



UNIVERSIDAD DE MURCIA
ESCUELA INTERNACIONAL DE DOCTORADO

Estudio *in vitro* del Efecto Citoprotector
de la Melatonina sobre la Citotoxicidad del Ácido
Zoledrónico en Osteoblastos Humanos

D^a Idoia Urrutia Rodríguez

2017



UNIVERSIDAD DE
MURCIA

D. L. Fernando Carballo Álvarez, Catedrático de Universidad del Área de Medicina Interna y **Presidente Comisión Académica programa doctorado** * en Ciencias de la Salud, INFORMA:

Que una vez evaluado, de conformidad con el procedimiento establecido en el artículo 21 del Reglamento de doctorado de la Universidad de Murcia, el expediente completo de la tesis doctoral titulada "ESTUDIO IN VITRO DEL EFECTO CITOPROTECTOR DE LA MELATONINA SOBRE LA CITOTOXICIDAD DEL ÁCIDO ZOLEDRÓNICO EN OSTEÓBLASTOS HUMANOS", realizada por D^a Idoia Urrutia Rodríguez, bajo la inmediata dirección y supervisión de D. Fabio Camacho Alonso y D. Ricardo Elías Oñate Sánchez, esta Comisión Académica, en sesión celebrada en fecha 23 de mayo de 2017, ha dado su autorización para su presentación ante la Comisión General de Doctorado.

Murcia, a 23 de mayo de 2017

Firmado con certificado electrónico reconocido.
La información sobre el firmante, la fecha de firma y el código de verificación del documento se encuentra disponible en los márgenes izquierdo e inferior

Doctorando: D^a. Idoia Urrutia Rodríguez

**Informe del Departamento para alumnos del RD 778/1998.*

**Informe de La Comisión Académica del Programa para alumnos del RD 56/2005 y RD 1393/2007.*

Mod: T-40

Código seguro de verificación: RUxFMkuQ-s9aRGvBL-8x9s90Pm-3wSZhT71

COPIA ELECTRÓNICA - Página 1 de 1

Esta es una copia auténtica imprimible de un documento administrativo electrónico archivado por la Universidad de Murcia, según el artículo 27.3 c) de la Ley 39/2015, de 2 de octubre. Su autenticidad puede ser contrastada a través de la siguiente dirección: <https://sede.um.es/validador/>





UNIVERSIDAD DE
MURCIA

D. Fabio Camacho Alonso, Profesor Titular de Universidad del Área de Estomatología en el Departamento de Dermatología, Estomatología, Radiología y Medicina Física, AUTORIZA:

La presentación de la Tesis Doctoral titulada "Estudio in vitro del efecto citoprotector de la melatonina sobre la citotoxicidad del ácido zoledrónico en osteoblastos humanos", realizada por D^a. Idoia Urrutia Rodríguez, 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 Abril de 2017



UNIVERSIDAD DE
MURCIA

D. Ricardo Elías Oñate Sánchez, Profesor Titular de Universidad del Área de Estomatología en el Departamento de Dermatología, Estomatología, Radiología y Medicina Física, AUTORIZA:

La presentación de la Tesis Doctoral titulada "Estudio in vitro del efecto citoprotector de la melatonina sobre la citotoxicidad del ácido zoledrónico en osteoblastos humanos", realizada por D^a. Idoia Urrutia Rodríguez, 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 Abril de 2017

AGRADECIMIENTOS

Sólo aquellos que hayan vivido la experiencia de la investigación, sabrán que no es sólo un proceso donde se crece a nivel científico-formativo, por todos los conocimientos nuevos que se adquieren, sino que también se crece a nivel emocional, ya que todo proyecto presenta una serie de retos y dificultades que deben ser superados y de lo contrario, nos enseña a encajar las derrotas y a intentarlo de nuevo.

En primer lugar, quiero dar las gracias a mis directores, Fabio Camacho Alonso y Ricardo Elías Oñate Sánchez, por haberme dado la oportunidad de vivir esta experiencia, descubrirme un mundo diferente y acompañarme en el proceso.

También me gustaría dar las gracias a todo el personal del S.A.C.E, Antonia Bernabeu Esclapez, José Muñoz Ramos y Juana María García Reverte, por su gran paciencia conmigo, por haberme guiado y enseñado todo lo que sé sobre el cultivo celular.

Gracias a Dámaris, que estuvo siempre ahí para escucharme y creyó que era capaz de conseguir este objetivo.

A Daniel, por estar a mi lado en todo momento, ser mi apoyo, y estar siempre dispuesto a prestarme su ayuda.

A mi hermano, Álvaro, por ser mi vía de escape sin él saberlo.

Y por último, agradecer a mis padres, Rodrigo y Enriqueta, que con su cariño me han permitido invertir estos años en conocimiento y formación, sin los cuales todo esto no habría sido posible.

INDICE DE ABREVIATURAS

6-SMT: 6-sulfatoximelatonina.

AAOMS: Asociación Americana de Cirujanos Orales y Maxilofaciales (American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons).

ADN: ácido dexoxiribonucleico.

ALP: fosfatasa alcalina (alkaline phosphatase).

AMPc: adenosín monofosfato cíclico (cyclic adenosine monophosphate cAMP)

Apppl: metabolito producido por acumulación de pirofosfato de isopentenilo.

Arg-Gly-Asp (RGD): secuencia ácido argininglicilaspartico. Es un tripérido formado por L-arginina, glicina y ácido L-aspartico (Arginylglycylaspartic acid (RGD))

ARNm: ácido ribonucleico.

ARNm: ácido ribonucleico mensajero.

ATM: articulación temporomandibular.

ATP: trifosfato de adenosina (Adenosin triphosphate).

AZ: ácido zoledrónico.

BFs: Bifosfonatos.

BF-N: Bifosfonato nitrogenado.

BMPs: proteínas morfogenéticas óseas (bone morphogenetic proteins).

BSP: sialoproteína ósea (bone sialoprotein).

CBFA1: factor de transcripción clave en la diferenciación de osteoblastos humanos, también llamado Runx-2.

CD44: Molécula de diferenciación celular 44 (Cluster of differentiation 44).

CD73: 5'-nucleotidase (5'-NT), regulador de la diferenciación osteogénica de células madre mesenquimales.

CD90: Thy-1 o CD90 (Cluster of Differentiation 90) es una proteína de superficie celular conservada anclada con glicofosfatidilinositol (GPI) fuertemente N-glicosilada de 25-37 kDa con un único dominio de inmunoglobulina similar a V, descubierto originalmente como un antígeno de timocito. Thy-1 puede ser utilizado como un marcador para una variedad de células madre y para los procesos axonales de las neuronas maduras.

CD105: La endoglina es una glicoproteína de la membrana tipo I localizada en la superficie de la célula que forma parte del complejo receptor del TGF-beta. Esta proteína consiste en un homodímero de 180 kDa con puentes disulfuro 1. Se ha encontrado en células endoteliales, macrófagos activados, fibroblastos y células de músculo liso.

CDK1: quinasa dependiente de ciclina 1 (cell división control protein 2 homolog).

CDK4: quinasa dependiente de ciclina 4.

CFU-GM: Unidad formadora de colonias de Granulocitos y Macrófagos (Granulocyte-macrophage colony-forming unit).

COX-2: ciclooxigenasa 2.

c-Raf: proteína quinasa proto-oncogénica serín /treonín, también llamada c-RAF o Raf-1. Enzima codificada en humanos por el gen RAF1, pertenece a la vía MAPK.

CRE: element de respuesta de cAMP.

CREB: element de union de respuesta a cAMP (cAMP response element-binding).

CTX: telopeptido carboxiterminal de procolágeno tipo 1.

CXCR4: Quimiocina (familia de las quinasas). Chemokine receptor type 4. También llamado fusin o CD184. Proteína codificada por el gen CXCR4. En superficie de inmunocitos TCD4. Correceptor del VIH.

DMSO: dimetilsulfóxido.

EDTA: ácido etilendiaminotetraacético.

EGFR: factor de crecimiento epidérmico.

ER: receptor de estrógeno (estrogen receptor).

ERE: elemento de respuesta a estrógenos.

ERK: vía ERK o vía MAPK, proteína quinasas activadas por mitógenos de regulación extracelular (Mitogen-Activated Protein Kinases).

FDA: Administración de Alimentos y Medicamentos de EE.UU (Food and Drug Administration).

FGF-2: factor de crecimiento de fibroblastos.

FPPS: farnesildifosfato sintetasa.

GDP: guanosín difosfato (Guanosine diphosphate).

GH: hormona del crecimiento.

GMPc: guanosín monofosfato cíclico (cyclic guanosine monophosphate, cGMP).

GTP: guanosín trifosfato (Guanosine triphosphate).

HA: hidroxapatita.

hAMSC: células madre mesenquimales adultas humanas.

HIOMT: Hidroxiindol-O-metiltransferasa.

HOBc: línea celular de osteoblastos humanos.

HUVEC: células endoteliales de la vena umbilical humanas.

IFI-6-16: proteína interferón inducible 6-16.

IL-1: interleuquina 1.

IL-2: interleuquina 2.

IL-4: interleuquina 4.

IL-6: interleuquina 6.

iNOS: óxido nítrico sintetasa.

IPP: pirofosfato de isopentenilo.

JNK: quinasa c-Jun N-terminal.

MAP: proteínas asociadas a microtúbulos (microtubule associated proteins).

MAPK: vía MAP cinasas o ERK (Mitogen-Activated Protein Kinases).

M-CSF: factor estimulante de colonias de macrófagos (Macrophage colony stimulating factor).

MEK: proteína quinasa activada por mitógeno perteneciente a la vía MAPK o ERK.

MLT: melatonina.

MRONJ: osteonecrosis mandibular asociada a medicamentos (medication related osteonecrosis of the jaw).

MSK1: Mitogen-and stress-activated protein kinase-1. Activada por MAPK y SAPK/p38 puede mediar la activación de CREB.

MT1: receptor de melatonina 1.

MT2: receptor de melatonina 2.

MT3: receptor de melatonina 3.

MTT: Dimetil Tiazol Tetrazolium.

NAD: El dinucleótido de nicotinamida y adenina, también conocido como nicotin adenin dinucleótido o nicotinamida adenina dinucleótido (abreviado NAD⁺ en su forma oxidada y NADH en su forma reducida), es una coenzima que se halla en las células vivas y que está compuesta por un dinucleótido, es decir, por dos nucleótidos, unidos a través de grupos fosfatos: uno de ellos es una base de adenina y el otro, una nicotinamida. Su función principal es el intercambio de electrones y protones y la producción de energía de todas las células.

NAS: N-acetilserotonina.

NAT: N-acetiltransferasa.

NE: norepinefrina.

NQO2: quinona reductasa 2.

OCN: osteocalcina.

ODF: factor de diferenciación de osteoclastos.

ONM: osteonecrosis maxilar.

ONMB: osteonecrosis maxilar por bifosfonatos.

OPG: osteoprotegerina.

OPN: osteopontina.

PI: pirofosfato inorgánico.

PKA: proteína quinasa A (proteín kinase A).

PKC: proteína quinasa C (proteín kinase C).

PKC α : proteína quinasa C α .

PLC: fosfolipasa C (phospholipase C).

PPARC: receptor de peroxisomas.

Prkd1: proteína quinasa D1, regula la señalización de receptores de membrana, el transporte a Golgi, protección frente al estrés oxidativo mitocondrial, transcripción genética, y morfología, movilidad y adhesión celular.

p38: proteína quinasa activada por mitógeno responsable de la estimulación por estrés y de la diferenciación celular, apoptosis y fagocitosis.

P90rsk: quinasa AGC de la familia RSK. Fosforilada y activada por ERK1/2 en respuesta a factores de crecimiento, hormonas polipeptídicas y neurotransmisores. Participa en la regulación negativa de la apoptosis y caspasas, regulación positiva de diferenciación celular y crecimiento celular, y regulación positiva de factores de transcripción de ARN polimerasa II.

RANK: receptor activador del factor nuclear κ B (Receptor Activator for Nuclear Factor κ B).

RANKL: ligando del receptor activador del factor nuclear κ B (Receptor Activator for Nuclear Factor κ B Ligand).

REM: fase del sueño REM (Rapid Eye Movement).

RUNX-2: factor de transcripción clave en la diferenciación de osteoblastos humanos, también llamado Cbfa1.

SIR2: gen sirtuin (su homólogo en mamíferos es SIRT1). Participa en la respuesta a estrés como calor o inanición y en la extensión del tiempo de vida bajo restricción calórica.

SIRT1: miembro de la familia de proteína sirtuin, homólogo de Sir2. Proteínas reguladoras intracelulares con actividad mono-ADP-ribosiltransferasa. La inducción de su expresión aumenta la sensibilidad celular a insulina.

Stat 3: El transductor de señal y activador de la transcripción 3, factor de transcripción codificado en humanos por el gen STAT3.

STS: Staurosporine. Induce cambios en MAPK.

TNFR: receptor de factor de necrosis tumoral.

TNF- α : factor de necrosis tumoral α (tumoral necrosis factor α).

TXNIP: Thioredoxin-interacting protein.

Wnts: glicoproteínas ricas en cisteína.

RESUMEN

Objetivo: Evaluar los efectos citoprotectores de la melatonina (MLT) sobre osteoblastos humanos tratados con ácido zoledrónico (AZ). **Métodos:** Los osteoblastos humanos fueron expuestos a AZ (1, 5, 10, 50, 100 and 300 μM) y MLT (1, 10, 50, 100 y 200 μM) durante 24, 48 y 72 horas de incubación, para evaluar sus efectos sobre la viabilidad celular. **Resultados:** la viabilidad celular de los osteoblastos humanos disminuyó con las concentraciones crecientes de AZ, durante el periodo de incubación de 24, 48 y 72 horas. Se obtuvo una mejora en la viabilidad celular tras 24 horas de incubación con MLT a baja concentración (sin diferencias estadísticamente significativas); la viabilidad celular aumentó tras 48 y 72 horas de incubación con MLT a alta concentración (100 and 200 μM). La MLT a concentraciones de 100 y 200 μM parece tener cierto efecto citoprotector sobre los osteoblastos humanos tratados con AZ a bajas concentraciones de AZ (1 y 5 μM), ya sea a las 24, 48 o 72 horas. Sin embargo, a concentraciones de AZ $\geq 10 \mu\text{M}$ los posibles efectos citoprotectores de la MLT fueron bajos a las 24 horas de incubación. **Conclusiones:** La MLT tiene un efecto citoprotector sobre los osteoblastos humanos tratados con AZ y podría representar una alternativa preventiva prometedora para los pacientes con riesgo de osteonecrosis mandibular relacionada con los bisfosfonatos.

SUMMARY

Objective: To evaluate the cytoprotective effects of melatonin (MLT) on zoledronic acid (ZA)-treated human osteoblasts. **Methods:** Human osteoblasts were exposed to ZA (1, 5, 10, 50, 100 and 300 μM) and MLT (1, 10, 50, 100 y 200 μM) for 24, 48 and 72 hours of incubation, to evaluate their effects on cell viability. **Results:** As ZA concentration increased, greater reductions in cell viability of human osteoblasts were induced whether at 24, 48 or 72 hours incubation. At 24 hours incubation with MLT, greatest cell viability was obtained when low dose of MLT was applied (without significant differences); 48 and 72 hours incubation presented the greatest cell viability with the highest MLT concentrations (100 and 200 μM). MLT at concentrations of 100 and 200 μM would appear to have a certain cytoprotective effect on ZA-treated human osteoblasts with low concentrations of ZA (1 y 5 μM), whether at 24, 48 or 72 hours; however, at ZA concentrations ≥ 10 μM the possible cytoprotective effects of MLT were low at 24 hours incubation. **Conclusions:** MLT has a cytoprotective effect on ZA-treated human osteoblasts and could represent a promising preventative alternative for patients at risk of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw.

INDICE

1. Introducción	1
1.1 Bifosfonatos	1
1.1.1 Cronología histórica de los bifosfonatos	1
1.1.2 Estructura química de los bifosfonatos	2
1.1.3 Clasificación de los bifosfonatos	4
1.1.4 Mecanismo de acción de los bifosfonatos	7
1.1.4.1 Ciclo de remodelado óseo	7
1.1.4.2 Acción de los bifosfonatos sobre el metabolismo óseo ..	11
1.1.5 Aplicación clínica de los bifosfonatos	15
1.1.6 Farmaco cinética	16
1.1.7 Ácido Zoledrónico	21
1.2 Osteonecrosis maxilar por bisfosfonatos	26
1.2.1 Definición.....	26
1.2.2 Criterios diagnósticos	26
1.2.3 Factores de riesgo	28
1.2.4 Etiopatogenia.....	30
1.2.5 Epidemiología.....	32
1.2.6 Clínica.....	33
1.2.7 Tratamiento de la osteonecrosis maxilar	35
1.3 Melatonina	39
1.3.1 Síntesis de melatonina.....	39
1.3.2 Receptores de melatonina.....	45
1.3.3 Mecanismos mediados por la melatonina dentro de una célula	49
1.3.4 Funciones de la melatonina.....	51
1.3.5 Acción de la melatonina sobre el metabolismo óseo	54
1.3.6 Receptores de melatonina en las células óseas	61
2. Justificación y Objetivos	65
2.1 Justificación	65

2.2	Objetivos	67
3.	Material y Métodos	69
3.1	Material	69
3.2	Métodos	73
3.2.1	Diseño de estudio	73
3.2.2	Estudio del efecto del ácido zoledrónico sobre la viabilidad celular.....	74
3.2.3	Estudio del efecto de la melatonina sobre la viabilidad celular.....	75
3.2.4	Estudio del efecto del ácido zoledrónico y la melatonina sobre la viabilidad celular.....	75
3.2.5	Tratamiento estadístico	76
4.	Resultados	78
4.1	Efectos del AZ sobre la viabilidad celular de la línea de osteoblastos humanos HOB-c a las 24, 48 y 72 horas de incubación.	78
4.2	Efectos de la MLT sobre la viabilidad celular de la línea de osteoblastos humanos HOB-c a las 24, 48 y 72 horas de incubación...	80
4.3	Efecto citoprotector de la MLT sobre la línea de osteoblastos humanos HOB-c tratados con AZ, a las 24, 48 y 72 horas de incubación.....	81
5.	Discusión.....	90
6.	Conclusiones.....	114
7.	Bibliografía.....	116
8.	Anexos.....	162

Introducción

1.1 BIFOSFONATOS

Los bisfosfonatos o bifosfonatos (BFs), antes denominados difosfonatos, son compuestos químicos análogos al pirofosfato inorgánico, que presentan una gran afinidad por los cristales de hidroxiapatita óseos (Drake y cols., 2008).

El amplio uso de los bifosfonatos como inhibidores de la resorción ósea en múltiples patologías y/o situaciones clínicas, es directamente atribuible a su eficacia en la mejora de la calidad de vida de los pacientes con cáncer metastásico de hueso, osteoporosis o enfermedad de Paget (Russell y cols., 2006).

1.1.1 Cronología histórica de los bifosfonatos

Aunque los primeros bifosfonatos fueron sintetizados a mediados del siglo XIX, las características biológicas de los bifosfonatos como regulador fisiológico en la calcificación ósea no fueron publicadas hasta 1968, por lo que su aplicación en medicina se ha producido exclusivamente en las 3 o 4 últimas décadas.

Los BFs se empleaban en la industria textil, como inhibidores de la corrosión, fertilizantes y aceites industriales.

Uno de los pasos más importantes para el uso clínico de este fármaco fue el descubrimiento de que inhibían la reabsorción ósea, ya que tienen la propiedad de ser capaces de inhibir la disolución de cristales de hidroxiapatita. Encontraron que el pirofosfato inorgánico presente en el plasma y en la orina inhibía la precipitación del fosfato de calcio. Se demostró que el pirofosfato afectaba a la formación y disolución de cristales de fosfato de calcio *in vitro*. Posteriormente, se demostró que el pirofosfato podía inhibir la calcificación ectópica *in vivo*, y se planteó su utilización como regulador fisiológico de los procesos de calcificación. Pero el pirofosfato, administrado por vía oral, tiene una escasa acción y por vía parenteral se hidroliza rápidamente, por ello se buscaron compuestos similares al pirofosfato que tuvieran mejores propiedades

y surgieron los BFs (Francis y cols., 1969; Fleisch y cols., 1969; Russell y cols., 1970; Fleisch y cols., 1998).

Se realizó un trabajo clínico con etidronato en el tratamiento de trastornos de calcificación tales como miositis osificante progresiva (ahora conocido como la fibrodisplasia osificante progresiva, o FOP), y en la enfermedad de Paget, (Smith y cols., 1971; Bassett y cols., 1969), en el que se mostró más eficacia que los tratamientos utilizados anteriormente, debido a la fuerte afinidad del fármaco al mineral óseo. Otro uso clínico era como agentes de exploración ósea para detectar metástasis óseas y otras lesiones esqueléticas. Durante la década de 1970, comenzaron a ser utilizados como agentes terapéuticos en oncología y ahora se han establecido para el tratamiento y la prevención de complicaciones esqueléticas asociadas con metástasis óseas o de mieloma derivadas de cánceres de mama, de próstata, y otros órganos. En la osteoporosis posmenopáusica, reducen los marcadores de recambio óseo, aumentan la densidad mineral ósea en la columna lumbar y la cadera, por lo que reducen el riesgo de fracturas. (Lieberman y cols., 1995; Watts y cols., 1990; Reginster y cols., 2000; Harris y cols., 1999; Black y cols., 1996; Boonen y cols., 2005) También se utilizan para el tratamiento de la osteoporosis inducida por glucocorticoides, osteoporosis masculina y en niños con osteogénesis imperfecta.

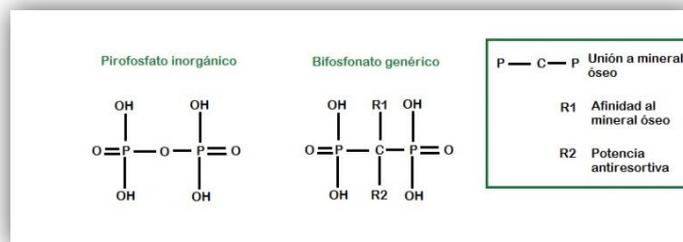
En la actualidad, están indicados en: la prevención y el tratamiento de la osteoporosis, el manejo de metástasis óseas asociadas a diferentes tipos de cáncer (mieloma múltiple, cáncer de mama, próstata y pulmón) y finalmente en determinadas displasias y distrofias óseas como la enfermedad de Paget y la osteogénesis imperfecta.

1.1.2 Estructura química de los bifosfonatos

Los bisfosfonatos son compuestos químicamente estables derivados del pirofosfato inorgánico, un compuesto que se produce de manera natural en los organismos, en el cual dos grupos fosfato se unen por esterificación de una molécula de oxígeno (ver Figura 1). A diferencia del pirofosfato inorgánico, los

bifosfonatos se caracterizan por la presencia de dos uniones C-P y por la sustitución de un átomo central de oxígeno por uno de carbono para conectar los dos fosfatos. Si la dos uniones están localizadas en el mismo átomo de carbono se denomina bifosfonato geminal (Fleisch y cols., 1998). Esta estructura molecular, les concede una gran estabilidad, resistencia a la hidrólisis y alta afinidad por el calcio de la hidroxiapatita (Drake y cols., 2008).

Figura 1: Estructura molecular de un bifosfonato.



Casi todos los bisfosfonatos de uso clínico actual también tienen un grupo hidroxilo unido al carbono central (denominado posición R1). Los grupos fosfato proporcionan una fuerte afinidad por los cristales de hidroxiapatita en el hueso, mientras que el grupo hidroxilo aumenta aún más su capacidad para unirse al calcio, proporcionándole así una interacción terciaria con la matriz ósea (Russell y cols., 2006).

Los dos grupos fosfato tienen una doble función, para la unión a mineral óseo y para la actividad antirresortiva mediada por células. Las modificaciones de uno o ambos grupos fosfonato pueden reducir drásticamente la afinidad de los bifosfonatos al mineral óseo (Ebetino y cols., 1998), así como reducir su potencia bioquímica (Ebetino y cols., 1995; Luckman y cols., 1998).

Aunque los grupos fosfato e hidroxilo son esenciales para la afinidad de los BFs con la matriz ósea, las estructuras de la fracción final (denominado posición R2) unidas al carbono central, determinan la potencia de los BFs en la inhibición de la resorción ósea. La presencia de un átomo de nitrógeno o un grupo amino aumenta la potencia antiresortiva de los BFs de 10 a 10.000, en

relación con los primeros BFs no nitrogenados (Drake y cols., 2008).

1.1.3 Clasificación de los bisfosfonatos

La evolución farmacológica del medicamento ha dado lugar a dos grandes grupos de fármacos: en primer lugar los bisfosfonatos no nitrogenados que se siguen usando en la actualidad, de los cuales los más conocidos y empleados en medicina son el Clodronato, Etidronato y el Tiludronato (ver Figura 2); y una segunda generación de bisfosfonatos nitrogenados, siendo los más utilizados el Ácido Zoledronato, el Pamidronato, el Ibandronato y el Risendronato (ver Figura 3).

La diferencia entre ambos grupos depende de la unión de la cadena lateral R2 al carbono central y de la presencia o ausencia de un átomo de nitrógeno en dicha cadena (Senel y cols., 2009).

Figura 2: Estructura química de los BFs no nitrogenados.

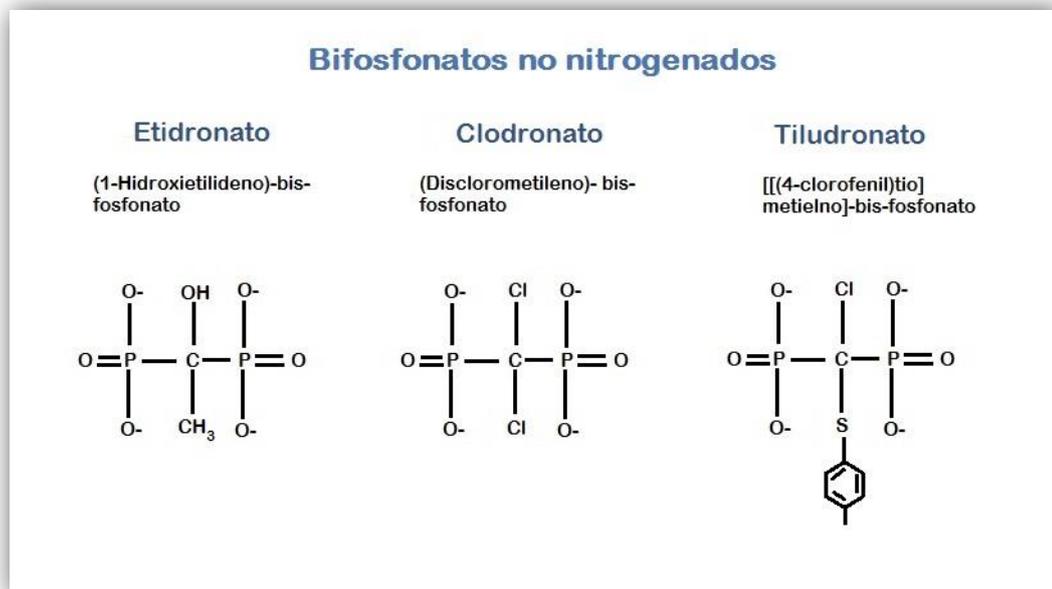
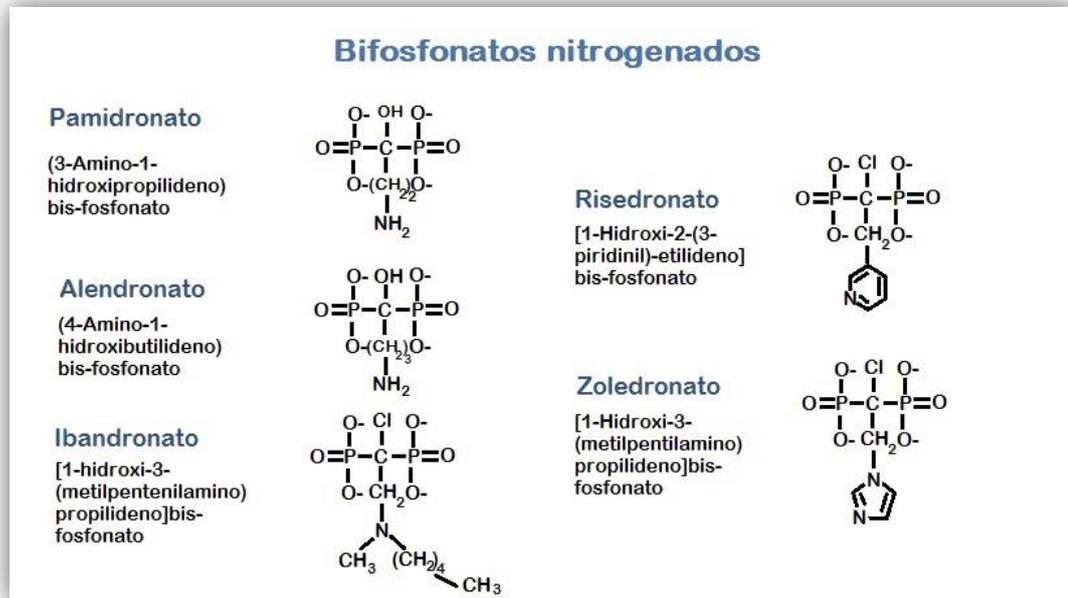


Figura 3: Estructura química de los BFs nitrogenados.



Hoy en día, se ha comenzado a clasificar a los BFs por generaciones, siendo la primera generación la de los BFs no nitrogenados, similares al pirofosfato inorgánico. La segunda generación estaría formada por los BFs nitrogenados, más potentes que los de la primera generación, como el pamidronato (que inhibe la reabsorción ósea a unas dosis que no afectan a la mineralización). Por último, los Bf de tercera generación donde se incluye el zoledronato que es el más potente y tiene una fuerte actividad antiosteoclástica (Ruggiero y cols., 2004; Senel y cols., 2009).

En la tabla 1 se recogen los BFs comúnmente empleados en la práctica clínica.

Tabla 1: BFs más empleados en la práctica clínica actual (Woo y cols., 2006; ADA., 2006; Montoya y cols., 2009).

Nombre genérico	Nombre comercial	Fabricación y localización	Formas de dosificación	Contiene nitrógeno	Aprobación por la FDA
Etidronato disódico	Didronel	Procter & Gamble Pharmaceuticals, Cincinnati, Ohio	Tabletas de 200 y 400 mg	no	1/09/1977
	Osteum Difosfen				
Clodronato disódico	Bonefos (Canada)	Schering AG, Berlin, Germany	Tabletas de 400 y 800 mg, ampollas de 600mg/ml IV	no	No aprobado
Tiludronato disódico	Skelid	Sanofi- Synthelabo Inc., New York, New	Tableta 200 mg	No, fracción de azufre	7/03/1997
Alendronato sódico	Fosamax	Merck & Co. Inc., Whitehouse Station, New Jersey	Tabletas de 5, 10, 35, 40, y 70 mg; solución oral 70 mg/ 75 mL	sí	29/09/1995
	Fosavance				
Alendronato sodio plus vitamina D3	Fosamax plus D	Merck & Co. Inc., Whitehouse Station, New Jersey	Tabletas 70 mg y 2800 U cloranfenicol	sí	7/04/2005
Pamidronato disódico	Aredia	Novartis Pharmaceuticals, East Hanover, New Jersey	Viales de 30, 60 y 90 mg IV	sí	31/10/1991
	Linoten Pmifos Xinsidona				
Risedronato sódico	Actonel	Procter & Gamble Pharmaceuticals, Cincinnati, Ohio	Tabletas 5, 30, y 35 mg	sí	27/03/1998
	Acrel				
Risedronato sódico plus cálcico	Actonel con calcio	Procter & Gamble Pharmaceuticals, Cincinnati, Ohio	Tabletas de 35 mg y 500 mg de calcio	sí	12/08/2005
Ácido Zoledrónico	Zometa	Novartis Pharmaceuticals, East Hanover, New Jersey	Viales de 4mg IV	sí	20/08/2001
	Aclasta				
Ibandronato sódico	Boniva	Roche Laboratories Inc., Nutley, New Jersey	Tableta 2,5 mg Tableta 150 mg 3mg/ 3mL IV	sí	16/05/2003 24/03/2005 6/06/2006
	Bondronat				

1.1.4 Mecanismo de acción de los bifosfonatos

1.1.4.1 Ciclo de remodelación ósea

El hueso es un tejido dinámico en constante formación y reabsorción. Este fenómeno equilibrado, denominado proceso de remodelado, permite la renovación de un 5-15 % del hueso total al año en condiciones normales (Davies y cols., 2000). El remodelado óseo consiste en la reabsorción de una cantidad determinada de hueso llevada a cabo por los osteoclastos, así como la formación de la matriz osteoide por los osteoblastos y su posterior mineralización. Este fenómeno tiene lugar en pequeñas áreas de la cortical o de la superficie trabecular, llamadas "unidades básicas de remodelado óseo" (Fernández-Tresguerres y cols., 2006).

El hueso es un tejido conjuntivo mineralizado muy vascularizado e inervado, que está estructurado en laminillas de matriz osteoide calcificada. La disposición de estas laminillas es la que determina que el hueso sea cortical o esponjoso.

En el hueso cortical la matriz ósea forma laminillas y los osteocitos se ubican entre ellas formando osteoplastos. Las laminillas se disponen de forma concéntrica alrededor de los canales vasculares llamados conductos de Havers y forman osteonas. La laminillas situadas entre las osteonas forman el sistema intersticial. Los conductos de Havers se comunican con los espacios medulares a través de los canales perforantes o de Volkman.

El hueso esponjoso lo constituyen laminillas óseas que forman placas llamadas trabéculas en las que se sitúan los osteocitos. Las trabéculas forman una red que delimita cavidades en cuyo interior se encuentra médula ósea (Wheater y cols., 1987).

Ambos tipos de hueso contienen células especializadas, matriz orgánica y fase mineral.

En el hueso encontramos varias estirpes celulares distintas: fibroblastos,

osteoblastos, condroblastos, adipocitos y mioblastos, todas ellas derivan de células mesenquimales pluripotenciales indiferenciadas.

➤ **Osteoblastos**

Los osteoblastos derivan de células madre mesenquimales, se sabe que su diferenciación está controlada por genes, por el factor de transcripción Cbfa1 y por las proteínas morfogenéticas óseas (BMPs) (Fernández-Tresguerres y cols., 2006).

A medida que las células precursoras se van diferenciando expresan en la membrana celular proteínas específicas de su función o marcadores, como Cbfa1, o el colágeno I y la osteopontina (OPN). Igualmente la fosfatasa alcalina (ALP) es una proteína de superficie que podría participar en la regulación de la proliferación, migración y diferenciación de las células osteoblásticas. La sialoproteína ósea (BSP) y la osteocalcina (OCN), son marcadores de diferenciación del pre-osteoblasto al osteoblasto y aparecen cuando se inicia la mineralización (Fernández-Tresguerres y cols., 2006).

Los osteoblastos son células grandes (20-30 μm), de forma poliédrica, con citoplasma basófilo y con un aparato de Golgi y un retículo endoplásmico rugoso de tamaño importante. Los osteoblastos y osteocitos se comunican entre sí por proteínas transmembrana o integrinas (Civitelli y cols., 1993).

Los osteoblastos sintetizan las proteínas colágenas y no colágenas de la matriz orgánica del hueso, dirigen la disposición de las fibrillas de la matriz extracelular, contribuyen a la mineralización de la sustancia osteoide, median en la reabsorción llevada a cabo por los osteoclastos a través de la síntesis de citoquinas específicas y sintetizan factores de crecimiento (Fernández-Tresguerres y cols., 2006)

La vida media de los osteoblastos humanos es de 1 a 10 semanas, al término de las cuales pueden desaparecer por mecanismos de apoptosis, transformarse en células limitantes o de revestimiento (bone lining cells) o en

osteocitos (15 %) (Aubin y Lin, 1996).

➤ **Osteocitos**

Una vez mineralizada la matriz, algunos osteoblastos quedan atrapados dentro, transformándose en osteocitos. Los osteocitos poseen forma estrellada y su cuerpo se sitúa en el interior de lagunas u osteoplasmas, y se organizan formando un sincitio de células interconectadas (Ham y cols., 1952).

Los osteocitos constituyen el estadio final desde la línea osteoblástica y son incapaces de renovarse. Poseen los mismos marcadores que los osteoblastos, pero tienen como marcador específico el CD44 (Fernández-Tresguerres y cols., 2006).

➤ **Osteoclastos**

Las células encargadas de la reabsorción son los osteoclastos. Se trata de células grandes (100 µm), multinucleadas, ricas en mitocondrias y vacuolas.

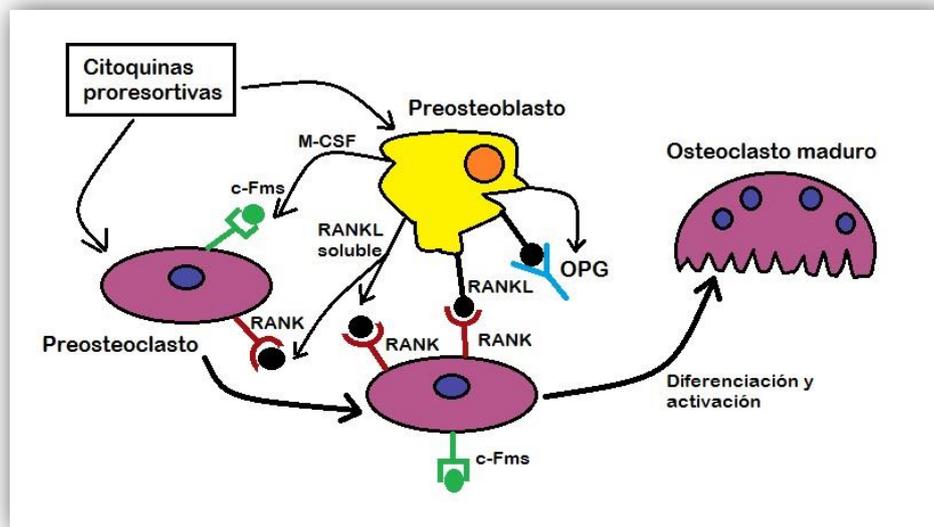
Proceden de células madre hematopoyéticas medulares denominadas "Unidades Formadoras de Colonias de Granulocitos y Macrófagos" (CFU-GM), precursoras de macrófagos y monocitos (Mundy y cols., 1993).

Los osteoclastos se movilizan hacia la zona a reabsorber y se adhieren a la superficie ósea mineralizada por la zona de su membrana con borde en cepillo. El citoplasma adjunto al borde en cepillo está libre de orgánulos y se denomina "zona clara" y el osteoclasto se une al hueso a través de las integrinas. Las integrinas reconocen la secuencia Arg-Gly-Asp (RGD) existente en el colágeno y otras proteínas de la matriz osteoide. El aparato de Golgi excreta enzimas lisosomales que provocan un ambiente ácido. Estas enzimas proteolíticas como colagenasas, metaloproteasas, catepsina K, o glucuronidasa, van a originar la reabsorción del hueso mediante la solubilización de la matriz orgánica primero y de la mineral después (Mundy y cols., 1993).

Los osteoblastos son fundamentales para la osteoclastogénesis, ya que

producen el factor estimulante de las colonias de macrófagos (M-CSF) para la formación de células gigantes multinucleadas. La regulación de la osteoclastogénesis está mediada por 3 moléculas: RANK (Receptor for Activation of Nuclear Factor KB) situado en la membrana de osteoclastos y pre-osteoclastos, RANKL (ligando de RANK) situado en la superficie de osteoblastos y pre-osteoblastos y OPG (osteoprotegerina) proteína sintetizada por osteoblastos y pre-osteoblastos. Los osteoclastos se diferencian y se activan cuando RANK se une a RANKL y favorecen la reabsorción ósea. Además en este proceso de diferenciación y activación también participan citoquinas como las interleuquinas 1, 6 y 11, el factor de necrosis tumoral α (TNF- α), el interferón gamma (γ) y el factor estimulador de colonias de macrófagos (M-CSF) que se une al receptor C-Fms de los osteoclastos (Takahashi y col, 2002). La osteoprotegerina secretada por el osteoblasto, se une a RANKL para impedir la unión de RANKL a RANK y así impedir la reabsorción ósea (ver Figura 4) (Fernández-Tresguerres y col, 2006).

Figura 4: Sistema RANK-RANKL-OPG



➤ **Matriz orgánica**

La matriz orgánica o sustancia osteoide representa un tercio del peso óseo. Está formada fundamentalmente por proteínas, entre las que destaca el colágeno (90% de la matriz extracelular) sobre todo tipo I (>95%) y tipo V (<5%). También se ha comprobado la presencia en pequeñas proporciones de colágeno tipo III, relacionado con las fibras de Sharpey y tipo XII, formado bajo estrés mecánico.

Entre las proteínas no colágenas destacan los Proteoglicanos (Hialuronano y Condroitín-sulfato); Proteínas con ácido γ -carboxi-glutámico como la osteocalcina sintetizada por los osteoblastos; Glicoproteínas (osteonectina para la adhesión celular, la fosfatasa alcalina para la mineralización, y las proteínas con el tripéptido RGD (Arg-Gly-Asp) (osteopontina, sialoproteínas óseas, fibronectina, trombospondina y vitronectina), fundamentales en los procesos de remodelado y regeneración óseos.

También encontramos factores de crecimiento y proteínas procedentes del plasma (albúmina y α 2-SH-glicoproteína), probablemente relacionadas con la incorporación del calcio a la matriz osteoide.

➤ **Fase mineral**

El componente mineral del hueso representa el 65% del peso óseo. Está formado por calcio, fosfato y carbonato (en proporciones de 10:6:1) en forma de pequeños cristales de hidroxiapatita $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ y, en menor proporción hay magnesio, sodio, potasio, manganeso y flúor.

