet-rich plasma in the treatment of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2012; 41:1410-5.

**Bocanegra-Pérez S**, Vicente-Barrero M, Sosa-Henríquez M, Knezevic M, Castellano-Navarro JM, Rodríguez-Millares J. Osteonecrosis maxilar asociada al uso de bisfosfonatos. Una propuesta para el tratamiento conservador. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 2009; 14:32-5.

**Blus C**, Szmukler-Moncler S, Giannelli G, Denotti G, Orrù G. Use of Ultrasonic Bone Surgery (Piezosurgery) to Surgically Treat Bisphosphonate-Related Osteonecrosis of the Jaws (BRONJ). A Case Series Report with at Least 1 Year of Follow-Up. *The Open Dentistry Journal* 2013; 7:94-101.

**Camacho-Alonso F**, López-Jornet P, Vicente-Hernández A. Short-term effect of zoledronic acid upon fracture resistance of the mandibular condyle and femoral head in an animal model. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 2013; 18:e421-6.

**Caraglia M**, Santini D, Marra M, Vincenzi B, Tonini G, Budillon A. Emerging anti-cancer molecular mechanisms of aminobisphosphonates. *Endocr Relat Cancer* 2006; 13:7-26.

**Cardaropoli G**, Araújo M, Lindhe J. Dynamics of bone tissue formation in tooth extraction sites. An experimental study in dogs. *J Clin Periodontol* 2003; 30, 809-18.

**Cardona F**, Bagán JV, Sáinz E, Figuerido J, Giner F, Vidán FJ. Osteonecrosis de los maxilares por bisfosfonatos. Actualización y puesta al día. *An Sist Sanit Navar* 2009; 32: 423-37.



**Cetinkaya BO**, Keles GC, Ayas B, Gurgor P. Effects of risedronate on alveolar bone loss and angiogenesis: a stereologic study in rats. *J Periodontol* 2008; 79:1950-61.

**Chen ST**, Wilson TG Jr, Hämmerle CH. Immediate or early placement of implants following tooth extraction: review of biologic basis, clinical procedures and outcomes. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2004; 19:12-25.

**Chung ES**, Chauhan SK, Jin Y, et al. Contribution of macrophages to angiogenesis induced by vascular endothelial growth factor receptor-3-specific ligands. *Am J Pathol* 2009; 175:1984-92.

**Conte-Neto N**, Spolidorio LC, Andrade CR, S Bastos AS, Guimarães M, Marcantonio E Jr. Experimental development of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw in rodents. *Int J Exp Pathol* 2013; 94:65-73.

**Conte-Neto N**, de Souza Bastos A, Spolidorio LC, Chierici-Marcantonio RA, Marcantonio E. Long-term treatment with alendronate increases the surgical difficulty during simple exodontias – an in vivo observation in Holtzman rats. *Head & Face Medicine* 2012; 8:20.

**Coviello V**, Peluso F, Dehkhargani SZ, et al. Platelet-rich plasma improves wound healing in multiple myeloma bisphosphonate-associated osteonecrosis of the jaw patients. *J Biol Regul Homeost Agents* 2012; 26:151-5.

**Croucher PI**, De Raeve H, Perry MJ, et al. Zoledronic acid treatment of 5T2MM-bearing mice inhibits the development of myeloma bone disease: evidence for decreased osteolysis, tumor burden and angiogenesis, and increased survival. *J Bone Miner Res* 2003; 18: 482-92.



**Cruz AF Jr**, Buchpiguel C, Guarniero R, Barbieri A. Pamidronate and zoledronate effects in the increment of bone mineral density and histomorphometry in rats. *Acta Cir Bras* 2011; 26:114-20.

**Del Castillo Pardo de Vera JL**, García de Marcos JA, Arroyo Rodríguez S, Galdeano Arenas M, Calderón Polanco J. Osteonecrosis de los maxilares asociada al empleo de bifosfonatos. *Rev Esp Cir Oral y Maxilofac* 2007; 29:295-308.

**Dunford JE**, Thompson K, Coxon FP, et al. Structure-activity relationships for inhibition of farnesyl diphosphate synthase in vitro and inhibition of bone resorption in vivo by nitrogen-containing bisphosphonates. *J Pharmacol Exp Ther* 2001; 296:235-42.