1.1.4.2 Acción de los bifosfonatos sobre el metabolismo óseo

Los BFs tienen una estructura química similar a la del pirofosfato inorgánico, por ello se unen a los cristales de hidroxiapatita (HA) del hueso. Tienden a incorporarse en las zonas de hueso que tienen una remodelación ósea activa. Los BFs que no se unen al hueso se eliminan por excreción renal (Drake y cols., 2008). Los BFs quedan unidos al hueso durante largos periodos de

tiempo alterando el microambiente óseo; parece que impide la colonización de células cancerígenas y debido a ello se emplea en pacientes oncológicos, pero las células normales también se ven alteradas (Melo y cols., 2005). Durante el remodelado óseo el BF se libera del hueso y lo absorbe el osteoclasto que no puede hidrolizarlo y en su interior provoca una serie de procesos que lo conducirán finalmente a la apoptosis. La muerte de los osteoclastos inhibirá la activación de la formación de hueso por parte de los osteoblastos, y el hueso afectado no tendrá capacidad de remodelado. Este efecto, es el deseado en aquellas patologías con alteración del metabolismo óseo, como por ejemplo en la osteoporosis, para impedir la desmineralización y para frenar el avance de metástasis óseas en casos oncológicos (Melo y cols., 2005).

Durante el proceso de remodelado óseo, el osteoblasto integrado en la matriz orgánica segrega proteínas y contribuye a la mineralización de los cristales de HA. En esta matriz mineralizada queda atrapado el osteoblasto que se diferencia a osteocito, que constituye el estadio final de esta línea celular con una vida media de 150 días, tras los cuales, se desarrollan microfracturas en dicha matriz. Los osteoblastos son los encargados de activar la osteoclastogénesis y tras ella, la nueva formación ósea. Los BFs interrumpen este ciclo de remodelado y los osteocitos no vitales se acumulan en la matriz ósea (Marx y cols., 2003).

Los osteoclastos segregan ácidos y enzimas para solubilizar la matriz ósea, causando un ambiente ácido que hace que los BFs, almacenados en el hueso unidos a la HA, se liberen de la superficie ósea. Posteriormente, se incluyen dentro del osteoclasto e inhiben su actividad. Entre las formas de captación de los BFs por los osteoclastos, se han señalado la transcitosis (paso de los fragmentos de hueso resorbidos al interior de los osteoclastos en las vesículas) y la pinocitosis (captación de material extracelular a través de la formación de vesículas, formadas a partir de invaginaciones de la membrana celular) (Reszka y cols., 2003).

El BF puede inhibir al osteoclasto causándole retracción, condensación y fragmentación que culmina con su apoptosis, o alterar las vesículas

intracelulares y desorganizar la actina del citoesqueleto, y alterar el borde en cepillo del osteoclasto (Diel y cols., 2007).

Los efectos farmacológicos clásicos de los BFs parecen ser el resultado de dos propiedades fundamentales: su afinidad por el mineral óseo y sus efectos inhibitorios sobre los osteoclastos. La afinidad de unión mineral difiere entre los BFs clínicamente usados y puede influir en su distribución dentro del hueso, su potencia biológica, y su duración de acción (Russell y cols., 2008).

El mecanismo por el que los BFs que contienen nitrógeno promueven la apoptosis de osteoclastos es distinto del mecanismo de los BFs que no contienen nitrógeno. Los BFs que no contienen nitrógeno se consideran de primera generación. Debido a su estrecha similitud estructural con el pirofosfato inorgánico, éstos se incorporan a las moléculas de trifosfato de adenosina (ATP) recién formado por la sintetasa de transferencia clase II aminoacil-ARN después de la captación mediada por los osteoclastos a partir de la superficie mineral del hueso (Russell y cols., 2006). Se cree que la acumulación intracelular de estos análogos de ATP no hidrolizables puede ser citotóxica para los osteoclastos, ya que inhiben múltiples procesos celulares dependientes de ATP, lo que conduce a la apoptosis de los osteoclastos. Los análogos no hidrolizables de ATP inhiben la adenina nucleótido translocasa de la membrana mitocondrial lo que afecta a su permeabilidad e inicia la activación de las caspasas que conducen a la apoptosis del osteoclasto (Rogers y cols., 2003; Diel y cols., 2007; Hewitt y cols., 2007; Russell y cols., 2008).

Los efectos antirresortivos de los BFs que contienen nitrógeno parecen ser el resultado de su inhibición de la enzima farnesildifosfato sintetasa (FPPS) en los osteoclastos. La FPPS es una enzima clave en la vía del mevalonato, que genera lípidos isoprenoides utilizados para la modificación post-traducciona de las pequeñas proteínas de unión a GTP que son esenciales para la función de los osteoclastos. La prenilación de estas proteínas las activa para regular propiedades estructurales de los osteoclastos como su morfología, citoesqueleto, tráfico vesicular y mantenimiento de la membrana (Russell y

cols., 2008).

La inhibición de la FPPS causa la acumulación de pirofosfato de isopentenilo (IPP), el metabolito previo de FPPS en la vía del mevalonato. Se ha demostrado recientemente que la acumulación de IPP en células tratadas con bifosfonatos nitrogenados también causa la producción de un nuevo metabolito, Apppl. De acuerdo con la evidencia reciente, este metabolito se forma por la condensación de monofosfato de adenosina con IPP. Apppl provoca la apoptosis de los osteoclastos inhibiendo la adenina nucleótido translocasa de la membrana mitocondrial (Monkkonen y cols., 2006). Como resultado, la inhibición de la FPPS puede causar la apoptosis de osteoclastos, y por lo tanto, impedir la resorción ósea, no sólo por la interferencia con la prenilación de proteínas, sino también por la acumulación de Apppl. Parece que los cambios morfológicos asociados con la exposición de los osteoclastos a bifosfonatos nitrogenados (como la pérdida del borde rugoso, la alteración de la actina del citoesqueleto, y la alteración del tráfico vesicular) se explican mejor por su efecto sobre la prenilación de proteínas (Coxon y cols., 2000).

La reabsorción ósea tiene lugar en un espacio delimitado por la superficie ósea y el borde en cepillo del osteoclasto creando un ambiente ácido, se desmineraliza la matriz y se degrada el colágeno. Cuando el osteoblasto tiene alterada la membrana y también el tráfico vesicular, se altera el proceso de reabsorción ósea.

Se han investigado además, efectos sobre otras dianas celulares, tales como los osteocitos, que también pueden ser importantes, habiéndose sugerido que los BFs limitan la apoptosis tanto de osteoblastos como de osteocitos (Russell y cols., 2008; Plotkin y cols., 1999). La inhibición de la apoptosis de osteocitos parece estar mediada a través de la apertura de los hemicanales de conexina y la posterior activación de quinasas reguladas por señales extracelulares (ERK) (Plotkin y cols., 2006).

1.1.5 Aplicación clínica de los bifosfonatos

El amplio uso de los BFs como inhibidores de la resorción ósea en múltiples patologías y/o situaciones clínicas, es directamente atribuible a su eficacia en la mejora de la calidad de vida de los pacientes con cáncer metastásico de hueso, osteoporosis o enfermedad de Paget.

La osteopenia y osteoporosis son consecuencias de un desequilibrio en los procesos de remodelación ósea. La función y la actividad de los osteoblastos y los osteoclastos son moduladas por hormonas sexuales, una variedad de citoquinas, y la tensión mecánica fisiológica. Los cambios relacionados con la edad, la actividad física y niveles de hormonas sexuales originan un aumento en el número de osteoclastos y zonas de resorción ósea, dando como resultado una disminución global en la masa ósea y la resistencia.

Como supresores potentes de la actividad de los osteoclastos, los bisfosfonatos provocan un remodelado lento y aumentan la densidad mineral ósea, reduciendo así el riesgo de fractura en pacientes con osteopenia y osteoporosis (Chestnut y cols., 2001; Guyatt y cols., 2002).

La metástasis de tumores sólidos o el mieloma múltiple pueden comportarse con actividades osteolíticas, osteogénicas o mixtas. En metástasis con componente osteolítico, se cree que se produce una activación osteoclástica, ya sea directamente por las células de mieloma o indirectamente a través de la estimulación de factores osteoclastogénicos tales como la interleuquina (IL-6), la proteína inflamatoria de macrófagos 1α , IL - 1, y RANKL (Ruggiero y cols., 2009a). Por ello, ya que los BFs son potentes inhibidores de la función de los osteoclastos, son eficaces clínicamente en todas estas enfermedades.

Esta terapia ha tenido un impacto significativo en la disminución de la morbilidad del cáncer, al reducir el dolor de huesos, la hipercalcemia, y las complicaciones esqueléticas tales como fracturas patológicas. En ensayos clínicos, se ha comprobado la eficacia de los BFs intravenosos en el retraso de la lisis ósea en la enfermedad secundaria al mieloma múltiple, cáncer de mama

avanzado, y otros tumores sólidos (Van Holten-Verzantvoort y cols., 1993; Michaelson y cols., 2005).

En las guías de práctica clínica establecidas por la Sociedad Americana de Oncología Clínica, el uso de los bifosfonatos es considerado como el estándar de cuidado para el tratamiento de hipercalcemia (de moderada a severa) asociada a malignidad y para las lesiones osteolíticas asociadas a metástasis de cáncer de mama y mieloma múltiple en conjunción con agentes quimioterapéuticos antineoplásicos (Hillner y cols., 2000; Berenson y cols., 2002). La Food and Drug Administration de EE.UU. (FDA) ha ampliado las indicaciones de los bifosfonatos intravenosos al incluir su utilización para casos de metástasis óseas de cualquier tumor sólido. En 2005 se estimó que más de 2,8 millones de pacientes con cáncer de todo el mundo habían recibido bisfosfonatos intravenosos desde su introducción en el mercado (United States Food and Drug Administration Oncologic Drugs Advisory Committee., 2005).

Lógicamente, los pacientes tratados con BFs también pueden sufrir sus efectos secundarios. Los efectos secundarios negativos se pueden clasificar en cuatro grandes grupos: a) las reacciones de fase aguda, b) efectos gastrointestinales, c) efectos secundarios renales y d) osteonecrosis maxilar (ONM). Los BFs más frecuentemente asociados con la ONM son los BFs que contienen nitrógeno de administración endovenosa y con la característica de ser de potencia elevada, por ejemplo, pamidronato o zoledronato. En cuanto a la etiopatogenia de ONM, se están discutiendo varias teorías: la inhibición de la remodelación ósea, el efecto sobre los tejidos blandos, y el efecto antiangiogénico de los BFs (Walter y cols., 2011).

1.1.6 Farmacocinética

En general, los BFs pueden considerarse fármacos que se absorben, distribuyen y excretan sin experimentar grandes modificaciones (Stepensky y cols., 2003). Esto se debe al enlace PCP, que confiere a estos compuestos resistencia a la hidrólisis por pirofosfatasas. Sin embargo, es posible que las cadenas laterales que caracterizan a cada fármaco, específicamente sean

hidrolizadas y posteriormente metabolizadas (García y cols., 2002).

➤ **Absorción**

Una característica fundamental que rige la farmacología clínica de los BFs es su biodisponibilidad. Como clase, los BFs son muy hidrófilos. En consecuencia, son mal absorbidos desde el tracto gastrointestinal después de la *administración oral* (generalmente con una absorción inferior al 1% en una dosis oral) (Lin y cols., 1996). Además, sólo alrededor del 50% del fármaco absorbido se retiene selectivamente en el esqueleto, mientras que el resto se elimina en la orina sin ser metabolizado (Cremers y cols., 2005).

La absorción oral de los BFs es dosis-dependiente, como demuestran algunos ensayos llevados a cabo en animales, y ensayos clínicos realizados (Sharpe y cols., 2001; Dooley y cols., 1999). Además, puede verse interferida por la ingesta alimentaria concomitante.

En cambio, los BFs usados por *vía parenteral* presentan una biodisponibilidad del 50%, lo que aumenta la incidencia de complicaciones.

➤ **Distribución**

En cuanto a su distribución en el hueso, a nivel microscópico, los BFs inicialmente se localizan en regiones donde el hueso se reabsorbe por osteoclastos y donde se está depositando nuevo mineral debajo de los osteoblastos. Como la matriz derivada de osteoblastos comienza a mineralizar, los cristales recién formados proporcionan grandes superficies de mineral expuesto disponible para su depósito (Rusell y cols., 2008).

A pH fisiológico (7.4) los BFs están ionizados y se unen a proteínas plasmáticas para circular por el plasma sanguíneo siendo la albúmina la proteína más susceptible a esta unión (Sharpe y cols., 2001; Dooley y cols., 1999).

Aproximadamente de un 20 a un 50% de la dosis absorbida de BF, se fija en

los lugares de mineralización ósea. Los bifosfonatos se dirigen a los sitios de alta remodelación en estados de enfermedad, tales como la enfermedad de Paget y el cáncer metastático en el hueso, y tal vez incluso en la osteoporosis, en los que ejercen su efecto terapéutico.

Por tanto, la cantidad de fármaco fijado, está directamente relacionado con el grado de mineralización, y cuanto mayor sea ésta, menor será el porcentaje de fármaco eliminado por la orina (Mönkkönen y cols., 1990).

Gran parte del fármaco unido a las superficies óseas queda enterrado rápidamente y puede ser retenido durante largos períodos. Los BFs desaparecerán del esqueleto más rápidamente cuando los procesos de remodelación estén acelerados.

En teoría, la liberación de los mismos a partir de hueso puede producirse a través de al menos dos mecanismos, a saber, la desorción química y la resorción osteoclástica. La unión de BFs a superficies de HA es un proceso físico-químico reversible (Nancollas y cols., 2006; Lawson y cols., 2005). El BF se adsorbe cuando las concentraciones del mismo en el líquido extracelular son altas y este proceso se revertirá cuando las concentraciones sean bajas. Por tanto, los BFs con mayor afinidad por el mineral óseo, se prevé que muestren mayor adsorción y baja desorción. (Russell y cols., 2008). Esta noción se apoya en las observaciones de que los BFs se pueden encontrar en plasma y en orina muchos meses después de su dosificación (Green y cols., 2002; Christiansen y cols., 2003; Cremers y cols., 2002).

Se han demostrado diferencias significativas en la afinidad de unión cinética de varios puntos básicos a HA y se ha establecido el orden siguiente: clodronato < etidronato < risedronato < ibandronato < alendronato < pamidronato < zoledronato (Nancollas y cols., 2006; Ebetino y cols., 2004). Este mismo orden de clasificación se ha encontrado para apatita carbonatada, que se asemeja más de cerca al mineral óseo natural (Henneman y cols., 2007). Las pequeñas diferencias en la estructura del BF conducen a cambios sorprendentes en la afinidad a hueso. Sustituyentes R1 tales como hidroxil o

amino mejoran la quimioabsorción al mineral. Mientras que las variaciones en el grupo R2 influyen en la inhibición de los osteoclastos que resulta en diferencias en la potencia antiresortiva. Por lo tanto, se postula que la configuración tridimensional del BF que contiene nitrógeno (BF-N) y la orientación de su nitrógeno pueden desempeñar un papel importante en la afinidad de unión a minerales, lo que a su vez puede tener una influencia sobre la potencia farmacológica y efectos clínicos diferentes (Lawson y cols., 2005; Rusell y cols., 2008).

En cuanto a los resultados hasta ahora publicados y los estudios recientes, la capacidad de unión parece estar en el orden siguiente, a pH 7,4: risedronato < zoledronato < ibandronato < etidronato < alendronato (Ebetino y cols., 1998). Además de la afinidad de unión, hay propiedades fisicoquímicas de los BF-N que pueden influir aún más en sus actividades diferenciales, tales como la carga molecular y la tensión interfacial.

En resumen, el orden de rango de cada una de las propiedades más críticas es el siguiente:

- Afinidad Mineral: clodronato < etidronato < risedronato < ibandronato < alendronato < pamidronato < zoledronato

- Inhibición enzimática de FPPS: etidronato = clodronato (inhibidores muy débiles) <<<< pamidronato < alendronato < ibandronato < risedronato < zoledronato

- Efecto de unirse a HA en la carga superficial (potencial zeta) BP: risedronato < clodronato < etidronato < zoledronato < ibandronato < alendronato

Se han observado diferencias entre bifosfonatos en base a su comportamiento clínico y los efectos que podrían explicarse por sus propiedades químicas y bioquímicas. Se cree que las diferencias en la unión al mineral y la potencia inhibidora para la FPPS afectan a la duración de su

acción. Las diferencias en el grado de inhibición de la enzima FPPS dentro de los osteoclastos, pueden suponer una importante contribución a la potencia farmacológica de los bifosfonatos nitrogenados. Hasta cierto punto, este ranking de potencia se correlaciona con la velocidad de protección frente a las fracturas. Russell y Watts mantienen la hipótesis de que los compuestos con alta afinidad por el mineral pueden quedar atrapados en los sitios de primera exposición en mayor medida que los compuestos de baja afinidad. Por tanto, la hipótesis predice que el BF de menor afinidad se puede distribuir de manera más eficiente a todos los sitios dentro del hueso. (Russell y cols., 2008).

Normalmente, los BFs no se depositan en tejidos blandos pero a veces, pueden depositarse en el estómago, el hígado o el bazo, siendo este depósito mayor, cuanto mayor es la dosis administrada de fármaco. Este depósito puede ser debido a que los BFs forman complejos con el hierro y el calcio, que posteriormente son fagocitados por los macrófagos del sistema reticuloendotelial. Las infusiones intravenosas de estos fármacos o las dosis elevadas son peligrosas, ya que pueden provocar fallo renal (Fleisch y cols., 1969).

➤ **Eliminación**

Tras la administración de BF, el fármaco desaparece del plasma rápidamente, con una semivida de eliminación de 1- 2 horas. La rápida desaparición de los BF del plasma, se debe a la excreción renal y a la captación por parte del tejido óseo. Tras la fijación de los BF al tejido óseo, cuando éste se reabsorbe, se vuelven a liberar, por lo que su semivida depende del grado de remodelación ósea y se ha estimado que ésta puede ser de 10 años (Gertz y cols., 2009). Además, la disposición ósea de los BF se ve afectada por la edad, el sexo y la unión a proteínas plasmáticas. Todo esto, contribuye a la gran variabilidad inter e intraindividual descrita (Stepensky y cols., 2003).

Russell y cols., establecieron el rango de excreción urinaria en 24 horas, tras la primera dosis, siendo: ácido zoledrónico (38%) <alendronato (44%)

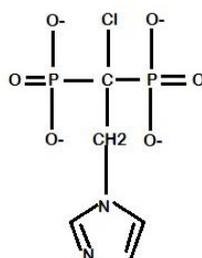
<risedronato (65%) <clodronato (73%). Estos resultados coinciden de forma inversa con los perfiles de afinidad, es decir, BFs con una mayor afinidad de unión tienen una menor excreción urinaria en 24 horas. Por tanto a través de la excreción urinaria se podrían medir, pequeñas cantidades de BFs, durante muchas semanas, meses, o años después de interrumpir el tratamiento, presumiblemente debido a su liberación continua de la estructura ósea (Russell y cols., 2008).

1.1.7 Ácido Zoledrónico

Los BFs de primera generación como etidronato o clodronato no contienen nitrógeno, los de segunda generación sí lo contienen, y dentro de éstos últimos se pueden diferenciar los que contienen nitrógeno dentro de una cadena alquílica como son el alendronato, el pamidronato y el ibandronato, de los BFs que contiene el nitrógeno dentro de un anillo heterocíclico como risedronato y zoledronato.

El ácido zoledrónico (1-hidroxi-2 (1H-imidazol-1-il) etilen-1,1-diildifosfónico), es un BF de tercera generación que contiene nitrógeno y actualmente es el más potente. Los dos grupos fosfato se unen por un átomo de carbono central y tiene dos cadenas laterales R1 y R2, donde R1 es el grupo hidroxilo y R2 es el anillo imidazol. El grupo hidroxilo se ancla a la superficie ósea y el grupo R2 le proporciona la potencia antiresortiva (ver Figura 5) (Qingzhu y cols., 2016).

Figura 5: Estructura química del ácido zoledrónico.



En 2002, el AZ (Zometa[®], Novartis Pharmaceuticals Corporation, East

Hanover, New Jersey) fue aprobado para el tratamiento de metástasis ósea por la Food and Drug Administration (FDA) de EE.UU. (Otto y cols., 2010) Después, para el tratamiento de la osteoporosis se aprobó una perfusión anual de zoledronato (Reclast[®], Novartis Pharmaceuticals Corporation, East Hanover, New Jersey). La FDA en agosto de 2007 aprobó el ácido zoledrónico (Aclasta[®], Novartis Pharmaceuticals Corporation, East Hanover, New Jersey) administrado una vez al año para el tratamiento de la osteoporosis (United States Food and Drug Administration Oncologic Drugs Advisory Committee., 2007).

La importante actividad reguladora del metabolismo óseo ha hecho que BFs como el AZ hayan sido administrados en 2009 a una población mundial estimada de 3 millones de pacientes, para prevenir o tratar neoplasias óseas y/o metástasis que afectaban al tejido óseo (Russell y cols., 2008) como en el cáncer de mama en etapa temprana (Gnant, 2012) y cáncer de próstata (Marech y cols., 2012).

El AZ, a una dosis de 4 ó 5 mg (la dosis aprobada por la Administración de Alimentos y Medicamentos para la osteoporosis), suprime eficazmente los marcadores bioquímicos de la resorción ósea durante 1 año en mujeres con osteoporosis posmenopáusica. El AZ también es eficaz en la reducción de fracturas vertebrales, de cadera y otras (Black y cols., 2007).

El primer ensayo para evaluar los efectos del zoledronato en la fracturas fue el realizado por Black y cols., en 2007. Este ensayo a doble ciego incluyó 7765 mujeres postmenopáusicas de una media de edad de 73 años, con osteoporosis y evidencia de fracturas clínicas. Las pacientes fueron clasificadas según el uso de fármacos para el tratamiento de osteoporosis. Las pacientes del grupo 1 (3889 mujeres) recibieron una infusión de 5 mg de ácido zoledrónico durante 15 minutos, las del grupo 2 (3876 mujeres) recibieron una infusión de placebo, al inicio del estudio, a los 12 y 24 meses. Todos los pacientes tomaron calcio diario vía oral 1000-1500 mg y vitamina D 400-1200 UI. El seguimiento de los pacientes fue de 3 años. En cuanto a los resultados del estudio, se encontró que el zoledronato redujo el riesgo de fracturas

vertebrales en un 70% en comparación con el placebo en el grupo de pacientes que no tomaban otros medicamentos para la osteoporosis (Black y cols., 2007).

El zoledronato tiene un perfil de fuerte actividad inhibidora sobre la FPPS y los osteoclastos, además de tener una alta afinidad por el mineral óseo. Estas características parecen contribuir a su alta potencia, así como la duración de su acción. El AZ es el BF que mayor capacidad inhibidora tiene sobre la FPPS (Nacollas y cols., 2002). El orden de los BF en cuanto a la potencia de inhibición de la FPPS coincide con el orden de potencia antiresortiva (zoledrónico>risedronato>ibandronato>alendronato) (Farahmand y cols., 2005). El grado de inhibición de la FPPS y su potencia está relacionado con el grado de afinidad a los cristales de HA y se ha demostrado que esta diferencia entre los BF reside en la cadena lateral R2 (zoledrónico>alendronato>ibandronato=risedronato) (Nacollas y cols., 2006). El zoledronato es el único BF que se ha desarrollado en exclusiva para uso intravenoso pero no para uso oral, lo que ha dado lugar a un atractivo régimen de una única dosis al año en el tratamiento de la osteoporosis. A pesar de que su perfil podría sugerir que el AZ debiese mostrar el inicio más rápido de acción entre los bifosfonatos, sobre todos los tipos de fractura, en realidad sólo tiene un efecto rápido para las fracturas vertebrales y no para la reducción de fracturas de cadera según los datos disponibles hasta el momento. (Black y cols., 2007) El AZ puede representar un ejemplo adicional de cómo la propiedad de alta afinidad y / o alta capacidad posiblemente restringe la distribución a los sitios dentro del hueso que son críticos para la prevención de fracturas no vertebrales.

Después de la administración de una sola dosis intravenosa (2-16 mg) de AZ, el 40 % de la dosis se recupera en la orina en 24 horas, siempre que exista una función renal normal. La vida media plasmática varía de 0 a 87 horas, con eliminación terminal de hasta 146 horas. El resto de la dosis se presume que está unida al hueso, donde se libera lentamente con el tiempo, lo que resulta en niveles bajos en plasma. Al no ser metabolizado, no interacciona con el sistema citocromo P450 por lo que no interfiere en el metabolismo de

sustancias que lo hagan por esta vía. No se han documentado interacciones medicamentosas específicas (Bilezikian y cols., 2006; Chen y cols., 2002).

En pacientes con insuficiencia renal leve (aclaramiento de creatinina = 50-80 ml/min) y moderada (aclaramiento de creatinina = 35-50 ml/min), no es necesario ajustar la dosis de ácido zoledrónico. En pacientes con insuficiencia renal grave (aclaramiento de creatinina <35 ml/min) no se recomienda su uso (Demontiero y Duque., 2009).

Algunas de las complicaciones de estos fármacos son la fibrilación auricular, la supresión excesiva del recambio óseo, la hipocalcemia, la respuesta inflamatoria aguda debido al nitrógeno, un severo dolor musculoesquelético y por supuesto la osteonecrosis maxilar, la más relevante para este estudio (Drake y cols., 2008).

Tras la infusión intravenosa del AZ se pueden desencadenar síntomas similares a la gripe, como fiebre, mialgia y fatiga (Reid y cols., 2010). En el estudio de Kotian y cols., de 2016, este tipo de síntomas se dio en el 78% de los pacientes, comenzaron tras las 16 horas de la infusión parenteral y se resolvieron a los tres días. El tratamiento para ello se basa en la toma de fármacos antipiréticos (Kotian y cols., 2016). Se cree que esta reacción aguda está mediada por citoquinas proinflamatorias (Dicuonzo y cols., 2003).

Un efecto secundario de la infusión de AZ es la nefrotoxicidad, cuya incidencia es de 0-9% (Lyles y cols., 2007). La lesión renal se produce por necrosis tubular aguda (Perazella y Markowitz, 2008). Es más probable si la infusión del fármaco es rápida (menos de 15 minutos) (Berenson y cols., 2009), y en pacientes ancianos, con enfermedad renal preexistente, con otras enfermedades, o que estén tomando medicamentos nefrotóxicos (Orwoll y cols., 2005). El ácido zoledrónico está contraindicado en pacientes con aclaramiento de creatinina <35 ml/min.

La correlación entre la administración de AZ y fibrilación auricular no está clara (Camm, 2010). En el estudio de Black y cols., de 2007 la incidencia de

fibrilación auricular fue de 2'4% respecto al 1'9% en los pacientes que recibieron un placebo. La fibrilación auricular se consideró grave en 50 pacientes del grupo tratado con zoledrónico (1,3%), en comparación con 17 pacientes (0,4%) en el grupo placebo. Entre los 50 pacientes, los eventos ocurrieron más de 30 días después de la infusión en 47 pacientes. Se requiere más evidencia para considerar si este hallazgo es sólo una casualidad o un efecto secundario real que debe considerarse seriamente al tratar a pacientes ancianos (Black y cols., 2007).

Kotian y cols., de 2016, concluyen que el AZ tiene muy pocos efectos adversos que pueden ser controlados y prevenidos con el seguimiento del paciente. Encontraron que los síntomas más frecuentes eran pirexia, artralgia y mialgia y que se resolvían con el tratamiento sintomático (Kotian y cols., 2016).

1.2 OSTEONECROSIS MAXILAR POR BIFOSFONATOS

1.2.1 Definición

Desde el año 2003, han sido publicadas numerosas series de pacientes en tratamiento con bifosfonatos que sufren un tipo de osteomielitis posterior a un tratamiento odontológico. La misma, que es de etiología desconocida, ha sido denominada osteonecrosis maxilar por BFs (ONMB) (Ruggiero y cols., 2009a; Woo y cols., 2006; Marx y cols., 2003; López-Jornet y cols., 2010a).

Según la Asociación Americana de Cirujanos Orales y Maxilofaciales (AAOMS), la ONMB se define como el hueso necrótico expuesto en la región maxilofacial por un período de al menos 8 semanas en relación al tratamiento con BFs actual o anterior, con ausencia de radiación de cabeza y cuello en la historia del paciente (Ruggiero y cols., 2009a).

La AAOMS en la reunión efectuada en septiembre del 2013, recomendó cambiar la nomenclatura de osteonecrosis secundaria a BFs por osteonecrosis asociada a medicamentos antirreabsortivos y terapias antiangiogénicas. La evidencia actual, sugiere que hay una relación entre la aparición de OMN de la mandíbula y el uso de otras clases de tratamientos farmacológicos inhibidores de RANKL, así como inhibidores de la angiogénesis (Ruggiero y cols., 2014).

1.2.2 Criterios diagnósticos

En España, se aplican los siguientes criterios para la definición de ONMB (Bagan y cols., 2007; y 2008):

1. Paciente que recibió o está recibiendo tratamiento con BFs IV.
2. Presencia de una o más lesiones ulceradas en la mucosa de los procesos alveolares, con exposición del hueso maxilar o mandibular. También pueden existir casos sin exposición ósea, con dolor o fístulas, que deben ser considerados para realizar un estudio más detallado.

3. El hueso expuesto, cuando está presente, presenta un aspecto necrótico.
4. La lesión puede aparecer de forma espontánea, o más frecuentemente, tras un antecedente de cirugía dentoalveolar (especialmente exodoncias).
5. Ausencia de cicatrización de al menos un periodo de seis semanas.

Los signos y síntomas descritos, son sugestivos, pero no patognómicos de la ONMB, y su diagnóstico debe basarse además, en el examen clínico y radiográfico ya que no se recomienda practicar la biopsia de la lesión, para realizar el examen histológico, si no hay sospecha de lesión maligna (Estilo y cols., 2008; Khan y cols., 2008).

Las imágenes radiográficas de las lesiones de ONMB pueden mostrar regiones de hueso moteado, secuestros óseos, zonas de lisis ósea o zonas de lisis combinadas con osteoesclerosis. Además se ha observado un ensanchamiento del ligamento periodontal en la furca de molares (Marx y cols.2005).

También se han propuesto otras pruebas de diagnóstico por imagen como la gammagrafía, más sensible que la radiografía para la detección temprana, aunque no específica. La tomografía computerizada muestra cambios en el entramado óseo en lesiones mayores de 1 cm. También la resonancia magnética da información acerca de la isquemia y la necrosis en estadios iniciales. Y por último los escáneres de radionucleótidos óseos, que detectan la vascularización de forma más sensible para el diagnóstico precoz (Rusell y cols., 2007; Estilo y cols., 2008).

En el examen clínico podemos encontrar una o varias lesiones ulceradas. Estas úlceras pueden encontrarse en cualquier zona de la mandíbula y es muy típico encontrarlas en el alveolo postexodoncia o en zonas de roce de prótesis dentales. La zona del secuestro óseo puede presentar hinchazón y drenará pus si se ha sobreinfectado. El tejido que rodea la lesión ósea suele estar inflamado y eritematoso. El paciente puede o no presentar dolor, movilidad dental, fístulas

cutáneas o mucosas y en estadíos avanzados fractura ósea (Ruggiero y cols., 2004).

En el examen microscópico, se observa hueso necrótico asociado a bacterias y a tejido de granulación. En cuanto a las especies bacterianas encontradas, algunos autores han encontrado una flora oral normal, mientras que otros han obtenido muestras con *Actinomyces*, aunque no se ha establecido una relación de asociación directa entre esta especie y el desarrollo de ONMB. La trabeculación ósea vista con radiografía es normal o ligeramente irregular, con áreas radiotransparentes difusas, secuestros óseos, y regeneración ósea incompleta de la zona de la extracción dental, pero no hay imágenes patognomónicas. En la biopsia de los tejidos blandos se encuentra una mucosa escamosa inflamada o un tejido de granulación sin signos de malignidad (Ruggiero y cols., 2005).

El diagnóstico diferencial de ONMB debe excluir las condiciones clínicas comunes como la osteítis alveolar, osteomielitis de distinto orígenes, sinusitis, gingivitis/periodontitis, patología periapical, y los trastornos de la articulación temporomandibular (Ruggiero y cols., 2009b).

1.2.3 Factores de riesgo

Los factores de riesgo para el desarrollo de ONM pueden agruparse en tres apartados: (American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons, 2007)

a) Los *factores de riesgo relacionados con fármacos* pueden incluir la potencia del BF en particular. Los BF-N suponen mayor riesgo que los no nitrogenados. La administración intravenosa de BFs parece conferir un mayor riesgo que la administración oral. Por ejemplo, el AZ es más potente que el pamidronato, que a su vez, es más potente que los BFs orales. La duración de la terapia es importante, a mayor duración, mayor riesgo de desarrollo de ONM (Ruggiero y cols., 2004). Entre los pacientes que toman BFs orales, el factor de riesgo principal es el tratamiento con BFs continuo durante más de 3 años

(Ruggiero y cols., 2009a; Marx y cols., 2007).

b) Los *factores de riesgo locales* pueden incluir la cirugía dentoalveolar reciente, como extracciones, colocación de implantes dentales, cirugía periapical y cirugía periodontal que impliquen lesión ósea (American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons., 2007). Otros factores locales también pueden influir, como la anatomía local (torus, crestas milohioideas afiladas) y la enfermedad oral concomitante (enfermedad periodontal o abscesos dentales con riesgo). La enfermedad oral concomitante supone un riesgo siete veces mayor de padecer una ONMB. El trauma causado por prótesis dentales mal ajustadas es otro factor de riesgo (Ruggiero y cols., 2009a; Hoff y cols., 2008).

c) Los *factores demográficos y de patología sistémica y/o tratamiento para su terapéutica* incluyen numerosos factores como el aumento de la edad debido al incremento de preinscripción de estos medicamentos en personas de mayor edad (Hoff y cols., 2008; Ruggiero y cols., 2004; Bamias y cols., 2005; Dimopoulos y cols., 2006; Badros y cols., 2006; Jadu y cols., 2007; Zervas y cols., 2006; Corso y cols., 2007). En cuanto al sexo, se da más en mujeres que en hombres con una proporción de 8:1 (Pazianas y cols., 2007) o de 3:2 (Woo y cols., 2006). Por raza, los caucásicos tienen un mayor riesgo de padecerla en comparación con los sujetos de raza negra (Badros y cols., 2006). El riesgo de desarrollar ONM es mayor entre los pacientes con mieloma múltiple que entre aquellos con cáncer de mama (American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons., 2007). Los pacientes con cáncer que reciben BFs intravenosos tienen de 2.7 a 4.2 veces más riesgo de ONMB que los pacientes con cáncer que no están expuestos a bifosfonatos IV (Durie y cols., 2005; Wessel y cols., 2008). El diagnóstico simultáneo de la osteopenia o la osteoporosis, junto con un diagnóstico de cáncer es también un factor de riesgo. Otros factores de riesgo pueden incluir la terapia con corticosteroides, diabetes, tabaquismo,

consumo de alcohol, la mala higiene oral y medicamentos quimioterapéuticos (American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons., 2007).

1.2.4 Etiopatogenia

En la actualidad se desconoce la etiopatogenia de esta enfermedad, aunque han sido propuestos cuatro posibles mecanismos vinculados con el origen de esta ONMB, que podemos agrupar en las siguientes cuatro hipótesis etiológicas: a) inhibición en el remodelado óseo, b) alteración del proceso normal de cicatrización de la mucosa oral (debido a que reducen la viabilidad de los queratinocitos orales e inducen la apoptosis de células epiteliales y fibroblastos), c) teoría antiangiogénica y d) teoría infecciosa (Ruggiero y cols., 2009a; Walter y cols., 2011; López-Jornet y cols., 2010b; Novince y cols., 2009; Silverman y cols., 2009; Lam y cols., 2007; Bedogni y cols., 2008; Otto y cols., 2010; Koch y cols., 2010; Koch y cols., 2012; Shikama y cols., 2010; Pozzi y cols., 2009; Simon y cols., 2010; Naidu y cols., 2008; Ravosa y cols., 2011; Scheper y cols., 2009; Scheper y cols., 2010; Agis y cols., 2010; Ziebart y cols., 2011; Landesberg y cols., 2008).

Este trabajo se centra en la primera de las teorías anteriormente citadas, el cual se basa en la inhibición del remodelado óseo. Esta teoría sugiere que la ONMB es causada por el cese de la remodelación y el recambio óseo, tanto si se administran para reducir la pérdida de densidad ósea en la osteoporosis o para el manejo de metástasis óseas. Los BFs inhibirían de manera irreversible la acción de los osteoclastos a través de la interrupción de la vía del mevalonato, ya que el bloqueo de la enzima farnesil difosfato sintasa crea una escasez intracelular de sustancias necesarias para la regulación de la morfología y la actividad de los osteoclastos (Reszka y cols., 2003; Halasy-Nagy y cols., 2001), causando toxicidad directa sobre estas células, cuyo resultado es la apoptosis de las mismas. Los osteoblastos y los osteocitos tienen una vida media aproximada de 150 días. Si tras su muerte, la matriz mineral no es reabsorbida por los osteoclastos y no se estimula la formación de nuevos osteoblastos, las células progenitoras de éstos se convierten en osteonas acelulares y

necróticas. Los pequeños capilares localizados en el interior de los maxilares, involucionan, lo que daría lugar a un hueso avascular. En estas condiciones biológicas, una exposición ósea originada tras un tratamiento dental agresivo originaría una zona de hueso expuesto que no cura y termina por necrosarse (Walter y cols., 2011; Koch y cols., 2010; Koch y cols., 2012; Pozzi y cols., 2009; Naidu y cols., 2008).

Según esta teoría los BFs, como el AZ, podrían causar una ONMB actuando en 2 vías:

- Principalmente sobre el osteoclasto, aumentando la apoptosis del mismo.
- Pero también en menor medida sobre el osteoblasto, aumentando la apoptosis y reduciendo la proliferación de pre-osteoblastos y osteoblastos.

En contra de la hipótesis de la toxicidad directa de los BFs sobre el hueso, está el hecho de la afectación exclusiva de los maxilares y no de otros huesos. No se ha informado de esta complicación en los huesos fuera del esqueleto craneofacial. Sin embargo, se han observado patrones de fractura atípicos asociados con el recambio óseo severamente deprimido y el engrosamiento cortical difuso en la región del eje femoral de los pacientes tratados con la terapia con alendronato a largo plazo (Goh y cols., 2007; Lenart y cols., 2008).

Por el contrario, Badrós (Badros y cols., 2006) sostiene que es una verdadera complicación sistémica de hueso, que se manifiesta primero en la cavidad oral, pero que puede aparecer en otro lugar, si los pacientes llegan a vivir mucho tiempo.

Coxon y cols (Coxon y cols., 2000), argumentan que la mandíbula, el maxilar, y en particular el hueso alveolar y el periodonto, son zonas con elevada capacidad de remodelación, constante a lo largo de la vida, sobretodo durante los periodos de movimientos dentales o durante la cicatrización tras las exodoncias dentarias, por lo que, se podría decir, que existe un mayor

acumulo de BFs a nivel del hueso alveolar.

1.2.5 Epidemiología

La incidencia de un enfermedad es el número de casos nuevos de una población determinada en un periodo de tiempo definido. La prevalencia describe la proporción de la población que padece la enfermedad en un momento determinado.

La incidencia real de ONM se desconoce actualmente, y las cifras difieren entre los distintos autores. Esto puede deberse a que el número de pacientes en los distintos estudios varia. Además hay que tener en cuenta que la vida media de estos fármacos está entre 1 y 10 años, y esta por determinar su efecto acumulativo en el hueso. Por ello, la incidencia de esta patología puede cambiar en los próximos años.

Escobar y cols (Escobar y cols., 2007) realizaron una revisión bibliográfica en MedLine a través de PubMed desde septiembre de 2003 a mayo de 2006, incluyendo los términos: osteonecrosis, necrosis avascular, biphosphonates, jaw, cancer y mieloma. Seleccionaron 63 artículos, que recogían 340 casos de ONM por BFs. Los pacientes afectados de mieloma múltiple era el grupo mayoritario, seguido de los pacientes con cáncer de mama. El género más afectado fue el femenino. El promedio de edad fue de 65'5 años. El hueso más afectado fue la mandíbula.

La incidencia de ONM es mayor en pacientes tratados con BFs por vía parenteral para patologías neoplásicas, y mucho menor cuando el BF es administrado por vía oral para el tratamiento de osteoporosis fundamentalmente (Polymenidi y cols., 2014; Lee y cols., 2014). La incidencia de ONMB en pacientes tratados con BFs orales para la osteoporosis es de aproximadamente de 1 de cada 10.000 a 1 de cada 100.000 por paciente y año (Drake y cols., 2008; Bagán y cols., 2008).

El riesgo de padecer ONM también varía según el tipo de BFs, siendo la

terapia con ácido zoledrónico de mayor riesgo frente a terapias que combinan éste último con pamidronato o frente a terapias con BFs de menor potencia (Hewitt y cols., 2007). La incidencia de ONM por alendronato; administrado por vía oral, se estima en 0.7 casos por cien mil personas/año (ADA., 2006).

Según el consenso actualizado de la AAOMS del año 2014, los pacientes que toman BFs intravenosos presentan un riesgo del 1-15%. Por otro lado el riesgo de presentar ONM en pacientes tratados con bifosfonatos orales se estima en 0.001% a 0.01% (Ruggiero y cols., 2014; Khan y cols., 2015).

Las incidencias descritas para ONMB son de 1% a 11 % en pacientes con cáncer de mama (Hoff y cols., 2008), de 3% a 17 % en pacientes con mieloma múltiple (Boonyapakorn y cols., 2008), y de 3% a 19 % en pacientes con cáncer de próstata (Ruggiero y cols., 2009a; Walter y cols., 2008).

Según la localización de las lesiones la prevalencia varía, siendo la mandíbula la más afectada con una proporción del 65-68%, el maxilar con 26-27'8%, y ambos maxilares con una proporción de 4'2-9% (Marx y cols., 2005; Woo y cols., 2006). La zona molar de la mandíbula es la localización más común, seguido de la zona molar del maxilar (Estilo y cols., 2008; Pazianas y cols., 2007).

1.2.6 Clínica

La ONMB se caracteriza clínicamente por la presencia de una úlcera en la mucosa oral (generalmente posterior a un tratamiento dental invasivo) que presenta un proceso de cicatrización anormalmente lento. Estas úlceras ocasionan al paciente dolor e inflamación alrededor de la lesión, que finalmente culmina con la necrosis del hueso maxilar expuesto. Las pruebas radiológicas complementarias convencionales, son ineficaces en los estadios iniciales de la enfermedad, llegando a pasar desapercibidas entre el 30 y el 50% de las desmineralizaciones óseas atribuibles a ONMB.

Los síntomas en los pacientes con ONM pueden ser insignificantes, leves o

graves y ocurren a menudo después de una extracción dental, pero también pueden aparecer de forma espontánea. Los signos y síntomas que pueden ocurrir antes del diagnóstico de una osteonecrosis clínicamente detectable, incluyen dolor, movilidad dental, inflamación de las mucosas, eritema y ulceración. Los casos más graves pueden causar dolor intenso, secuestro óseo y fístulas de drenaje cutáneas. También puede alterarse la sensibilidad en el área afectada debido a la compresión del paquete neurovascular. Puede ocurrir sinusitis maxilar crónica secundaria a la osteonecrosis con o sin fístula oro-antral pudiendo ser el síntoma de presentación en pacientes con afectación ósea maxilar (Ruggiero y cols., 2009a; Lam y cols., 2007).

Las lesiones se encuentran con mayor frecuencia en la mandíbula que en el maxilar superior. El tamaño de la zona afectada puede variar desde un sitio de extracción que no cicatriza a necrosis de grandes secciones (ver Figura 6). El área de hueso expuesto es típicamente rodeada de tejido blando eritematoso inflamado. Cuando la zona se infecta secundariamente se presenta una secreción purulenta. Los datos de cultivos microbianos de la lesión pueden definir las infecciones orales concomitantes, facilitando la selección de un régimen antibiótico adecuado. El examen microscópico de muestras desbridadas de hueso expuesto, normalmente revela hueso necrótico con residuos bacterianos asociados y tejido de granulación. Las muestras de hueso necrótico no reflejan ninguna característica microscópica que sea única o de diagnóstico para ONMB (Ruggiero y cols., 2009a).

Figura 6: Lesión bucal e imagen radiológica de osteonecrosis maxilar.



La AAOMS ha descrito los siguientes estadios clínicos de la ONM (American

Association of Oral and Maxillofacial Surgeons., 2007):

- Estadio I: presencia de hueso expuesto o necrótico en pacientes asintomáticos sin evidencia de infección.
- Estadio II: presencia de hueso expuesto o necrótico en pacientes con dolor y sin evidencia de infección.
- Estadio III: presencia de hueso expuesto o necrótico en pacientes con dolor, infección y uno o más de los siguientes signos: fractura patológica, fístula extra-oral u osteolisis que se extiende al borde inferior.

Las últimas publicaciones (Fantasia y cols., 2009; Woo y cols., 2009; Ruggiero y cols., 2009b) incluyen un Estadio 0 para pacientes sin evidencias clínicas ni exposición ósea, pero con síntomas inespecíficos o hallazgos clínicos o radiológicos sospechosos de ONM, que requieren un seguimiento para evaluar la evolución.

1.2.7 Tratamiento de la osteonecrosis maxilar por bifosfonatos

En la actualidad se han propuesto tratamientos antibióticos sistémicos y enjuagues con colutorios de clorhexidina al 0,12% para el control de estas exposiciones óseas que en muchos casos permanecen asintomáticas. Sin embargo, en muchas ocasiones los tratamientos propuestos en la literatura científica son ineficaces y el manejo clínico de las ONMB se limita a tratamientos sintomáticos con analgésicos y un control clínico riguroso del progreso de la necrosis, que en muchos casos requiere un tratamiento quirúrgico más agresivo (Ruggiero SL y cols., 2009a).

Se recomienda una revisión bucal previa al inicio de la terapia con BFs. El objetivo será eliminar focos de infección activos y tratar también los focos potenciales. Se educará en hábitos saludables de higiene, alimentación y la eliminación del tabaco o el alcohol. También se revisará el ajuste de prótesis dentales y se eliminarán torus mandibulares de gran tamaño o torus palatinos. Si los tratamientos necesarios no son invasivos, como por ejemplo

tartrectomias o tratamientos restauradores, se podrá comenzar la terapia con BFs, pero si se requieren tratamientos invasivos, como cirugías dentales, tratamiento periodontal o tratamiento de conductos, el inicio de la terapia con BFs se aplazará durante un mes para que el hueso cicatrice. Algunos autores no recomiendan en estos pacientes la colocación de implantes dentales por el riesgo de exposición ósea (Campisi y cols., 2007; Marx y cols., 2005; American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons., 2007; Migliorati y cols., 2005; American Dental Association Council on Scientific Affairs., 2006).

En pacientes que ya estén tomando BFs pero que no hayan desarrollado la ONM se recomienda que acudan a revisiones bucales cada 3-6 meses para que el odontólogo pueda hacer un diagnóstico precoz de la lesiones. El paciente debe llevar a cabo las medidas de higiene bucal y el uso de colutorios antisépticos como el digluconato de clorhexidina al 0'12% (Campisi y cols., 2007; Marx y cols., 2005). Se evitarán los tratamientos dentales invasivos. Si fuese necesario este tipo de tratamientos, algunos autores proponen la suspensión de la toma del BFs entre 1 y 3 meses antes y después de la cirugía, pero no hay evidencia científica. Algunos autores defienden que la supresión del fármaco ayudaría a evitar los efectos antiangiogénicos y con ello promocionaría la curación de la zona tras la cirugía (Campisi y cols., 2007; Bagán y cols., 2007; Khosla y cols., 2007). De acuerdo con las directrices de la AAOMS, en pacientes que han estado expuestos a la terapia con BFs orales durante más de tres años, y requieren cirugía dentoalveolar, la interrupción de los fármacos orales durante al menos tres meses antes de la cirugía programada ha sido de gran ayuda en la prevención de necrosis. Sin embargo otros autores argumentan que la interrupción del tratamiento con bifosfonatos no mejora la ONMB debido a que los niveles de los bifosfonatos pueden persistir en el hueso hasta 12 años después de la interrupción del tratamiento (Lin y cols., 1999).

Cuando es necesaria una intervención dental invasiva, se ha propuesto la combinación de colutorios antisépticos con una cobertura antibiótica entre 3 días antes del evento, hasta 20 días después (Campisi y cols., 2007; Bagán y

cols., 2007; Khosla y cols., 2007).

En pacientes que ya presentan úlceras orales, si tienen dolor, se prescribirán analgésicos (Campisi y cols., 2007). Se irrigará la zona expuesta con clorhexidina al 0.12% cada 72 horas durante 1 mes (Bagán y cols., 2007). La mayoría de autores recomienda la prescripción de antibióticos de amplio espectro, variando el tipo, la dosis y la duración de tratamiento según cada autor (ver Tabla 2) (Campisi y cols., 2007; Bagán y cols., 2007; Woo y cols., 2006). Se puede realizar un cultivo microbiológico de una muestra de la lesión ulcerada con fin de conocer el tipo de patógeno y prescribir el antibiótico específico (Campisi y cols., 2007; Bagán y cols., 2007).

Tabla 2: Terapia antibiótica para el tratamiento de ONM ya establecidas (Woo y cols., 2006; Campisi y cols., 2007).

Antibiótico	Dosis
PRIMERA ELECCIÓN	
Penicilina	500 mg 3-4 veces /día 10 días
Amoxicilina	500 mg 3-4 veces /día 10 días
ALERGICOS A PENICILINA	
Clindamicina	150-300 mg 4 veces/día
Eritromicina	100 mg 4 veces/día
Azitromicina	400 mg 4 veces/día
PACIENTES QUE NO RESPONDEN O EN CASO DE SINTOMATOLOGÍA SEVERA (en adición a lo previo)	
Metronidazol	250-500mg
EN CASO DE INFECCIÓN SEVERA	
Ampicilina	1 gr 4 veces/día
Ácido clavulánico	500 mg 4 veces/día
Metronidazol	500 mg 3 veces/día
ALERGICOS A LA PENICILINA	
Ciprofloxacino + Metronidazol	500 mg 2 veces/día + 500 mg 3 veces /día
Eritromicina + Metronidazol	400 mg 3 veces/día + 500 mg 3 veces/día
ANTIFÚNGICOS (Cuando sean requeridos)	
En base al test de susceptibilidad.	
ANTIVIRALES (Cuando sean requeridos)	
Aciclovir	400 mg 2 veces/día
Valaciclovir	500 mg- 2 gr 2 veces/día

Cuando las lesiones no responden a los tratamientos anteriormente mencionados, dan sintomatología y se sobreinfectan con frecuencia, se recomienda actuar sobre el hueso expuesto mediante cirugía eliminando el hueso necrótico de manera conservadora (Marx y cols., 2005; Ruggiero y cols.,

2004).

Han surgido tratamientos alternativos como la terapia con ozono, el oxígeno hiperbárico, los láseres o la terapia fotodinámica, que buscan un efecto germicida y promotor de la curación de la lesión ulcerada, aunque estas técnicas aún están en desarrollo. Aunque la terapia de oxígeno hiperbárico se creyó que no era eficaz en el tratamiento de ONM, (Van den Wyngaert y col, 2006) actualmente se evidencia lo contrario. (Biasotto y col, 2006; Shimura y col, 2006)

Dado que hoy en día no existe un único protocolo de actuación ante ONM (ver Tabla 3), lo más importante, es el diagnóstico precoz y la información al paciente, para actuar de modo preventivo ya que no hay un tratamiento definitivo.

Tabla 3: Tratamiento de la ONM en base a su estadio clínico según la AAOMS

GUÍA DE TRATAMIENTO DE ONM	
CATEGORIA DE RIESGO	
Intervenciones no indicadas	
Educación del paciente para que conozca los riesgos potenciales.	
ESTADÍO 1	
Enjuagues antibacterianos	
Seguimiento clínico cada 3-4meses	
Educación del paciente	
ESTADÍO 2	
Enjuagues antibacterianos	
Tratamiento antibacteriano (penicilina, clindamicina, doxiciclina, flúor quinolona, metronidazol)	
Control del dolor	
ESTADÍO 3	
Enjuagues antibacterianos	
Tratamiento antibacteriano	
Tratamiento del dolor	
Desbridamiento quirúrgico o resección para la paliación del dolor o la infección	

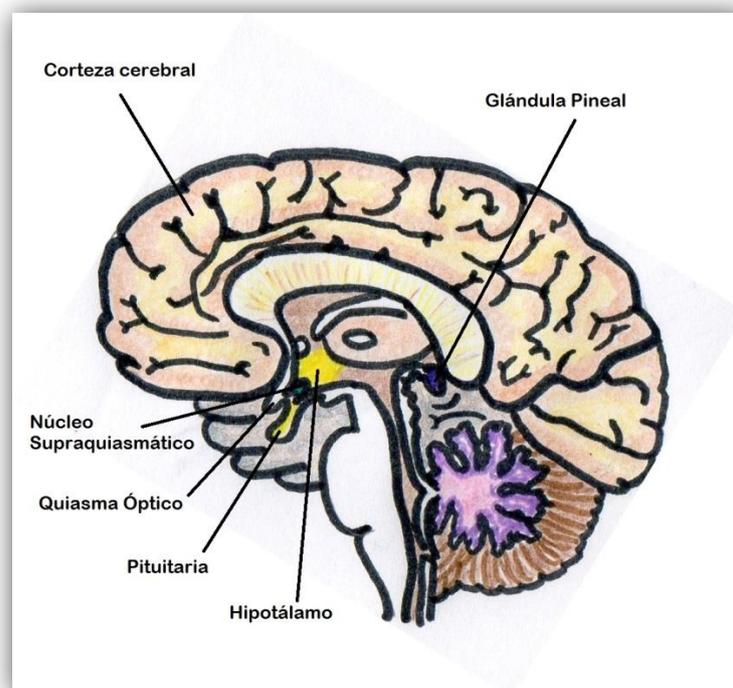
1.3 MELATONINA

1.3.1 Síntesis de melatonina

La melatonina (*N*-acetil-5-metoxitriptamina) es una neurohormona principalmente sintetizada y secretada por la glándula pineal (fundamentalmente durante el período nocturno de los ciclos circadianos) (Reiter y cols., 1991a), aunque también se sintetiza en otros órganos como la retina, el tracto gastrointestinal y el hueso medular (Sánchez-Barceló y cols., 2010). La melatonina (MLT) fue descrita inicialmente por McCord y Allen en 1917 y aislada por primera vez por Lerner en 1958 (McCord y Allen., 1917; Lerner y cols., 1958).

La glándula pineal es una prominencia dorsal de la pared posterior del tercer ventrículo y por ello se sitúa entre los tubérculos superiores del mesencéfalo, en la fosa pineal (Figura 7).

Figura 7: Glándula pineal.



Dado que la glándula pineal de mamíferos es incapaz de obtener fotorrecepción directa, la retina lleva a cabo esta función en nombre de la glándula pineal. Los ojos se comunican con la glándula pineal por una vía neuronal que incluye el tracto retino, el núcleo supraquiasmático, y las fibras pre y postganglionares del sistema nervioso simpático periférico. La retina recibe la señal lumínica y la transmite, a través de una vía multisináptica llamada tracto retino-hipotalámico, al núcleo supraquiasmático que se sitúa en el hipotálamo anterior, sobre el quiasma óptico (Moore y cols., 1978; Kim y cols., 2015). La luz impide la activación adrenérgica de la glándula pineal inhibiendo la síntesis de MLT, que ocurre durante la noche mediante la activación postsináptica de receptores β -adrenérgicos (Reiter y cols., 1981).

Las células encargadas de sintetizar la melatonina son los pinealocitos, siendo éstas las células parenquimales de la glándula pineal. El pinealocito es una célula de tipo neuronal con un citoplasma basófilo y núcleo de cromatina laxa. Tiene una prolongación larga en forma de “palo de golf” que tiene contacto con los capilares vasculares y se orienta hacia la periferia de la glándula, y un par de prolongaciones parenquimatosas que se orientan hacia el interior de la glándula y no tienen contacto vascular. Al microscopio electrónico se observa un núcleo indentado, un citoplasma normal y un aparato de Golgi abundante. También tienen una laminilla sináptica que son un resto vestigial de la retina y no conectan los pinealocitos entre sí.

Son células que responden a los cambios en la luminosidad durante el ciclo luz/oscuridad, lo que hace que su actividad metabólica se sincronice a un periodo de 24 horas denominado ritmo circadiano. En sujetos normales la mayor secreción de MLT se produce entre las doce de la noche y las dos de la madrugada, y la mínima entre el medio día y las dos de la tarde (Simonneaux y cols., 2003). Las concentraciones plasmáticas nocturnas de MLT llegan a ser aproximadamente 50 veces más altas que las alcanzadas durante el día (Lynch y cols., 1987; Reiter y cols., 1991b; y Reiter y cols., 1996). Los niveles de MLT alcanzan el pico en la noche y persisten durante aproximadamente 8 horas. Durante el día, los niveles se reducen 10 veces y persisten durante

aproximadamente 16 horas (Reiter y cols., 1991b). La duración de secreción nocturna es proporcional a la duración de la noche. Por lo tanto, las variaciones estacionales en la duración del día solar se codifican en esta señal humoral (Von Gall y cols., 2002).

La síntesis de MLT y la actividad secretora de la glándula pineal se determina principalmente por la liberación de norepinefrina (NE) (Axelrod y cols., 1974) en las terminaciones nerviosas simpáticas postganglionares que terminan en la glándula (Kappers y cols., 1960). La liberación de NE está estrictamente asociada con la oscuridad. Puesto que la liberación de NE en los pinealocitos se produce exclusivamente en la noche, la síntesis de MLT igualmente ocurre principalmente durante la oscuridad. Esta expresión nocturna de la síntesis de MLT es típica de todos los mamíferos (Gem y cols., 1986).

Los mecanismos de transducción de señales postsinápticos, aplicables a la producción nocturna de MLT después de la liberación de NE, implican receptores beta - y alfa- adrenérgicos en la membrana del pinealocito. La participación de dos receptores en la regulación de un segundo mensajero intracelular, en el caso de la adenosin monofosfato-3'5' cíclico (AMPc) pinealocítico, es una característica común a muchas células. El AMPc es el segundo mensajero intracelular requerido para el aumento de la producción de MLT pineal nocturna (Axelrod y cols., 1974; Klein y cols., 1981; Santana y cols., 1988). Además, un segundo nucleótido cíclico, el monofosfato de guanosina cíclico (GMPc), también se eleva en la glándula pineal de rata por la noche como consecuencia de la activación de los receptores adrenérgicos (Klein y cols., 1985; Chik y cols., 1989), aunque su significado funcional, sin embargo, permanece desconocido.

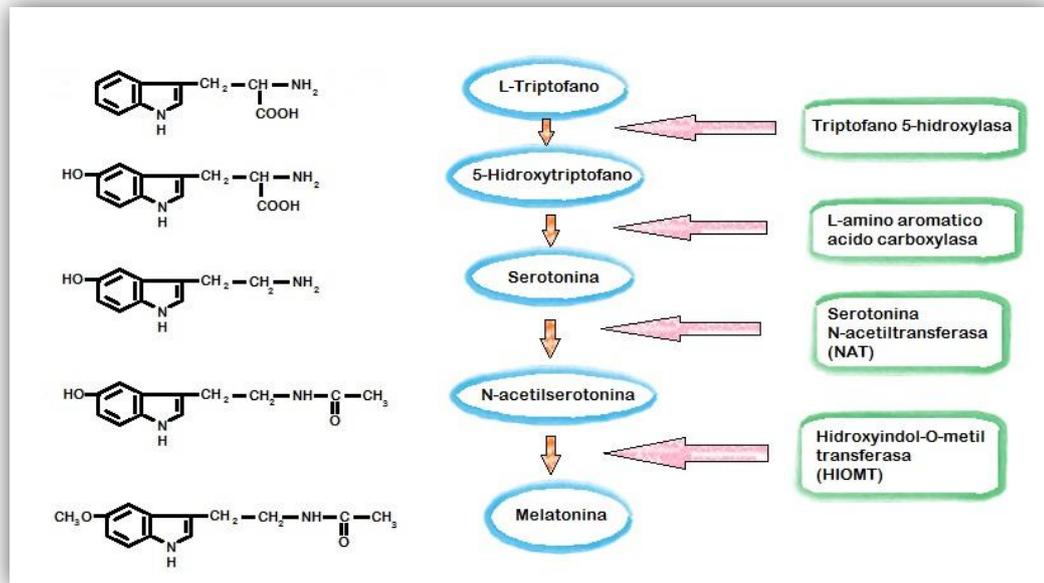
La estimulación de receptores β -adrenérgicos del pinealocito provoca un aumento de AMPc intracelular debido a su capacidad para aumentar la actividad de la adenilato ciclasa (O'Dea y cols., 1985). La activación única de los receptores β -adrenérgicos, induce un aumento de AMPc de hasta 10 veces en la glándula pineal. Por el contrario, la estimulación única de los receptores α -

adrenérgicos, no tiene efecto sobre la acumulación de nucleótidos cíclicos (Vanecek y cols., 1985). Sin embargo, cuando la estimulación por NE es combinada, para ambos receptores β -y α -adrenérgicos, la respuesta pineal de rata en términos de AMPc se potencia en gran medida, y el contenido de nucleótidos cíclicos aumenta hasta 100 veces (Klein y cols., 1985).

La regulación del receptor dual de AMPc en la glándula pineal también se traduce en una estimulación similar (por receptores beta-adrenérgicos) y de aumento (por receptores alfa-adrenérgicos) de la actividad de la enzima limitante en la producción de MLT, N-acetiltransferasa (NAT) (Klein y cols., 1981), así como de la MLT en sí (Santana y cols., 1989). Sin embargo, los aumentos medidos en el contenido de MLT pineal de animales en los que se activan una o ambas clases de receptores adrenérgicos indican que la estimulación alfa-adrenérgica aumenta sólo ligeramente (alrededor de un 15%) la cantidad real de MLT producida, que es principalmente un resultado de la estimulación del receptor beta-adrenérgico (Reiter y cols., 1991c). Por lo tanto, el efecto de receptores beta y alfa adrenérgicos en la estimulación del segundo mensajero AMPc no se traduce a un aumento equivalente de la cantidad de MLT formada.

La biosíntesis pineal comienza con la captación del triptófano, aminoácido aromático esencial, a través de un mecanismo de transporte activo que está bajo control adrenérgico. Dentro de la célula el triptófano se convierte en 5-hidroxitriptófano por la enzima triptófano 5-hidrolasa que a su vez es convertido a 5-hidroxitriptamina (serotonina) por la enzima L-triptófano descarboxilasa. Posteriormente, la serotonina es convertida a N-acetilserotonina (NAS) por la enzima serotonina N-acetiltransferasa. Una vez formada, la NAS se convierte rápidamente a la MLT por la acción de la enzima citosólica hidroxindol-O-metiltransferasa (HIOMT) (Figura 8) (Reiter y cols., 1991a).

Figura 8: Proceso de reacciones enzimáticas que dan lugar a la síntesis de la melatonina.



El patrón de la producción de MLT 24 h en la glándula pineal parece ser específico. Independientemente del modelo, la expresión del ritmo de MLT es siempre el mismo en el sentido de que el pico se produce invariablemente en la noche. Además, la duración del nivel elevado es proporcional a la duración del período de oscuridad, de modo que en noches largas (fotoperiodos de invierno) se refleja un aumento de la MLT más prolongado (Reiter y cols., 1991a).

Contini y cols., en el año 2000, realizaron un estudio en el cuál demostraron la presencia de MLT en ratones, en células de la médula ósea humana y otras líneas celulares humanas. La concentración de MLT identificada en la médula ósea fue mayor que en la glándula pineal y el suero, lo que confirmó sus estudios preliminares (Conti y cols., 1998). Aunque no se puede explicar la razón de esta diferencia de concentración, los datos apoyaron la evidencia de que la hormona se sintetiza en los ratones y en las células de la médula ósea humana. Uno de los dos enzimas claves esenciales para la biosíntesis de la MLT y que convierte 5-hidroxitriptamina (serotonina) a N-acetil-5-hidroxitriptamina, se detectó en el hueso de tres cepas de ratones (C57BL:6, C3H:ÉI, SJL:J), en cultivos de médula ósea a largo plazo y en líneas celulares

humanas (Nalm-6 , Jurkat , U-937). La segunda enzima clave implicada en la ruta de biosíntesis de la MLT, HIOMT, que cataliza la conversión de N-acetilserotonin a MLT (N-acetil-5-metoxitriptamina), también fue medida en este estudio. La actividad de esta enzima fue detectada en la glándula pineal, la retina, la glándula de Harder (situada en la parte posterior de la órbita de algunos animales), y el ovario de vertebrados (Itoh y cols., 1997). Sin embargo, en líneas celulares humanas, no se evaluó la actividad enzimática de HIOMT, sino que se midió la expresión del ARNm.

Una vez que la glándula pineal ha producido la MLT, se libera rápidamente en el sistema vascular. Su alta lipofilia, que presumiblemente permite la liberación rápida de la glándula, también permite su rápida transferencia a otros fluidos; cada fluido corporal probado hasta la fecha ha demostrado ser positivo para la MLT. Por lo tanto, su presencia se ha descrito en el líquido cefalorraquídeo (Hedlund y cols., 1976), la saliva (Vakkuri y cols., 1985), el líquido folicular de ovario (Brzezinski y cols., 1987), el fluido seminal (Bornman y cols., 1989), el fluido de la cámara anterior del ojo (Yu y cols., 1990), la leche (Reppert y cols., 1979), y el líquido amniótico (Kivelä y cols., 1989).

La MLT sintetizada en la glándula pineal se libera al torrente sanguíneo, pero la que se produce en otros órganos no se libera a la sangre y actúa in situ (Reiter y cols., 1991a).

Más del 90% de la MLT circulante se metaboliza en el hígado donde se cataboliza y se elimina en la orina en forma de compuestos sulfatados (6-sulfatoximelatonina o 6-SMT). Presenta una vida media corta (entre 20 y 45 minutos), y una mala biodisponibilidad oral que disminuye la idoneidad de su uso como fármaco, a pesar de sus múltiples funciones fisiológicas (Carocci y cols., 2014).

Como resultado de su presencia en cada compartimento de fluido en el organismo, esencialmente todas las células se exponen al ritmo circadiano de la MLT. Dado que pasa rápidamente a través de las membranas celulares, si tiene receptores o algún otro mecanismo para recibir la señal, cada célula en el

organismo es alertada al estado fotoperiódico (Reiter y cols., 1991a).

1.3.2 Receptores de melatonina

Durante todo el ciclo de 24 horas, la sensibilidad de los receptores a las señales específicas fluctúa y esta sensibilidad se puede modular de una manera homóloga, es decir, por la MLT en sí, o de manera heteróloga, es decir, por otras señales incluyendo el fotoperiodo o los estrógenos (Witt-Enderby y cols., 2003).

El fotoperiodo puede desempeñar un papel importante en la regulación de la densidad de receptores de MLT. Por ejemplo, en rata, en el núcleo supraquiasmático del hipotálamo, que es el reloj biológico maestro, la densidad de los receptores de MLT varía con el ciclo de luz / oscuridad. Los niveles de receptor son más bajos durante la noche en comparación con los niveles durante el día. Esta fluctuación en la densidad de receptores se produce incluso en ratas pinealectomizadas, lo que sugiere la participación del ciclo luz / oscuridad (Masson-Pevet y cols., 2000).

En la actualidad han sido descritos tres receptores de MLT en mamíferos; MT1, MT2 y MT3. Los receptores pertenecen a dos clases distintas de proteínas, a la súper familia de receptores acoplados a proteína G (MT1, MT2) y a la familia de la enzima reductasa de quinona (MT3) que los hace únicos a nivel molecular (Witt-Enderby y cols., 2003).

Debido a que estos receptores están localizados en la membrana plasmática, la MLT regula la función celular a través de segundos mensajeros intracelulares, disminuyendo la concentración intracelular de adenosín monofosfato cíclico (AMPc) y también se han encontrado efectos sobre otros segundos mensajeros como el calcio, el guanosín monofosfato cíclico (GMPc), y la proteína Kinasa.

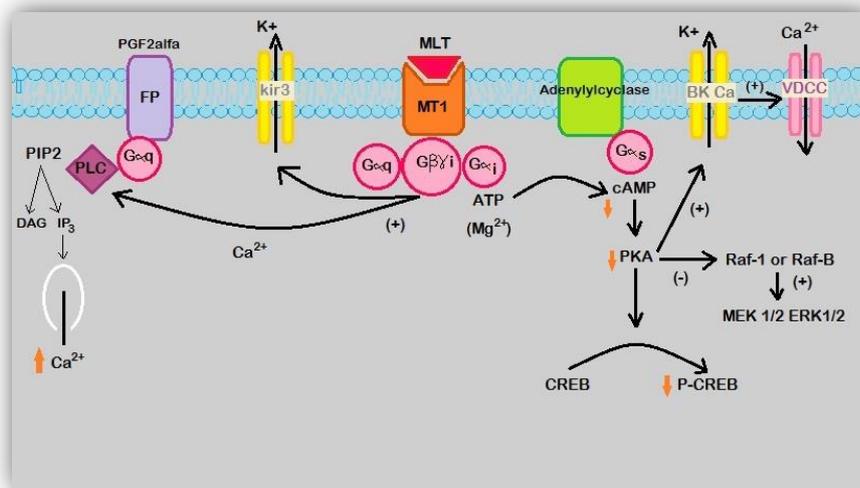
MT1

El receptor de melatonina MT1, que se expresa en el núcleo

supraquiasmático del hipotálamo y en vasos cardíacos, está implicado en la modulación de los ritmos circadianos (Dubocovich y cols., 1998; Liu y cols., 1997), y en la constricción de vasos cardíacos (Doolen y cols., 1998). Además de estas regiones específicas, el MT1 se expresa en otras regiones del cerebro y tejidos periféricos (Clemens y cols., 2001; Ram y cols., 2002; Scher y cols., 2002; Zhao y cols., 2000; Zhao y cols., 2002).

Como se muestra en numerosos estudios, los MT1 han demostrado producir respuestas inhibitorias en la cascada de transducción de señales de adenosin monofostato-3',5' cíclico (AMPc) (Brydon y cols., 1999a; Brydon y cols., 1999b; Morgan y cols., 1991; Niles y cols., 1990; Reppert y cols., 1994; Witt-Enderby y cols., 1996), resultando en una disminución en la actividad de proteína quinasa A (PKA) (Morgan y cols., 1994; Witt-Enderby y cols., 1998), y la disminución de la fosforilación del factor de transcripción CREB (cAMP response element-binding) (Witt-Enderby y cols., 1998; McNulty y cols., 1994). Asimismo, aumenta el guanisín monofosfato cíclico (GMPc). Sin embargo en ciertas células, MT1 estimula al AMPc vía proteína Gas. Además de la cascada del AMPc, los receptores MT1 estimulan la cascada de la fosfolipasa C (PLC) tanto directa como indirectamente (vía Ghg) y activan la proteína quinasa C (PKC) (Figura 9).

Figura 9: Procesos intracelulares mediados a través de los receptores de membrana MT1.



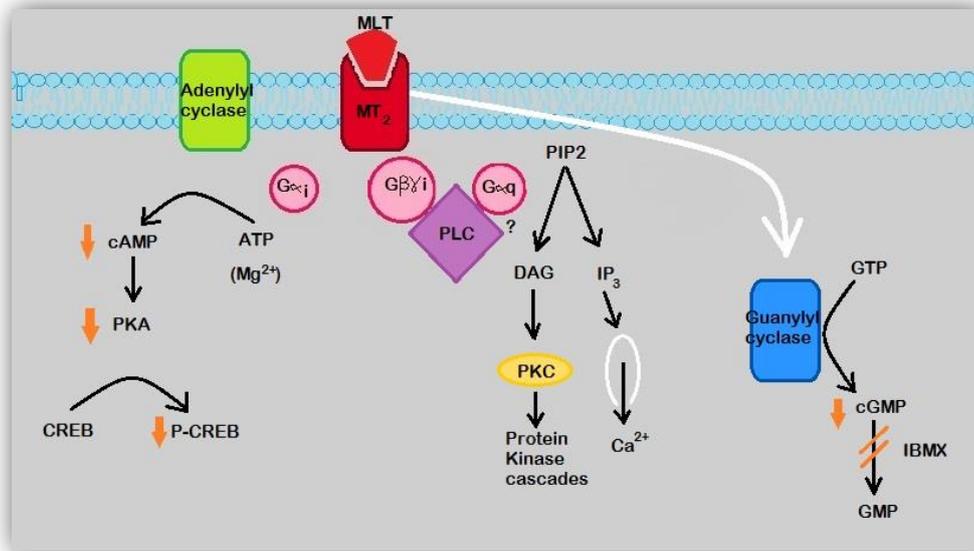
Estos receptores también pueden modular la formación de ácido araquidónico (Godson y cols., 1997), pueden estimular la quinasas c-Jun N-terminal (Chan y cols., 2002), y también modular las proteínas asociadas a microtúbulos (MAP) (Chan y cols., 2002; Hazlerigg y cols., 1996; Witt-Enderby y cols., 2000). En ciertos casos inhiben la inducción de ARNm de c-fos y jun B producida por forskolina.

Por lo tanto, en conjunto, los hallazgos de que la MLT puede regular estos factores puede sugerir la existencia de un mecanismo subyacente de la MLT para inducir la diferenciación de ciertas células (Bordt y cols., 2001).

MT2

Hasta la fecha, lo que se conoce es que los MT2 están implicados en la fisiología de la retina (Dubocovich y cols., 1997), en la modulación de los ritmos circadianos (Dubocovich y cols., 1998), en la dilatación de los vasos cardíacos (Dooleny cols., 1998), y están implicados en la respuesta inflamatoria y en la microcirculación (Von Gall y cols., 2002; Lotufo y cols., 2001; Li y cols., 2000; Masana y cols., 2001). Su localización incluye el cerebelo, núcleo supraquiasmático del hipotálamo, la retina, el riñón, el ovario, los vasos cardíacos y en diversas líneas de células cancerosas (Von Gall y cols., 2002; Li y cols., 2000; Masana y cols., 2001).

De forma similar a los MT1, los MT2 están acoplados con la inhibición de la cascada del AMPc y la estimulación de la hidrólisis de pirofosfato inorgánico. Sin embargo, difieren de los MT1 en que se produce disminución de GMPc (Figura 10).

Figura 10: Procesos intracelulares mediados a través de los receptores de membrana MT2.

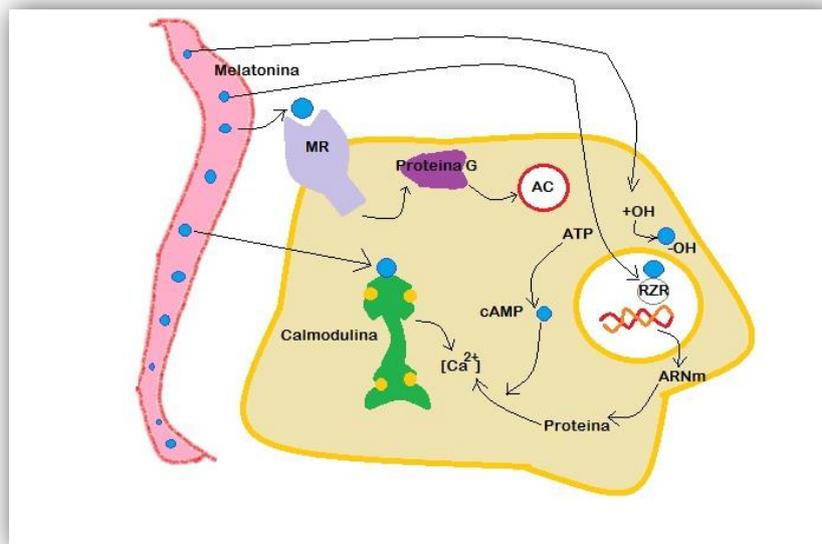
MT3

Recientemente, una proteína que muestra un perfil de unión similar al del receptor MT2 (Dubocovich y cols., 1995; Molinari y cols., 1996), ahora se denota como MT3 que se purificó por afinidad a partir del riñón de hámster sirio (Nosjean y cols., 2000). Se demostró que esta proteína comparte el 95% de homología con la quinona reductasa humana 2, una enzima implicada en la desintoxicación (Nosjean y cols., 2000). Esta proteína y su actividad asociada, tal como se revela a través de la unión de radioligando y ensayos enzimáticos, se ha demostrado que se expresa en el hígado, riñón, cerebro, corazón, tejido adiposo marrón, músculo esquelético, pulmón, intestino, testículo y en el bazo de hámster, ratón, perro y mono (Nosjean y cols., 2001). Muy recientemente, se demostró que la proteína MT3 puede estar implicada en la regulación de la presión intraocular en conejos (Pintor y cols., 2001), y en las respuestas inflamatorias de la microvasculatura (Lotufo y cols., 2001).

1.3.3 Mecanismos mediados por la melatonina dentro de una célula.

La MLT produce efectos de una manera dependiente del receptor o de forma independiente. La MLT independiente de los receptores, pasa a través de las membranas celulares, se acumula dentro de una célula, y se une a nivel intracelular, citosólico y nuclear (Figura 11). De esta manera actúa en la desintoxicación de radicales, que se produce a través de propiedades de eliminación de radicales libres, debido a su capacidad para la regulación a través del incremento de enzimas detoxificantes, incluyendo la catalasa, la superóxido dismutasa y la glutatión peroxidasa (Tan y cols., 2007).

Figura 11: Acción de la melatonina independiente y mediada a través del receptor.



Los receptores nucleares son proteínas localizadas en el interior del núcleo, capaces de unirse a la región reguladora de algunos genes. Estas proteínas regularían la actividad de la ARN polimerasa II. Se ha demostrado también la capacidad de la MLT para unirse a proteínas citosólicas como la proteína quinasa C 45, la calmodulina 46, y la calreticulina 47, y probablemente, también a la quinona-reductasa-2 (Tan y cols., 2007).

De manera simplificada, cuando una señal llega a la superficie celular estimula al receptor correspondiente, que pone en marcha un segundo mensajero (AMPc, calcio...) y actúa sobre una proteína quinasa, que se desplaza al interior del núcleo celular, donde se activa la CREB (proteína elemento-unión de respuesta de AMPc). CREB se une a la región CRE (elemento de respuesta a AMPc) configurando una Unidad de Proteína de unión a CREB, que lo coactiva. Esto permite "encender o apagar" ciertos genes.

La MLT inhibe la actividad de la calmodulina mediante la prevención de la unión y / o mediante la inducción de su fosforilación a través de la proteína quinasa C alfa (PKC α). La calmodulina es una proteína cuya función principal es quelar el calcio, lo que permite modular la actividad de muchas enzimas. La consecuencia de la inhibición de la calmodulina por la MLT puede dar lugar a una reducción en la acumulación de AMPc a través de la calmodulina adenil ciclasa sensible. Esto puede causar una atenuación de las cascadas de señalización dependientes de AMPc, incluyendo la activación de la proteína elemento-unión de respuesta de AMPc (CREB) y el elemento de respuesta a AMPc (CRE) que contienen los genes.

Las reducciones de la activación de calmodulina mediada por MLT disminuyen la unión al receptor de estrógeno (ER) y la activación del elemento de respuesta a estrógenos (ERE) que contienen los genes.

La calreticulina es una proteína del retículo endoplasmático que también se une al calcio. Se trata de una proteína que regula la homeostasis intracelular del calcio. La proteína quinasa C es una quinasa de serina y treonina activada por calcio que modifica la estructura del citoesqueleto. La MLT activa la proteína quinasa C, contribuyendo a modular el citoesqueleto (Macias y cols., 2003; Tan y cols., 2007).

La vía MAPK, Map cinasa o MAPK/ERK (Mitogen-Activated Protein Kinases) es un vía de transducción de señales de células eucaritotas que se sitúa corriente debajo de los receptores tirosin quinasa. La señal se transporta

mediante GRB2 y de Sos a Ras (proteínas G monoméricas). Ras ya activada estimula tres proteínas quinasas que actúan de forma secuencial y culmina con la activación de MAPK, que es una serín-treonín-quinasa, capaz de translocarse al núcleo para allí regular la transcripción modificando la actividad de proteínas, regulando la expresión de genes. El complejo Ras-GTP activo se fija al dominio regulador Raf (situado en su N terminal), una serín treonín quinasa que de este modo se activa. La hidrólisis de GTP asociado a Ras, da lugar a GDP y provoca la liberación de Raf ya activada, que fosforila y en consecuencia activa a MEK, que es otra quinasa que fosforila y activa a MAPK que es capaz de fosforilar a otras proteínas.

También, tal como se representa, la MLT puede actuar a través de sus receptores acoplados a proteína G, MT1 o MT2 para la supresión inducida de CREB y / o la activación de genes ER. Además, a través de los receptores MT2, la MLT pone en marcha la cascada de la quinasa activada por proteínas mitógenas (MEK / ERK 1/2) y promueve la diferenciación celular y retarda la proliferación celular. Esto puede ocurrir a través de acciones autocrinas de factor de crecimiento epidérmico unido a heparina liberado después de la activación de los receptores de melatonina MT2, las proteínas Gi, metaloproteinasas de la matriz y procesos de interiorización (Witt-Enderby y cols., 2006).

Los efectos de la MLT a través de receptores MT3 que regulan la actividad de quinona reductasa 2, aún no están claros, pero pueden estar involucrados con mecanismos oxidantes / reductores a través de mecanismos no identificados.

1.3.4 Funciones de la Melatonina

La melatonina está envuelta en numerosos procesos neuroendocrinos y fisiológicos, tales como: los ritmos circadianos (Cassone y cols., 1990; McMillen y cols., 1995; Cassone y cols., 1986), el sueño, la temperatura corporal (Dollins y cols., 1994), la inhibición del crecimiento tumoral, actúa sobre el sistema inmune (Liebmann y cols., 1997), sobre el sistema cardiovascular (Krause y

cols., 1995), tiene una importante actividad antioxidante, influye en la reproducción (Kennaway y cols., 1994), y sobre el desarrollo sexual (Esquifino y cols., 1987; Batmanabane y cols., 1996). También se ha demostrado que influye en la diferenciación de células en las que puede estimular o suprimir la división celular dependiendo de su concentración o el tipo de célula examinado (Hill y cols., 1988; Cos y cols., 1995; Roth y cols., 1997). Además, actúa sobre el metabolismo de los adipocitos y finalmente tiene una importante actividad osteogénica (Witt-Enderby y cols., 2006; Jarzinka y cols., 2009; Tamura y cols., 2009; Bejarano y cols., 2009; Cardinali y cols., 2003; Alonso-Vale y cols., 2006; Roth y cols., 1999; Koyama y cols., 2002; Satomura y cols., 2007; Scalbert y cols., 1998).

La MLT modula la respuesta inmune (**inmunomoduladora**) y corrige estados de inmunodeficiencia debidos a estrés agudo o, a tratamiento farmacológico. La activación de los receptores de la melatonina en células T-helper aumenta la liberación de citoquinas, tales como interferón gamma, interleucinas IL - 1 , IL - 2 , IL - 4 e IL - 6 (Del Gobbo y cols., 1989; Caroleo y cols., 1992; Pioli y cols., 1993; García-Maurino y cols., 1997; Barjavel y cols., 1998; García-Maurino y cols., 1998; Neri y cols., 1998; Shaji y cols., 1998), así como un nuevo grupo de moléculas que pertenecen a la familia de los opioides. (Maestroni y cols., 1993; Maestroni y cols., 1998). En las enfermedades autoinmunes, como la diabetes autoinmune, protege a los ratones diabéticos no obesos contra el desarrollo de la enfermedad a través de mecanismos distintos de la modulación de citoquinas o de los opioides (Conti y cols., 1996). La MLT a través de los monocitos aumenta la producción de IL-1, IL-6 y factor de necrosis tumoral, y a través de células mononucleares aumenta la producción de IL-2, IL-6 e interferón gamma. También estimula de forma directa a células del sistema inmune como polimorfonucleares neutrófilos, macrófagos, linfocitos y células natural Killer (Mehta y cols., 2014).

La MLT presenta **propiedades anticancerígenas**, ya que de forma exógena sola (Neri y cols., 1998; Hill y cols., 1988; Blask y cols., 1993), o en asociación con IL - 2 (Conti y cols., 1995), inhibe la carcinogénesis y el crecimiento

tumoral (Yu y cols., 1993), e inhibe la apoptosis en timocitos (Sainz y cols., 1995). Además, la MLT actúa como agente citoprotector ya que disminuye la toxicidad de la quimioterapia y/o radioterapia, mejorando la supervivencia global de un año (Vinther y cols., 2015) de los pacientes y aminorando los efectos secundarios de la quimioterapia (Seely y cols., 2012). La MLT se ha propuesto como un agente oncostático por su capacidad antiproliferativa, antioxidante e inmunoestimulante (Zamfir y cols., 2014).