**Engroff SL**, Kim DD. Treating bisphosphonate osteonecrosis of the jaws: is there a role for resection and vascularized reconstruction? *J Oral Maxillofac Surg* 2007; 65:2374-85.

**Estefanía-Fresco R**, Ponte-Fernández N, Aguirre-Urizar JM. Bisfosfonatos y patología oral II. Osteonecrosis maxilar: revisión de la literatura hasta 2005. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 2006; 11:265-70.

**Fernández-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; 11:32-6.

**Fernández-Tresguerres-Hernández-Gil I**, Alobera-Gracia MA, del Canto-Pingarrón M, Blanco-Jerez L. Bases fisiológicas de la regeneración ósea II. El proceso de remodelado. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 2006; 11:92-8.



**Ferretti G**, Fabi A, Carlini P, et al. Zoledronic acid and angiogenesis. *Clin Cancer Res* 2007; 13(Pt 1):6850.

**Ficarra G**, Beninati F. Bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws: an update on clinical, pathological and management aspects. *Head Neck Pathol* 2007; 1:132-40.

**Filleul O**, Crompton E, Saussez S. Bisphosphonate-induced osteonecrosis of the jaw: a review of 2,400 patient cases. *J Cancer Res Clin Oncol* 2010; 136:1117–24.

**Fisher JE**, Rogers MJ, Halasy JM, et al. Alendronate mechanism of action: geranylgeraniol, an intermediate in the mevalonate pathway, prevents inhibition of osteoclast formation, bone resorption, and kinase activation *in vitro*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96:133-8.

**Fleisch H**. Development of bisphosphonates. *Breast Cancer Res* 2002; 4: 30-4.

**Fleisch H**. Bisphosphonates in osteoporosis. *Eur Spine J* 2003; 12:S142-6.

**Fleisch H**. Bisphosphonates: Mechanisms of action. *Endocr Rev* 1998; 19:80-100.

**Fliefel R**, Tröltzsch M, Kuhnisch J, Ehrenfeld M, Otto S. Treatment strategies and outcomes of bisphosphonate related osteonecrosis of the jaw (BRONJ) with characterization of patients: a systematic review. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2015; 44:568-85.

**Fournier P**, Boissier S, Filleul S, et al. Bisphosphonates inhibit angiogenesis *in vitro* and testosterone-stimulated vascular regrowth in the ventral prostate in castrated rats. *Cancer Res* 2002; 62:6538-44.



**Freiberger JJ**, Padilla-Burgos R, Choeu AH, et al. Hyperbaric oxygen treatment and bisphosphonate-induced osteonecrosis of the jaw: a case series. *J Oral Maxillofac Surg* 2007; 65:1321-7.

**Fusco V**, Galassi C, Berruti A, et al. Decreasing frequency of osteonecrosis of the jaw in cancer and myeloma patients treated with bisphosphonates: the experience of the oncology network of Piedmont and Aosta Valley (North-Western Italy). *ISRN Oncol* 2013; 2013: 672027.

**Giraud E**, Inoue M, Hanahan D. An amino-bisphosphonate targets MMP-9-expressing macrophages and angiogenesis to impair cervical carcinogenesis. *J Clin Invest* 2004; 114:623-33.

**Gómez-Font R**, Martínez-García ML, Olmos-Martínez JM. Osteoquimionecrosis de los maxilares por tratamientos con bisfosfonatos. Puesta al día. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 2008; 13: 175-82.

**Grey A**, Bolland MJ, Wattie D, Horne A, Gamble G, Reid IR. The antiresorptive effects of a single dose of zoledronate persist for two years: a randomized, placebo-controlled trial in osteopenic postmenopausal women. *J Clin Endocrinol Metab* 2009; 94: 538-44.

**Günaldi M**, Afsar CU, Duman BB, Kara IO, Tatli U, Sahin B. Effect of the cumulative dose of zoledronic acid on the pathogenesis of osteonecrosis of the jaws. *Oncology Letters* 2015; 10:439-42.