La MLT actúa como **agente antioxidante**. La expresión diferencial del receptor de la melatonina se ha descrito en el plasma (Calvo y cols., 1995), y en las membranas nucleares (García-Maurino y cols., 1998), de linfocitos y en monocitos (Barjavel y cols., 1998). No obstante, algunas acciones intracelulares, que incluyen la actividad directa de extinción de radicales libres, son independientes de cualquier interacción con el receptor (Hardeland y cols., 1993; Tan y cols., 1993; Daniels y cols., 1995; Sewerynek y cols., 1995; Vijayalaxmi y cols., 1995; Vijayalaxmi y cols., 1996; Vijayalaxmi y cols., 1999; Reiter y cols., 1997), y aumentan tanto el ARNm (Antoli'n y cols., 1996; Kotler y cols., 1998), como la actividad de varias enzimas antioxidantes (Reiter y cols., 1997; Barlow-Balden y cols., 1995). Varias investigaciones han demostrado que la MLT también puede proteger al ácido graso poliinsaturado de la oxidación (Montilla y cols., 1998; Princ y cols., 1998), y al ADN nuclear del daño inducido por carcinógenos (Tan y cols., 1993; Tan y cols., 1994; Reiter y cols., 1998), irradiación ionizante (Vijayalaxmi y cols., 1999), o herbicidas (Melchiorri y cols., 1998).

Esta propiedad reside en que la MLT tiene una alta capacidad de difusión debido a su pequeño tamaño y a su alta lipofilia, siendo capaz de atravesar cualquier membrana celular, y acceder a todas las partes del organismo. En segundo lugar, tiene un potencial redox muy alto, de alrededor de 0.74 V, lo que le confiere una alta capacidad de ceder un electrón para reducir cualquier molécula que esté a su alcance. Para neutralizar especies reactivas de oxígeno, la MLT cede un electrón al radical hidroxilo (HO⁻) y lo neutraliza. Tras ceder el electrón la MLT se convierte en un radical llamado catión indolilo que

interacciona con un radical anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$) y generan N1-acetil-N2-formil-5 metoxiquinurenamina que se eliminará en orina (Poeggeler y cols., 1994).

Y en tercer lugar, es activadora de varias enzimas antioxidantes como la superóxido dismutasa, la glutatión reductasa y la glutatión peroxidasa (Antolín y cols., 1996).

Otra propiedad de la MLT es que **mejora la calidad y cantidad del sueño**. Ha resultado ser una herramienta importante para combatir el insomnio en pacientes de mediana edad y mayores. Otros autores han estudiado el efecto terapéutico de la MLT en el insomnio en pacientes con ciertas enfermedades, siendo igualmente efectiva.

La MLT se ha propuesto como **potenciadora de la formación ósea**, siendo ésta la característica de mayor interés para nuestro estudio, la cual desarrollaremos en el siguiente epígrafe.

1.3.5 Acción de la melatonina sobre el metabolismo óseo

En condiciones normales, la remodelación ósea actúa en ciclos en los que los osteoclastos se adhieren al hueso y posteriormente lo eliminan por acidificación y digestión proteolítica. Poco después de que los osteoclastos hayan abandonado el lugar de reabsorción, los osteoblastos invaden el área y comienzan el proceso de formación de hueso nuevo mediante la secreción de osteoide (una matriz de colágeno y otras proteínas), que se mineraliza finalmente. Esto es controlado por factores de crecimiento y citoquinas producidas en el microambiente de la médula ósea y por la acción de las hormonas sistémicas, como la hormona paratiroidea, el estradiol o la hormona del crecimiento. Uno de los candidatos que interviene en la modulación hormonal de la formación de osteoblastos y osteoclastos es la MLT (Cardinali y cols., 2003).

Los niveles de MLT declinan con la edad, de tal manera que en edades

avanzadas los niveles de MLT disponibles para el organismo son una fracción de los de individuos jóvenes (Iguchi y cols., 1982; Dori y cols., 1994; Girotti y cols., 2000; Mishima y cols., 2001; Siegrist y cols., 2001), esto puede deberse a la distrofia neuroaxonal de la inervación simpática de la glándula pineal (Schmidt y cols., 2006). También se ha informado de que la secreción de MLT disminuye bruscamente durante la menopausia (Sack y cols., 1986), disminuye con la inmovilidad (Vaughan y cols., 1978; Yocca y cols., 1984), y aumenta después del ejercicio físico (Carr y cols., 1981). Por lo tanto, hace tiempo que se sospecha la implicación de la MLT en los trastornos relacionados con la edad como la osteoporosis por post-menopausia y senescencia (Cardinali y cols., 2003).

El potencial terapéutico de la MLT está subestimado porque sus roles funcionales son diversos y sus mecanismos de acción son complejos y variados. La MLT produce efectos celulares a través de una variedad de mecanismos de forma tanto independiente como dependiente del receptor (Witt-Enderby y cols., 2006). En cuanto al efecto de la MLT sobre los osteoblastos que forman el hueso, los datos son contradictorios.

Un estudio realizado por Suzuki y cols., en 2002 (Suzuki y cols., 2002), fue el primero en demostrar un efecto inhibitor de la melatonina sobre los osteoblastos, cuando se incuban en presencia de osteoclastos. De hecho, los autores argumentaron que los efectos de la MLT reportados previamente para estimular la proliferación de los osteoblastos de mamífero (Roth y cols., 1999), eran artefactos, porque los experimentos se llevaron a cabo con osteoblastos aislados, mientras que en la formación de hueso y su metabolismo se producen los contactos entre osteoblastos y osteoclastos (Manolagas y cols., 2000). Hallazgos similares se encontraron en ratas Wistar macho, donde altos niveles endógenos de MLT se correlacionaban con bajos niveles de marcadores de la formación de hueso (es decir, fosfatasa alcalina, propéptido carboxiterminal de procolágeno de tipo 1, y el telopéptido carboxiterminal del colágeno tipo 1 (CTX)) (Ostrowska y cols., 2003a).

Koyama y cols., 2002, encontraron pocas evidencias sobre la promoción del

efecto de la MLT sobre la proliferación y diferenciación de osteoblastos *in vivo*, ya que la administración diaria de MLT durante 4 semanas en ratones macho, no tuvo un efecto apreciable sobre los parámetros histomorfométricos de formación ósea ni la afectación de la ALP sérica o la OCN. Estos autores concluyeron que a pesar del hecho de que la MLT aumenta la proliferación, la actividad de la formación de nódulos de diferenciación, y el hueso de los osteoblastos *in vitro* (Roth y cols., 1999, Nakade y cols., 1999), la MLT pudiera no ser osteogénica *in vivo*, al menos en ratones jóvenes en crecimiento. En su ensayo, cuatro grupos de ratones macho de 4 semanas de edad recibieron inyecciones diarias de 1, 5, o 50 mg / kg de MLT, respectivamente, durante 4 semanas. El tratamiento con 5 mg / kg / día o 50 mg / kg / día de MLT aumentó significativamente la densidad de mineral óseo en un 36% y la masa ósea (es decir, el volumen de hueso por volumen de tejido) en un 49% y el espesor trabecular en un 19%. Este tratamiento redujo significativamente los parámetros de resorción ósea (es decir, la superficie de osteoclastos) en un 74% y el número de osteoclastos en un 76%, pero no aumentó los parámetros histomorfométricos de formación ósea, lo que indica que la MLT aumenta la masa ósea predominantemente a través de la supresión de la resorción ósea (Koyama y cols., 2002).

En contraposición, otros autores defienden la capacidad osteogénica de la MLT, que promueve la maduración de osteoblastos *in vitro* y previene la pérdida ósea *in vivo* (Roth y cols., 1999; Koyama y cols., 2002; Satomura y cols., 2007). Se ha visto que la MLT promueve la diferenciación osteogénica sobre modelos de líneas celulares y en las células madre mesenquimales de la médula ósea multipotenciales (Sanchez-Hidalgo y cols., 2007).

Se ha demostrado que concentraciones fisiológicas mejoradas de MLT aumentan la actividad de la ALP durante el proceso de diferenciación osteogénica de las células madre mesenquimales (Radio y cols., 2006). Sin embargo el verdadero mecanismo de acción osteogénico de la MLT permanece desconocido, aunque su influencia sobre el metabolismo óseo ha sido propuesta por diferentes autores durante las últimas cuatro décadas (Kiss

y cols., 1969; Csaba y cols., 1974; Csaba y cols., 1977; Chen y cols., 1990; Shoumura y cols., 1992). Estos estudios proponen que debido a que la glándula pineal controla la secreción de hormonas paratiroideas y calcitonina; las alteraciones en los niveles fisiológicos de MLT podrían alterar el metabolismo óseo. En este sentido, ya en 1981 se observó que la inhibición de síntesis de MLT en ratas recién nacidas expuestas a luz fluorescente blanca reducía la concentración de calcio en suero (Hakanson y cols., 1981). Del mismo modo, en 1987 fue publicado un estudio en que tras la reducción de la secreción de MLT por administración de bloqueantes de β -adrenoreceptores, también se produjo una reducción de calcio en suero (Hakanson y cols., 1987).

Más recientemente, en 2003 fueron examinados en ratas adultas machos, los efectos de la modificación de los ciclos circadianos sobre el metabolismo óseo, no sólo a nivel de la calcemia sino más específicamente sobre la fisiología ósea. Se estudiaron marcadores bioquímicos del metabolismo óseo como la ALP en suero, la concentración propéptido carboxiterminal de procolágeno de tipo I, la concentración de telopéptido carboxiterminal de procolágeno de tipo I, el fósforo inorgánico y la excreción urinaria de hidroxipropileno y calcio. Observaron que la reducción del sueño mediante la ampliación de las horas de luz diarias producían un efecto inhibitorio en los marcadores de osteogénesis (Ostrowska y cols., 2003b).

Un importante hallazgo que potencialmente puede relacionar a la MLT con la regeneración ósea, es la presencia de altas concentraciones de MLT en células de hueso medular en ratones y humanos (Tan y cols., 1999; Conti y cols., 2000). Estas células contienen una alta actividad de la aril-alkil-N-acetiltransferasa y expresan la codificación de ARN para hidroxil-O-metiltransferasa, lo que indica una alta capacidad para sintetizar melatonina (Conti y cols., 2000). Esta presencia de melatonina en las células de hueso medular podría tener un efecto protector contra el daño oxidativo en la proliferación de células hematopoyéticas o en la diferenciación de preosteoblastos a osteoblastos (Sanchez-Hidalgo y cols., 2007; Roth y cols., 1999; Nakade y cols., 1999; Radio y cols., 2006; Haldar y cols., 1992; Zaminy y

cols., 2008a).

La actividad ALP es uno de los biomarcadores de osteoblastos comúnmente utilizados para evaluar la diferenciación de los mismos (Aubin y cols., 2002). Si las células madre mesenquimales adultas humanas (hAMSCs) se diferencian en osteoblastos maduros, aumentará la producción de ALP (Jaiswal y cols., 1997; Bruder y cols., 1997). Los objetivos del estudio de Radio y cols., 2006, eran determinar en primer lugar si la MLT mejoraba la diferenciación de células madre mesenquimales adultas humanas (hAMSC) en osteoblastos, evaluada mediante la actividad enzimática de la ALP, y en segundo lugar identificar las posibles vías de transducción de señales que median este proceso. La actividad de la ALP aumentó significativamente en hAMSCs después de una incubación de 10 días en medio osteogénico, en relación con hAMSCs incubadas en medio de crecimiento basal solo. La MLT (50 nM), añadida en combinación con el medio osteogénico, aumentó significativamente la actividad de la ALP en relación con el medio osteogénico solo. La co-exposición de hAMSCs al medio osteogénico suplementado con toxina pertussis (antagonista de la MLT), luzindol o 4P-PDOT (receptor MT2 selectivo), inhibió el aumento inducido por la MLT en la actividad de la ALP, lo que indicó la implicación de los receptores de la MLT, en particular, los receptores MT2 (Radio y cols., 2006).

La capacidad de la melatonina para promover directamente la maduración de osteoblastos se demostró por primera vez en células de osteosarcoma en ratas, donde concentraciones bajas (10 nM) de MLT aumentaban los niveles de expresión de los biomarcadores en los osteoblastos incluyendo la BSP, la ALP, la OPN y la OCN (Roth y cols., 1999) y el colágeno (Nakade y cols., 1999). Además, estos efectos en osteoblastos fueron mediados a través de receptores transmembrana de MLT (Roth y cols., 1999).

En otros estudios se ha demostrado la actividad de los osteoblastos inducida por MLT ya sea mediante la mejora de su proliferación o de su diferenciación. En las células MC3T3 (preosteoblastos), la MLT (50 nM) estimula la mineralización del hueso y la diferenciación de osteoblastos, según la

evaluación de proteínas marcadoras de hueso como la ALP, la OPN y la OCN, a través de un receptor transmembrana que es sensible a la toxina pertusis (Roth y cols., 1999).

En otro estudio, la MLT incrementó la proliferación de células óseas humanas y de células osteoblásticas humanas, de una manera dependiente de la dosis, (Nakade y cols., 1999), y después de una incubación de 2 días, aumentó significativamente la producción de procolágeno de tipo I c-péptido.

Ladizesky y cols., 2001, obtuvieron la primera indicación de que la MLT podría ser eficaz *in vivo* para disminuir la pérdida ósea en ratas ovariectomizadas (Ladizesky y cols., 2001). En este estudio midieron en ratas adultas, la desoxipiridinolina urinaria (marcador de la resorción ósea), la excreción de calcio, los niveles circulantes de calcio, fósforo, la actividad de la ALP ósea, la densidad mineral ósea y el área de hueso total, durante 60 días después de la ovariectomía. Las ratas recibieron MLT (25 µg / ml de agua) o agua sola. La desoxipiridinolina urinaria aumentó significativamente después de la ovariectomía en un 51% (30 días después de la cirugía) y en un 47% (60 días después de la cirugía). No se observó el aumento de la desoxipiridinolina urinaria 30 días después de la ovariectomía en las ratas tratadas con MLT. Quince días después de la cirugía, se produjo un aumento significativo del fósforo en suero y los niveles de ALP ósea en ratas ovariectomizadas que recibieron MLT en comparación con sus controles. Sesenta días después de la cirugía, la densidad ósea mineral y el área ósea disminuyó significativamente en las ratas ovariectomizadas, la MLT no modificó este efecto. El estradiol sérico disminuyó significativamente 30 días después de la ovariectomía para alcanzar valores cercanos al límite de detección del ensayo 60 días después de la ovariectomía. Los resultados apoyan la conclusión de que una dosis farmacológica de MLT modifica la remodelación del hueso después de la ovariectomía y que el efecto puede necesitar concentraciones adecuadas de estradiol (Ladizesky y cols., 2001).

Por otro lado, la actividad de los osteoclastos está bajo el control de los factores paracrinos producidos por los osteoblastos. La parathormona y

1,25-dihidroxicolecalciferol estimulan la expresión de un factor de diferenciación de osteoclastos (ODF) por las células del estroma de la médula y los osteoblastos. ODF se une al receptor activador del factor nuclear-kappa B (RANK) en la superficie de la activación de la resorción ósea de los osteoclastos (Cardinali y cols., 2003; Krane 2002). En los osteoblastos de ratón, la MLT, a dosis micromolares, disminuye la expresión de ARNm de RANK y aumenta tanto los niveles de ARNm de proteína OPG y, un miembro de la superfamilia de TNFR (receptor del factor de necrosis tumoral), que inhibe la diferenciación de osteoclastos mediante la prevención de la unión del factor ODF (Koyama y cols., 2002). A través de este mecanismo, la MLT podría causar una inhibición de la resorción ósea y un aumento de la masa ósea.

La OPG, una proteína osteoblástica que inhibe la diferenciación de los osteoclastos se ve aumentada por la MLT *in vitro*. Además, la MLT a través de sus propiedades antioxidantes y eliminadoras de radicales libres puede afectar la actividad de los osteoclastos y la resorción ósea (Cardinali y cols., 2003). La MLT suprime la actividad del oxígeno, anión radical superóxido, radical hidroxilo, radical peroxilo, y finalmente, el anión peroxinitrito. La MLT es capaz de proteger a las macromoléculas, en todos los compartimentos de la célula, del daño oxidativo y especialmente en las membranas celulares debido a su alta solubilidad en lípidos, haciéndolos más resistentes al ataque oxidativo (Reiter y cols., 2001; Reiter y cols., 2002; Okatani y cols., 2002). Por lo tanto, el efecto de la MLT en la prevención de la actividad de los osteoclastos en el hueso puede depender en parte de las propiedades de depuración de radicales libres (Cardinali y cols., 2003; Juknat y cols., 2005).

Como último apunte, Konturek y cols., 2008, realizaron un estudio que consistió en la aplicación de MLT y su precursor el L-triptófano para la curación de úlceras gástricas. Después de la inducción de la úlcera gástrica en ratas mediante la aplicación de ácido acético, la necrosis de la mucosa local se acompaña de una reducción en la microcirculación de la mucosa y por la expresión casi inmediata de óxido nítrico sintasa inducible y las citocinas proinflamatorias. La aplicación diaria de MLT (20 mg / kg) o L-triptófano (100

mg / kg) aceleró la curación de la úlcera al afectar al sistema de la ciclooxigenasa-2 (COX-2)-prostaglandina con producción excesiva de prostaglandina de protección, especialmente en el período de cicatrización de la úlcera (Konturek y cols., 2008).

Los resultados discutidos anteriormente indican que la MLT puede influir positivamente, de diferentes maneras, en la pérdida de hueso asociada con la edad. Una de ellas es directamente sobre el hueso al actuar sobre los osteoclastos y tal vez sobre los osteoblastos, girando de forma positiva el balance de calcio. El efecto de la MLT puede necesitar una cantidad adecuada de estrógeno para manifestarse (Ladizesky y cols., 2003). Otra forma de actuar es indirecta, a través de la liberación de hormona del crecimiento asociada con la mejora del sueño no REM en los sujetos de mayor edad. Se requieren más ensayos clínicos controlados para establecer si la MLT puede ser utilizada como un nuevo modo de terapia para aumentar la masa ósea en enfermedades caracterizadas por una masa ósea baja (Cardinali y cols., 2003).

En resumen los principales mecanismos revisados anteriormente relacionados con los efectos de la MLT sobre la función de la médula son: (a) la promoción de la diferenciación osteoblástica, la actividad y la expresión de la OPG que impide la diferenciación de los osteoclastos, y (b) de barrido de radicales libres generados por la actividad osteoclástica y responsables de la resorción ósea.

1.3.6 Receptores de melatonina en las células óseas

Los tres receptores de MLT vistos anteriormente, están presentes en los osteoblastos pero no en los osteoclastos. Además, el receptor MT3 sólo ha sido identificado en aves y roedores, no en humanos (Nosjean y cols., 2001; Reppert y cols., 1997). Los dos receptores humanos de MLT (MT1 y MT2) están asociados en la membrana a receptores de proteína G (Von Gall y cols., 2002; Reiter y cols., 2007). En la actualidad, se ha comprobado que estos receptores de melatonina pueden llegar a ser homólogos o heterólogos para la misma, en función de estímulos luminosos y del estradiol (Witt-Enderby y cols.,

2003). La expresión de estos receptores puede ser también observada en retina (Fujieda y cols., 1999; Poeggeler y cols., 1995), cerebro (Reiter y cols., 2007; Uz y cols., 2005), mama (Dillon y cols., 2002), y otros órganos periféricos (Konturek y cols., 2008; Naji y cols., 2004). En general, tras la activación de los receptores MT1 o MT2 en los osteoblastos, se produce una inhibición de la actividad de la adenilato ciclasa (Von Gall y cols., 2002), la cual inhibe la formación de AMP cíclico y por lo tanto se produce una disminución de la proteína quinasa A activada (Vanecek y cols., 1998).

A nivel de los osteoclastos humanos, debido a la ausencia de receptores MT1 o MT2, la actividad beneficiosa de la melatonina en la regeneración ósea, se basa en la actividad antioxidante que reduciría la gran cantidad de radicales libres producidos durante la degradación y reabsorción ósea (Fraser y cols., 1996), esta actividad podría reducir la apoptosis del osteoclasto.

Los mecanismos de señalización a través de los cuales la melatonina aumenta la formación de osteoblastos son menos conocidos. En general, la promoción de la diferenciación de osteoblastos se ha demostrado por numerosos laboratorios, siendo mediada a través de la cascada proteína quinasa mitógena (Radio y cols., 2006; Suzuki y cols., 1999; Suzuki y cols., 2002; Rawadi y cols., 2001; Xiao y cols., 2000; Fujita y cols., 2002); sin embargo otras vías (p38, MEK / ERK) siguen sin estar claras. Las entradas que conducen a la activación de las vías MAPK (Mitogen-Activated Protein Kinases) en las células osteoblásticas pueden implicar la activación de AMPc (Fujita y cols., 2002), y del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) (Radio y cols., 2006). Una vez activada la vía MAPK, se ha demostrado su capacidad para fosforilar proteínas específicas de osteoblastos, incluyendo CBFA-1 (factor de transcripción asociado a la diferenciación de osteoblastos humanos) y para controlar la expresión de genes específicos de osteoblastos, incluyendo la OCN (Xiao y cols., 2000). Claramente, el papel de la vía MAPK inducida por la MLT en la diferenciación de osteoblastos es importante y se necesitan más estudios para definir aún más estas cascadas de señalización. Además, el papel de los estrógenos y la MLT en la formación de hueso se debe evaluar como terapias

combinadas que pueden demostrar ser eficaces para el tratamiento de la osteoporosis.

En general, la mayoría de los estudios sugieren un papel protector de la MLT sobre el hueso, es decir, evita la degradación de hueso y promueve la formación de hueso más probablemente a través de una acción que implica los receptores de MLT. Por otra parte, teniendo en cuenta que los genes relacionados con el metabolismo óseo están sujetos al ritmo circadiano (Ostrowska y cols., 2003a; Ostrowska y cols., 2003b), la determinación de la ventana terapéutica para los efectos de la MLT sobre proteínas marcadoras de hueso también requiere investigación adicional (Hakanson y cols., 1987).

Justificación y objetivos

2. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

2.1 Justificación

Los BFs son análogos químicamente estables de compuestos de pirofosfato con una alta afinidad por la hidroxiapatita y ampliamente utilizados en enfermedades donde se produce un incremento de la reabsorción ósea, tales como la enfermedad de Paget, afectaciones óseas en procesos cancerígenos (tanto en paciente con niveles de calcio sérico normal como en presencia de hipercalcemia de causa tumoral), son uno de los tratamientos básicos en la osteoporosis y también han sido utilizados en algunas enfermedades pediátricas esqueléticas como la osteogénesis imperfecta. Se clasifican en nitrogenados (de mayor potencia) y no nitrogenados (menos potentes). Aunque los BFs son muy efectivos en reducir la pérdida de hueso y en disminuir las manifestaciones clínicas en patologías óseas, ellos pueden inducir algunos efectos adversos tales como problemas gastrointestinales, fiebre y síndrome pseudogripal, fibrilación auricular, hipocalcemia, inhibición de la mineralización ósea y osteonecrosis maxilar relacionada con BFs (ONMB). La ONMB se define como una condición caracterizada por la falta de cicatrización de hueso necrótico expuesto en la mandíbula o el maxilar superior que persiste más de ocho semanas en un paciente que está tomando BFs o los ha tomado recientemente, en ausencia de una exposición a radiación ionizante de cabeza y/o cuello.

El ZA es un BF nitrogenado que ha sido desarrollado en exclusiva para su uso intravenoso pero no para su uso oral. Es un potente inhibidor de la reabsorción ósea mediada por los osteoclastos con una acción ósea selectiva basada en su gran afinidad por el hueso mineralizado. Administrado por vía intravenosa se distribuye rápidamente en el hueso y, como otros BFs, se localiza preferentemente en los lugares de reabsorción ósea. La diana molecular principal del AZ en el osteoclasto es la enzima FPPS, aunque esto no excluye otros mecanismos de acción sobre el hueso. La relativamente larga duración de su acción se atribuye a su alta afinidad por el centro activo de la

FPPS y a su alta capacidad de unión al mineral óseo. Sin embargo, la acción del AZ no parece ser exclusiva sobre el osteoclasto; ya que, diversos estudios sugieren que tanto los osteocitos como los osteoblastos podrían ser células objetivo para los BFs en el hueso (Plotkin y cols., 1999; Aguirre y cols., 2006; Bonewald, 2007). A diferencia de la acción sobre el osteoclasto (donde el BF induce su apoptosis), en el osteocito estos fármacos inhiben la apoptosis (Plotkin y cols., 2006). La acción del AZ sobre los osteoblastos es controvertida; ya que, aunque concentraciones muy bajas de BFs han mostrado estimular a los osteoblastos en estudios *in vitro* (Rogers, 2003), altas concentraciones de AZ podrían reducir la capacidad de migración y la viabilidad celular de los osteoblastos (Koch y cols., 2010; Walter y cols., 2011).

Por otra parte, la MLT (*N*-acetil-5-metoxitriptamina) es una neurohormona principalmente sintetizada y secretada por la glándula pineal (fundamentalmente durante el período nocturno de los ciclos circadianos), aunque también se sintetiza en otros órganos como la retina, el tracto gastrointestinal y el hueso medular. Algunos de sus efectos son diferentes a sus funciones neurohormonales primarias y son debidas a sus propiedades antiinflamatorias, su habilidad para actuar como un eficaz depurador de radicales libres y por la estimulación de varias enzimas antioxidantes. En este sentido, han sido descritas funciones inmunomoduladoras, anticancerígenas, antiinflamatorias y relacionadas con el metabolismo óseo favoreciendo la regeneración ósea. En relación a la actividad osteogénica, la MLT ha demostrado promover la maduración de osteoblastos *in vitro* y prevenir la pérdida ósea *in vivo*, (Roth y cols., 1999; Koyama y cols., 2002; Satomura y cols., 2007). Además, se ha demostrado que concentraciones fisiológicas mejoradas de MLT aumentan la actividad de la fosfatasa alcalina durante el proceso de diferenciación osteogénica de las células madre mesenquimales (Radio y cols., 2006). Por último, recientemente, ha sido probado con éxito el efecto citoprotector de MLT sobre células madre mesenquimales humanas de ligamento periodontal y médula ósea (Rodríguez-Lozano y cols., 2015).

2.2 Objetivos

El **objetivo general** fue el estudio *in vitro* del efecto citoprotector de la melatonina sobre la citotoxicidad del ácido zoledrónico en osteoblastos humanos.

El objetivo general puede ser desglosado en una serie de objetivos específicos que nos permiten sistematizar y responder a los diferentes aspectos que plantea nuestro estudio.

Objetivos específicos:

1. Estudiar el efecto del ácido zoledrónico (a concentraciones de 1, 5, 10, 50, 100 y 300 μM) sobre la viabilidad celular en la línea de osteoblastos humanos HOB-c, a las 24, 48 y 72 horas de incubación.
2. Valorar la acción de la melatonina (a concentraciones de 1, 10, 50, 100 y 200 μM) sobre la viabilidad celular en la línea de osteoblastos humanos HOB-c, a las 24, 48 y 72 horas de incubación.
3. Analizar el posible efecto citoprotector de la melatonina sobre la viabilidad celular en la línea de osteoblastos humanos HOB-c tratados con ácido zoledrónico (a concentraciones de 1, 5, 10, 50, 100 y 300 μM), a las 24, 48 y 72 horas de incubación.

Material y métodos

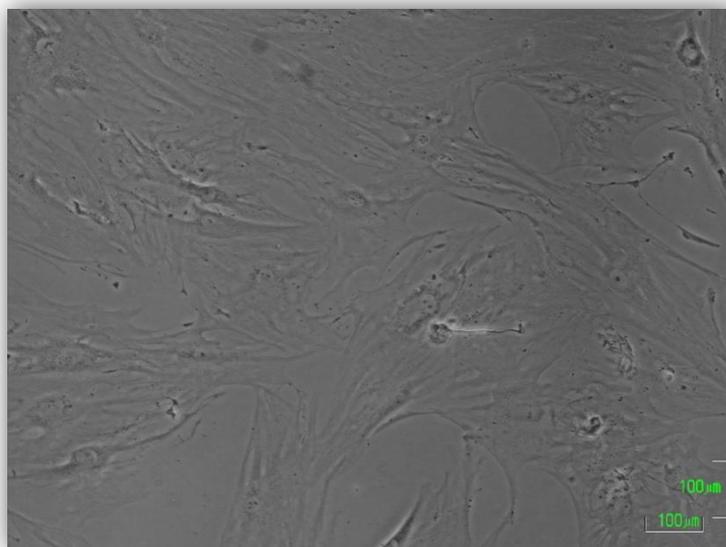
3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1 Material

➤ *Línea celular*

En este estudio in vitro hemos utilizado la línea celular de Osteoblastos humanos HOB-c (PromoCell, Heidelberg, Alemania) (Figura 12).

Figura 12: Imagen de un cultivo celular a 90% de confluencia de la línea celular HOB-c, realizada con un objetivo 10x en un microscopio de contraste de fases.



Como medio de cultivo para esta línea celular hemos utilizado el medio Osteoblast Growth Medium (PromoCell, Heidelberg, Alemania) suplementado al 10% con Osteoblast Growth Medium SupplementMix (PromoCell, Heidelberg, Alemania) y penicilina al 1%. Los cultivos se han mantenido a 37°C, con una humedad relativa del 90-95% y en una atmósfera con un 5% de CO₂, tal y como indica su ficha.

➤ *Método de cultivo*

Establecimos los cultivos a partir de viales criocongelados en nitrógeno líquido a -196°C. Para ello, descongelamos los viales rápidamente en un baño

a 37 °C. Pasamos el contenido del vial a un tubo de centrifuga con 9 mL de medio de cultivo preparado previamente. Centrifugamos, decantamos, añadimos 2 mL de medio de cultivo, resuspendemos bien y realizamos el recuento celular mediante la técnica con azul tripán y la cámara de hemocitómetro.

Una vez realizado el recuento celular y según el número de células que hayamos obtenido procedemos al cultivo masivo según nos indica su ficha. Sembramos 10.000-20.000 células por cm² en dos frascos de cultivo de 75 cm² con 12 mL de medio de cultivo en cada uno. Cambiamos el medio de cultivo cada 48 horas (Figura 13).

Figura 13: Frasco de cultivo (A), medio de cultivo (B) y suplemento (C)



A

B

C

Para realizar los subcultivos esperamos a que los cultivos estén a una confluencia del 70-80% aproximadamente. Dicha confluencia la conseguimos pasada una semana. Debemos subcultivar siempre en el mismo espacio de tiempo para saber cómo crecen nuestras células, sembrando siempre el mismo número de células y recogiendo aproximadamente a la semana unos 2 millones de las mismas.

Para subcultivar seguimos los siguientes pasos:

- Añadimos aproximadamente 6 ml de HEPES-BSS (PromoCell,

Heidelberg, Alemania) para lavar las células durante 15 segundos.

- Aspiramos el HEPES-BSS.
- Añadimos aproximadamente 6 ml de Trypsin/EDTA Solution (PromoCell, Heidelberg, Alemania) al frasco de cultivo y esperamos 10 minutos a temperatura ambiente.
- Tras la separación de las células, añadimos 6 ml de Trypsin Neutralization Solution (PromoCell, Heidelberg, Alemania) al frasco de cultivo.
- Tras la neutralización de las células, aspiramos la suspensión y la transferimos a un tubo de centrifuga y centrifugamos 5 minutos a 220xg.
- Decantamos el sobrenadante, añadimos 2 ml de medio de cultivo, resuspendemos y realizamos el recuento celular, comprobando siempre que la viabilidad celular media fuese del 97-99%.

A partir de los sucesivos subcultivos calculamos el número de células necesario para nuestros ensayos.

➤ **Instrumental**

Para la elaboración de nuestro estudio hemos utilizado los siguientes equipos e instrumental facilitados por el Servicio de Cultivo de Tejidos, Servicio de Apoyo a la Investigación (SAI), Universidad de Murcia:

- Cabina de flujo laminar Telstar Bio-II-A (Figura 14).
- Lector de placas de 96 pocillos (Servicio de Cultivo de Tejidos, SAI, Universidad de Murcia) modelo FLUOstar Omega (BMG Lab. Technologies, USA), que realiza medidas de absorbancia en placas de 96 pocillos, y que dispone de los siguientes filtros: 560 y 690 nm (Figura 15).
- Microscopio óptico (Servicio de Cultivo de Tejidos, SAI, Universidad de Murcia) Nikon Eclipse TE20009U (Nikon corp., Japon).

Figura 14: Cabina de flujo laminar de seguridad biológica tipo II.



Figura 15: Fluorímetro FLUOstar Omega.



➤ **Reactivos**

Los productos utilizados fueron los siguientes:

- El medio Osteoblast Growth Medium (PromoCell, Heidelberg, Alemania) suplementado al 10% con Osteoblast Growth Medium SupplementMix (PromoCell, Heidelberg, Alemania) y penicilina al 1% (Figura 13).
- Ácido Zoledrónico (Sigma-Aldrich Química, S.A., Madrid, España) (Figura 16).

- Melatonina (Sigma-Aldrich Química, S.A., Madrid, España), disuelta en alcohol absoluto a 50mg/ml (Figura 17).
- Bromuro de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil).2,5.difenil-2H-tetrazolio (MTT).
- Dimetil sulfóxido (DMSO)

Figura 16: Estructura química del ácido zoledrónico.

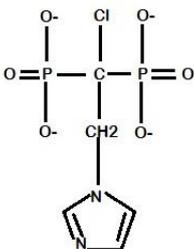
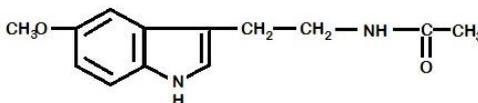


Figura 17: Estructura química de la melatonina.



3.2 Métodos

3.2.1 Diseño de estudio

Los cultivos y mediciones fueron realizados siempre por el mismo investigador y en las mismas condiciones. Los aparatos que se utilizaron se calibraron para las longitudes de onda requeridas en los distintos ensayos.

Tras la descogelación de la línea celular, se realizaron los cultivos y subcultivos necesarios para que las células alcanzaran el nivel óptimo de crecimiento, para posteriormente proceder a la realización de los diferentes estudios.

Si tras la realización de un ensayo, la línea celular sobrepasaba el número de subcultivos que se consideraba óptimo según las indicaciones, las células se desechaban y se procedía a una nueva descongelación y cultivo celular.

3.2.2 Estudio del efecto del ácido zoledrónico sobre la viabilidad celular.

- **Tratamientos**

La línea celular HOB-c fue tratada con ácido zoledrónico a las siguientes concentraciones: 1, 5, 10, 50, 100 y 300 μM , durante 24, 48 y 72 horas.

Esta misma línea celular fue tratada con melatonina a concentraciones de 1, 10, 50, 100 y 200 μM , durante 24, 48 y 72 horas.

- **Estudio de la viabilidad celular**

Utilizamos la técnica descrita por Carmichael y cols. (1987a; 1987b), adaptada a nuestras condiciones de cultivo, para cuantificar la viabilidad celular.

Las células HOB-c fueron cultivadas a una densidad de 3000 células por pocillo, en placas de 96 pocillos, durante 48 horas, tras lo que añadimos el tratamiento preparado, realizando réplicas de 6 por cada tratamiento. Pasadas 24, 48 y 72 horas de incubación con los tratamientos, eliminamos el medio e incubamos las células según las condiciones de cultivo con 200 μl de MTT recién disuelto en medio durante 4 horas. Pasado este tiempo, eliminamos el medio con el MTT no metabolizado y añadimos 100 μl de DMSO a cada pocillo para solubilizar el formazano producido por las células viables (Figura 18). Posteriormente se leyeron las placas en el FLUOstar Omega, utilizando una longitud de onda de 570 nm para la lectura y 690 nm como longitud de onda de referencia.

Figura 18: Placa de 96 pocillos tras la solubilización del formazano.



3.2.3 Estudio del efecto la melatonina sobre la viabilidad celular.

- **Tratamientos**

La línea celular HOB-c fue tratada con melatonina a concentraciones de 1, 10, 50, 100 y 200 μM , durante 24, 48 y 72 horas.

- **Estudio de la viabilidad celular**

Se realizó el mismo ensayo de viabilidad que el del ensayo citado anteriormente, cambiando el ácido zoledrónico por melatonina.

3.2.4 Estudio del efecto del ácido zoledrónico y la melatonina sobre la viabilidad celular.

- **Tratamientos**

La línea celular HOB-c fue tratada con ácido zoledrónico a las siguientes concentraciones: 1, 5, 10, 50, 100 y 300 μM , más melatonina a las concentraciones de 100 y 200 μM , durante 24, 48 y 72 horas.

- **Estudio de la viabilidad celular**

Se llevó a cabo el mismo ensayo de viabilidad celular tras 24, 48 y 72 horas de incubación con la mezcla de ácido zoledrónico y melatonina.

3.2.5 Tratamiento estadístico

Analizamos los datos estadísticos con el paquete de software SPSS® (versión 20.0) para Windows, en el cual hemos efectuado los siguientes procedimientos estadísticos:

- **Estadística inferencial**

Para el análisis comparativo de las variables se consideró que la hipótesis nula (es decir, la existencia de una relación de independencia entre las variables), se debería rechazar, cuando la probabilidad mínima de rechazo (el llamado “*p*-valor”) no sea superior al nivel crítico estándar de 0.05 (si esta se rechaza, se considera que la relación entre las variables es de dependencia). Para ello, se ha realizado el contraste para el estudio de las asociaciones entre las variables cuantitativas continuas mediante el test «ANOVA» de un factor: este test estadístico se utilizó para comparar tres o más medias (de muestras independientes), cuando eran tres o más las variables a comparar.

Resultados

4. RESULTADOS

4.1 Efectos del AZ sobre la viabilidad celular de la línea de osteoblastos humanos HOB-c a las 24, 48 y 72 horas de incubación

A medida que aumentábamos la concentración de AZ, la viabilidad de los osteoblastos humanos se reducía, tanto a las 24, 48, como a las 72 horas de incubación. Las concentraciones más citotóxicas se fueron $\geq 50 \mu\text{M}$, en todos los tiempos de incubación estudiados. El menor porcentaje de células en comparación con las muestras controles fue observado a las 24 horas con una concentración de AZ de $300 \mu\text{M}$, aunque sin observar diferencias estadísticamente significativas con el resto de concentraciones ($p=0,138$) (Figura 19A y Tabla 4A). A las 48 horas de incubación, el menor porcentaje de células respecto al control fue observado con una concentración de AZ de $100 \mu\text{M}$, pero sin diferencias significativas con las otras concentraciones utilizadas ($p=0,102$) (Figura 19B y Tabla 4B). A las 72 horas de incubación, la mayor reducción de la viabilidad celular de osteoblastos humanos fue obtenida con una concentración $50 \mu\text{M}$ de AZ, con diferencias estadísticamente significativas ($p<0,001$) (Figura 19C y Tabla 4C).

Figura 19: Efecto del AZ sobre la viabilidad celular en la línea de osteoblastos humanos HOB-c, a las 24 (A), 48 (B) y 72 (C) horas de incubación.

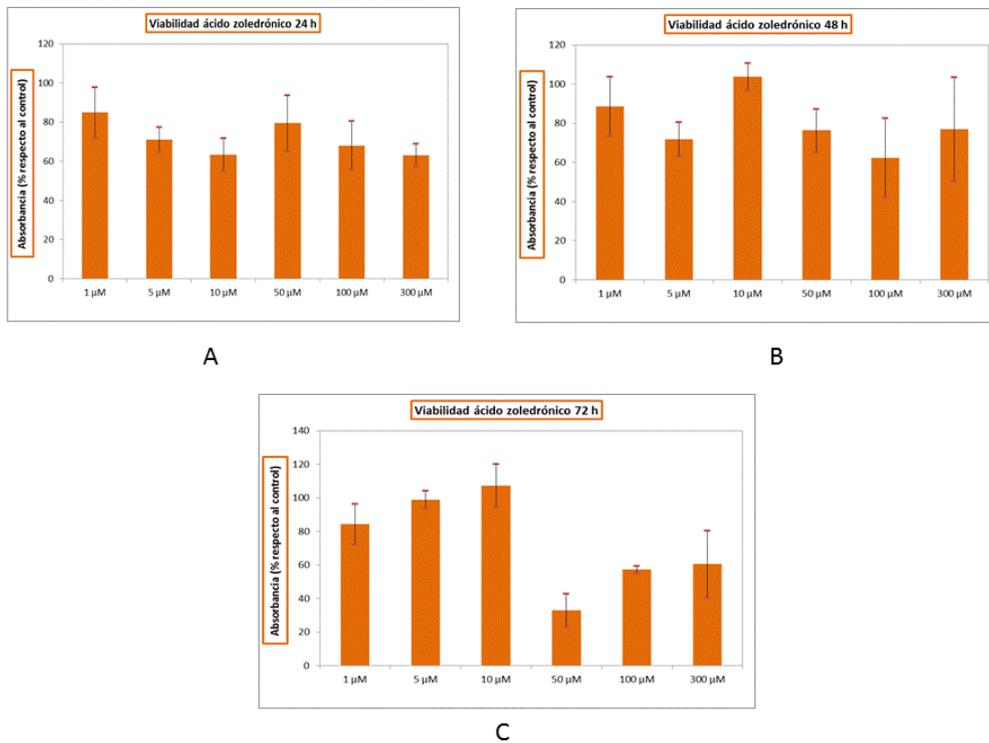


Tabla 4: Efecto del AZ sobre la viabilidad celular en la línea de osteoblastos humanos HOB-c, a las 24 (A), 48 (B) y 72 (C) horas de incubación.

Concentraciones de Ácido Zoledrónico	Viabilidad celular (% respecto al control) 24h Media ± DT*
1 µM	84,83 ± 13,02
5 µM	70,96 ± 6,33
10 µM	63,21 ± 8,58
50 µM	79,41 ± 14,31
100 µM	67,95 ± 12,46
300 µM	63,04 ± 5,91
p-valor= 0,138	
* DT = desviación típica	

A

Concentraciones de Ácido Zoledrónico	Viabilidad celular (% respecto al control) 48h Media ± DT*
1 µM	88,55 ± 15,05
5 µM	71,69 ± 8,87
10 µM	103,76 ± 6,99
50 µM	76,22 ± 10,88
100 µM	62,25 ± 20,25
300 µM	76,85 ± 26,52
p-valor= 0,102	
* DT = desviación típica	

B

Concentraciones de Ácido Zoledrónico	Viabilidad celular (% respecto al control) 72h Media ± DT*
1 µM	84,11 ± 12,12
5 µM	98,74 ± 5,31
10 µM	107,07 ± 13,02
50 µM	32,86 ± 9,92
100 µM	57,07 ± 2,16
300 µM	60,37 ± 20,06
p-valor<0,001	
* DT = desviación típica	

C

4.2 Efectos de la MLT sobre la viabilidad celular de la línea de osteoblastos humanos HOB-c a las 24, 48 y 72 horas de incubación.

Aunque a las 24 horas de incubación con MLT, la mayor viabilidad celular fue obtenida con una dosis baja de MLT (1 μ M), no observamos diferencias estadísticamente significativas con el resto de concentraciones usadas ($p=0,446$) (Figura 20A y tabla 5A). A las 48 horas, la mayor viabilidad celular de osteoblastos humanos fue obtenida con la máxima concentración de MLT utilizada (200 μ M), con diferencias estadísticamente sifnificativas ($p=0,033$) (Figura 20B y Tabla 5B). A las 72 horas, la mayor viabilidad celular se obtuvo con una concentración de 100 μ M de MLT ($p=0,149$) (Figura 20C y Tabla 5C).

Figura 20: Efecto de la MLT sobre la viabilidad celular en la línea de osteoblastos humanos HOB-c, a las 24 (A), 48 (B) y 72 (C) horas de incubación.

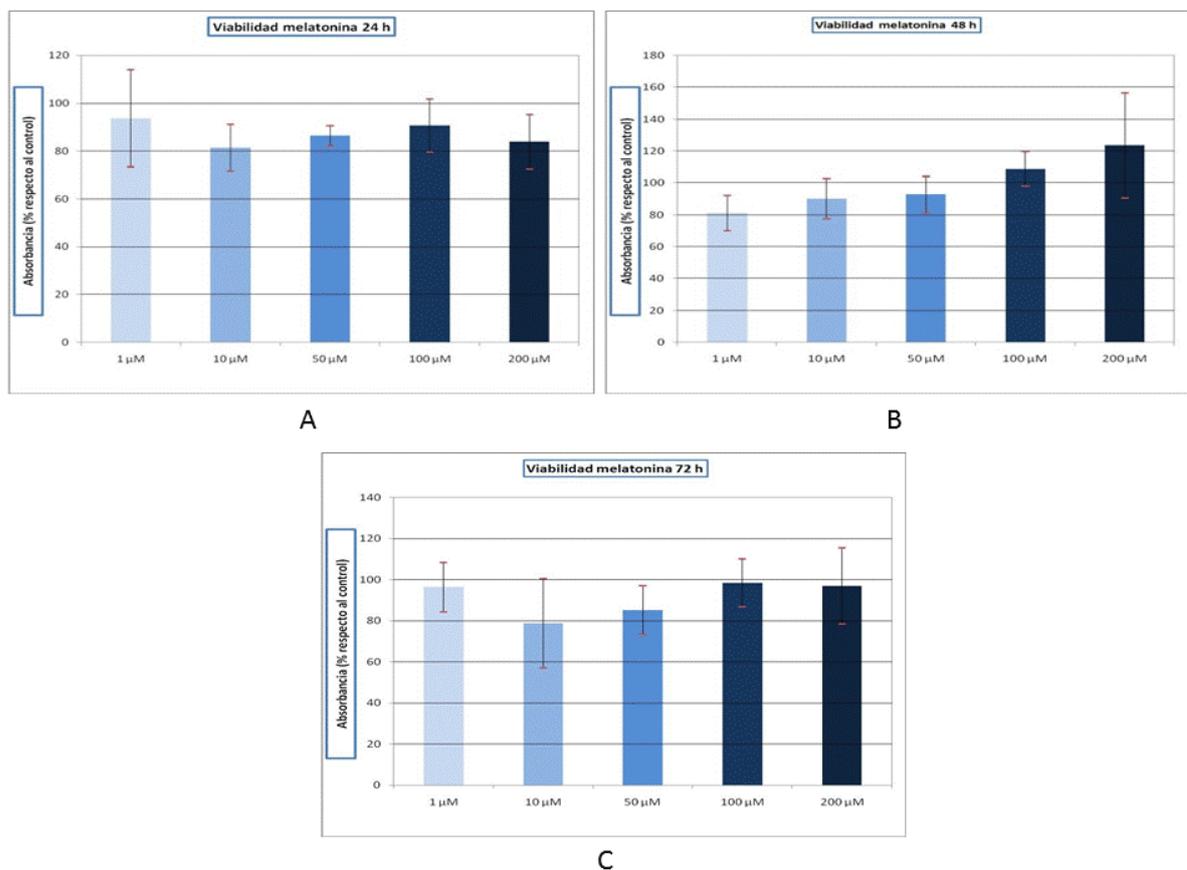


Tabla 5: Efecto de la MLT sobre la viabilidad celular en la línea de osteoblastos humanos HOB-c, a las 24 (A), 48 (B) y 72 (C) horas de incubación.

Concentraciones de Melatonina	Viabilidad celular (% respecto al control) 24h Media ± DT*
1 µM	93,69 ± 20,28
10 µM	81,37 ± 9,75
50 µM	86,48 ± 4,11
100 µM	90,66 ± 11,06
200 µM	83,88 ± 11,43
p-valor=0,446	
* DT = desviación típica	

A

Concentraciones de Melatonina	Viabilidad celular (% respecto al control) 48h Media ± DT*
1 µM	81,17 ± 11,11
10 µM	90,19 ± 12,77
50 µM	92,91 ± 11,31
100 µM	108,89 ± 10,98
200 µM	123,52 ± 33,03
p-valor= 0,003	
* DT = desviación típica	

B

Concentraciones de Melatonina	Viabilidad celular (% respecto al control) 72h Media ± DT*
1 µM	96,42 ± 11,99
10 µM	78,72 ± 21,67
50 µM	85,14 ± 11,86
100 µM	98,51 ± 11,68
200 µM	97,01 ± 18,56
p-valor=0,149	
* DT = desviación típica	

C

4.3 Efecto citoprotector de la MLT sobre la línea de osteoblastos humanos HOB-c tratados con AZ, a las 24, 48 y 72 horas de incubación.

La MLT a concentraciones de 100 y 200 µM mostró tener cierto efecto citoprotector sobre osteoblastos humanos tratados con AZ a bajas concentraciones (1 y 5 µM), en todos los tiempos de incubación estudiados (24, 48 y 72 horas) (Figura 21, Tabla 6, Figura 22 y Tabla 7), aunque sólo encontramos diferencias estadísticamente significativas, en osteoblastos tratados con 5 µM de AZ a las 24 horas de incubación ($p=0,047$) (Figura 22A y Tabla 7 A).

Figura 21: Comparación de los efectos del AZ 1 µM sólo o combinado con MLT 100 µM y MLT 200 µM sobre la viabilidad celular, a las 24 (A), 48 (B) y 72 (C) horas de incubación.

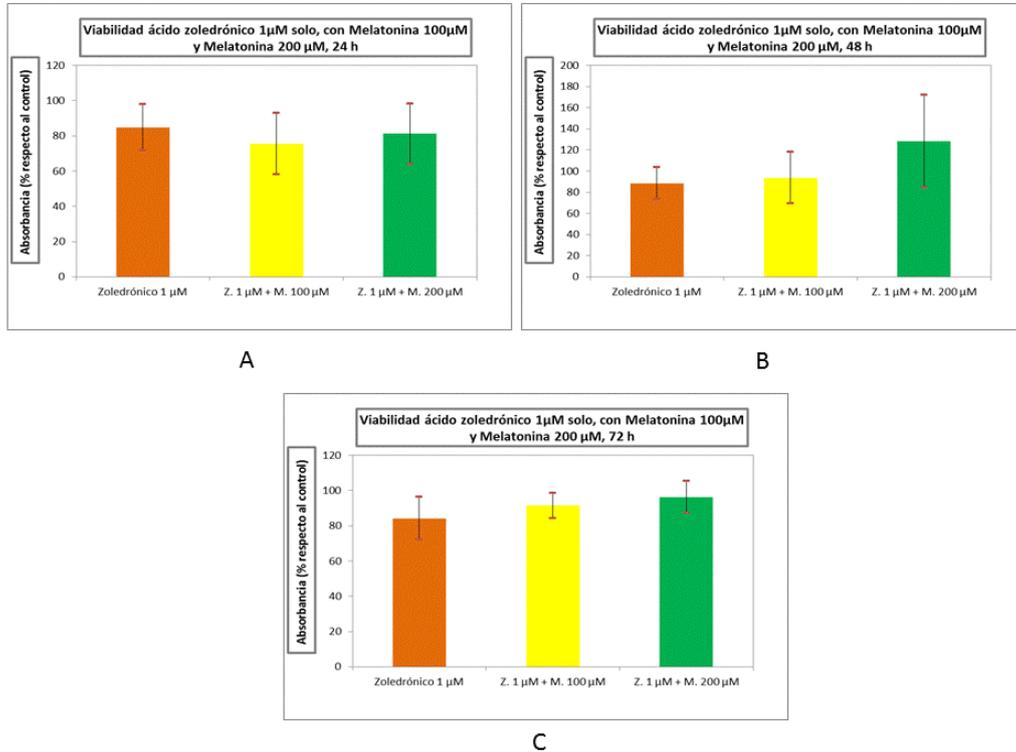


Tabla 6: Comparación de los efectos del AZ 1 µM sólo o combinado con MLT 100 µM y MLT 200 µM sobre la viabilidad celular, a las 24 (A), 48 (B) y 72 (C) horas de incubación.

Concentraciones de Ácido Zoledrónico 1µM solo, con Melatonina 100 y 200 µM	Viabilidad celular (% respecto al control) 24h Media ± DT*	Concentraciones de Ácido Zoledrónico 1µM solo, con Melatonina 100 y 200 µM	Viabilidad celular (% respecto al control) 48h Media ± DT*
Ácido Zoledrónico 1µM	84,83 ± 13,02	Ácido Zoledrónico 1µM	88,55 ± 15,05
Ácido Zoledrónico 1µM + Melatonina 100 µM	75,46 ± 17,45	Ácido Zoledrónico 1µM + Melatonina 100 µM	93,71 ± 24,38
Ácido Zoledrónico 1µM + Melatonina 200 µM	81,21 ± 17,17	Ácido Zoledrónico 1µM + Melatonina 200 µM	128,29 ± 43,87
p-valor=0,779		p-valor=0,290	
* DT = desviación típica		* DT = desviación típica	

Concentraciones de Ácido Zoledrónico 1µM solo, con Melatonina 100 y 200 µM	Viabilidad celular (% respecto al control) 72h Media ± DT*
Ácido Zoledrónico 1µM	84,11 ± 12,12
Ácido Zoledrónico 1µM + Melatonina 100 µM	91,46 ± 7,07
Ácido Zoledrónico 1µM + Melatonina 200 µM	96,33 ± 9,03
p-valor=0,358	
* DT = desviación típica	

Figura 22: Comparación de los efectos del AZ 5 μM sólo o combinado con MLT 100 μM y MLT 200 μM sobre la viabilidad celular, a las 24 (A), 48 (B) y 72 (C) horas de incubación.

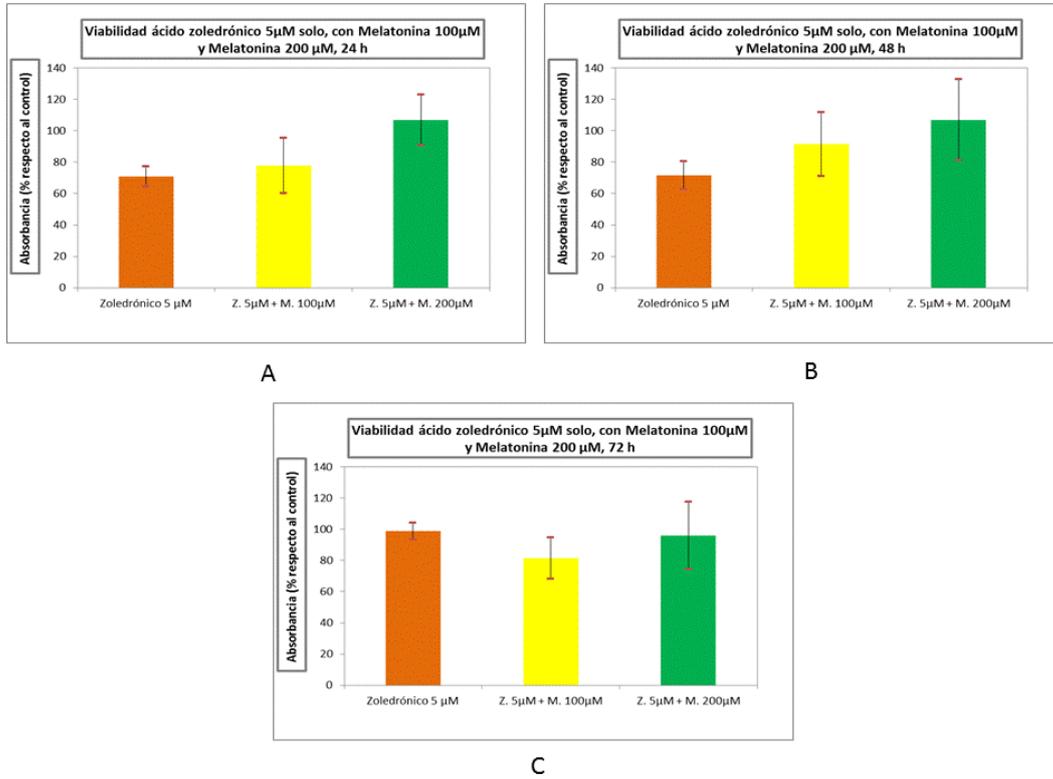


Tabla 7: Comparación de los efectos del AZ 5 μM sólo o combinado con MLT 100 μM y MLT 200 μM sobre la viabilidad celular, a las 24 (A), 48 (B) y 72 (C) horas de incubación.

Concentraciones de Ácido Zoledrónico 5 μM solo, con Melatonina 100 y 200 μM	Viabilidad celular (% respecto al control) 24h Media \pm DT*	Concentraciones de Ácido Zoledrónico 5 μM solo, con Melatonina 100 y 200 μM	Viabilidad celular (% respecto al control) 48h Media \pm DT*
Ácido Zoledrónico 5 μM	70,96 \pm 6,33	Ácido Zoledrónico 5 μM	71,69 \pm 8,87
Ácido Zoledrónico 5 μM + Melatonina 100 μM	77,81 \pm 17,71	Ácido Zoledrónico 5 μM + Melatonina 100 μM	91,41 \pm 20,44
Ácido Zoledrónico 5 μM + Melatonina 200 μM	106,77 \pm 16,11	Ácido Zoledrónico 5 μM + Melatonina 200 μM	106,99 \pm 25,63
p-valor=0,047		p-valor=0,168	
* DT = desviación típica		* DT = desviación típica	

Concentraciones de Ácido Zoledrónico 5 μM solo, con Melatonina 100 y 200 μM	Viabilidad celular (% respecto al control) 72h Media \pm DT*
Ácido Zoledrónico 5 μM	98,74 \pm 5,31
Ácido Zoledrónico 5 μM + Melatonina 100 μM	81,51 \pm 13,29
Ácido Zoledrónico 5 μM + Melatonina 200 μM	95,95 \pm 21,47
p-valor=0,377	
* DT = desviación típica	

Sin embargo, a concentraciones de AZ $\geq 10 \mu\text{M}$ el posible efecto citoprotector de la MLT se reducía exclusivamente a las 24 horas de incubación (Figura 23, Tabla 8, Figura 24, Tabla 9, Figura 25, Tabla 10, Figura 26 y Tabla 11), con diferencias estadísticamente significativas a concentraciones de AZ de $10 \mu\text{M}$ ($p=0,015$) (Figura 23A y Tabla 8A), $100 \mu\text{M}$ ($p=0,024$) (Figura 25A y Tabla 10A) y $300 \mu\text{M}$ ($p=0,005$) (Figura 26A y Tabla 11A).

Figura 23: Comparación de los efectos del AZ $10 \mu\text{M}$ sólo o combinado con MLT $100 \mu\text{M}$ y MLT $200 \mu\text{M}$ sobre la viabilidad celular, a las 24 (A), 48 (B) y 72 (C) horas de incubación.

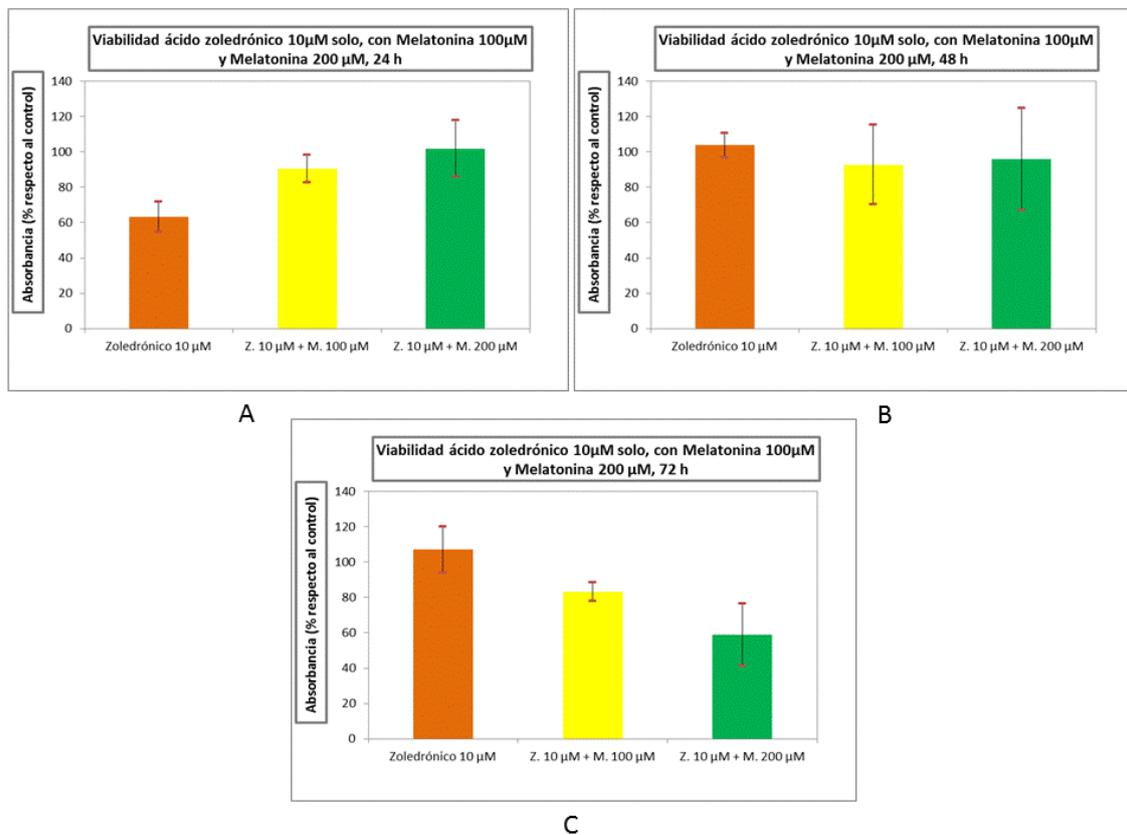


Tabla 8: Comparación de los efectos del AZ 10 µM sólo o combinado con MLT 100 µM y MLT 200 µM sobre la viabilidad celular, a las 24 (A), 48 (B) y 72 (C) horas de incubación.

Concentraciones de Ácido Zoledrónico 10 µM solo, con Melatonina 100 y 200 µM	Viabilidad celular (% respecto al control) 24h Media ± DT*	Concentraciones de Ácido Zoledrónico 10 µM solo, con Melatonina 100 y 200 µM	Viabilidad celular (% respecto al control) 48h Media ± DT*
Ácido Zoledrónico 10 µM	63,21 ± 8,58	Ácido Zoledrónico 10 µM	103,76 ± 6,99
Ácido Zoledrónico 10 µM + Melatonina 100 µM	90,61 ± 7,82	Ácido Zoledrónico 10 µM + Melatonina 100 µM	92,82 ± 22,62
Ácido Zoledrónico 10 µM + Melatonina 200 µM	101,76 ± 15,97	Ácido Zoledrónico 10 µM + Melatonina 200 µM	95,93 ± 29,01
p-valor=0,015		p-valor= 0,821	
* DT = desviación típica		* DT = desviación típica	

A B

Concentraciones de Ácido Zoledrónico 10 µM solo, con Melatonina 100 y 200 µM	Viabilidad celular (% respecto al control) 72h Media ± DT*
Ácido Zoledrónico 10 µM	107,07 ± 13,02
Ácido Zoledrónico 10 µM + Melatonina 100 µM	83,09 ± 5,22
Ácido Zoledrónico 10 µM + Melatonina 200 µM	58,95 ± 17,63
p-valor=0,012	
* DT = desviación típica	

C

Figura 24: Comparación de los efectos del AZ 50 µM sólo o combinado con MLT 100 µM y MLT 200 µM sobre la viabilidad celular, a las 24 (A), 48 (B) y 72 (C) horas de incubación.

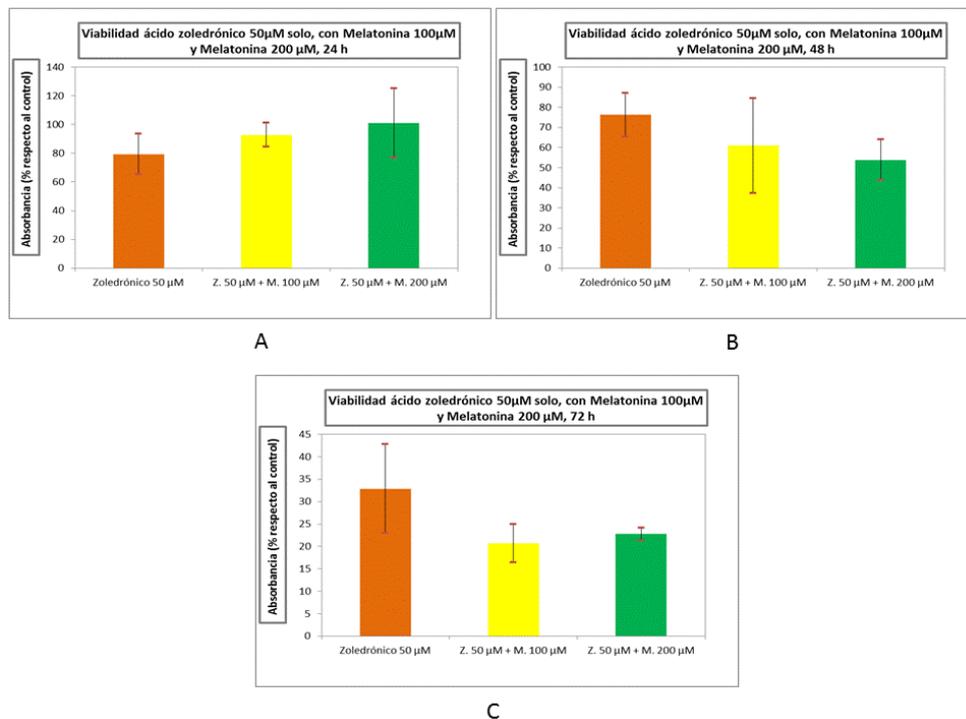


Tabla 9: Comparación de los efectos del AZ 50 µM sólo o combinado con MLT 100 µM y MLT 200 µM sobre la viabilidad celular, a las 24 (A), 48 (B) y 72 (C) horas de incubación.

Concentraciones de Ácido Zoledrónico 50 µM solo, con Melatonina 100 y 200 µM	Viabilidad celular (% respecto al control) 24h Media ± DT*	Concentraciones de Ácido Zoledrónico 50 µM solo, con Melatonina 100 y 200 µM	Viabilidad celular (% respecto al control) 48h Media ± DT*
Ácido Zoledrónico 50 µM	79,41 ± 14,31	Ácido Zoledrónico 50 µM	76,22 ± 10,88
Ácido Zoledrónico 50 µM + Melatonina 100 µM	92,84 ± 8,26	Ácido Zoledrónico 50 µM + Melatonina 100 µM	60,89 ± 23,63
Ácido Zoledrónico 50 µM + Melatonina 200 µM	100,94 ± 24,05	Ácido Zoledrónico 50 µM + Melatonina 200 µM	53,82 ± 10,14
p-valor=0,352		p-valor= 0,294	
* DT = desviación típica		* DT = desviación típica	

Concentraciones de Ácido Zoledrónico 50 µM solo, con Melatonina 100 y 200 µM	Viabilidad celular (% respecto al control) 72h Media ± DT*
Ácido Zoledrónico 50 µM	32,86 ± 9,92
Ácido Zoledrónico 50 µM + Melatonina 100 µM	20,69 ± 4,31
Ácido Zoledrónico 50 µM + Melatonina 200 µM	22,73 ± 1,45
p-valor= 0,113	
* DT = desviación típica	

Figura 25: Comparación de los efectos del AZ 100 µM sólo o combinado con MLT 100 µM y MLT 200 µM sobre la viabilidad celular, a las 24 (A), 48 (B) y 72 (C) horas de incubación.

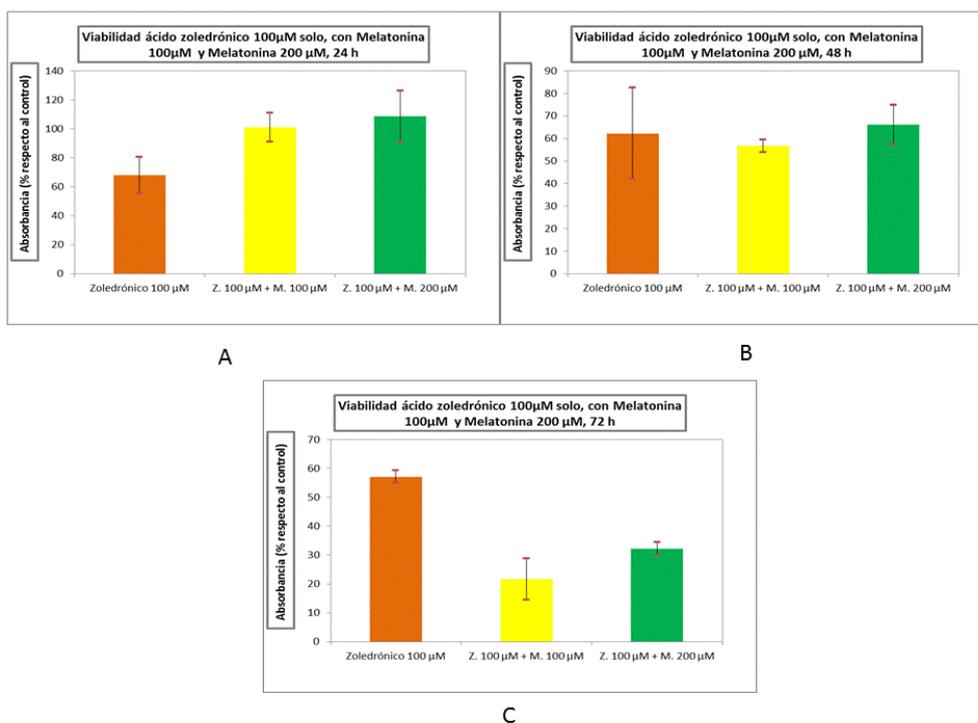


Tabla 10: Comparación de los efectos del AZ 100 µM sólo o combinado con MLT 100 µM y MLT 200 µM sobre la viabilidad celular, a las 24 (A), 48 (B) y 72 (C) horas de incubación.

Concentraciones de Ácido Zoledrónico 100 µM solo, con Melatonina 100 y 200 µM	Viabilidad celular (% respecto al control) 24h Media ± DT*	Concentraciones de Ácido Zoledrónico 100 µM solo, con Melatonina 100 y 200 µM	Viabilidad celular (% respecto al control) 48h Media ± DT*
Ácido Zoledrónico 100 µM	67,95 ± 12,46	Ácido Zoledrónico 100 µM	62,25 ± 20,25
Ácido Zoledrónico 100 µM + Melatonina 100 µM	101,05 ± 10,06	Ácido Zoledrónico 100 µM + Melatonina 100 µM	56,66 ± 2,78
Ácido Zoledrónico 100 µM + Melatonina 200 µM	108,53 ± 17,58	Ácido Zoledrónico 100 µM + Melatonina 200 µM	66,17 ± 8,75
p-valor= 0,024		p-valor=0,678	
* DT = desviación típica		* DT = desviación típica	

A B

Concentraciones de Ácido Zoledrónico 100 µM solo, con Melatonina 100 y 200 µM	Viabilidad celular (% respecto al control) 72h Media ± DT*
Ácido Zoledrónico 100 µM	57,07 ± 2,16
Ácido Zoledrónico 100 µM + Melatonina 100 µM	21,64 ± 7,11
Ácido Zoledrónico 100 µM + Melatonina 200 µM	32,17 ± 2,33
p-valor<0,001	
* DT = desviación típica	

C

Figura 26: Comparación de los efectos del AZ 300 µM sólo o combinado con MLT 100 µM y MLT 200 µM sobre la viabilidad celular, a las 24 (A), 48 (B) y 72 (C) horas de incubación.

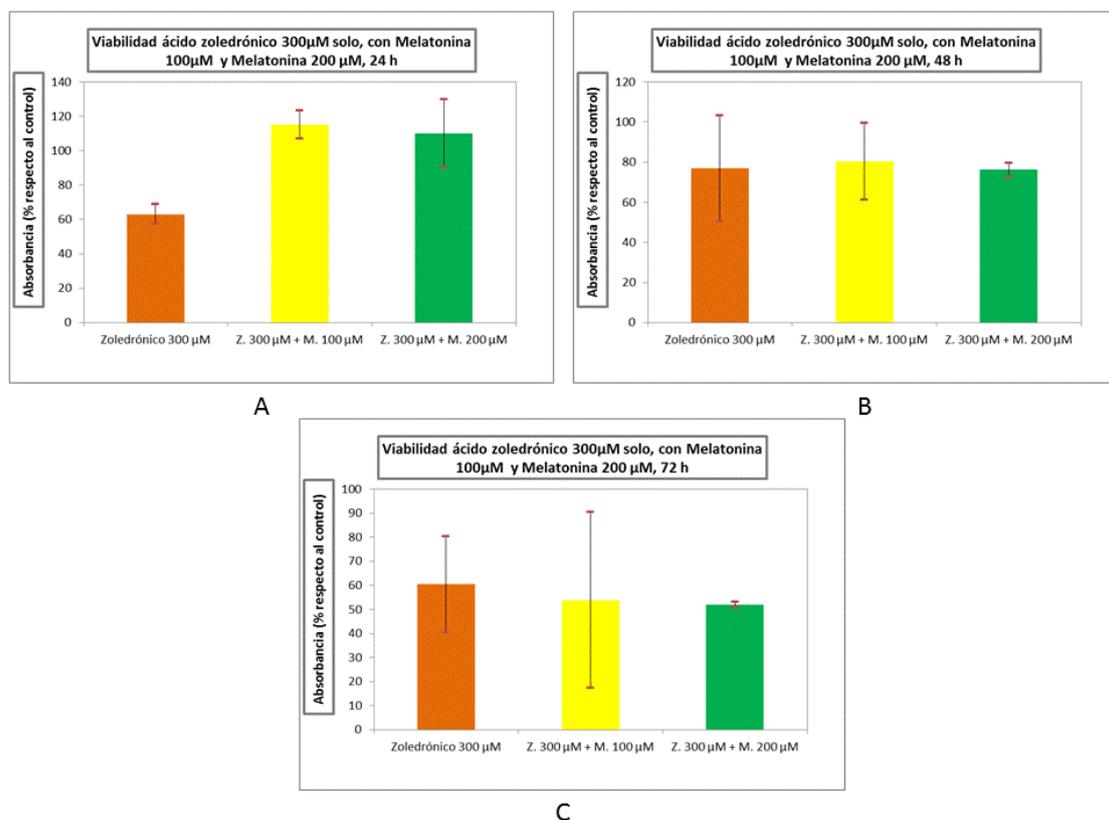


Tabla 11: Comparación de los efectos del AZ 300 µM sólo o combinado con MLT 100 µM y MLT 200 µM sobre la viabilidad celular, a las 24 (A), 48 (B) y 72 (C) horas de incubación.

Concentraciones de Ácido Zoledrónico 300 µM solo, con Melatonina 100 y 200 µM	Viabilidad celular (% respecto al control) 24h Media ± DT*	Concentraciones de Ácido Zoledrónico 300 µM solo, con Melatonina 100 y 200 µM	Viabilidad celular (% respecto al control) 48h Media ± DT*
Ácido Zoledrónico 300 µM	63,04 ± 5,91	Ácido Zoledrónico 300 µM	76,85 ± 26,52
Ácido Zoledrónico 300 µM + Melatonina 100 µM	115,14 ± 8,31	Ácido Zoledrónico 300 µM + Melatonina 100 µM	80,25 ± 19,11
Ácido Zoledrónico 300 µM + Melatonina 200 µM	110,16 ± 19,74	Ácido Zoledrónico 300 µM + Melatonina 200 µM	76,26 ± 3,46
p-valor= 0,005		p-valor= 0,962	
* DT = desviación típica		* DT = desviación típica	

A

B

Concentraciones de Ácido Zoledrónico 300 µM solo, con Melatonina 100 y 200 µM	Viabilidad celular (% respecto al control) 72h Media ± DT*
Ácido Zoledrónico 300 µM	60,37 ± 20,06
Ácido Zoledrónico 300 µM + Melatonina 100 µM	53,86 ± 36,57
Ácido Zoledrónico 300 µM + Melatonina 200 µM	52,02 ± 1,15
p-valor =0,907	
* DT = desviación típica	

C

Discusión

5. DISCUSIÓN

La ONM es un tipo de necrosis mandibular producida por fármacos antirresortivos. Es una entidad clínica que se localiza en los maxilares, fundamentalmente en mandíbula. Consiste en una forma especial de osteomielitis crónica de progresión lenta que puede o no acompañarse de dolor, exposición ósea, hueso necrótico expuesto y sin curación espontánea (Marx y cols., 2003). Algunos autores (Junquera y Gallego, 2008; Bagan y cols., 2009; Mawardi y cols., 2009) sugieren que la ONM puede darse sin exposición ósea, presentando fístula, dolor y alteraciones radiográficas.

Se ha visto que esta patología ósea no sólo es causada por BFs orales e intravenosos, sino que también se produce por otros medicamentos (Hamadeh y cols., 2015), como el denominado denosumab que es un agente antiresortivo o fármacos oncológicos como el sunitinib, sorafenib, bevacizumab o sirolimus. Como resultado, algunos autores (Patel y cols., 2012; Ruggiero y cols., 2013) han propuesto nuevos términos como "osteonecrosis mandibular inducida por medicamentos" o osteonecrosis asociada a medicamentos antirresortivos y a terapias antiangiogénicas. En 2014, la AAOMS propuso el cambio de nomenclatura a "osteonecrosis mandibular asociada a medicamentos" MRONJ (medication related osteonecrosis of the jaw). (Ruggiero y cols., 2014). Recientemente, la International Task Force on Osteonecrosis of the Jaw (Khan y cols., 2015) ha definido la MRONJ como: exposición ósea en la región maxilofacial que no cura en un periodo de 8 semanas, que ha sido identificada por un profesional sanitario, en un paciente expuesto a terapia antiresortiva sin historia previa de radioterapia en la región craneofacial.

La primera publicación en la literatura científica es del año 2003, por Marx y Miglioratti, que describieron los primeros casos (Marx y cols., 2003).

Los pacientes son tratados con BFs por diferentes patologías; entre ellas podemos enumerar las metástasis óseas por cáncer de mama o próstata, mieloma múltiple, osteoporosis o artritis reumatoide. (Kuijpers y cols., 2011) Los BFs detienen la pérdida ósea actuando sobre las células del hueso.

Inhiben la actividad de los osteoclastos provocando su apoptosis, y previenen la apoptosis de osteoblastos y osteocitos (Bellido y cols., 2011; Allen y cols., 2011). La alteración que provocan en el metabolismo del recambio óseo puede provocar en ciertas situaciones la necrosis del hueso alveolar por sobre infección, en zonas de extracciones dentales recientes o zonas de roce de alimentos o prótesis (Lee y cols., 2009).

La ONM se correlaciona frecuentemente con los procedimientos quirúrgicos orales, como extracciones dentales durante el tratamiento con BFs, (Marx y cols., 2003; Marx y cols., 2005; Ficarra y cols., 2005). La presencia de infección dental o periodontal supone un aumento en el riesgo de padecer ONM (Marx y cols., 2005). Diversos estudios (Boonyapakorn y cols., 2008; Ficarra y cols., 2005) han demostrado que la extracción dental en un diente con patología periapical o enfermedad periodontal muestra un mayor riesgo de desarrollar ONM en esa área. La cirugía dentoalveolar se considera un factor de alto riesgo en el desarrollo de ONM, tal y como se ha informado en estudios de series de casos de que hasta el 52-61% de los pacientes con ONM habían sido sometidos a una extracción dental previa (Ruggiero y cols., 2014).

Sin embargo, han sido descritos otros factores de riesgo asociados con la ONM, tales como el uso de corticosteroides, quimioterapia, radioterapia, traumatismos, o infección, y la verdadera fisiopatología del proceso aún no ha sido completamente aclarada.

La AAOMS la describe como un área de hueso expuesto en la región bucomaxilar que persiste más de 8 semanas después de su identificación, en un paciente que estuvo o está recibiendo tratamiento con BFs y en ausencia de radiación previa en la región craneofacial (Rasmusson y cols., 2014; Ruggiero y cols., 2014). El consenso del panel español de expertos (2008), consideró varios criterios diagnósticos de ONM en relación a BFs intravenosos: 1. Paciente que está o ha estado tratado con BFs IV; 2. Presencia de una o varias lesiones ulceradas en la mucosa de los procesos alveolares, con exposición de hueso maxilar o mandibular. Pueden existir casos con dolor o

fístulas. 3. El hueso expuesto presenta aspecto necrótico; 4. La lesión se presenta de forma espontánea o tras una cirugía dento-alveolar; 5. Ausencia de cicatrización durante un periodo de al menos 6 semanas (Bagan y cols., 2007; Bagan y cols., 2008).

La incidencia de ONM depende del tiempo, dosis y vía de administración, siendo mayor en pacientes tratados con BFs por vía parenteral para patologías neoplásicas, y mucho menor cuando el BF es administrado por vía oral para el tratamiento de osteoporosis fundamentalmente (Inderjeeth y cols., 2014; Polymenidi y cols., 2014; Lee y cols., 2014). Las estimaciones acumulativas de la incidencia varían de 0,8-12% para los BFs intravenosos, (Bamias y cols., 2005; Durie y cols., 2005) y entre 1/10.000 y <1/100.000 pacientes por año de tratamiento para los BFs orales (Khosla y cols., 2007).

La potencia de los BFs y la dosis acumulada en hueso, representan uno de los mayores factores de riesgo de ONM. En un análisis multivariante, realizado por Marcin Kos y cols., mostró un aumento cinco veces superior en el riesgo de desarrollar ONM, después de la administración de un BF más potente como es el Zolendronato en comparación con el pamidronato y el ibandronato. Curiosamente algunos estudios mostraron que aquellos pacientes que sólo habían recibido una dosis de Zolendronato, presentaban un incremento del riesgo relativo, para desarrollar lesiones de osteonecrosis, de 4'5 a 28 veces superior (Kos y cols., 2015; Yamazaki y cols., 2012).

Los BFs intravenosos inducen ONM con mayor frecuencia que los orales (Bagan y cols., 2009). El tratamiento con BFs intravenosos de elevada potencia (nitrogenados) como pamidronato y zoledronato aumenta el riesgo de ONM; el nivel de riesgo también depende del número de administraciones y de la duración del tratamiento (Stumpe y cols., 2009; Boonyapakorn y cols., 2008).

Sin embargo, informes recientes con otros fármacos antirresortivos con diferente mecanismo de acción como el Denosumab, anticuerpo monoclonal inhibidor de RANKL, lo que conlleva a una potente inhibición de la diferenciación y la función de los osteoclastos, mostraron que el riesgo de

osteonecrosis dependía más del grado de inhibición del recambio óseo, mediado por los osteoclastos, que del tipo de inhibidor de los mismos (Stopeck y cols., 2010).

La principal limitación de nuestro estudio consiste en la falta de evidencia científica sobre el efecto citoprotector de la MLT sobre osteoblastos humanos en presencia de AZ, aunque existen algunos estudios donde se observan los diferentes efectos *in vitro* de la MLT y del AZ por separado sobre los osteoblastos.

Los BFs se aplican terapéuticamente para tratar enfermedades del metabolismo óseo, como la osteoporosis o las metástasis óseas. Los estudios clínicos han demostrado su potencia para aumentar la densidad ósea durante un período prolongado de tiempo (Lieberman y cols., 1995; Bone y cols., 2004; Devogelaer y cols., 1996; Mortensen y cols., 1998).

En las primeras publicaciones, el pamidronato se relacionaba con un mayor número de ONM que el AZ, solo o combinado con pamidronato (Bagán y cols., 2005; Bamias y cols., 2005). Sin embargo, parece que se invierte la tendencia en los años siguientes, siendo el AZ el principal causante de ONM. Esto puede deberse a su mayor potencia y a la utilización más frecuente en los últimos años (Hoff y cols., 2008; Carmagnola y cols., 2008).

El mecanismo de acción de los BFs no está claro. Su acción antirresortiva acelera la mineralización secundaria produciendo un aumento rápido de la densidad mineral ósea (Reid y cols., 2008).

Además, no sólo actúan sobre los osteoclastos sino que también lo hacen sobre los osteoblastos, disminuyendo su apoptosis y bloqueando sus sistemas de reclutamiento de osteoclastos (Ponte Fernández y cols., 2006). Por otro lado, también inhiben la proliferación de células endoteliales (Wood y cols., 2002).

La diferenciación de células hematopoyéticas a osteoclastos, requiere la presencia de un trío de péptidos, la osteoprotegerina (OPG), el activador del

receptor de NF-kappa B ligando (RANKL) y el activador del receptor del factor nuclear-kB (RANK) (Bruzzaniti y cols., 2006). Los osteoblastos secretan RANKL (miembro de la superfamilia del factor de necrosis tumoral) (Udagawa y cols., 1990). RANKL unido a su receptor RANK (proteína de membrana presente en los osteoclastos y sus precursores) estimula la diferenciación de osteoclastos. La interacción entre RANKL y RANK puede ser inhibida competitivamente por la OPG, una proteína soluble producida por los osteoblastos (Lin y cols., 2007; Yasuda y col., 1998; Burgess y cols., 1999; Lacey y cols., 1998). Los BFs interfieren en estos procesos de remodelación ósea.