**Gutta R**, Louis PJ. Bisphosphonates and osteonecrosis of the jaws: science and rationale. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2007; 104:186-93.

**Hampson G**, Fogelman I. Clinical role of bisphosphonate therapy. *International Journal of Women's Health* 2012; 4:455-69.



**Harper RP**, Fung E. Resolution of bisphosphonate-associated osteonecrosis of the mandible: possible application for intermittent low-dose parathyroid hormone [rhPTH(1-34)]. *J Oral Maxillofac Surg* 2007; 65:573-80.

**Henríquez-Távora N**, García-Molina JA, Greco-Machado Y, et al. Análisis semicuantitativo del calcio y fósforo en los tejidos calcificados de la mandíbula. *Biomecánica* 2002; 10:5-13.

**Heras-Rincón I**, Zubillaga-Rodríguez I, Castrillo-Tambay M, Montalvo-Moreno JJ. Necrosis maxilar por bisfosfonatos. Exposición de 15 casos clínicos. Recomendaciones terapéuticas. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 2007; 12:210-4.

**Hewitt C**, Farah CS. Bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws: a comprehensive review. *J Oral Pathol Med* 2007; 36:319-28.

**Howie RN**, Borke JL, Kurago Z, et al. A model for osteonecrosis of the jaw with zoledronate treatment following repeated major trauma. *PLoS ONE* 2015; 10:e0132520.

**Infante-Cossío P**, Cabezas-Macián A, Pérez-Ceballos JL, Palomino-Nicas J, Gutiérrez-Pérez JL. Osteonecrosis maxilar relacionada con bisfosfonatos en pacientes con mieloma múltiple. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 2008; 13:35-40.

**Insalaco L**, Di Gaudio F, Terrasi M, et al. Analysis of molecular mechanisms and anti-tumoral effects of zoledronic acid in breast cancer cells. *J Cell Mol Med* 2012; 16:2186-95.



**Jabbour Z**, El-Hakim M, Henderson JE, De Albuquerque Jr RF. Bisphosphonates inhibit bone remodeling in the jaw bones of rats and delay healing following tooth extractions. *Oral Oncology* 2014; 50:485-90.

**Jee JH**, Lee W, Lee BD. The influence of alendronate on the healing of extraction sockets of ovariectomized rats assessed by in vivo micro-computed tomography. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2010; 110:e47-e53.

**Junquera LM**, Martín-Granizo R. Diagnóstico, prevención y tratamiento de la osteonecrosis de los maxilares por bisfosfonatos. Recomendaciones de la Sociedad Española de Cirugía Oral y Maxilofacial (SECOM). *Rev Esp Cir Oral Maxilofac* 2008; 30:145-56.

**Khan AA**, Morrison A, Hanley DA, et al. Diagnosis and management of osteonecrosis of the jaw: a systematic review and international consensus. *J Bone Miner Res* 2015; 30:3-23.

**Kang B**, Cheong S, Chaichanasakul T, et al. Periapical disease and bisphosphonates induce osteonecrosis of the jaw in mice. *J Bone Miner Res* 2013; 28:1631-40.

**Kato GF**, Lopes RN, Jaguar GC, Silva AP, Alves FA. Evaluation of socket healing in patients undergoing bisphosphonate therapy: Experience of a single Institution. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 2013; 18:e650-6.

**Kavanagh KL**, Guo K, Dunford JE, et al. The molecular mechanism of nitrogen-containing bisphosphonates as antiosteoporosis drugs. *PNAS* 2006; 103:7829-34.

**Kellinsalmi M**, Mönkkönen H, Mönkkönen J, et al. *In vitro* comparison of Clodronate, Pamidronate and Zoledronic Acid effects on rat



osteoclasts and human stem cell-derived osteoblasts. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 2005; 97:382-91.

**Kim JW**, Kim SJ, Kim MR. Leukocyte-rich and platelet-rich fibrin for the treatment of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw: a prospective feasibility study. *Br J Oral Maxillofac Surg* 2014; 52:854-9.

**Kos M**, Kuebler JF, Luczak K, Engelke W. Bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws: A review of 34 cases and evaluation of risk. *J Craniomaxillofac Surg* 2010; 38:255-9.