El objetivo del estudio *in vitro* de Felix Peter Koch y cols., fue demostrar el impacto de los BFs en la expresión de genes RANKL y de OPG en osteoblastos durante un periodo de 14 días. Se compararon BFs que contenían nitrógeno con BFs no nitrogenados. Los osteoblastos humanos se estimularon con zoledronato, ibandronato y clodronato. Los resultados mostraron una mejora moderada de la expresión génica de OPG, y se observó un fuerte incremento en la expresión del gen RANKL con los BFs que contenían nitrógeno a una alta concentración de 5×10^{-5} M. El clodronato, sin embargo, aumentó en menor medida la expresión de los genes RANKL y OPG. Por lo tanto se deduce que los BFs bloquean la diferenciación osteoclástica (Koch y cols., 2012).

Algunos autores, han concluido que los BFs disminuyen la proliferación de osteoblastos. Reinholz y cols., (Reinholz y cols., 2000) muestran en un estudio *in vitro*, el efecto antiproliferativo del pamidronato (BF nitrogenado) sobre los osteoblastos, siendo este efecto dependiente de la dosis.

Koch y cols., también concluyeron que los BFs disminuyen la proliferación de osteoblastos. Realizaron un estudio analizando la expresión del gen ciclina D1 que es un marcador de la proliferación celular; y la expresión del gen de colágeno tipo I que indica la maduración de la matriz osteoide, en osteoblastos humanos bajo el efecto de zoledronato, ibandronato y clodronato a concentraciones de 5×10^{-5} M, durante 14 días. Los resultados mostraron que

existe un efecto antiproliferativo de los BFs sobre los osteoblastos, ya que se redujo la producción del gen de ciclina D1. Sin embargo, parecen mejorar la producción de colágeno tipo I de la matriz extracelular, lo que significa que promueven la diferenciación osteoblastica en detrimento de su proliferación. Los BFs no nitrogenados no parecen influir en la proliferación de osteoblastos y la producción de matriz extracelular, ya que el clodronato no mostró alteraciones en la expresión de ninguno de los dos genes analizados (Koch y cols., 2010).

En contraposición a lo señalado, Simon y cols., defienden que los BFs no sólo afectan a la proliferación de osteoblastos sino que también disminuyen la expresión de genes relacionados con la maduración de la matriz osteoide. Estos autores obtuvieron como resultado de su estudio *in vitro* que una larga exposición a BFs disminuía la expresión de colágeno tipo I, II, III y V en fibroblastos gingivales humanos, en osteoblastos y en células de osteosarcoma (SAOS-2 cells), durante 28 días de tratamiento. La PCR en tiempo real indicó que el AZ inhibe la expresión de genes por debajo de 16 % en cualquier concentración usada. Por lo tanto, la reducción de la producción de la matriz extracelular de estas líneas celulares bajo la exposición de BFs, podría ser una posible indicación clínica de por qué los pacientes experimentan ONM. Sin embargo, sigue siendo incierto por qué la ONM se da principalmente en los maxilares y no en otros huesos (Simon y cols., 2010).

Además estos autores observaron que las concentraciones superiores a 1mM, tanto de ácido zoledrónico como de pamidronato, resultaron citotóxicas. En nuestro estudio se produce una mayor reducción de la viabilidad a concentraciones mayores de AZ.

Walter y cols., investigaron el efecto de diferentes BFs potentes sobre los osteoblastos, fibroblastos y células humanas endoteliales de la vena umbilical (HUVEC). Compararon ibandronato, pamidronato y zoledronato (nitrogenados) y clodronato (no nitrogenado), en relación con su potencia en la inducción de apoptosis, la viabilidad celular y la potencia de migración. Concluyeron que los BFs que contienen nitrógeno, en particular pamidronato y zoledronato, afectan

a la viabilidad celular, la migración celular y la inducción de la apoptosis de los osteoblastos, fibroblastos y células HUVEC. Estos resultados apoyan la teoría de que la ONMB es una enfermedad multifactorial, debido a que varias líneas de células de la cavidad oral, que son responsables de la integridad y la cicatrización de heridas se ven afectadas negativamente por los BFs que contienen nitrógeno (Walter y cols., 2011).

El AZ es un BFs de tercera generación con un segundo átomo de nitrógeno situado en una posición crucial para producir un grupo de sustitución de imidazol heterocíclico, responsable de su alta relación terapéutica y su alta resistencia; esto lo convierte en el fármaco más utilizado para tratar la metástasis ósea. Es un potente inhibidor de la resorción ósea, inhibe la proliferación de los osteoclastos e induce la muerte celular apoptótica de los osteoclastos (Coxon y cols., 2000; Benford y cols., 2001). Esto se debe a que el AZ inhibe la FPPS y, como consecuencia, impide la biosíntesis celular, ya que, en ausencia de FPPS, no se produce FPP y pirofosfato de geranil, dando como resultado la inhibición de la prenilación de proteína de unión a GTP en osteoclastos. Los niveles bajos de proteínas preniladas de unión a GTP inhiben la actividad de los osteoclastos y por lo tanto inducen la apoptosis (Green y cols., 2001).

Pero la acción del AZ no se produce exclusivamente sobre los osteoclastos, ya que estudios recientes sugieren que tanto los osteocitos como los osteoblastos podrían ser células diana para los BFs en el hueso (Plotkin y cols., 1999; Aguirre y cols., 2006; Bonewald y cols., 2007). A diferencia de su acción sobre los osteoclastos (por la cual los BFs inducen su apoptosis), en los osteocitos estos fármacos inhiben la apoptosis (Plotkin y cols., 2006), incluso en osteocitos cuya apoptosis ha sido inducida químicamente por otras sustancias tales como glucocorticoides (Plotkin y cols., 1999). Parece que el AZ a bajas concentraciones podría estimular los osteoblastos, mientras que se han observado efectos adversos a altas concentraciones, como reducciones en la viabilidad celular y disminución de la capacidad de migración (Koch y cols., 2010).

En el presente estudio, a medida que las concentraciones de AZ aumentaron, la viabilidad de los osteoblastos humanos se redujo a todos los tiempos de incubación (24, 48 ó 72 horas), con concentraciones de 100 y 300 μM , que demostraron ser las más citotóxicas. Walter y cols., (Walter y cols., 2011) usaron concentraciones similares a las utilizadas en nuestro estudio (5, 50, 100, 200 y 500 μM) en la línea celular de osteoblastos HOB-c (PromoCell, Heidelberg, Alemania), encontrando que en relación con la viabilidad celular, el AZ tuvo mayor impacto que los otros BFs ensayados en su estudio (clodronato, ibandronato y pamidronato). El AZ redujo la viabilidad de los osteoblastos a medida que aumentaba su concentración. Se observó que el AZ tenía el mismo efecto sobre la capacidad de migración de los osteoblastos, aunque las diferencias observadas entre AZ, pamidronato e ibandronato no fueron estadísticamente significativas.

Pozzi y cols., concluyeron que altas dosis de AZ interfieren con osteoblastos y osteoclastos, resultando en una posible inhibición de ambos tipos de células. Altas dosis de fármaco tienen efectos sobre la función y morfología del hueso trabecular y cortical. La exposición a AZ resulta en un aumento de la rigidez ósea asociada con un aumento de la fragilidad que provoca propiedades biomecánicas alteradas. Estas observaciones sugerirán el uso de dosis más bajas de fármaco o durante un periodo más corto, y / o su combinación con agentes anabólicos novedosos para contrarrestar sus efectos catabólicos puramente con el objetivo de restaurar la homeostasis ósea en el tratamiento de la enfermedad ósea de cáncer en el futuro (Pozzi y cols., 2009).

Los resultados de nuestro estudio coinciden con lo anteriormente mencionado, ya que la viabilidad de los osteoblastos humanos expuestos a AZ se redujo, teniendo un efecto citotóxico.

La MLT ha sido descrita como un agente citoprotector que actúa a través de la membrana celular de manera dependiente e independiente de su receptor. (Luchetti y cols., 2014). Las funciones principales que desempeñan sus propiedades antioxidantes son la estimulación de la actividad enzimática

antioxidante, la fosforilación oxidativa mitocondrial, la liberación de electrones, la expresión génica de las enzimas de oxidación-reducción y la eliminación de los radicales libres (Pieri y cols., 1994; Cuesta y cols., 2011; Sánchez y cols., 2015). En este contexto, los tres mecanismos principales por los que la MLT podría mostrar efectos favorables sobre el hueso en relación con su acción sobre los osteoblastos son: la promoción de la diferenciación y actividad de los osteoblastos; el aumento de la expresión de la OPG por los osteoblastos, evitando así la diferenciación de los osteoclastos; y la depuración de los radicales libres generados por la actividad osteoclástica responsable de la resorción ósea (Sánchez-Barceló y cols., 2010).

Se ha demostrado que los osteoblastos humanos expresan el receptor de MLT y que sus niveles de expresión disminuyen gradualmente con la edad de los sujetos. La MLT estimula la proliferación y la actividad de la ALP de osteoblastos humanos, de manera dependiente de la dosis. Además, promueve la expresión de genes de colágeno de tipo I, OPN, BSP, y OCN, estimulando la formación de la matriz mineralizada *in vitro* (Satomura y cols., 2007).

En el estudio realizado por Satomura y cols., (Satomura y cols., 2007) la administración intraperitoneal de MLT en ratones, aumentó el volumen de hueso cortical recién formado en los fémures. Los mecanismos de este efecto estimulante sobre la formación ósea pueden ser directos (acciones directas sobre osteoblastos) o indirectos a través de la secreción de la hormona de crecimiento (Forsling y cols., 1999) y el cortisol (Kostoglou-Athanassiou y cols., 1998; Cagnacci y cols., 1995), o la regulación a la baja del receptor activador de la formación de osteoclastos (RANKL) mediada por MLT (Koyama y cols., 2002).

Otro estudio que demuestra el efecto de la MLT en la diferenciación de osteoblastos es el realizado por Sánchez-Hidalgo y cols., en el año 2007. Examinaron el efecto de la MLT sobre la acumulación de triglicéridos intracelulares, un indicador de la diferenciación adipogénica en la línea celular ROS17/2.8 osteoblástica de rata. La MLT en concentraciones nanomolares inhibió la acumulación de triglicéridos inducida por el ácido oleico. Para

identificar el mecanismo por el que la MLT redujo la acumulación de triglicéridos, las células se incubaron con los dos antagonistas del receptor de la MLT, luzindol y S20928, o forskolina, un estimulador de adenilato ciclasa y la producción de AMPc. Estos compuestos previnieron el efecto inhibitorio de la MLT en la acumulación de triglicéridos, lo que indicó que la MLT actuaba a través de mecanismos conocidos mediados por su receptor. Estos autores demostraron el efecto positivo de la MLT en la promoción de la diferenciación osteoblástica en células ROS17/2.8, e inhibición de la diferenciación adipocítica inducida por ácidos grasos. Las observaciones de estos autores pueden servir para relacionar las disminuciones de la producción de MLT asociadas a la edad, con el cambio en el hueso medular hacia una línea adipocítica en el desarrollo de las células, y el desarrollo de la osteoporosis durante el envejecimiento (Sanchez-Hidalgo y cols., 2007).

Zaminy y cols., también apoyan la teoría de que la MLT contribuye a la diferenciación osteogénica. Concluyeron que las células madre de hueso tienen un mayor potencial osteogénico que las células madre de tejido adiposo y que la MLT promueve la diferenciación osteogénica en las células madre de hueso, mientras que tiene un efecto negativo sobre la diferenciación osteogénica en las células madre de tejido adiposo (Zaminy y cols., 2008b).

Los resultados de un estudio llevado a cabo por Zhang y cols, proponen a la MLT como un medicamento contra la osteoporosis, ya que comprobaron que promovía la diferenciación osteogénica de células madre mesenquimales humanas, e inhibía su conversión adipogénica, de manera dependiente de la dosis. La MLT suprime la expresión de PPARC (receptor de peroxisomas) y promueve la expresión del factor de transcripción Runx2, en las primeras etapas de la adipogénesis y la osteogénesis de las células madre mesenquimales humanas. Además, la MLT regula a la baja marcadores de la diferenciación adipocítica como son leptina, lipoproteína lipasa, adiponectina y proteína adipocítica 2; mientras que regula al alza los marcadores de la diferenciación osteogénica como la ALP, la OPN y la OCN (Zhang y cols., 2010).

Se ha demostrado que la administración de MLT en combinación con factor de crecimiento de fibroblastos FGF-2 estimula la formación de hueso alrededor de implantes de titanio, promoviendo la osteointegración. Debido a sus diferentes efectos en diferentes etapas de las células, podrían ser sinérgicos en la promoción de la formación de hueso. Se cree que el FGF desarrollaría un papel de proliferación de células osteoprogenitoras mientras que la MLT es más importante en la diferenciación de osteoblastos (Takechi y cols., 2008).

A menudo, los primeros eventos bioquímicos asociados con el proceso de diferenciación celular desencadenan una cascada de señalización que culmina con cambios en la regulación de la transcripción que conducen a la diferenciación celular. Los resultados del estudio realizado por Sethi y cols., demuestran que la MLT no tuvo un efecto sobre la actividad de la ALP cuando se añade al cultivo de células madre mesenquimales humanas (hAMSCs) y luego se retira, lo que sugiere que la MLT no tiene un efecto dominante sobre los procesos de diferenciación. Teniendo en cuenta que la mineralización ósea, que ocurre durante el proceso de diferenciación ósea, se realiza entre los 14 y 21 días del cultivo de hAMSCs, los autores concluyeron que la MLT debía ser administrada de forma continua durante los 21 días para tener un efecto positivo sobre la formación de hueso y obtener un aumento en la diferenciación de estas células hacia el linaje de osteoblastos (Sethi y cols., 2010).

Se plantea la hipótesis de que la localización de la proteína quinasa regulada extracelular (ERK1/2) determina si una célula procederá por un camino de diferenciación (es decir, localización citosólica) o un camino de proliferación (es decir, la localización nuclear). Los resultados del mismo estudio muestran que ERK1/2 se localiza principalmente en el citosol cuando la ALP es más alta, inducida por la actividad de la MLT. Curiosamente, una rápida reexposición de MLT (10 min) en hAMSCs ya prediferenciadas, promueve la translocación de ERK1/2 desde el citosol al núcleo. Con base en los resultados, se sugiere que la MLT, actuando a través de receptores MT2, aumenta la diferenciación de hAMSCs a través de un aumento de la actividad de la ALP (no los niveles de ARNm) y por medio de un aumento en la expresión del ARNm de RUNX-2,

BMP-2, y OCN (Sethi y cols., 2010).

La activación de receptores de la MLT, MT1 y MT2, en respuesta a la unión a MLT, conduce a la activación de las proteínas Gi. Esta activación de las proteínas Gi produce una inhibición de la adenilato ciclasa, lo que en última instancia activa las cascadas de señalización de la proteína quinasa activada por mitógeno (MEK) y la proteína quinasa regulada extracelular (ERK1/2). La desensibilización de estas vías conduce a la falta de una disminución de 3', 5' adenosí monofosfato cíclico (AMPc) y la proteína quinasa A, pudiendo inhibir las cascadas de señalización MEK y ERK1/2 teniendo un impacto sobre la diferenciación celular. La localización intracelular de las proteínas Gi y los receptores MT1 y MT2 podría ser crítica para la diferenciación o proliferación celular. La MLT podría actuar como un inductor de la proliferación de osteoblastos, mientras que el estradiol parece inducir la diferenciación. En el estudio realizado por Letellier y cols., en las células expuestas a 17- β - estradiol se encontró que las proteínas Gi y el receptor MT2 estaban localizados en el citoplasma, mientras que cuando las células se exponían a MLT, no se observó esta localización. En los osteoblastos, las proteínas Gi α inhiben la producción de AMPc mediante la supresión de la estimulación de la adenilato ciclasa y esta inhibición es bajo el control de estradiol. En respuesta al 17- β -estradiol en un grupo específico de pacientes con escoliosis, el nivel de AMPc fue significativamente disminuido en comparación con el nivel observado en presencia de concentraciones crecientes de MLT sola. Concluyen que existe una fuerte evidencia de la diafonía entre 17- β -estradiol y la señalización de la MLT en los osteoblastos humanos en pacientes con escoliosis adolescente ideopática. Estos resultados indican un nuevo papel para 17- β -estradiol y la MLT en esta patología, controlar el acoplamiento de la proteína G α y el receptor MT2 en osteoblastos humanos. Se encontró que el aumento de los niveles de AMPc inducidos por la MLT pueden ser corregidos por el tratamiento de las células con 17- β -estradiol. Por lo tanto, los estrógenos o agonistas de los receptores de estrógeno se convierten en compuestos importantes a considerar en el funcionamiento celular de osteoblastos en estos pacientes (Letellier y

cols., 2008).

La proliferación de osteoblastos estimulada por MLT, puede estar mediada por su acción a través del receptor MT2 en osteoblastos. Man y cols., realizaron un estudio sobre la acción de la MLT en la proliferación de osteoblastos en pacientes con escoliosis ideopática. Encontraron que ambos receptores MT1 y MT2 se expresan en osteoblastos del grupo control. Sin embargo, en los pacientes con escoliosis ideopática, la expresión del receptor MT1 es normal, pero la de MT2 está ausente en algunos pacientes. Vieron que la estimulación de los osteoblastos por MLT fue mínima en estos pacientes sin MT2 en comparación al grupo control (Man y cols., 2011).

Se ha visto que la MLT promueve la diferenciación y la mineralización en osteoblastos MC3T3-E1 de ratón, a través de las vías de señalización Wnt/BMP / ERK. Wnts son glicoproteínas ricas en cisteína, que activan vías de señalización mediadas por el receptor para controlar la expresión génica, la determinación del destino celular, la proliferación y la migración. La MLT activa Wnt 5 α/β , β -catenina y la fosforilación de la quinasa c-Jun N-terminal (JNK), y la quinasa regulada por señal extracelular (ERK) de una manera dependiente del tiempo, mientras que atenúa la fosforilación de glucógeno quinasa 3 β sintasa (GSK-3 β) en las células MC3T3-E1 (Park y cols., 2011).

Son y cols., confirman el efecto de la MLT en la diferenciación osteoblástica de las células MC3T3-E1 (preosteoblásticas) en condiciones de hipoxia. Encontraron que la MLT regula positivamente la actividad de ALP, OPN, OCN, y procolágeno tipo I péptido C de una manera dependiente del tiempo y de la concentración. Por otra parte, la MLT estimula la fosforilación de MAPK p38 y Prkd1 en estas células MC3T3-E1, lo que indica que en condiciones de hipoxia, la melatonina promueve la diferenciación osteoblástica de las células MC3T3-E1 a través de estas vías de señalización (Son y cols., 2014).

Xiao-Chuan Xiong y cols., concluyen de sus estudios que MLT en un rango de concentraciones de 1-100 μ M, promueve significativamente la proliferación de osteoblastos a través de la activación de la vía de señalización c-Raf / MEK

/ ERK / p90rsk / MSK1. También concluyen que la MLT no tiene casi ninguna citotoxicidad para los osteoblastos. Sin embargo, vale la pena señalar que la MLT puede estimular o suprimir la proliferación de osteoblastos dependiendo de las concentraciones y duración del tratamiento (Xiao-Chuan Xiong y cols., 2015).

Otro estudio que evalúa la cualidad proliferativa de la MLT es el de Clafshenkel y cols., que concluyen que los scaffold de aluminato de calcio enriquecidos con MLT tienen propiedades tanto osteoconductoras como osteoinductoras, y en comparación con los scaffold de aluminato de calcio sólo, mejoran la adherencia, la viabilidad y la proliferación de osteoblastos humanos (Clafshenkel y cols., 2012).

Sin embargo, aunque muchos estudios muestran que la MLT produce proliferación celular, otros indican que ésta podría inhibirla. Es el caso del estudio realizado por Suzuki y cols., en 2008. Sintetizaron derivados de bromomelatonina para hacer sus ensayos sobre modelos de peces de oro que cuentan con una estructura calcificada que contiene osteoclastos, osteoblastos, y matriz ósea, similares a los encontrados en el hueso de mamífero. Todos los derivados de bromomelatonina, así como la MLT, tenían una acción inhibitoria sobre los osteoclastos. En referencia a los osteoblastos, todos los derivados de bromomelatonina tenían una acción estimulante sobre los osteoblastos, pero la melatonina inhibía la actividad osteoblástica (Suzuki y cols., 2008a). En un estudio posterior realizado por el mismo grupo de investigación, concluyeron que el derivado de la bromomelatonina 1-bencil-2,4,6-tribromomelatonin, tenía una actividad más potente que la MLT en la inhibición de los osteoclastos en el modelo de pez oro, y tenía una actividad estimuladora de los osteoblastos, proponiéndose como tratamiento en enfermedades óseas (Suzuki y cols., 2008b).

Otro estudio que apoya esta teoría es el realizado por Liu y cols., que confirma que la MLT a concentraciones de 1 nM- 100 μ M (especialmente de 100 nM y 1 μ M) promueve la proliferación de osteoblastos, mientras que melatonina a 1 mM inhibió la proliferación de osteoblastos, probablemente por

la regulación a la baja de la ciclina D1 y CDK4, en relación con la fase G1, y de ciclina B1 y CDK1, en relación con la fase G2/M. sin embargo, la viabilidad celular se mantuvo en un 99% incluso después de la exposición a MLT 1 mM durante 72 horas, lo que significa que la MLT no produce la muerte celular pero si puede inhibir la proliferación de osteoblastos (Liu y cols., 2011).

Otras investigaciones ponen de manifiesto el papel citoprotector de la MLT. She y cols., realizaron un estudio en el cual sometieron la línea celular MG63 al efecto citotóxico del peróxido de hidrógeno. Comprobaron que el tratamiento previo con MLT 1mM paliaba los efectos tóxicos del daño oxidativo causado por el peróxido de hidrógeno. El peróxido de hidrógeno reduce significativamente la viabilidad celular, el aumento de la liberación de lactato deshidrogenasa, el aumento de los niveles de especies reactivas de oxígeno y malondialdehído, reduce la concentración de adenosina-5'-trifosfato, interrumpe el potencial de membrana mitocondrial y disminuye el número de copias de ADN mitocondrial en las células MG63. Los efectos protectores de la MLT pueden atribuirse a su capacidad para mantener la función mitocondrial en células. Este estudio sugiere que la MLT es un agente farmacológico potencial para la prevención de la pérdida ósea inducida por especies reactivas de oxígeno en enfermedades tales como osteoporosis (She y cols., 2014).

El efecto citoprotector y antiinflamatorio de la MLT ha sido estudiado durante años, en diferentes tipos de células y ante diferentes agentes tóxicos. Lim y cols., realizaron un estudio sobre condrocitos humanos y sobre un modelo de conejo con osteoartritis inducida. Obtuvieron como resultados que la MLT es un potente inhibidor de la iNOS (óxido nitroso sintetasa) y la COX-2 inducidas por peróxido de hidrógeno en condrocitos humanos. La MLT podría inhibir la producción de óxido nitroso y prostaglandina E2 a través de la regulación de los niveles de transcripción de moléculas previas a iNOS y COX-2. Además, la MLT indujo una disminución significativa de TNF- α , IL-1b, y la liberación de IL-8, y CXCR-4, TXNIP, STS, y IFI-6-16, que son importantes en la patogénesis de los desórdenes temporomandibulares, y la reducción de estos mediadores se ha asociado con la mejora de la ruptura del cartílago. SIRT1 (SIRT1), el

homólogo de mamífero de SIR2, fue originalmente identificado como una histona deacetilasa dependiente de NAD, cuya actividad está estrechamente asociada con la duración de la vida bajo la restricción calórica. SIRT1 juega un papel fundamental en diversos procesos celulares, incluyendo la diferenciación, el silenciamiento de genes, el metabolismo y la resistencia al estrés. Estos resultados sugieren que las propiedades anti-inflamatorias de la MLT implican la acción dinámica de la vía de SIRT1. También se comprobó la participación de otras vías citoprotectoras de la MLT como son JNK, ERK, p38, y PI3K / Akt . Los resultados de este estudio sugieren que la MLT induce citoprotección y efecto anti-inflamatorio contra la citotoxicidad inducida por la expresión de iNOS y COX-2 por peróxido de hidrógeno a través de la regulación a la baja de las vías de señalización PI3K / Akt, MAPK y NF- κ B, mediante la inhibición de SIRT1. El uso de inhibidores de la SIRT1 confirma la participación de SIRT1 en el efecto anti-inflamatorio y citoprotector de la MLT en el modelo conejo con osteoartritis. Por lo tanto, la MLT puede ser un posible tratamiento de la osteoartritis y el estrés oxidativo en desórdenes temporomandibulares de la ATM (Lim y cols., 2012).

Se ha demostrado el efecto citoprotector de la MLT sobre células madre mesenquimales de médula ósea. Estas células son efectivas para el trasplante en tejido cardíaco isquémico, sin embargo, durante la técnica, las células sufren muerte por apoptosis debido a las condiciones de hipoxia y privación de suero, que conlleva a la escasa supervivencia de las células madre mesenquimales de médula ósea trasplantadas. Los autores concluyeron que la MLT ejercía su efecto citoprotector a través de varias vías, siendo efectiva en la reducción de la generación de especies reactivas de oxígeno intracelulares, en el aumento en la relación de Bax / Bcl-2, en la reducción en la pérdida de membrana mitocondrial y en la inactivación de caspasa-3. En cuanto a la reducción de especies reactivas de oxígeno intracelulares se conoce que la MLT es un potente antioxidante. Además, algunos estudios han demostrado que la MLT puede mejorar la actividad de las enzimas antioxidantes tales como glutatión peroxidasa, glutatión reductasa, glutatión s-transferasa, la superóxido dismutasa, la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa y la

catalasa, y estas enzimas podrían metabolizar y desintoxicar el estrés oxidativo, que atribuye la capacidad antioxidante de la MLT. La MLT también produce un cambio en el balance de la proteína Bax/Bcl-2, y produce un aumento de la proteína Bcl-2 anti-apoptótica y una disminución de la proteína Bax pro-apoptótica. La MLT provoca la inhibición de la caspasa-3 (pro-apoptótica) de manera dependiente de la dosis. En este estudio, también analizaron la vía por la cual se daba el efecto citoprotector de la MLT. Observaron que la MLT inhibe la fosforilación de p38, encargada de la detención del crecimiento celular y la apoptosis; y aumenta la fosforilación de ERK, vía de mitogénesis y diferenciación celular. Lo que sugiere que la MLT inhibe la muerte celular inducida por hipoxia y privación de suero en células madre mesenquimales de médula ósea a través de la vía de señalización MAPK. Los hallazgos implican que la MLT podría mejorar la supervivencia de las células madre mesenquimales de médula ósea injertadas en condiciones de hipoxia y privación de suero (Wang y cols., 2015).

Otro grupo de investigadores obtuvieron resultados similares al analizar el efecto citoprotector y antiinflamatorio de la MLT sobre células de la astrogliia. Los ácidos grasos saturados inducen neurotoxicidad y estrés oxidativo en las lesiones del sistema nervioso central y las patologías neurodegenerativas. El estudio muestra que en cultivo primario de células astrogliales, la MLT atenúa significativamente la citotoxicidad inducida por el ácido palmítico de una forma dosis y tiempo dependiente. La MLT suprime la generación de especies de oxígeno reactivo inducidas por ácido palmítico y previene la apoptosis, inhibe el aumento de la relación de Bax / Bcl-2 e inactiva la caspasa-3 en células astrogliales. Con el uso de luzindol (antagonista no selectivo del receptor de la MLT), se observó una atenuación en el efecto de la MLT sobre la supervivencia celular y la fosforilación de Stat3, lo que indica que la MLT ejerce su propiedad de protección en las células astrogliales, al menos en parte, a través de la activación de los receptores de membrana y por la vía de señalización Stat3. Además, la MLT tuvo un efecto inhibitorio sobre la expresión de genes de citoquinas pro-inflamatorias. Los resultados sugieren que la MLT puede ser un agente citoprotector efectivo contra la citotoxicidad causada por el ácido

palmítico a través de la modulación de la supervivencia celular y la respuesta inflamatoria en las células astrogiales (Zhen Wang y cols., 2012).

Kadnikov y cols., estudiaron el efecto citoprotector de afobazole, un fármaco ansiolítico y su metabolito M-11. Este fármaco y su metabolito tienen afinidad por los receptores MT1, MT3, los receptores σ_1 y la monoamino oxidasa A. El receptor MT3 es un sitio de regulación al que se une la quinona reductasa 2 (NQO2) potenciadora de estrés oxidativo. Realizaron estudios en células de médula ósea de ratones sometidas a estrés oxidativo mediante medianona (vitamina K3) y dicumarol (anticoagulante antagonista de la vitamina K). Obtuvieron como resultado que el afobazole y el M-11 redujeron el daño en el ADN nuclear, siendo afobazole más potente que su metabolito. Ambos compuestos ejercieron su efecto citoprotector tanto en presencia de menadiona sola, como asociada a dicumarol que potencia los efectos perjudiciales de menadiona (Kadnikov y cols., 2015). Por lo tanto, los efectos neuroprotectores de afobazole pueden ser debidos a la inhibición reversible de NQO2. Sin embargo, debemos tener en cuenta que el receptor MT3 aún no ha sido aislado en humanos.

Un estudio que también analizó el efecto citoprotector de la MLT frente al AZ fue el llevado a cabo por Lozano y cols., sobre células madre mesenquimales humanas del ligamento periodontal y (PDLSCs) y de la médula ósea (BMMSCs). Ambos tipos celulares fueron expuestos a AZ, a MLT, y a ambos compuestos simultáneamente durante 72h. La proliferación celular se midió mediante un ensayo colorimétrico, mientras que su fenotipo mesenquimal se analizó por citometría de flujo. Obtuvieron que BMMSCs presentan mayor resistencia que PDLSCs a AZ, así como una diferencia en la respuesta en el tratamiento de AZ + MLT. En PDLSCs, altas dosis de melatonina (300mM) aumentaron significativamente su proliferación, mientras que concentraciones más bajas (100mM) fueron suficientes para aumentar la proliferación de la línea BMMSC. Por otra parte, como respuesta al tratamiento con AZ los marcadores celulares de células madre mesenquimales en PDLSCs mostraron una regulación a la baja de CD90 / CD105 y una regulación positiva de CD73, que

fue más pronunciada en respuesta a la melatonina (500mM). Por otra parte, el AZ sólo o con MLT (300mM), indujeron una disminución de la expresión de CD90 / CD105 / CD73 en la línea BMMSCs, mientras que mayores concentraciones de MLT (500mM) recuperaban los niveles de CD73. Estos resultados sugieren que la MLT tiene un efecto citoprotector sobre PDLSCs y BMMSCs tratadas con AZ. Por lo tanto, podría ser utilizado para la prevención ONMB. El hecho de que las PDLSCs son más sensibles al AZ que BMMSCs, podría explicar la relación entre enfermedad periodontal y la aparición de ONMB. Es importante destacar que la MLT aumentó la expresión de CD73 (regulador de la diferenciación osteogénica de células madre mesenquimales) sobre PDLSCs y BMMSCs tratadas con AZ, siendo, por tanto, un compuesto que podría potenciar el proceso de diferenciación de los osteoblastos (Rodríguez-Lozano y cols., 2015).

En el presente estudio *in vitro*, después de 24 horas de incubación, una baja concentración de MLT (1 μ M) obtuvo un incremento en la viabilidad celular similar al obtenido con altas concentraciones (100 y 200 μ M), a las 48 y 72 horas de incubación, pero se observó una mayor viabilidad a concentraciones de MLT de 100 y 200 μ M. Autores como Satomura y cols., (Satomura y cols., 2007) ensayaron las mismas concentraciones que las de este estudio (1, 10, 50, 100 y 200 μ M) en cultivos primarios de osteoblastos humanos obtenidos de 30 pacientes, encontrando que el tratamiento con MLT promovió la proliferación de osteoblastos humanos de una manera dependiente de la dosis a concentraciones de entre 50 y 200 μ M. Liu y cols., (Liu y cols., 2011) probaron el efecto de MLT sobre la viabilidad celular de la línea celular de osteoblastos fetales humanos, encontrando una mayor proliferación celular a altas concentraciones de MLT a las 24, 48 y 72 horas de incubación.

Por último, analizando los posibles efectos citoprotectores de la MLT en células HOBc tratadas con AZ, el presente estudio encontró que concentraciones de 100 y 200 μ M de MLT parecían tener cierto efecto citoprotector sobre osteoblastos humanos tratados con bajas concentraciones de AZ (1 y 5 μ M) a los tiempos de incubación (24, 48 ó 72 horas); sin embargo,

a concentraciones de AZ $\geq 10 \mu\text{M}$ el efecto citoprotector sólo se produjo después de una incubación corta (24 horas), pero no cuando el tiempo de contacto de los osteoblastos con estas concentraciones de AZ ($\geq 10 \mu\text{M}$) fue mayor.

Finalmente, la aplicación clínica de la MLT como tratamiento preventivo de la ONMB puede ser un mecanismo de protección en pacientes en tratamiento con BFs, como lo son las nuevas terapias, oxígeno hiperbárico, plasma rico en factores de crecimiento, terapia fotodinámica, láser de baja potencia y ozono.

Tras la lesión ulcerosa lo importante es el control de la infección secundaria a través de la mejora de la higiene bucal y la antibioticoterapia. Se utiliza el digluconato de clorhexidina como antiséptico a las concentraciones de 0.12% o 0.20% (Montebugnoli y cols., 2007).

Algunos autores, consideran que la suspensión del BF no evita ni mejora las lesiones, debido a que el fármaco queda almacenado en el hueso y se puede seguir liberando. Además, en caso de paciente oncológico, la supresión de dicho tratamiento antirresortivo debe ser prescrita por el oncólogo, debido al riesgo de reaparición de dolor óseo y progresión de metástasis o lesiones osteolíticas (Gallego y cols., 2009).

Algunos autores, afirman que la terapia con oxígeno hiperbárico puede emplearse como tratamiento coadyuvante a la cirugía y la antibioticoterapia. Refieren que esta terapia mejora el dolor y la calidad de vida de los pacientes (Freiberger y cols., 2012). Sin embargo, otros autores desaprueban esta teoría (Heras-Ricón y cols., 2007; Ruggiero y cols., 2006; Migliorati y cols., 2005).

Otra terapia propuesta ha sido la terapia con ozono debido a que el desbridamiento quirúrgico de la lesión no es suficiente para evitar la progresión. Entre las propiedades del ozono podemos mencionar su alto poder antimicrobiano contra bacterias tanto aerobias como anaerobias, especialmente sobre *Staphylococcus Aureus*, y contra virus. Además estimula el sistema circulatorio aumentando la hemoglobina y los hematíes, produciendo

así un aumento de oxígeno en el tejido. También modula la respuesta inmune y mejora la fagocitosis. Estimula la angiogénesis y la formación de fibroblastos que mejora la cicatrización. Todo ello se ve reflejado en una disminución del dolor. Consigue un secuestro óseo de la lesión necrótica y aumenta la vascularización y el tejido de granulación alrededor de la misma. El plan de tratamiento planteado es como terapia coadyuvante pre o postquirúrgica, llevándose a cabo la aplicación local de ozono-oxígeno y combinando la antibioticoterapia. Se ha observado una remisión de los síntomas del 90% (Agrillo y cols., 2012).

La terapia fotodinámica se utiliza para gestionar los diferentes tumores sólidos y muchas enfermedades no malignas, implica un proceso de 2 etapas: 1) la absorción selectiva y la retención de un fotosensibilizador en tejidos neoplásicos o anormales; y 2) la activación del fotosensibilizador con una longitud de onda específica de luz no térmica, por lo general de un láser. La luz activa al fotosensibilizador, que interactúa con el oxígeno molecular para producir un estado excitado. Esto resulta en la producción de radicales libres de oxígeno o la formación de oxígeno singlete intracelular, que provoca la muerte celular. La actividad citotóxica directa y daño microvascular contribuyen a la destrucción de células anormales / tumorales, que se manifiesta como la inflamación y la formación de tejido necrótico. La producción de moléculas bactericidas tiene un efecto antimicrobiano, por lo que está indicada en el tratamiento de la ONMB con signos de infección o para su prevención, aplicándola directamente sobre el hueso expuesto (Minamisako y cols., 2016).

Vescovi y cols., sostienen la teoría de combinar la terapia de láser de baja potencia junto con antibióticos, tras una exodoncia dental en pacientes tratados con bifosfonatos (Vescovi y cols., 2013). Se ha visto que la terapia láser de baja potencia produce analgesia, disminuye el edema, es biomoduladora celular y acelera la curación. Esta terapia ayuda a la proliferación de fibroblastos y condroblastos, aumenta la síntesis de colágeno, promueve la osteogénesis y la diferenciación de células óseas y mecanismos de reparación ósea. Además, aumenta el flujo sanguíneo y la proliferación de

células endoteliales. Todo ello se ve reflejado en la curación de la mucosa tras la exposición del hueso necrótico (Minamisako y cols., 2016).

Por último, otra alternativa de tratamiento en la ONMB consiste en la administración de un concentrado de plaquetas autólogo. Las plaquetas son portadoras de factores de crecimiento que actúan sobre la cicatrización, proliferación y diferenciación celular. Contiene fibrina y fibronectina que son osteoconductoras y también contiene leucocitos para la acción antimicrobiana. Esta técnica puede aplicarse para reducir el riesgo de ONMB tras realizar una exodoncia. Las ventajas que aporta son la activación de múltiples factores de crecimiento; aumenta la vascularización del tejido mediante la promoción de la angiogénesis; actúa como un agente hemostático biocompatible; y es reabsorbido por el organismo. En un estudio *in vitro* realizado por Anitua y cols., (Anitua y cols., 2016) se muestra que el AZ tiene un efecto citotóxico sobre fibroblastos gingivales humanos y sobre osteoblastos alveolares humanos, pero que la adición de plasma rico en factores de crecimiento suprime los efectos negativos del BF.

En la revisión realizada por López-Jornet y cols., encontraron que de las 697 extracciones realizadas, sólo el 0,99% de los casos desarrolló osteonecrosis, lo que sugiere que las concentraciones de plaquetas estimulan la cicatrización y regeneración de los tejidos. Reduce los tiempos de regeneración y cicatrización a la mitad, y mejora el postoperatorio. El concentrado rico en plaquetas se obtiene del mismo paciente por lo que no sufrirá rechazo, alergia o reacción a cuerpo extraño. Esta terapia debe considerarse como adyuvante al tratamiento de desbridamiento quirúrgico (Lopez-Jornet y cols., 2016).

La principal limitación de este estudio es la imposibilidad de comparar los resultados con otras investigaciones, ya que no se ha publicado evidencia científica previa sobre el efecto citoprotector de la MLT en osteoblastos humanos tratados con AZ. Sin embargo, Rodríguez-Lozano y cols., (Rodríguez-Lozano y cols., 2015) estudiaron el posible efecto citoprotector de la MLT PDLSCs y en BMMSCs, tratadas con AZ, con similares resultados a los de nuestro estudio. En su estudio *in vitro*, la dosis de MLT de 100-300 μ M, fue

suficiente para disminuir el número de BMMSC apoptóticas en cultivo o aumentar su proliferación hasta las concentraciones de 30 μM AZ, mientras que para PDLSCs, dosis ≥ 300 μM de MLT sólo tenían efecto protector para el AZ a la concentración de 5 μM .

Como conclusión, los presentes resultados sugieren que la MLT tiene un efecto citoprotector sobre osteoblastos humanos tratados con AZ y podría representar una prometedora medida preventiva alternativa contra la ONMB en pacientes de alto riesgo.

Conclusiones

6. CONCLUSIONES

1. El ácido zoledrónico tuvo un efecto citotóxico sobre la línea celular de osteoblastos humanos HOB-c, cuya viabilidad celular disminuía a medida que aumentábamos la concentración de ácido zoledrónico. Las concentraciones con mayor citotoxicidad fueron 300 μM a las 24 horas de incubación, 100 μM a las 48 horas y 50 μM a las 72 horas de incubación.

2. Respecto a la acción de la melatonina sobre la viabilidad celular en la línea de osteoblastos humanos HOB-c, aunque a las 24 horas de incubación la mayor viabilidad celular fue obtenida con una dosis baja de melatonina (1 μM), esta viabilidad celular fue similar a la obtenida con el resto de concentraciones de melatonina. Sin embargo, a las 48 y 72 horas de incubación la mayor viabilidad celular se observó con altas concentraciones de melatonina (100 y 200 μM).

3. Al analizar el posible efecto citoprotector de la melatonina (a concentraciones de 100 y 200 μM) sobre la viabilidad celular de la línea de osteoblastos humanos HOB-c tratados con ácido zoledrónico (a concentraciones de 1, 5, 10, 50, 100 y 300 μM), observamos que dichas concentraciones de melatonina tienen cierto efecto citoprotector sobre osteoblastos tratados con bajas concentraciones de ácido zoledrónico (1 y 5 μM), a todos los tiempos de incubación estudiados (24, 48 y 72 horas). Sin embargo, a concentraciones de ácido zoledrónico ≥ 10 μM el posible efecto citoprotector de la melatonina queda reducido a las 24 horas de incubación, no observándose a 48 y 72 horas.

Bibliografía

7. BIBLIOGRAFÍA

Agis H, Blei J, Watzek G, Gruber R. Is zoledronate toxic to human periodontal fibroblasts?. *J Dent Res* 2010; 89:40-5.

Agrillo A, Filiaci F, Ramieri V, Riccardi E, Quarato D, Rinna C, et al. Bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw (BRONJ): 5 year experience in the treatment of 131 cases with ozone therapy. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 2012; 16:1741-7.

Aguirre JI, Plotkin LI, Stewart SA, Weinstein RS, Partiff AM, Manolagas S, et al. Osteocyte apoptosis induced by weightlessness in mice and precedes osteoclasts recruitment and bone loss. *J Bone Miner Res* 2006; 21:605-15.

Allen MR. The effects of bisphosphonates on jaw bone remodeling, tissue properties, and extraction healing. *Odontology* 2011; 99:8-17.

Alonso-Vale MI, Andreotti S, Borges-Silva CN, Mukai PY, Cipolla-Neto J, Lima FB. Intermittent and rhythmic exposure to melatonin in primary cultured adipocytes enhances the insulin and dexamethasone effects on leptin expression. *J Pineal Res* 2006; 41:28-34.

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

American Dental Association Council on Scientific Affairs. Dental management of patients receiving oral bisphosphonate therapy: expert panel recommendations. *J Am Dent Assoc* 2006; 137:1144–50.

Antolín A, Rodríguez C, Sainz RM, Mayo JC, Uria H, Kotler M, et al. Neurohormone melatonin prevents cell damage: Effect on gene expression for antioxidative enzymes. *FASEB J* 1996; 10:882–90.

Aubin JE y Liu F. The osteoblasts lineage. En: Bilezikian JP, Raisz LG, Rodan

GA, eds. Principles of Bone Biology. San Diego, California: Academic Press; 1996; p. 51-67.

Aubin JE y Triffitt JT. Mesenchymal Stem Cells and Osteoblast Differentiation. En: Bilezikian JP, Raisz LG, Rodan GA, eds. Principles of Bone Biology. San Diego, California: Academic Press; 2002; p. 59–74.

Axelrod J. The pineal gland: a neurochemical transducer. *Sci* 1974; 184:1341-8.

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

Bagan J, Blade J, Cozar JM, Constela M, García Sanz R, Gómez Veiga F, et al. Recommendations for the prevention, diagnosis, and treatment of osteonecrosis of the jaw (ONJ) in cancer patients treated with bisphosphonates. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 2007; 12:E336-40.

Bagan JV, Diz Dios P, Gallego L, Infante Cossio P, Jiménez Y, Junquera LM, et al. Recomendaciones para la prevención de la osteonecrosis de los maxilares (ONM) en pacientes tratados con bisfosfonatos intravenosos. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 2008; 13:1617.

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

Bamias A, Kastritis E, Bamia C, Mouloupoulos LA, Melakopoulos I, Bozas G, et al. Osteonecrosis of the jaw in cancer after treatment with bisphosphonates: incidence and risk factors. *J Clin Oncol* 2005; 23:8580-7.

Barjavel MJ, Mandouh Z, Raghbate N, Bakouche O. Differential expression of the melatonin receptor in human monocytes. *J Immunol* 1998; 160:1191–7.

Barlow-Balden L, Reiter RJ, Abe M, Pablos MI, Menendez-Paláez A, Chen LD, et al. Melatonin stimulates brain glutathione peroxidase activity. *Neurochem Int* 1995; 26:497–502.

Bassett CA, Donath A, Macagno F, Preisig R, Fleisch H, Francis MD, et al. Diphosphonates in the treatment of myositis ossificans. *Lancet* 1969; 2:845.

Batmanabane M, y Ramesh KP. Effect of exogenous melatonin on the onset of puberty in female albino rats. *Anat Rec* 1996; 245:519–24.

Becker-André M, André E, DeLamarter JF. Identification of nuclear receptor mRNAs by RT-PCR amplification of conserved zinc-finger motif sequences. *Biochem Biophys Res Commun* 1993; 16:1371–9.

Bedogni A, Blandamura S, Lokmic Z, Palumbo C, Ragazzo M, Ferrari F, et al. Bisphosphonate-associated jawbone osteonecrosis: a correlation between imaging techniques and histopathology. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2008; 105:358-64.

Bejarano I, Redondo PC, Espino J, Rosado JA, Paredes SD, Barriga C, et al. Melatonin induces mitochondrial-mediated apoptosis in human myeloid HL-60 cells. *J Pineal Res* 2009; 46:392-400.

Bellido T y Plotkin LI. Novel actions of bisphosphonates in bone: preservation of osteoblast and osteocyte viability. *Bone* 2011;49:50-5.

Berenson J, Hillner B, Kyle R. American Society of Clinical Oncology clinical practice guidelines: the role of bisphosphonates in multiple myeloma. *J. Clin. Oncol* 2002; 20:3719–36.

Berenson J, Hirschberg R. Safety and convenience of a 15-minute infusion of zoledronic acid. *Oncologist* 2009; 9:319–29.

Biasotto M, Chiandussi S, Dore F, Rinaldi A, Rizzardi C, Cavalli F, et al. Clinical aspects and management of bisphosphonate-associated osteonecrosis of the jaws. *Acta Odontol Scand* 2006; 64:348–54.

Bilezikian JP. Osteonecrosis of the jaw-do bisphosphonates pose a risk?. *N Engl J Med* 2006; 355:2278-81.

Black DM, Cummings SR, Karpf DB, Cauley JA, Thompson DE, Nevitt MC, et al. Randomised trial of effect of alendronate on risk of fracture in women with existing vertebral fractures. *Lancet* 1996; 348:1535–41.

Black DM, Delmas PD, Eastell R, Reid IR, Boonen S, Cauley JA, et al. Once-yearly zoledronic acid for treatment of postmenopausal osteoporosis. *N Engl J Med* 2007; 356:1809–22.

Blask DE. Melatonin in oncology. In: Yu HS y Reiter RJ. *Melatonin. Biosynthesis, Physiological Effects and Clinical Applications*. eds, Boca Raton 1993; FL, pp. 290–306.

Bone HG, Hosking D, Devogelaer JP, Tucci JR, Emkey RD, Tonino RP, et al. Ten years' experience with alendronate for osteoporosis in postmenopausal women. *N Engl J Med* 2004; 350:1189-99.

Bonewald LF. Osteocytes as dynamic multifunctional cells. *Ann N Y Acad Sci* 2007; 1116:281-90.

Boonen S, Laan RF, Barton IP, Watts NB. Effect of osteoporosis treatments on risk of non-vertebral fractures: review and metaanalysis of intention-to-treat studies. *Osteoporos Int* 2005; 16:1291–8.

Boonyapakorn T, Schirmer I, Reichart PA, Sturm I, Massenkeil G. Bisphosphonate-induced osteonecrosis of the jaws: prospective study of 80 patients with multiple myeloma and other malignancies. *Oral Oncol* 2008;

44:857–69.

Bordt SL, McKeon RM, Li PK, Witt-Enderby PA, Melan MA. N1E-115 mouse neuroblastoma cells express MT1 melatonin receptors and produce neurites in response to melatonin. *Biochim Biophys Acta* 2001; 1499:257–64.

Bornman MS, Oosthuizen JM, Barnard HC, Schulenberg GW, Boomker D, Reif S. Melatonin and sperm motility. *Andrologia* 1989; 21:483-7.

Bruder SP, Jaiswal N, Haynesworth SE. Growth kinetics, self-renewal, and the osteogenic potential of purified human mesenchymal stem cells during extensive subcultivation and following cryopreservation. *J Cell Biochem* 1997; 64:278–94.

Bruzzaniti A y Baron R. Molecular regulation of osteoclast activity. *Rev Endocr Metab Disord* 2006; 7:123–39.

Brydon L, Petit L, de Coppet P, Barrett P, Morgan PJ, Strosberg AD, et al. Polymorphism and signaling of melatonin receptors. *Reprod Nutr Dev* 1999b; 39:315–24.

Brydon L, Roka F, Petit L, de Coppet P, Tissot M, Barrett P, et al. Dual signaling of human Mel1a melatonin receptors via G(i2), G(i3), and G(q/11) proteins. *Mol Endocrinol* 1999a; 13:2025–38.

Brzezinski A, Seibel MM, Lynch HJ, Deng MH, Wurtman RJ. Melatonin in human preovulatory follicular fluid. *J Clin Endocrinol Metab* 1987; 64:865-7.

Burgess TL, Qian Y, Kaufman S, Ring BD, Van G, Capparelli C, et al. The ligand for osteoprotegerin (OPGL) directly activates mature osteoclasts. *J Cell Biol* 1999; 145:527–38.

Cagnacci A, Soldani R, Yen SS. Melatonin enhances cortisol levels in aged but

not young women. *Eur J Endocrinol* 1995; 133:691–5.

Calvo JR, Rafii-El-Idrissi M, Pozo D, Guerrero JM. Immunomodulatory role of melatonin: Specific binding sites in human and rodent lymphoid cells. *J Pineal Res* 1995; 18:119–26.

Cardinali DP, Ladizesky MG, Boggio V, Cutrera RA, Mautalen C. Melatonin effects on bone: experimental facts and clinical perspectives. *J Pineal Res* 2003; 34:81-7.

Carlberg C, Hooft Van Huijsduijnen R, Staple JK, DeLamarter JF, Becker-André M. RZR_s, a new family of retinoid-related orphan receptors that function as both monomers and homodimers. *Mol Endocrinol* 1994; 8:757–70.

Carmagnola D, Celestino S, Abati S. Dental and periodontal history of oncologic patients on parenteral bisphosphonates with or without osteonecrosis of the jaws: a pilot study. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2008; 106:10-5.

Carmichael J, DeGraff WG, Gazdar AF, Minna JD, Mitchell JB. Evaluation of a tetrazolium-based semiautomated colorimetric assay: assessment of chemosensitivity testing. *Cancer Res* 1987a; 47:936-42.

Carmichael J, DeGraff WG, Gazdar AF, Minna JD, Mitchell JB. Evaluation of a tetrazolium-based semiautomated colorimetric assay: assessment of radiosensitivity testing. *Cancer Res* 1987b; 47:943-6.

Carocci A, Catalano A, Sinicropi MS. Melatonergic drugs in development. *Clin Pharmacol* 2014; 6:127-37.

Caroleo MC, Frasca D, Nistico G, Doria G. Melatonin as immunomodulator in immunodeficient mice. *Immunophar* 1992; 23:81–9.

Carr DB, Reppert SM, Bullen B, Skrinar G, Beitins I, Arnold M, et al. Plasma melatonin increases during exercise in women. *J Clin Endocrinol Metab* 1981; 53:224–5.

Cassone VM. Effects of melatonin on vertebrate circadian system. *Trends Neurosci* 1990; 13:457–64.

Cassone VM, Chesworth MJ, Armstrong SM. Entrainment of rat circadian rhythms by daily injection of melatonin depends upon the hypothalamic suprachiasmatic nuclei. *Physiol Behav* 1986; 36:1111–21.

Chan AS, Lai FP, Lo RK, Voyno-Yasenetskaya TA, Stanbridge EJ, Wong YH. Melatonin mt1 and MT2 receptors stimulate c-Jun N-terminal kinase via pertussis toxin-sensitive and -insensitive G proteins. *Cell Signal* 2002; 14:249–57.

Chen H, Shoumura S, Emura S, Utsumi M, Yamahira T, Isono H. Effects of pinealectomy on the ultrastructure of the golden hamster parathyroid gland. *Histol Histopathol* 1990; 5:477-84.

Chen T, Berenson J, Vescio R, Swift R, Gilchick A, Goodin S, et al. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of zoledronic acid in cancer patients with bone metastases. *J Clin Pharmacol* 2002; 42:1228-36.

Chestnut C, Majumdar S, Gardner J, Shields A, Newitt DC, Erickson E, et al. Assessment of bone quality, quantity and turnover with multiple methodologies at multiple skeletal sites. *Adv Exp Med Biol* 2001; 496:95–7.

Chik CL y Ho AK. Multiple receptor regulation of cyclic nucleotides in rat pinealocytes. *Prog Biophys Mol Biol*. 1989; 53,197-203.

Christiansen C, Phipps R, Burgio D. Comparison of risedronate and alendronate pharmacokinetics at clinical doses. *Osteoporos Int* 2003; 14:S38.

Civitelli R, Beyer EC, Warlow PM, Robertson AJ, Geist ST, Steinberg TH. Connexin43 mediates direct intercellular communication in human osteoblastic cells networks. *J Clin Invest* 1993; 91:1888-96.

Clafshenkel WP, Rutkowski JL, Palchesko RN, Romeo JD, McGowan KA, Gawalt ES, et al. A novel calcium aluminate-melatonin scaffold enhances bone regeneration within a calvarial defect. *J Pineal Res* 2012; 53:206-18.

Clemens JW, Jarzynka MJ, Witt-Enderby PA. Down-regulation of mt1 melatonin receptors in rat ovary following estrogen exposure. *Life Sci* 2001; 69:27–35.

Conti A, Conconi S, Hertens E, Skwarlo-Sonta K, Markowska M, Maestroni JM. Evidence for melatonin synthesis in mouse and human bone marrow cells. *J Pineal Res* 2000; 28:193-202.

Conti A, Maestroni GJ. Endogenous melatonin in serum, pineal gland and bone marrow of inbred and outbred mice. *Thymus and Pineal Gland in Neuroimmunoendocrinology* 1998; Swieradow Zdrog 22 B.

Conti A, Maestroni GJ. Role of the pineal gland and melatonin in the development of autoimmune diabetes in non-obese diabetic (NOD) mice. *J Pineal Res* 1996; 20:164–72.

Conti A, Maestron GJ. The clinical neuroimmunotherapeutic role of melatonin in oncology. *J Pineal Res* 1995; 19:103–10.

Corso A, Varettoni M, Zappasodi P, Klersy C, Mangiacavalli S, Pica G, et al. A different schedule of zoledronic acid can reduce the risk of the osteonecrosis of the jaw in patients with multiple myeloma. *Leukemia* 2007; 21:1545-8.

Cos S, y Sánchez-Barceló EJ. Melatonin inhibition of MCF-7 human breast-cancer cells growth: influence of cell proliferation rate. *Cancer Lett* 1995;

93:207–12.

Coxon FP, Helfrich MH, Van't Hof R, Sebti S, Ralston SH, Hamilton A, et al. Protein geranylgeranylation is required for osteoclast formation, function, and survival: inhibition by bisphosphonates and GGTI-298. *J Bone Miner Res* 2000; 15:1467–76.

Cremers S, Sparidans R, Hartigh J, Hamdy N, Vermeij P, Papapoulos S. A pharmacokinetic and pharmacodynamic model for intravenous bisphosphonate (pamidronate) in osteoporosis. *Eur J Clin Pharmacol* 2002; 57:883–90.

Cremers SC, Pillai G, Papapoulos SE. Pharmacokinetics / pharmacodynamics of bisphosphonates: use for optimisation of intermittent therapy for osteoporosis. *Clin Pharmacokinet* 2005; 44:551–70.

Csaba G, y Baráth P. The effect of pinealectomy on the parafollicular cells of the rat thyroid gland. *Acta Anat (Basel)* 1974; 88:137-46.

Csaba G, y Bókay J. The effect of melatonin and corpus pineale extract on serum electrolytes in the rat. *Acta Biol Acad Sci Hung* 1977; 28:143-4.

Daniels WMU, Reiter RJ, Melchiorri D, Sewerynek E, Pablos MI, Ortiz GG. Melatonin counteracts lipid peroxidation induced by carbon tetrachloride but not restore glucose-6-phosphatase activity. *J Pineal Res* 1995; 19:1–6.

Davies JE, Hosseini MM. Histodynamics of endosseous wound healing. En: Davies JE ed. *Bone Engineering*. Toronto: Davies JE ed.; 2000. p. 1-14.

Del Gobbo V; Libri V, Villani N, Calìò R, Nisticò G. Pinealectomy inhibits interleukin-2 production and natural killer activity in mice. *Int J Immunopharmacol* 1989; 11:567–77.

Demontiero O, y Duque G. Once-yearly zoledronic acid in hip fracture

prevention. *Clin Interv Aging* 2009; 4:153–64.

Devogelaer JP, Broll H, Correa-Rotter R, Cumming DC, De Deuxchaisnes CN, Geusens P, et al. Oral alendronate induces progressive increases in bone mass of the spine, hip, and total body over 3 years in postmenopausal women with osteoporosis. *Bone* 1996; 18:141-50.

Dicuonzo G, Vincenzi B, Santini D, Avvisati G, Rocci L, Battistoni F, et al. Fever after zoledronic acid administration is due to increase in TNF-alpha and IL-6. *J Interferon Cytokine Res* 2003; 23:649–54.

Diel IJ, Fogelman I, Al-Nawas B, Hoffmeister B, Migliorati C, Gligorov J, et al. Pathophysiology, risk factors and management of bisphosphonate-associated osteonecrosis of the jaw: Is there a diverse relationship of amino- and non-aminobisphosphonates?. *Crit Rev Oncol Hematol* 2007; 64:198-207.

Dillon DC, Easley SE, Asch BB, Cheney RT, Brydon L, Jockers R, et al. Differential expression of high-affinity melatonin receptors (MT1) in normal and malignant human breast tissue. *Am J Clin Pathol* 2002; 118:451-8.

Dimopoulos MA, Kastritis E, Anagnostopoulos A, Melakopoulos I, Gika D, Moulopoulos LA, et al. Osteonecrosis of the jaw in patients with multiple myeloma treated with bisphosphonates: evidence of increased risk after treatment with zoledronic acid. *Haematologica* 2006; 91:968-71.

Dollins AB, Zhdanova IV, Wurtman RJ, Lynch HJ, and Deng MH. Effect of inducing nocturnal serum melatonin concentrations in daytime on sleep, mood, body temperature, and performance. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91,1824–8.

Doolen S, Krause DN, Dubocovich ML, Duckles SP. Melatonin mediates two distinct responses in vascular smooth muscle. *Eur J Pharmacol* 1998; 345:67–9.

Dooley M,y Balfour JA. Ibandronate. *Drugs*1999; 57:101-8.

Dori D, Casale G, Solerte SB, Fioravanti M, Migliorati G, Cuzzoni G, et al. Chrono-neuroendocrinological aspects of physiological aging and senile dementia. *Chronobiol* 1994; 21:121–6.

Drake MT, Clarke BL, Khosla S. Bisphosphonates: Mechanism of Action and Role in Clinical Practice. *Mayo Clin Proc* 2008; 83:1032-45.

Dubocovich ML, Masana MI, Iacob S, Sauri DM. Melatonin receptor antagonists that differentiate between the human Mel1a and Mel1b recombinant subtypes are used to assess the pharmacological profile of the rabbit retina ML1 presynaptic heteroreceptor. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 1997; 355:365–75.

Dubocovich ML, Yun K, Al-Ghoul WM, Benloucif S, Masana MI. Selective MT2 melatonin receptor antagonists block melatonin-mediated phase advances of circadian rhythms. *FASEB J* 1998; 12:1211–20.

Dubocovich ML. Melatonin receptors: are there multiple subtypes? *Trends Pharmacol Sci* 1995; 16:50–6.

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

Ebetino FH, y Dansereau SM. Bisphosphonate antiresorptive structure–activity relationships. In: Bijvoet OLM, Fleisch HA, Canfield RE, Russell RGG. eds. *Bisphosphonate on bones*. Elsevier, Amsterdam. 1995; pp 139–53.

Ebetino FH, Emmerling P, Barnett B, et al. Differentiation of hydroxyapatite affinity of bisphosphonate analogs for mechanism of action studies. *J Bone Miner Res* 2004; 19:S157

Ebetino FH, Francis MD, Rogers MJ, et al. Mechanisms of action of etidronate and other bisphosphonates. *Rev Contemp Pharmacother* 1998; 9:233–43.

Ecarot-Charrier B, Bouchard F, Delloye C. Bone sialoprotein II synthesized by cultured osteoblasts contains tyrosine sulfate. *J Biol Chem* 1989; 264,20049–53.

Escobar EA, López J, Marques MS, Chimenos E. Osteonecrosis de los maxilares asociada a Bifosfonatos: revisión sistemática. *Av Odontoestomatol* 2007; 23:91101.

Esquifino A I, Villanua MA, Agrasal CJ. Effect of neonatal melatonin administration on sexual development in the rat. *J Steroid Biochem* 1987; 27:1089–93.

Estilo CL, Van Poznak CH, Wiliamz T, Bohle GC, Lwin PT, Zhou Q, et al. Osteonecrosis of the Maxilla and Mandible in Patients with Advanced Cancer Treated with Bisphosphonate Therapy. *Oncologist* 2008; 13:911–20.

Fantasia JE. Bisphosphonates what the dentist needs to know: practical considerations. *J Oral Maxillofac Surg* 2009; 67:53-60.

Farahmand BY, Michaelsson K, Ahlbom A, Ljunghall S, Baron JA. Survival after hip fracture. *Osteoporos Int* 2005; 16:1583–90.

Fernández-Tresguerres Hernández-Gil I, Alobera Gracia M.A, 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 buccal* v.11 n.1 Madrid ene.-feb. 2006

Ficarra F, Beninati F, Rubio I, Vannucchi A, Longo G, Tonelli P, et al. Osteonecrosis of the jaws in periodontal patients with a history of bisphosphonates treatment. *J Clin Periodontol* 2005; 32:1123–8.

Fleisch H, Russell RGG, Francis MD. Diphosphonates inhibit hydroxyapatite dissolution in vitro and bone resorption in tissue culture and in vivo. *Sci* 1969; 165:1262–4.

Fleisch H. Bisphosphonates: Mechanisms of Action. *Endocr Rev* 1998; 19:80–100.

Flores ME, Norgård M, Heinegård D, Reinholt FP, Andersson, G. RGD-directed attachment of isolated rat osteoclasts to osteopontin, bone sialoprotein, and fibronectin. *Exp Cell Res* 1992; 201:526–30.

Forsling ML, Wheeler MJ, Williams AJ. The effect of melatonin administration on pituitary hormone secretion in man. *Clin Endocrinol* 1999; 51:637–42.

Francis MD, Russell RGG, Fleisch H. Diphosphonates inhibit formation of calcium phosphate crystals in vitro and pathological calcification in vivo. *Science* 1969; 165:1264–6.

Fraser JH, Helfrich MH, Wallace HM, Ralston SH. Hydrogen peroxide, but not superoxide, stimulates bone resorption in mouse calvariae. *Bone* 1996; 19:223–6.

Freiberger JJ, Padilla-Burgos R, McGraw T, Suliman HB, Kraft KH, Stolp BW, et al. What is the role of hyperbaric oxygen in the management of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw: a randomized controlled trial of hyperbaric oxygen as an adjunct to surgery and antibiotics. *J Oral Maxillofac Surg* 2012; 70:1573–83.

Fujieda H, Hamadanizadeh SA, Wankiewicz E, Pang SF, Brown GM. Expression of mt1 melatonin receptor in rat retina: evidence for multiple cell targets for melatonin. *Neurosci* 1999; 93:793–9.

Fujita T, Meguro T, Fukuyama R, Nakamuta H, Koida M. New signaling

pathway for parathyroid hormone and cyclic AMP action on extracellular-regulated kinase and cell proliferation in bone cells. Checkpoint of modulation by cyclic AMP. *J Biol Chem* 2002; 277:22191–200.

Gallego L, y Junquera L. Consequence of therapy discontinuation in bisphosphonate-associated osteonecrosis of the jaws. *Br J Oral Maxillofac Surg* 2009; 47:67-8.

García E, Muñoz MJ, Honorato J. Bisfosfonatos: química y farmacocinética. En: *Bisfosfonatos en las enfermedades del metabolismo óseo y mineral. Monografía de la Fundación Hispana de Osteoporosis y Enfermedades Metabólicas Óseas*. Madrid. FHOEMO .2002. p.717.

García-Maurino S, Gonzalez-Haba MG, Calvo JR, Rafii-EI-Idrissi M, Sánchez-Margalet V, Goberna R, et al. Melatonin enhances IL-2, IL-6 and IFN-g production by human circulating CD4+cells. *J Immunol* 1997; 159:574–81.

García-Maurino S, Gonzalez-Haba MG, Calvo JR, Goberna R, Guerrero JM. Involvement of nuclear binding sites in the regulation of IL-2 and IL-6 production by human blood mononuclear cells. *J Neuroimmunol* 1998; 92:76–84.

Gem WA, and Nervina JM. Melatonin in vertebrates: arguments for local functions and hormonal effect. In: *Pineal and Retinal Relationships*. O'Brien, P.J. and Klein, D.C., eds. Academic Press, Orlando, Florida, 1986; pp. 119-132.

Gertz BJ, Holland SD, Kline WF, Matuszewski BK, Porras AG. Clinical pharmacology of alendronate sodium. *Osteoporos Int* 1993; 3:13-6.

Girotti L, Lago M, Ianovsky O, Carbajales J, Elizari MV, Brusco LI, et al. Low urinary 6-sulphatoxymelatonin levels in patients with coronary artery disease. *J Pineal Res* 2000; 29:138–42.

Gnant M. Zoledronic acid in the treatment of early-stage breast cancer: is there

a final verdict? *Curr Oncol Rep* 2012; 14:35–43.

Godson C y Reppert SM. The Mel1a melatonin receptor is coupled to parallel signal transduction pathways. *Endocrinol* 1997; 138:397–404.

Goh S, Yang K, Koh J, Wong MK, Chua SY, Chua DT, et al. Subtrochanteric insufficiency fractures in patients on alendronate therapy. *J Bone Joint Surg Br* 2007; 89:349–53.

Green JR, y Rogers MJ. Pharmacologic profile of zoledronic acid: a highly potent inhibitor of bone resorption. *Drug Dev Res* 2002; 55:210–24.

Guyatt G, Cranney A, Griffith L, Walter S, Krolicki N, Favus M, et al. Summary of meta-analysis of therapies for postmenopausal osteoporosis and the relationship between bone density and fractures. *Endocrinol Metab Clin North Am* 2002; 31:659–79.

Hakanson DO, y Bergstrom WH. Phototherapy-induced hypocalcemia in newborn rats: prevention by melatonin. *Sci* 1981; 214:807-9.

Hakanson DO, Penny R, Bergstrom WH. Calcemic responses to photic and pharmacologic manipulation of serum melatonin. *Pediatr Res* 1987; 22:414-6.

Halasy-Nagy JM, Rodan GA, Reszka AA. Inhibition of bone resorption by alendronate and risedronate does not require osteoclast apoptosis. *Bone* 2001; 29:553–9.

Haldar C, Häussler D, Gupta D. Effect of the pineal gland on circadian rhythmicity of colony forming units for granulocytes and macrophages (CFU-GM) from rat bone marrow cell cultures. *J Pineal Res* 1992; 12:79-83.

Ham AW. Some histophysiological problems peculiar to calcified tissue. *J Bone Joint Surg Am* 1952; 24:701-28.

Hamadeh IS, Ngwa BA, Gong Y. Drug induced osteonecrosis of the jaw. *Cancer Treat Rev* 2015; 41:455-64.

Hardeland R, Reiter RJ, Poeggeler B, Tan DX. The significance of the metabolism of the neurohormone melatonin: Antioxidant protection and formation of bioactive substances. *Neurosci Biobehav Rev* 1993; 17:347–57.

Harris ST, Watts NB, Genant HK, McKeever CD, Hangartner T, Keller M, et al. Effects of risedronate treatment on vertebral and nonvertebral fractures in women with postmenopausal osteoporosis: a randomized controlled trial. Vertebral Efficacy with Risedronate Therapy (VERT) Study Group. *JAMA* 1999; 282:1344–52.

Hazlerigg DG, Thompson M, Hastings MH, Morgan PJ. Regulation of mitogen-activated protein kinase in the pars tuberalis of the ovine pituitary: interactions between melatonin, insulin-like growth factor-1, and forskolin. *Endocrinol* 1996; 137:210–8.

Hedlund L, Lischko MM, Rollag MD, Niswender GD. Melatonin: daily cycle in plasma and cerebrospinal fluid of calves. *Sci* 1977; 195:686-7.

Henneman ZJ, Nancollas GH, Ebetino FH, Russell RG, Phipps RJ. Bisphosphonate bone affinity as assessed by inhibition of carbonated apatite dissolution in vitro. *J Biomed Mater Res A* 2008; 85:993-1000.

Heras Rincón I, Zubillaga Rodríguez I, Castrillo Tambay M, Montalvo Moreno JJ. Osteonecrosis of the jaws and bisphosphonates. Report of fifteen cases. Therapeutic recommendations. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 2007; 12:267-71.

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

Hill BT, y Blask D. Effects of the pineal hormone melatonin on the proliferation and morphological characteristics of human breast cancer cell (MCF7) in culture. *Cancer Res* 1988; 48:6121–6.

Hillner B, Ingle J, Berenson J, Janjan NA, Albain KS, Lipton A, et al. American Society of Clinical Oncology guideline on the role of bisphosphonates in breast cancer. *J Clin Oncol* 2000; 18:1378–91.

Hoff AO, Toth BB, Altundag K, Johnson MM, Warneke CL, Hu M, et al. Frequency and risk factors associated with osteonecrosis of the jaw in cancer patients treated with intravenous bisphosphonates. *J Bone Miner Res* 2008; 23:826–36

Iguchi H, Kato KI, Ibayashi H. Age-dependent reduction in serum melatonin concentrations in healthy human subjects. *J Clin Endocrinol Metab* 1982; 55:27–9.

Inderjeeth CA, Glendenning P, Ratnagobal S, Inderjeeth DC, Ondhia C. Long-term efficacy, safety, and patient acceptability of ibandronate in the treatment of postmenopausal osteoporosis. *Int J Womens Health* 2014; 7:7-17.

Itoh MT, Ishizuka B, Kudo Y, Fusama S, Amemiya A, Sumi Y. Detection of melatonin and serotonin serotonin N-acetyltransferase and hydroxyindole-O-methyltransferase in rat ovary. *Mol Cell Endocrinol* 1997; 136:7–13.

Jadu F, Lee L, Pharoah M, Reece D, Wang L. A retrospective study assessing the incidence, risk factors and comorbidities of pamidronate-related necrosis of the jaws in multiple myeloma patients. *Ann Oncol* 2007; 18:2015-9.

Jaiswal N, Haynesworth SE, Caplan AI, Bruder SP. Osteogenic differentiation of purified, culture-expanded human mesenchymal stem cells in vitro. *J Cell Biochem* 1997; 64:295–312.

Jarzinka MJ, Passey DK, Johnson DA, Konduru NV, Fitz NF, Radio NM, et al. Microtubules modulate melatonin receptors involved in phase-shifting circadian activity rhythms: in vitro and in vivo evidence. *J Pineal Res* 2009; 46:161-71.

John Camm A. Review of the cardiovascular safety of zoledronic acid and other bisphosphonates for the treatment of osteoporosis. *Clin Ther* 2010; 32:426–36.

Junquera L, Gallego L. Nonexposed bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws: another clinical variant? *J Oral Maxillofac Surg.* 2008; 66:1516-7.

Juknat AA, Mendez MDELV, Quaglino A, Fameli CI, Mena M, Kotler ML. Melatonin prevents hydrogen peroxide- induced Bax expression in cultured rat astrocytes. *J Pineal Res* 2005; 38:84–92.

Kadnikov IA, Voronin MV, Seredenin SB. Cytoprotective Effect of Afobazole and Its Main Metabolite M-11. *Bull Exp Biol Med* 2015; 159:44-7.

Kappers JA. The development, topographical relations and innervation of the epiphysis cerebri in the albino rat. *Z Zellforsch Mikrosk Anat* 1960; 52:163-215.

Kennaway DJ, y Rowe SA. Melatonin binding sites and their role in seasonal reproduction. *J Reprod Fertil* 1995; 49,423–35.

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

Khan AA, Sándor GK, Dore E, Morrison AD, Alsaqli M, Amin F, et al. Canadian Consensus Practice Guidelines for Bisphosphonate Associated Osteonecrosis of the Jaw. *J Rheumatol* 2008; 35:1391-7.

Khosla S, Burr D, Cauley J, Dempster DW, Ebeling PR, Felsenberg D, et al. American Society for Bone and Mineral Research. Bisphosphonate-associated osteonecrosis of the jaw: report of a task force of the American Society for Bone

e and Mineral Research. *J Bone Miner Res* 2007; 22:1479-91.

Kim TW, Jeong JH, Hong SC. The impact of sleep and circadian disturbance on hormones and metabolism. *Int J Endocrinol* 2015; 59:1729.

Kim RH, Shapiro HS, Li JJ, Wranan JL, y Sodek J. Characterization of the human bone sialoprotein (BSP) gene and its promoter sequence. *Matrix Biol* 1994; 14:31–40.

Kiss J, Bánhegyi D, Csaba G. Endocrine regulation of blood calcium level. II. Relationship between the pineal body and the parathyroid glands. *Acta Med Acad Sci Hung* 1969; 26:363-70.

Kivelä A, Kauppila A, Leppäluoto J, Vakkuri O. Serum and amniotic fluid melatonin during human labor. *J Clin Endocrinol Metab* 1989; 69:1065-9.

Klein DC. Photoneural regulation of the mammalian pineal gland. in *Photoperiodism, Melatonin and the Pineal Gland*. David Evered (Organizer) and Sarah Clark. Pitman, London. 1985; pp. 38-56

Klein DC, Auerbach D, Namboodiri MAA, Wheler GHT. Anatomy and Biochemistry. In: Reiter RJ, ed. *The Pineal Gland*, Vol. 1, CRC Press, Boca Raton, FL. 1981; pp. 199-227.

Koch FP, Merkel C, Ziebart T, Smeets R, Walter C, Al-Nawas B. Influence of bisphosphonates on the osteoblast RANKL and OPG gene expression in vitro. *Clin Oral Investig* 2012; 16:79-86.

Koch FP, Yekta SS, Merkel C, Ziebart T, Smeets R. The impact of bisphosphonates on the osteoblast proliferation and Collagen gene expression in vitro. *Head Face Med* 2010; 6:12.

Konturek PC, Konturek SJ, Burnat G, Brzozowski T, Brzozowska I, Reiter RJ. Dynamic physiological and molecular changes in gastric ulcer healing achieved

by melatonin and its precursor L-tryptophan in rats. *J Pineal Res* 2008; 45:180-90.

Kos M. Incidence and risk predictors for osteonecrosis of the jaw in cancer patients treated with intravenous bisphosphonates. *Arch Med Sci* 2015; 11:319-24.

Kostoglou-Athanassiou I, Treacher DF, Wheeler MJ, Forsling ML. Melatonin administration and pituitary hormone secretion. *Clin Endocrinol* 1998; 48:31–7.

Kotian P, Bloor A, Sreenivasan S. Study of Adverse Effect Profile of Parenteral Zoledronic Acid in Female Patients with Osteoporosis. *J Clin Diagn Res* 2016; 10:OC04–OC06.

Kotler M, Rodriguez C, Sainz RM, Antolin I, Menendez-Palaez A. Melatonin increases mRNA for antioxidant enzymes in brain cortex. *J Pineal Res* 1998; 24:83–9.

Koyama H, Nakade O, Takada Y, Kaku T, Lau KH. Melatonin at pharmacologic doses increases bone mass by suppressing resorption through down-regulation of the RANKL-mediated osteoclast formation and activation. *J Bone Miner Res* 2002; 17:1219-29.

Krane SM. Genetic control of bone remodeling insights from a rare disease. *N Engl J Med* 2002; 347:210–12.

Krause DN, Barrios VE, Duckles SP. Melatonin receptors mediate potentiation of contractile responses to adrenergic nerve stimulation in rat caudal artery. *Eur J Pharmacol* 1995; 276: 207–13.

Kuijpers SC, de Jong E, Hamdy NA, van Merkesteyn JP. Initial results of the treatment of diffuse sclerosing osteomyelitis of the mandible with bisphosphonates. *J Craniomaxillofac Surg* 2011; 39:65-8.

Lacey DL, Timms E, Tan HL, Kelley MJ, Dunstan CR, Burgess T, et al.

Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation. *Cell* 1998; 93:165–76.

Ladizesky MG, Boggio V, Albornoz LE, Castrillon P, Mautalen CA, Cardinali DP. Melatonin increases estradiol-induced bone formation in ovariectomized rats. *J Pineal Res* 2003; 34:143–51.

Ladizesky MG, Cutrera RA, Boggio V, Somoza J, Centrella JM, Mautalen C, et al. Effect of melatonin on bone metabolism in ovariectomized rats. *Life Sci* 2001; 70:557–65.

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.

Landesberg R, Cozin M, Cremers S, Woo V, Kousteni S, Sinha S, et al. Inhibition of oral mucosal cell wound healing by bisphosphonates. *J Oral Maxillofac Surg* 2008; 66:839–47.

Landesberg R, Woo V, Cremers S, Cozin M, Marolt D, Vunjak-Novakovic G, et al. Potential pathophysiological mechanisms in osteonecrosis of the jaw. *Ann N Y Acad Sci* 2011; 1218:62-79.

Lawson MA, Triffin JT, Ebetino FH et al. Potential bone mineral binding differences among bisphosphonates can be demonstrated by the use of hydroxyapatite column chromatography. *J Bone Miner Res* 2005; 20:S396.

Lee J. Complication related to bisphosphonate therapy: osteonecrosis of the jaw. *J Infus Nurs* 2009; 32:330-5.

Lee SH, Chang SS, Lee M, Chan RC, Lee C. Risk of osteonecrosis in patients taking bisphosphonates for prevention of osteoporosis: a systematic review and metaanalysis. *Osteoporos Int* 2014; 25:1131-9.

Lenart B, Lorich D, Lane J. Atypical fractures of the femoral diaphysis in

postmenopausal women taking alendronate. *N Engl J Med* 2008; 358:1304–6.

Lerner AB, Case JD, Takahashi Y, Lee TH, Mori W. Isolation of melatonin, the pineal gland factor that lightens melanocytes. *J Am Chem Soc* 1958; 80:2587.

Letellier K, Azeddine B, Parent S, Labelle H, Rompre PH, Moreau A, et al. Estrogen cross-talk with the melatonin signaling pathway in human osteoblasts derived from adolescent idiopathic scoliosis patients. *J Pineal Res* 2008; 45:383–93.

Li PK, Witt-Enderby PA. Melatonin receptors as potential targets for drug discovery. *Drugs Future* 2000; 25:945–57.

Liberman UA, Weiss SR, Bröll J, Minne HW, Quan H, Bell NH, et al. Effect of oral alendronate on bone mineral density and the incidence of fractures in postmenopausal osteoporosis. *N Engl J Med* 1995; 333:1437–43.

Liebmann PM, Wölfer A, Felsner P, Hofer D, Schauenstein K. Melatonin and the immune system. *Int. Arch. Allergy Immunol* 1997; 112:203-11.

Lim HD, Kim YS, Ko SH, Yoon IJ, Cho SG, Chun YH, et al. Cytoprotective and anti-inflammatory effects of melatonin in hydrogen peroxide-stimulated CHON-001 human chondrocyte cell line and rabbit model of osteoarthritis via the SIRT1 pathway. *J Pineal Res* 2012; 53:225–37.

Lin JH, Russell G, Gertz B. Pharmacokinetics of alendronate: an overview. *Int J Clin Pract Suppl* 1999; 101:18–26.

Lin JH. Bisphosphonates: a review of their pharmacokinetic properties. *Bone* 1996; 18:75–85.

Lin JM, Callon KE, Lin CQ, Bava U, Zheng MH, Reid IR, et al. Alteration of bone cell function by RANKL and OPG in different in vitro models. *Eur J Clin Invest* 2007; 37:407–15.

Liu C, Weaver DR, Jin X, Shearman LP, Pieschl RL, Gribkoff VK, et al. Molecular dissection of two distinct actions of melatonin on the suprachiasmatic circadian clock. *Neuron* 1997; 19:91–102.

Liu L, Zhu Y, Xu Y, Reiter RJ. Melatonin delays cell proliferation by inducing G1 and G2/M phase arrest in a human osteoblastic cell line hFOB 1.19. *J Pineal Res* 2011; 50:222–31.

Liu Q, Qiu L, Wang Y, Lv G, Liu G, Wang S, et al. Solvent effect on molecular structure, IR spectra, thermodynamic properties and chemical stability of zoledronic acid: DFT study. *J Mol Model* 2016; 22:84.

Lopez-Jornet P, Sanchez Perez A, Amaral Mendes R, Tobias A. Medication-related osteonecrosis of the jaw: Is autologous platelet concentrate application effective for prevention and treatment? A systematic review. *J Cranio-Maxillo-Facial Surg* 2016; 44:1067-72.

López-Jornet P, Camacho-Alonso F, Molina-Miñano F, Gomez-Garcia F. Bisphosphonate-associated osteonecrosis of the jaw. Knowledge and attitudes of dentists and dental students: a preliminary study. *J Eval Clin Pract* 2010a; 16:878-82.

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* 2010b; 39:697-702.

Lotufo CM, Lopes C, Dubocovich ML, Farsky SH, Markus RP. Melatonin and N-acetylserotonin inhibit leukocyte rolling and adhesion to rat microcirculation. *Eur J Pharmacol* 2001; 430:351–7.

Luckman SP, Coxon FP, Ebetino FH, Russell RG, Rogers MJ. Heterocyclecontaining bisphosphonates cause apoptosis and inhibit bone resorption by preventing protein prenylation: evidence from structure-activity

relationships in J774 macrophages. *J Bone Miner Res* 1998; 13:1668–78.

Lyles K, Colon-Emeric C, Magaziner J, Adachi J, Pieper C, Mautalen C, et al. Zoledronic acid and clinical fractures and mortality after hip fracture. *N Engl J Med* 2007; 357:1799–809.

Lynch HJ, Brzezinski A, Deng MH, Lieberman H. in *Advances in Pineal Research*. Fraschini, F, and Reiter RJ, eds. 1987; Vol. 2, pp. 181–189, Libbey, London.

Macias M, Escames G, León J, Coto A, Sbihi Y, Osuna A, et al. Calreticulin-melatonin. An unexpected relationship. *Eur J Biochem* 2003; 270:832-40.

Maestroni GJM, y Conti A. Melatonin in relation to the immune system. In: *Melatonin. Biosynthesis, Physiological Effects and Clinical Applications*, Yu HS, Reiter RJ, eds. CRC Press, Boca Raton. 1993; 290–306.

Maestroni GJ. The photoperiod transducer melatonin and immune-hematopoietic system. *J Photochem Photobiol B* 1998; 43:186-92.

Man GC, Wong JH, Wang WW, Sun GQ, Yeung BH, Ng TB, et al. Abnormal melatonin receptor 1B expression in osteoblasts from girls with adolescent idiopathic scoliosis. *J Pineal Res* 2011; 50:395–402.

Manolagas SC. Birth and death of bone cells: basic regulatory mechanisms and implications for the pathogenesis and treatment of osteoporosis. *Endocrine Rev* 2000; 21:115–37.

Marech I, Vacca A, Ranieri G, Gnoni A, Dammacco F. Novel strategies in the treatment of castration-resistant prostate cancer (Review). *Int J Oncol* 2012; 40:1313–20.

Marx RE, Sawatari Y, Fortin M, Broumand V. Bisphosphonate-induced exposed

bone (osteonecrosis/osteopetrosis) of the jaws: risk factors, recognition, prevention, and treatment. *J Oral Maxillofac Surg* 2005; 63:1567–75.

Marx RE. Oral and intravenous bisphosphonate-induced osteonecrosis of the jaws. History, etiology, prevention, and treatment. Marx, Robert E, eds. Quintessence Publishing Co Inc 2007; 9–96.