**Kuiper JWP**, Forster C, Sun C, Peel S, Glogauer M. Zoledronate and pamidronate depress neutrophil functions and survival in mice. *Br J Pharmacol* 2012; 165:532-9.

**Kumar SKS**, Gorur A, Schaudinn C, Shuler CF, Costerton JW, Sedghizadeh PP. The role of microbial biofilms in osteonecrosis of the jaw associated with bisphosphonate therapy. *Curr Osteoporos Rep* 2010; 8:40-8.

**Lam DK**, Sándor GKB, Holmes HI, Evans AW, Clokie CML. A review of bisphosphonate-associated osteonecrosis of the jaws and its management. *J Can Dent Assoc* 2007; 73:417-22.

**Lenz JH**, Steiner-Krammer B, Schmidt W, Fietkau R, Mueller PC, Gundlach KKH. Does avascular necrosis of the jaws in cancer patients only occur following treatment with bisphosphonates? *J Cranio Maxillofac Surg* 2005; 33:395-403.

**Little DG**, McDonald M, Bransford R, Godfrey CB, Amanat N. Manipulation of the anabolic and catabolic responses with OP-1 and zoledronic acid in a rat critical defect model. *J Bone Miner Res* 2005; 20:2044-52.



**Lobato JV**, Rodrigues JM, Cavaleiro MV, et al. Maxilla osseus sequestre and oral exposure. Effects of the treatment of multiple myeloma with bisphosphonates. *Acta Med Port* 2007; 20:185-93.

**López-Jornet P**, Camacho-Alonso F, Martínez-Cánovas A, Molina-Miñano F, Gómez-García F, Vicente-Ortega V. Perioperative antibiotic regimen in rats treated with pamidronate plus dexamethasone and subjected to dental extraction: a study of the changes in the jaws. *J Oral Maxillofac Surg* 2011; 69:2488-93.

**López-Jornet P**, Camacho-Alonso F, Molina-Miñano F, Gómez-García F, Vicente-Ortega V. An experimental study of bisphosphonate-induced jaws osteonecrosis in Sprague-Dawley rats. *J Oral Pathol Med* 2010; 39:697-702.

**Luckman SP**, Hughes DE, Coxon FP, Russell RGG, Rogers MJ. Nitrogen-containing bisphosphonates inhibit the mevalonate pathway and prevent post-translational prenylation of GTP-binding proteins, including Ras. *J Bone Miner Res* 1998; 13:581-9.

**Maahs MP**, Azambuja AA, Campos MM, Salum FG, Cherubini K. Association between bisphosphonates and jaw osteonecrosis: a study in Wistar rats. *Head Neck* 2011; 33:199-207.

**Magopoulos C**, Karakinaris G, Telioudis Z, et al. Osteonecrosis of the jaws due to bisphosphonate use. A review of 60 cases and treatment proposals. *Am J Otolaryngol* 2007; 28:158-63.

**Magremanne M**, Lahon M, De Ceulaer J, Reyckler H. Unusual Bevacizumab-related complication of an oral infection. *J Oral Maxillofac Surg* 2013; 71:53-5.



**Marino KL**, Zakhary I, Abdelsayed RA, et al. Development of a rat model of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw (BRONJ). *Journal of Oral Implantology* 2012; 38:511-8.

**Margaix-Muñoz M**, Bagán J, Poveda-Roda R. Intravenous bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws: Influence of coadjuvant antineoplastic treatment and study of buccodental condition. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 2013; 18:e194-200.

**Marx RE**. Pamidronate (Aredia) and zoledronate (Zometa) induced avascular necrosis of the jaws: a growing epidemic. *J Oral Maxillofac Surg* 2003; 61:1115-8.

**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; 65:415-23.

**Mayahara M**, Sasaki T. Cellular mechanism of inhibition of osteoclastic resorption of bone and calcified cartilage by long-term pamidronate administration in ovariectomized mature rats. *Anat Rec Part A* 2003; 274A:817-26.

**Merigo E**, Manfredi M, Meleti M, et al. Bone necrosis of the jaws associated with bisphosphonate treatment: a report of twenty-nine cases. *Acta Biomed* 2006; 77:109-17.

**Migliorati CA**, Schubert MM, Peterson DE, Seneda LM. Bisphosphonate-associated osteonecrosis of mandibular and maxillary bone. *Cancer* 2005; 104:89-93.



**Mínguez-Serra MP**, Salort-Llorca C, Silvestre-Donat FJ. Implantes orales en pacientes que reciben tratamiento con bisfosfonatos: Revisión y puesta al día. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 2009; 14:8-13.

**Mondelo E**. Evaluación experimental de bisfosfonatos: aspectos básicos y regulatorios. *Actualiz Osteología* 2006; 2: 93-103.

**Morgan G**, Lipton A. Antitumor effects and anticancer applications of bisphosphonates. *Semin Oncol* 2010; 37(Suppl 2):S30-S40.

**Otto S**, Abu-Id MH, Fedele S, et al. Osteoporosis and bisphosphonates-related osteonecrosis of the jaw: Not just a sporadic coincidence -a multi-centre study. *J Craniomaxillofac Surg* 2011; 39:272-7.

**Palacio EP**, Müller SS, Sardenberg T, et al. Detecting early biomechanical effects of zoledronic acid on femurs of osteoporotic female rats. *J Osteoporos* 2012; 2012:162806.

**Palaska PK**, Cartsos V, Zavras AI. Bisphosphonates and time to osteonecrosis development. *Oncologist* 2009; 14:1154-66.

**Park R**, Kim JH, Choi H, Park YB, Jung HS, Moon HS. Effect of alendronate on bone remodeling around the implant in the rat. *J Adv Prothodont* 2013; 5:374-81.

**Pastor-Zuazaga D**, Garatea-Crelgo J, Martino-Gorbea R, Etayo-Pérez A, Sebastián-López C. Osteonecrosis maxilar y bisfosfonatos. Presentación de tres nuevos casos. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 2006; 11:57-60.

**Pataki A**, Müller K, Green JR, Ma YF, Li QN, Jee WSS. Effects of short-term treatment with the bisphosphonates zoledronate and



pamidronate on rat bone: a comparative histomorphometric study on the cancellous bone formed before, during, and after treatment. *Anat Rec* 1997; 249:458-68.

**Pazianas M**, Miller P, Blumentals WA, Bernal M, Kothawala P. A review of the literature on osteonecrosis of the jaw in patients with osteoporosis treated with oral bisphosphonates: prevalence, risk factors, and clinical characteristics. *Clin Ther* 2007; 29:1548-58.

**Pelaz A**, Junquera L, Gallego L, García-Consuegra L, Junquera S, Gómez C. Alternative treatments for oral bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws: a pilot study comparing fibrin rich in growth factors and teriparatide. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 2014;19:e320-6.

**Pichardo SEC**, van Merkesteyn JPR. Bisphosphonate related osteonecrosis of the jaws: spontaneous or dental origin? *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2013; 116:287-92

**Ponte-Fernández N**, Estefanía-Fresco R, Aguirre-Urizar JM. Bisfosfonatos y patología oral I. aspectos generales y preventivos. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 2006; 11:226-30.

**Pozzi S**, Raje N. The role of bisphosphonates in multiple myeloma: mechanisms, side effects, and the future. *Oncologist* 2011; 16:651–62.

**Reid IR**, Bolland MJ. Is bisphosphonate-associated osteonecrosis of the jaw caused by soft tissue toxicity? *Bone* 2007; 41:318-20.

**Ribatti D**, Maruotti N, Nico B, et al. Clodronate inhibits angiogenesis in vitro and in vivo. *Oncol Rep* 2008; 19:1109-12.



**Rodan GA**, Fleisch HA. Bisphosphonates: Mechanisms of action. *J Clin Invest* 1996; 97:2692–6.

**Rosini S**, Rosini S, Bertoldi I, Frediani B. Understanding bisphosphonates and osteonecrosis of the jaw: uses and risks. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences* 2015; 19:3309-17.

**Ruggiero SL**, Dodson TB, Fantasia J, et al. American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons position paper on medication related osteonecrosis of the jaw - 2014 update. *J Oral Maxillofac Surg* 2014; 72:1938-56.

**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.

**Ruggiero SL**, Fantasia J, Carlson E. Bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw: background and guidelines for diagnosis, staging and management. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2006; 102:433-41.

**Rupel K**, Ottaviani G, Gobbo M, et al. A systematic review of therapeutical approaches in bisphosphonates-related osteonecrosis of the jaw (BRONJ). *Oral Oncol* 2014; 50:1049-57.

**Russell RGR**. Bisphosphonates: Mode of action and pharmacology. *Pediatrics* 2007; 119 (supl 2):S150-62 .

**Sahni M**, Guenther HL, Fleisch H, Collin P, Martin TJ. Bisphosphonates act on rat bone resorption through the mediation of osteoblasts. *J Clin Invest* 1993; 91:2004-11.



**Santini D**, Gentilucci UV, Vincenzi B, et al. The antineoplastic role of bisphosphonates: from basic research to clinical evidence. *Ann Oncol* 2003; 14:1468-76.

**Santini D**, Vincenzi B, Avvisati G, et al. Pamidronate induces modifications of circulating angiogenetic factors in cancer patients. *Clin Cancer Res* 2002; 8:1080-4.

**Santini D**, Vincenzi B, Dicuonzo G, et al. Zoledronic acid induces significant and long-lasting modifications of circulating angiogenic factors in cancer patients. *Clin Cancer Res* 2003; 9:2893-7.

**Santini D**, Vincenzi B, Galluzzo S, et al. Repeated intermittent low-dose therapy with zoledronic acid induces an early, sustained, and long-lasting decrease of peripheral vascular endothelial growth factor levels in cancer patients. *Clin Cancer Res* 2007; 13:4482-6.

**Santini D**, Vincenzi B, Hannon RA, et al. Changes in bone resorption and vascular endothelial growth factor after a single zoledronic acid infusion in cancer patients with bone metastases from solid tumours. *Oncol Rep* 2006; 15:1351-7.

**Santini D**, Virzi V, Fratto ME, et al. Can we consider zoledronic acid a new antitumor agent? Recent evidence in clinical setting. *Curr Cancer Drug Targets* 2010; 10:46-54.

**Scavelli C**, Di Pietro G, Cirulli T, et al. Zoledronic acid effects over-angiogenic phenotype of endothelial cells in patients with multiple myeloma. *Mol Cancer Ther* 2007; 6:3256-62.



**Senel FC**, Duman MK, Muci E, et al. Jaw bone changes in rats after treatment with zoledronate and pamidronate. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2010; 109:385-91.

**Sharma D**, Hamlet S, Petcu E, Ivanovski S. Animal models for bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws – an appraisal. *Oral Dis* 2013; 19:747-54.

**Siniscalchi EN**, Cutroneo G, Catalfamo L, et al. Immunohistochemical evaluation of sarcoglycans and integrins in gingival epithelium of multiple myeloma patients with bisphosphonate-induced osteonecrosis of the jaw. *Oncol Rep* 2010; 24:129-34.

**Soltau J**, Zirrgiebel U, Esser N, et al. Antitumoral and antiangiogenic efficacy of bisphosphonates *in vitro* and in a murine RENCA model. *Anticancer Res* 2008; 28:933-42.

**Sosa Henríquez M**, Gómez de Tejada Romero MJ, Bagán Sebastián JV, y cols. Osteonecrosis de los maxilares: Documento de consenso. *Rev Osteoporos Metab Miner* 2009; 1:41-51.

**Tang X**, Zhang Q, Shi S, et al. Bisphosphonates suppress insulin-like growth factor 1-induced angiogenesis via the HIF-1 $\alpha$ /VEGF signaling pathways in human breast cancer cells. *Int J Cancer* 2010; 126:90-103.

**Torregrosa JV**, Ramos AM. Uso de bisfosfonatos en la enfermedad renal crónica. *Nefrología* 2010; 30:288-96.

**Van Poznak C**. Osteonecrosis of the jaw and bevacizumabtherapy. *Breast Cancer Res Treat* 2010; 122:189-91.





**Varun RR**, Sivakumar TT, Nair BJ, Joseph AP. Bisphosphonate induced osteonecrosis of jaw in breast cancer patients: A systematic review. *J Oral Maxillofac Pathol* 2012; 16:210-4.

**Vescovi P**. Bisphosphonates and osteonecrosis: an open matter. *Clin Cases Miner Bone Metab* 2012; 9:142-4.

**Vescovi P**, Meleti M, Merigo E, et al. Case series of 589 tooth extractions in patients under bisphosphonates therapy. Proposal of a clinical protocol supported by Nd:YAG low-level laser therapy. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 2013; 18:e680-5.

**Vescovi P**, Merigo E, Meleti M, Fornaini C, Nammour S, Manfredi M. Nd:YAG laser biostimulation of bisphosphonate-associated necrosis of the jawbone with and without surgical treatment. *Br J Oral Maxillofac Surg* 2007; 45:628-32.

**Vescovi P**, Merigo E, Meleti M, Manfredi M, Fornaini C, Nammour S. Surgical Approach and Laser Applications in BRONJ Osteoporotic and Cancer Patients. *J Osteoporos* 2012; 2012:585434.

**Vincenzi B**, Napolitano A, Zoccoli A, et al. Serum VEGF levels as predictive marker of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw. *J Hematol Oncol* 2012; 5:56.

**Vincenzi B**, Santini D, Rocci L, Tonini G. Bisphosphonates: new antiangiogenic molecules in cancer treatment? *Ann Oncol* 2003; 14:806-7.

**Wang EP**, Kaban LB, Strewler GJ, Raje N, Troulis MJ. Incidence of osteonecrosis of the jaw in patients with multiple myeloma and breast or prostate cancer on intravenous bisphosphonate therapy. *J Oral Maxillofac Surg* 2007; 65:1328-31.



**Wang J**, Stern PH. Dose-dependent differential effects of risedronate on gene expression in osteoblasts. *Biochem Pharmacol* 2011; 81:1036-42

**Weiss HM**, Pfaar U, Schweitzer A, Wiegand H, Skerjanec A, Schran H. Biodistribution and plasma protein binding of zoledronic acid. *Drug Metab Dispos* 2008; 36:2043-9.

**Wilde F**, Heufelder M, Winter K, et al. The role of surgical therapy in the management of intravenous bisphosphonates-related osteonecrosis of the jaw. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2011; 111:153-63.

**Williamson RA**. Surgical management of bisphosphonate induced osteonecrosis of the jaws. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2010; 39: 251-5.

**Wood J**, Bonjean K, Ruetz S, et al. Novel antiangiogenic effects of the bisphosphonate compound zoledronic acid. *J Pharmacol Exp Ther* 2002; 302:1055-61.

**Yamashita J**, Koi K, Yang DY, McCauley L. Effect of zoledronate on oral wound healing in rats. *Clin Cancer Res* 2011; 17: 1405-14.

**Yamashita J**, McCauley L, Van Poznak C. Updates on osteonecrosis of the jaw. *Curr Opin Support Palliat Care* 2010; 4:200-6.

**Yang H**, Pan H, Yu F, Chen K, Shang G, Xu Y. A novel model of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw in rats. *Int J Exp Pathol* 2015; 8:5161-7.

**Yoneda T**, Hagino H, Sugimoto T, et al. Bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw: position paper from the Allied Task Force Committee of Japanese Society for Bone and Mineral Research, Japan



Osteoporosis Society, Japanese Society of Periodontology, Japanese Society for Oral and Maxillofacial Radiology, and Japanese Society of Oral and Maxillofacial Surgeons. *J Bone Miner Metab* 2010; 28:365-83.

**Yu YY**, Lieu S, Hu D, Miclau T, Colnot C. Site specific effects of zoledronic acid during tibial and mandibular fracture repair. *PLoS One* 2012; 7:e31771.

**Zeisberger SM**, Odermatt B, Marty C, Zehnder-Fjällman AHM, Ballmer-Hofer K, Schwendener RA. Clodronate-liposome-mediated depletion of tumour-associated macrophages: a new highly effective antiangiogenic therapy approach. *Br J Cancer* 2006; 95:272-81.