Marx RE. Pamidronate (Aredia) and Zoledronate (Zometa) induced avascular necrosis of the jaws: a growing epidemic. *J Oral Maxillofac Surg* 2003; 61:115-7.

Masana MI, Dubocovich ML. Melatonin receptor signaling: finding the path through the dark. *Sci STKE* 2001; 107:E39.

Masson-Pevet M, Gauer F, Schuster C, Guerrero HY. Photic regulation of mt(1) melatonin receptors and 2-iodomelatonin binding in the rat and Siberian hamster. *Biol Signals Recept* 2000; 9:188–96.

McCord CP, Allen FB. Evidences associating pineal gland function with alterations in pigmentation. *J Exp Zool* 1917; 23:207-24.

McMillen IC, Houghton DC, Young IR. Melatonin and the development of circadian and seasonal rhythmicity. *J Reprod Fertil* 1995; 49:137–46.

McNulty S, Ross AW, Barrett P, Hastings MH, Morgan PJ. Melatonin regulates the phosphorylation of CREB in ovine pars tuberalis. *J Neuroendocrinol* 1994; 6:523–32.

Mehta A, y Kaur G. Potential role of melatonin in prevention and treatment of oral carcinoma. *Indian J Dent* 2014; 5:86-91.

Melchiorri D, Ortiz GG, Reiter RJ, Sewerynek E, Daniels WMU, Pablos MI, et al. Melatonin reduces paraquat-induced genotoxicity in mice. *Toxicol Lett* 1998;

95:103–8.

Melo MD, y Obeid G. Osteonecrosis of the Maxilla in a Patient with a History of Bisphosphonate Therapy. *J Can Dent Assoc* 2005; 71:111–3.

Michaelson M, y Smith M. Bisphosphonates for the treatment and prevention of bone metastases. *J Clin Oncol* 2005; 23:8219–24.

Migliorati CA, Casiglia J, Epstein J, Jacobsen PL, Siegel MA, Woo SB. Managing the care of patients with bisphosphonate-associated osteonecrosis: an American Academy of Oral Medicine position paper. *J Am Dent Assoc* 2005; 136:1658–68.

Migliorati CA, Casiglia J, Epstein J, Jacobsen PL, Siegel MA, Woo SB. Managing the care of patients with bisphosphonate-associated osteonecrosis: an American Academy of Oral Medicine position paper. *J Am Dent Assoc* 2005 Dec 136:1658-68. Review. Erratum in: *J Am Dent Assoc* 2006; 137:26.

Minamisako MC, Ribeiro GH, Lisboa ML, Rodríguez-Cordeiro MM, Grando LJ. Medication-Related Osteonecrosis of Jaws: A Low-Level Laser Therapy and Antimicrobial Photodynamic Therapy Case Approach. *Case Rep Dent* 2016; 2016:6267406.

Mishima K, Okawa M, Shimizu T, Hishikawa Y. Diminished melatonin secretion in the elderly caused by insufficient environmental illumination. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; 86:129–34.

Molinari EJ, North PC, Dubocovich ML. 2-[125I] iodo-5-methoxycarbonylamino-N-acetyltryptamine: a selective radioligand for the characterization of melatonin ML2 binding sites. *Eur J Pharmacol* 1996; 301:159–68.

Mönkkönen H, Auriola S, Lehenkari P, Kellinsalmi M, Hassinen IE, Vepsäläinen J, et al. A new endogenous ATP analog (Apppl) inhibits the mitochondrial adenine nucleotide translocase (ANT) and is responsible for the apoptosis

induced by nitrogen-containing bisphosphonates. *Br J Pharmacol* 2006; 147:437–45.

Mönkkönen J, Koponen HM, Yalitalo P. Comparison of the distribution of three bisphosphonates in mice. *Pharmacol Toxicol* 1990; 66:294-8.

Montebugnoli L, Felicetti L, Gissi DB, Pizzigallo A, Pelliccioni GA, Marchetti C. Bisphosphonate-associated osteonecrosis can be controlled by nonsurgical management. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2007; 104:473-7.

Montilla PL, Túnez IF, Muñoz de Agueda CM, Gascón FJ, Lopez-Soria JV. Protective role of melatonin and retinol palmitate in oxidative stress and hyperlipidemic nephropathy induced by adriamycin in rats. *J Pineal Res* 1998; 25:86–93.

Moore RY. The innervation of the mammalian pineal gland. *Prog Reprod Biol* 1978; 4:1-29.

Morgan PJ, Barrett P, Howell HE, Helliwell R. Melatonin receptors: localization, molecular pharmacology and physiological significance. *Neurochem Int* 1994; 24:101–46.

Morgan PJ, Hastings MH, Thompson M, Barrett P, Lawson W, Davidson G. Intracellular signalling in the ovine pars tuberalis: an investigation using aluminium fluoride and melatonin. *J Mol Endocrinol* 1991; 7:137–44.

Mortensen L, Charles P, Bekker PJ, Digennaro J, Johnston CC. Risedronate increases bone mass in an early postmenopausal population: two years of treatment plus one year of follow-up. *J Clin Endocrinol Metab* 1998; 83:396-402.

Mundy GR. Cytokines and growth factors in the regulation of bone remodeling.

J Bone Miner Res 1993; 8:505-10.

Naidu A, Dechow PC, Spears R, Wright JM, Kessler HP, Opperman LA. The effects of bisphosphonates on osteoblasts in vitro. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 2008; 106:5-13.

Naji L, Carrillo-Vico A, Guerrero JM, Calvo JR. Expression of membrane and nuclear melatonin receptors in mouse peripheral organs. Life Sci 2004; 74:2227-36.

Nakade O, Koyama H, Arijji H, Yajima A, Kaku T. Melatonin stimulates proliferation and type I collagen synthesis in human bone cells in vitro. J Pineal Res 1999; 27:106–10.

Nancollas G, Tang R, Guide S, Ebetino FH, Phipps RJ, Russell RGG. Mineral binding affinities and zeta potentials of bisphosphonates. J Bone Miner Res 2002; 1:S368.

Nancollas GH, Tang R, Phipps RJ, Henneman Z, Gulde S, Wu W, et al. Novel insights into actions of bisphosphonates on bone: differences in interactions with hydroxyapatite. Bone 2006; 38:617–27.

Neri B, De Leonardis V, Gemelli MT, Di Loro F, Mottola A, Ponchietti R, et al. Melatonin as biological response modifier in cancer patients. Anticancer Res 1998; 18:1329–32.

Niles LP, y Hashemi F. Picomolar-affinity binding and inhibition of adenylate cyclase activity by melatonin in Syrian hamster hypothalamus. Cell Mol Neurobiol 1990; 10:553–8.

Nosjean O, Ferro M, Coge F, Beauverger P, Henlin JM, Lefoulon F, et al. Identification of the melatonin-binding site MT3 as the quinone reductase 2. J Biol Chem 2000; 275:31311–7.

Nosjean O, Nicolas JP, Klupsch F, Delagrangé P, Canet E, Boutin JA. Comparative pharmacological studies of melatonin receptors: MT1, MT2 and MT3/QR2, Tissue distribution of MT3/QR2. *Biochem Pharmacol* 2001; 61:1369–79.

Novince CM, Ward BB, McCauley LK. Osteonecrosis of the jaw: an update and review recommendations. *Cells Tissues Organs* 2009; 189:275-83.

O'Dea RF, y Zatz M. Catecholamine-stimulated cyclic GMP accumulation in the rat pineal: apparent presynaptic site of action. *Proc Natl Acad Sci USA* 1976; 73:3398-402.

Okatani Y, Wakatsuki A, Reiter RJ, Miyahara Y. Melatonin reduces oxidative damage of neural lipids and proteins in senescence-accelerated mouse. *Neurobiol Aging* 2002; 23:639–44.

Orwoll E, Blank J, Barrett-Connor E, Cauley J, Cummings S, Ensrud K, et al. Design and baseline characteristics of the osteoporotic fractures in men (MrOS) study – a large observational study of the determinants of fracture in older men. *Contemp Clin Trials* 2005; 26:569–85.

Ostrowska Z, Kos-Kudla B, Marek B, Kajdaniuk D. Influence of lighting conditions on daily rhythm of bone metabolism in rats and possible involvement of melatonin and other hormones in this process. *Endocr Regul* 2003b; 37:163–74.

Ostrowska Z, Kos-Kudla B, Nowak M, Swietochowska E, Marek B, Gorski J, et al. The relationship between bone metabolism, melatonin and other hormones in sham-operated and pinealectomized rats. *Endocr Regul* 2003a; 37:211–24.

Otto S, Pautke C, Opelz C, Westphal I, Drosse I, Schwager J, et al. Osteonecrosis of the jaw: effect of bisphosphonate type, local concentration,

and acidic milieu on the pathomechanism. *J Oral Maxillofac Surg* 2010; 68:2837-45.

Park KH, Kang JW, Lee EM, Kim JS, Rhee YH, Kim M, et al. Melatonin promotes osteoblastic differentiation through the BMP/ ERK/Wnt signaling pathways. *J Pineal Res* 2011; 51:187–94.

Perazella M, Markowitz G. Bisphosphonate nephrotoxicity. *Kidney Int* 2008; 74:1385–93.

Pintor J, Martin L, Pelaez T, Hoyle CH, Peral A. Involvement of melatonin MT(3) receptors in the regulation of intraocular pressure in rabbits. *Eur J Pharmacol* 2001; 416:251–4.

Pioli C, Caroleo MC, Nistico G, Doria G. Melatonin increases antigen presentation and amplifies specific and non specific signals for T-cell proliferation. *Int J Immunopharmacol* 1993; 15:463–8.

Plotkin LI, Manolagas SC, Bellido T. Dissociation of the pro-apoptotic effects of bisphosphonates on osteoclasts from their anti-apoptotic effects on osteoblasts/osteocytes with novel analogs. *Bone* 2006; 39:443–52.

Plotkin LI, Weinstein RS, Parfitt AM, Roberson PK, Manolagas SC, Bellido T. Prevention of osteocyte and osteoblast apoptosis by bisphosphonates and calcitonin. *J Clin Invest* 1999; 104:1363–74.

Poeggeler B, Saarela S, Reiter RJ, Tan DX, Chen LD, Manchester LC, et al. Melatonin a highly potent endogenous radical scavenger and electron donor: New aspects of the oxidation chemistry of this indole assessed in vitro. *Ann N Y Acad Sci* 1994; 738:419-20.

Poeggeler BH, Barlow-Walden LR, Reiter RJ, Saarela S, Menendez-Pelaez A, Yaga K, et al. Red-light-induced suppression of melatonin synthesis is

mediated by N-methyl-D-aspartate receptor activation in retinally normal and retinally degenerate rats. *J Neurobiol* 1995; 28:1-8.

Polymenidi I, Trombetti A, Carballo S. The risk of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw. *Rev Med Suisse* 2014; 10:1930-4.

Ponte Fernández N, Estefania Fresco R, Aguirre Urizar JM. Bisphosphonates and oral pathology I. General and preventive aspects. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 2006; 11:E396-400.

Pozzi S, Vallet S, Mukherjee S, Cirstea D, Vaghela N, Santo L, et al. High-dose zoledronic acid impacts bone remodeling with effects on osteoblastic lineage and bone mechanical properties. *Clin Cancer Re* 2009; 15:5829-39.

Princ FG, Maxit AG, Cardalda C, Batle A, Juknat AA. In vivo protection by melatonin against delta-aminolevulinic acid-induced oxidative damage and its antioxidant effect on the activity of haem enzyme. *J Pineal Res* 1998; 24:1-8.

Radio NM, Doctor JS, Witt-Enderby PA. Melatonin enhances alkaline phosphatase activity in differentiating human adult mesenchymal stem cells grown in osteogenic medium via MT2 melatonin receptors and the MEK/ERK (1/2) signaling cascade. *J Pineal Res* 2006; 40:332-42.

Ram PT, Dai J, Yuan L, Dong C, Kiefer TL, Lai L, et al. Involvement of the mt1 melatonin receptor in human breastcancer. *Cancer Lett* 2002; 179:141-50.

Rasmusson L, y Abtahi J. Bisphosphonate associated osteonecrosis of the jaw: an update on pathophysiology, risk factors, and treatment. *Int J Dent* 2014; 2014:471035.

Ravosa MJ, Ning J, Liu Y, Stack MS. Bisphosphonate effects on the behaviour of oral epithelial cells and oral fibroblasts. *Ach Oral Biol* 2011; 56:491-8.

Rawadi G, Ferrer C, Spinella-Jaegle S, Roman-Roman S, Bouali Y, Baron R. 1-

(5-oxohexyl)-3,7-Dimethylxanthine, a phosphodiesterase inhibitor, activates MAPK cascades and promotes osteoblast differentiation by a mechanism independent of PKA activation (pentoxifylline promotes osteoblast differentiation). *Endocrinol* 2001; 142:4673–82.

Reginster J, Minne HW, Sorensen OH, Hooper M, Roux C, Brandi ML, et al. Randomized trial of the effects of risedronate on vertebral fractures in women with established postmenopausal osteoporosis. *Osteoporos Int* 2000; 11:83–91.

Reid I, Gamble G, Mesenbrink P, Lakatos P, Black D. Characterization of and risk factors for the acute-phase response after zoledronic acid. *J Clin Endocrinol Metab* 2010; 95:4380–87.

Reid I. Pathogenesis of osteonecrosis of the Jaw. *IBMS Bonekey* 2008; 2:69-77

Reinholz GG, Getz B, Pederson L, Sanders ES, Subramaniam M, Ingle JN, et al. Bisphosphonates directly regulate cell proliferation, differentiation, and gene expression in human osteoblasts. *Cancer Res* 2000; 60:6001-7.

Reiter RJ, Tan DX, Allegra M. Review. Melatonin: Reducing molecular pathology and dysfunction due to free radicals and associated reactants. *Neuro Endocrinol Lett.* 2002; 1:3–8.

Reiter RJ, Tan DX, Manchester LC, Pilar Terron M, Flores LJ, Koppisepi S. Medical implications of melatonin receptor-mediated and receptor independent actions. *Adv Med Sci* 2007; 52:11-28.

Reiter RJ, Tan DX, Manchester LC, Qi W. Biochemical reactivity of melatonin with reactive oxygen and nitrogen species: a review of the evidence. *Cell Biochem Biophys* 2001; 34:237–56.

Reiter RJ. Melatonin: the chemical expression of darkness. *Moll Cell Endocrinol* 1991a; 79:C153-8.

Reiter RJ. Pineal melatonin: cell biology of its synthesis and of its physiological interactions. *Endocr Rev* 1991b; 12:151–80.

Reiter RJ, Oh CS, Fujimori O. Melatonin Its intracellular and genomic actions. *Trends Endocrinol Metab* 1996; 7:22–7.

Reiter RJ. The mammalian pineal gland: structure and function. *Am J Anat* 1981; 162:287-313.

Reiter RJ. Antioxidant action of melatonin. *Adv Pharmacol* 1997; 38:103–17.

Reiter RJ. Oxidative damage in the central nervous system: Protection by melatonin. *Prog Neurobiol* 1998; 56:359-84.

Reiter RJ. Pineal gland interface between the photoperiodic environment and the endocrine system. *Trends Endocrinol Metab* 1991c; 2:13-9.

Reppert SM, Weaver DR, Ebisawa T. Cloning and characterization of a mammalian melatonin receptor that mediates reproductive and circadian responses. *Neuron* 1994; 13:1177–85.

Reppert SM. Melatonin receptors: molecular biology of a new family of G protein-coupled receptors. *J Biol Rhythms* 1997; 12:528-31.

Reppert SM, Chez RA, Anderson A, Klein DC. Maternal-fetal transfer of melatonin in the non-human primate. *Pediatr Res* 1979; 13:788-91.

Reszka AA, y Rodan GA. Bisphosphonate mechanism of action. *Curr Rheumatol Rep* 2003; 5:65–74.

Rodríguez-Lozano FJ, García-Bernal D, Ros-Roca MA, Algueró MC, Oñate-Sanchez RE, Camacho-Alonso F, et al. Cytoprotective effects of melatonin on zoledronic acid-treated human mesenchymal stem cells in vitro. *J*

Craniomaxillofac Surg 2015; 43:855-62.

Rogers MJ. New insights into the molecular mechanisms of action of bisphosphonates. Curr Pharm Des 2003; 9:2643-58.

Roth JA, Kim BG, Lin WL, Cho MI. Melatonin promotes osteoblast differentiation and bone formation. J Biol Chem 1999; 274:22041-7.

Roth JA, Rabin R, Agnello K. Melatonin suppression of PC12 cell growth and death. Brain Res 1997; 768:63–70.

Ruggiero S, Dodson T, Fantasia J, Goodday R, Aghaloo T, Mehrotra B, et al. American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons. position paper on medication related osteonecrosis of the jaw-update. J Oral Maxillofac Surg 2014; 72:1938-56.

Ruggiero SL, Dodson TB, Assael LA, Landesberg R, Marx RE, Mehrotra B. American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons position paper on bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw – 2009 update. Aust Endod J 2009a; 35:119-30.

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, y Mehrotra B. Bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw: diagnosis, prevention, and management. Annu Rev Med 2009b; 60:85-96.

Ruggiero SL, Gralow J, Marx RE, Hoff AO, Schubert MM, Huryn JM, et al. Practical guidelines for the prevention, diagnosis, and treatment of osteonecrosis of the jaw in patients with cancer. J Oncol Pract 2006; 2:7-14.

Rusell RGG, Watts NB, Ebetino FH, Rogers MJ. Mechanisms of action of bisphosphonates: similarities and differences and their

potential influence on clinical efficacy. *Osteoporos Int* 2008; 19:733-59.

Russell RG, Mühlbauer RC, Bisaz S, Williams DA, Fleisch H. The influence of pyrophosphate, condensed phosphates, phosphonates and other phosphate compounds on the dissolution of hydroxyapatite in vitro and on bone resorption induced by parathyroid hormone in tissue culture and in thyroparathyroidectomised rats. *Calcif Tissue Res* 1970; 6:183–96.

Russell RG. Bisphosphonates: from bench to bedside. *Ann N Y Acad Sci* 2006; 1068:367-401.

Sack RL, Lewy AJ, Erb DL, Vollmer WM, Singer CM. Human melatonin production decreases with age. *J Pineal Res* 1986; 3:379–88.

Sainz RM, Mayo JC, Uría H, Kotler M, Antolín I, Rodríguez C, et al. The pineal neurohormone melatonin prevents in vivo and in vitro apoptosis of thymocytes. *J Pineal Res* 1995; 19:178–88.

Sánchez-Barceló EJ, Mediavilla MD, Tan DX, Reiter RJ. Scientific basis for the potential use of melatonin in bone diseases: osteoporosis and adolescent idiopathic scoliosis. *J Osteoporos* 2010; 2010:830231.

Sanchez-Hidalgo M, Lu Z, Tan DX, Maldonado MD, Reiter RJ, Gregerman RI. Melatonin inhibits fatty acid-induced triglyceride accumulation in ROS17/2.8 cells: implications for osteoblast differentiation and osteoporosis. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2007; 292:R2208-15.

Santana C, Guerrero JM, Reiter RJ, Menendez- Pelaez A. Role of postsynaptic alpha-adrenergic receptors in the beta-adrenergic stimulation of melatonin production in the Syrian hamster pineal gland in organ culture. *J Pineal Res* 1989; 7:13-22.

Santana C, Guerrero JM, Reiter RJ, Gonzalez-Brito A, Menendez-Pelaez A.

Forskolin, an activator of adenylate cyclase activity, promotes large increases in N-acetyl transferase activity and melatonin production in the Syrian hamster pineal gland only during the late dark period. *Biochem Biophys Res Commun* 1988; 155:209-15.

Satomura K, Tobiume S, Tokuyama R, Yamasaki Y, Kudoh K, Maeda E, et al. Melatonin at pharmacological doses enhances human osteoblastic differentiation in vitro and promotes mouse cortical bone formation in vivo. *J Pineal Res* 2007; 42:231-9.

Scalbert E, Guardiola-Lemaitre B, Delagrangre P. Melatonin and regulation of the cardiovascular system. *Therapie* 1998; 53:459–65.

Scheper MA, Badros A, Chaisuparat R, Cullen KJ, Meiller TF. Effect of zoledronic acid on oral fibroblasts and epithelial cells: a potential mechanism of bisphosphonate-associated osteonecrosis. *Br J Haematol* 2009; 144:667-76.

Scheper MA, Chaisuparat R, Cullen KJ, Meiller TF. A novel soft-tissue in vitro model for bisphosphonate-associated osteonecrosis. *Fibrogenesis Tissue Repair* 2010; 1:3-6.

Scher J, Wankiewicz E, Brown GM, Fujieda H. MT(1) Melatonin Receptor in the Human Retina: Expression and Localization. *Investigative Ophthalmology and Visual Science* 2002; 43:889–97.

Schmidt RE, Dorsey DA, Parvin CA, Beaudet LN. Sympathetic neuroaxonal dystrophy in the aged rat pineal gland. *Neurobiol Aging* 2006; 27:1514-23.

Seely D, Wu P, Fritz H, Kennedy DA, Tsui T, Seely AJ, et al. Melatonin as Adjuvant Cancer Care With and Without Chemotherapy: A Systematic Review and Meta-analysis of Randomized Trials. *Integr Cancer Ther* 2012; 11:293-303.

Sethi S, Radio NM, Kotlarczyk MP, Chen CT, Wei YH, Jockers R, et al. Determination of the minimal melatonin exposure required to induce osteoblast

differentiation from human mesenchymal stem cells and these effects on downstream signaling pathways. *J Pineal Res* 2010; 49:222–38.

Sewerynek E, Melchiorri D, Ortiz GG, Poeggeler B, Reiter RJ. Melatonin reduces H₂O₂-induced lipid peroxidation in homogenates of different rat regions. *J Pineal Res* 1995; 19:51-6.

Shaji AV, Kulkarni SK, Agrewala JN. Regulation and secretion of IL-4 and IgG1 isotype by melatonin – stimulated ovalbumin-specific T cells. *Clin Exp Immunol* 1998; 111:181–5.

Sharpe M, Noble S, Spencer MC. Alendronate. An update of its use in osteoporosis. *Drugs* 2001; 61:999-1039.

She F, Wang W, Wang Y, Tang P, Wei J, Chen H, et al. Melatonin protects MG63 osteoblast-like cells from hydrogen peroxide-induced cytotoxicity by maintaining mitochondrial function. *Mol Med Rep* 2014; 9:493-8.

Shikama Y, Nagai Y, Okada S, Oizumi T, Shimauchi H, Sugawara S. Pro-IL-1 β accumulation in macrophages by alendronate and its prevention by clodronate. *Toxicol Lett* 2010; 199:123-8.

Shimura K, Shimazaki C, Taniguchi K, Akamatsu S, Okamoto M, Uchida R, et al. Hyperbaric oxygen in addition to antibiotic therapy is effective for bisphosphonate-induced osteonecrosis in a patient with multiple myeloma. *Int J Hematol* 2006; 84:343–5.

Shoumura S, Chen H, Emura S, Utsumi M, Hayakawa D, Yamahira T, et al. An in vitro study on the effects of melatonin on the ultrastructure of the hamster parathyroid gland. *Histol Histopathol* 1992; 7:715-8.

Siegrist C, Benedetti C, Orlando A, Beltrán JM, Tuchscher L, Nosedá CM, et al. Lack of changes in serum prolactin, FSH, TSH, and estradiol after melatonin treatment in doses that improve sleep and reduce benzodiazepine consumption

in sleep-disturbed, middle-aged, and elderly patients. *J Pineal Res* 2001; 30:34–42.

Silverman SL, y Landesberg R. Osteonecrosis of the jaw and the role of bisphosphonates: a critical review. *Am J Med* 2009; 122:S33-45.

Simon MJ, Niehoff P, Kiming B, Wiltfand J, Açil Y. Expression profile and synthesis of different collagen types I, II, III, and V of human gingival fibroblasts, osteoblasts, and SaOS-2 cells after bisphosphonate treatment. *Clin Oral Invest* 2010; 14:51-8.

Simonneaux V, y Ribelayga C. Generation of the Melatonin Endocrine Message in mammals: a review of the complex regulation of melatonin synthesis by norepinephrine, peptides, and other pineal transmitters. *Pharmacol Rev* 2003; 55:325-95.

Smith R, Russell RG, Bishop M. Diphosphonates and Paget's disease of bone. *Lancet* 1971; 1:945–7.

Son JH, Cho YC, Sung IY, Kim IR, Park BS, Kim YD. Melatonin promotes osteoblast differentiation and mineralization of MC3T3-E1 cells under hypoxic conditions through activation of PKD/p38 pathways. *J Pineal Res* 2014; 57:385–92.

Stepensky D, Kleinberg L, Hoffman A. Bone as an effect compartment. Models for uptake and release of drugs. *Clin Pharmacokinet* 2003; 42:863-81.

Stopeck AT, Lipton A, Body JJ, Steger GG, Tonkin K, de Boer RH, et al. Denosumab versus zoledronic acid for treatment of bone metastases in patients with advanced breast cancer: a randomized, double-blind study. *J Clin Oncol* 2010; 28:5132-9.

Suzuki A, Guicheux J, Palmer G, Miura Y, Oiso Y, Bonjour JP, et al. Evidence for a role of p38 MAP kinase in expression of alkaline phosphatase during osteoblastic cell differentiation. *Bone* 2002; 30:91–8.

Suzuki A, Palmer G, Bonjour JP, Caverzasio J. Regulation of alkaline phosphatase activity by p38 MAP kinase in response to activation of Gi protein-coupled receptors by epinephrine in osteoblast-like cells. *Endocrinology* 1999; 140:3177–82.

Suzuki N, y Hattori A. Melatonin suppresses osteoclastic and osteoblastic activities in the scales of goldfish. *J Pineal Res* 2002; 33:253–8.

Suzuki N, Somei M, Kitamura KI, Reiter RJ, Hattori A. Novel bromomelatonin derivatives suppress osteoclastic activity and increase osteoblastic activity: implications for the treatment of bone diseases. *J Pineal Res* 2008a; 44:326–34.

Suzuki N, Somei M, Seki A, Reiter R.J, Hattori A. Novel bromomelatonin derivatives as potentially effective drugs to treat bone diseases. *J Pineal Res* 2008b; 45:229–34.

Takahashi N, Udagawa N, Takami M, Suda T. Cells of bone: osteoclast generation. In: Bilezikian JP, Raisz LG, and Rodan GA. *Principles of bone biology*. 2^o edition. Volume 1. San Diego, California: Academic Press; 2002. p. 109-26.

Takechi M, Tatehara S, Satomura K, Fujisawa K, Nagayama M. Effect of FGF-2 and melatonin on implant bone healing: a histomorphometric study. *J Mater Sci Mater Med* 2008; 19:2949–52.

Tamura EK, Cecon E, Monteiro AW, Silva CL, Markus RP. Melatonin inhibits LPS-induced NO production in rat endothelial cells. *J Pineal Res* 2009; 46:268-74.

Tan DX, Manchester LC, Reiter RJ, Qi WB, Zhang M, Weintraub ST, et al. Identification of highly elevated levels of melatonin in bone marrow: its origin and significance. *Biochim Biophys Acta* 1999; 1472:206-14.

Tan DX, Manchester LC, Terron MP, Flores LJ, Tamura H, Reiter RJ. Melatonin as a naturally occurring co-substrate of quinone reductase-2, the putative MT3 melatonin membrane receptor: hypothesis and significance. *J Pineal Res* 2007; 43:317-20.

Tan DX, Reiter RJ, Chen LD, Poeggeler B, Manchester LC, Barlow-Walden L. Both physiological and pharmacological levels of melatonin reduce DNA adduct formation induced by the carcinogen safrole. *Carcinogenesis* 1994; 15:215–8.

Tan DX, Chen LD, Poeggeler B, Manchester LC, Reiter RJ. Melatonin: A potent endogenous hydroxyl radical scavenger. *Endocrine J* 1993; 1:57–60.

Udagawa N, Takahashi N, Akatsu T, Tanaka H, Sasaki T, Nishihara T, et al. Origin of osteoclasts: mature monocytes and macrophages are capable of differentiating into osteoclasts under a suitable microenvironment prepared by bone marrow-derived stromal cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 8:7260–4.

United States Food and Drug Administration Oncologic Drugs Advisory Committee. New Hampshire: FDA [citado el 27 de Febrero de 2017] Disponible en: <http://www.fda.gov/ohrms/dockets/ac/cder05.html>

Uz T, Arslan AD, Kurtuncu M, Imbesi M, Akhisaroglu M, Dwivedi Y, et al. The regional and cellular expression profile of the melatonin receptor MT1 in the central dopaminergic system. *Brain Res Mol Brain Res* 2005; 136:45-53.

Vakkuri O. Diurnal rhythm of melatonin in human saliva. *Acta Physiol Scand* 1985; 124:409-12.

Van den Wyngaert T, Huizing MT, Vermorcken JB. Bisphosphonates and osteonecrosis of the jaw: cause and effect or a post hoc fallacy? *Ann Oncol* 2006; 17:1197–204.

Van Holten-Verzantvoort A, Kroon H, Bijvoet O, Cleton FJ, Beex LV, Blijham G,

et al. Palliative pamidronate treatment in patients with bone metastases from breast cancer. *J Clin Oncol* 1993; 11:491–8.

Vanecek J, Sugden D, Weller JL, Klein DC. Atypical synergistic alpha 1- and beta-adrenergic regulation of adenosine 3',5'-monophosphate and guanosine 3',5'-monophosphate in rat pinealocytes. *Endocrinol* 1985; 116:2167-73.

Vanecek J. Cellular mechanisms of melatonin action. *Physiol Rev* 1998; 78:687-721.

Vaughan GM, McDonald SD, Jordan RM, Allen JP, Bohmfalk GL, Abou-Samra M, et al. Melatonin concentration in human blood and cerebrospinal fluid: Relationship to stress. *J Clin Endocrinol Metab* 1978; 47:220–3.

Vijayalaxmi, Meltz ML, Reiter RJ, Herman TS. Melatonin and protection from genetic damage in bone marrow: Whole-body irradiation studies in mice. *J Pineal Res* 1999; 27:221-5.

Vijayalaxmi, Reiter RJ, Leal BZ, Meltz ML. Effects of melatonin on mitotic and proliferation indices and sister chromatide exchange in human blood lymphocytes. *Mutat. Res* 1996; 351:187–192.

Vijayalaxmi, Reiter RJ, Metz ML. Melatonin protects human blood lymphocytes from radiation–induced chromosome damage. *Mutat Res* 1995; 346:23–31.

Vinther AG, y Claësson M. The influence of melatonin on the immune system and cancer. *Ugeskr Laeger* 2015; 18:177.

Vescovi P, Meleti M, Merigo E, Manfredi M, Fornaini C, Guidotti R, et al. Case series of 589 tooth extractions in patients under bisphosphonates therapy. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 2013; 18:e680-5.

Von Gall C, Stehle JH, Weaver DR. Mammalian melatonin receptors: molecular biology and signal transduction. *Cell Tissue Res* 2002; 309:151-62.

Von Knoch F, Jaquier C, Kowalsky M, Schaeren S, Alabre C, Martin I, et al. Effects of bisphosphonates on proliferation and osteoblast differentiation of human bone marrow stromal cells. *Biomaterials* 2005; 26:6941-9.

Walter C, Al-Nawas B, Grötz KA, Thomas C, Thüroff JW, Zinser V, et al. Prevalence and risk factors of bisphosphonate-associated osteonecrosis of the jaw in prostate cancer patients with advanced disease treated with zoledronate. *Eur Urol* 2008; 54:1066–72.

Walter C, Pabst A, Ziebart T, Klein M, Al-Nawas B. Bisphosphonates affect migration ability and cell viability of HUVEC, fibroblasts and osteoblasts in vitro. *Oral Dis* 2011; 17:194-9.

Wang F, Zhou H, Du Z, Chen X, Zhu F, Wang Z, et al. Cytoprotective effect of melatonin against hypoxia/serum deprivation-induced cell death of bone marrow mesenchymal stem cells in vitro. *Eur J Pharmacol* 2015; 748:157–65.

Wang Z, Liu D, Wang J, Liu S, Gao M, Ling EA, et al. Cytoprotective effects of melatonin on astroglial cells subjected to palmitic acid treatment in vitro. *J Pineal Res* 2012; 52:253–64.

Watts NB, Harris ST, Genant HK, Wasnich RD, Miller PD, Jackson RD, et al. Intermittent cyclical etidronate treatment of postmenopausal osteoporosis. *N Engl J Med* 1990; 323:73–9.

Wessel JH, Dodson TB, Zavras AI. Zoledronate, smoking, and obesity are strong risk factors for osteonecrosis of the jaw: a case-control study. *J Oral Maxillofac Surg* 2008; 66:625-31.

Wheater PR, Burkitt HG, Daniels VG. The endocrine system. In: *Functional Histology*. New York: Churchill Livingstone ed.; 1987. p. 142-60.

Witt-Enderby PA, Bennett J, Jarzynka MJ, Firestone S, Melan MA. Melatonin

receptors and their regulation: biochemical and structural mechanisms. *Life Sci* 2003; 72:2183-98.

Witt-Enderby PA, y Dubocovich ML. Characterization and regulation of the human ML1A melatonin receptor stably expressed in Chinese hamster ovary cells. *Mol Pharmacol* 1996; 50:166–74.

Witt-Enderby PA, MacKenzie RS, McKeon RM, Carroll EA, Bordt SL, Melan MA. Melatonin induction of filamentous structures in non-neuronal cells that is dependent on expression of the human mt1 melatonin receptor. *Cell Motil Cytoskeleton* 2000; 46:28–42.

Witt-Enderby PA, Masana MI, Dubocovich ML. Physiological exposure to melatonin supersensitizes the cyclic adenosine 3',5'-monophosphate-dependent signal transduction cascade in Chinese hamster ovary cells expressing the human mt1 melatonin receptor. *Endocrinol* 1998; 139:3064–71.

Witt-Enderby PA, Radio NM, Doctor JS, Davis VL. Therapeutic treatments potentially mediated by melatonin receptors: potential clinical uses in the prevention of osteoporosis, cancer and as an adjuvant therapy. *J Pineal Res* 2006; 41:297-305.

Woo SB, Hellstein JW, Kalmar JR. Narrative [corrected] review: bisphosphonates and osteonecrosis of the jaws. *Ann Intern Med* 2006; 144:753-61.

Woo SB, Mawardi H, Treister N. Comments on "Osteonecrosis of the jaws in intravenous bisphosphonate use: Proposal for a modification of the clinical classification". *Oral Oncol* 2009; 45:740.

Wood J, Bonjean K, Ruetz S, Bellahcène A, Devy L, Foidart JM, et al. Novel antiangiogenic effects of the bisphosphonate compound zoledronic acid. *J Pharma*

col Exp Ther 2002; 302:1055-61.

Xiao G, Jiang D, Thomas P, Benson MD, Guan K, Karsenty G, et al. MAPK pathways activate and phosphorylate the osteoblast-specific transcription factor, Cbfa1. J Biol Chem 2000; 275:4453–9.

Xiong XC, Zhu Y, Ge R, Liu LF, Yuan W. Effect of Melatonin on the Extracellular-Regulated Kinase Signal Pathway Activation and Human Osteoblastic Cell Line hFOB 1.19 Proliferation. Int J Mol Sci 2015; 16:10337-53.

Yamazaki T, Yamori M, Ishizaki T, Asai K, Goto K, Takahashi K, et al. Increased incidence of osteonecrosis of the jaw after tooth extraction in patients treated with bisphosphonates: A cohort study. Int J Oral Maxillofac Surg 2012; 41:1397-403.

Yasuda H, Shima N, Nakagawa N, Mochizuki SI, Yano K, Fujise N, Sato Y, et al. Identity of osteoclastogenesis inhibitory factor (OCIF) and osteoprotegerin (OPG): a mechanism by which OPG/OCIF inhibits osteoclastogenesis in vitro. Endocrinology 1998; 139:1329–37.

Yocca FD, y Friedman E. Effect of immobilization stress on rat pineal beta-adrenergic receptor-mediated function. J Neurochem 1984; 42:1427–32.

Yu HS, Reiter RJ, eds. Melatonin. Biosynthesis, Physiological Effects and Clinical Applications. CRC press, Boca Raton, Florida 1993; pp. 550-72.

Yu HS, Yee RW, Howes KA, Reiter RJ. Diurnal rhythms of immunoreactive melatonin in the aqueous humor and serum of male pigmented rabbits. Neurosci Lett 1990; 116:309-14.

Zamfir Chiru AA, Popescu CR, Gheorghe DC. Melatonin and cancer. J Med Life 2014; 7:373-4.

Zaminy A, Ragerdi Kashani IR, Barbarestani M, Hedayatpour A, Mahmoudi R,

Farzaneh Nejad AF. Osteogenic Differentiation of Rat Mesenchymal Stem Cells from Adipose Tissue in Comparison with Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells: Melatonin As a Differentiation Factor. *Iran Biomed J* 2008a; 12:133-41.

Zaminy A, Kashani IR, Barbarestani M, Hedayatpour A, Mahmoudi R, Vardasbi S, et al. Effects of melatonin on the proliferation and differentiation of rat adipose-derived stem cells. *Indian J Plast Surg* 2008b; 41:8-14.

Zervas K, Verrou E, Teleioudis Z, Vahtsevanos K, Banti A, Mihou D, et al. Incidence, risk factors and management of osteonecrosis of the jaw in patients with multiple myeloma: a single-centre experience in 303 patients. *Br J Haematol* 2006; 134:620-3.

Zhang L, Su P, Xu C, Chen C, Liang A, Du K, et al. Melatonin inhibits adipogenesis and enhances osteogenesis of human mesenchymal stem cells by suppressing PPARc expression and enhancing Runx2 expression. *J Pineal Res* 2010; 49:364–72.

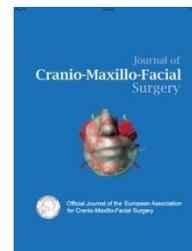
Zhao H, Pang SF, Poon AM. mt(1) Receptor-mediated antiproliferative effects of melatonin on the rat uterine antimesometrial stromal cells. *Mol Reprod Dev* 2002; 61:192–9.

Zhao H, Poon AM, Pang SF. Pharmacological characterization, molecular subtyping, and autoradiographic localization of putative melatonin receptors in uterine endometrium of estrous rats. *Life Sci* 2000; 66:1581–91.

Ziebart T, Pabst A, Klein MO, Kämmerer P, Gauss L, Brüllmann D. Bisphosphonates: restrictions for vasculogenesis and angiogenesis: inhibition of cell function of endothelial progenitor cells and mature endothelial cells in vitro. *Clin Oral Investig* 2011; 15:105-11.

Anexos

8. ANEXOS



Accepted Manuscript

Cytoprotective effects of melatonin on zoledronic acid-treated human osteoblasts

F. Camacho-Alonso, DDS, PhD, I. Urrutia-Rodríguez, DDS, D. Oñate-Cabrerizo, MD, R.E. Oñate-Sánchez, MD, DDS, PhD, F.J. Rodríguez-Lozano, DDS, PhD

PII: S1010-5182(17)30138-5 DOI: 10.1016/j.jcms.2017.04.006 Reference: YJCMS 2656

To appear in: Journal of Cranio-Maxillo-Facial Surgery

Received Date: 22 November 2016 Revised Date: 11 January 2017 Accepted Date: 11 April 2017

Please cite this article as: Camacho-Alonso F, Urrutia-Rodríguez I, Oñate-Cabrerizo D, Oñate-Sánchez R, Rodríguez-Lozano F, Cytoprotective effects of melatonin on zoledronic acid-treated human osteoblasts, Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery (2017), doi: 10.1016/j.jcms.2017.04.006.

This is a PDF file of an unedited manuscript that has been accepted for publication. As a service to our customers we are providing this early version of the manuscript. The manuscript will undergo copyediting, typesetting, and review of the resulting proof before it is published in its final form. Please note that during the production process errors may be discovered which could affect the content, and all legal disclaimers that apply to the journal pertain.

ACCEPTED MANUSCRIPT

Title: Cytoprotective effects of melatonin on zoledronic acid-treated human osteoblasts

Authors: Camacho-Alonso F, DDS, PhD¹; Urrutia-Rodríguez I, DDS²; OñateCabrerizo D, MD³; Oñate-Sánchez RE, MD, DDS, PhD³; Rodríguez-Lozano FJ, DDS, PhD^{3,4}.

1 Department of Oral Surgery, University of Murcia, Murcia (Spain) 2 In private dental practice, Murcia (Spain) 3 Department of Dentistry in Special Patients, University of Murcia, Murcia (Spain) 4 Hematopoietic Transplant and Cellular Therapy Unit, Hematology Department, Virgen de la Arrixaca University Hospital, IMIB, University of Murcia (Spain)

Corresponding author:

Fabio Camacho-Alonso

Clínica Odontológica Universitaria

Unidad Docente de Cirugía Bucal

Hospital Morales Meseguer (2 planta)

Avda. Marqués de los Vélez s/n

30008 - Murcia (Spain)

Phone: +34868888589

Fax: +34868888576

E-mail: fcamacho@um.es

ABSTRACT

Objective: To evaluate the cytoprotective effects of melatonin (MLT) on zoledronic acid (ZA) treated human osteoblasts. **Methods:** Human osteoblasts were exposed to ZA (1, 5, 10, 50, 100 and 300 μM) and MLT (1, 10, 50, 100 y 200 μM) for 24, 48 and 72 hours of incubation, to evaluate their effects on cell viability. **Results:** As ZA concentration increased, greater reductions in cell viability of human osteoblasts were induced whether at 24, 48 or 72 hours incubation. At 24 hours incubation with MLT, greatest cell viability was obtained when low dose of MLT was applied (without significant differences); 48 and 72 hours incubation presented the greatest cell viability with the highest MLT concentrations (100 and 200 μM). MLT at concentrations of 100 and 200 μM would appear to have a certain cytoprotective effect on ZA treated human osteoblasts with low concentrations of ZA (1 y 5 μM), whether at 24, 48 or 72 hours; however, at ZA concentrations ≥ 10 μM the possible cytoprotective effects of MLT were low at 24 hours incubation. **Conclusions:** MLT has a cytoprotective effect on ZA-treated human osteoblasts and could represent a promising preventative alternative for patients at risk of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw.

Key words: Cytoprotective effects, melatonin, zoledronic acid, human osteoblasts, bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw (BRONJ).

INTRODUCTION

Bisphosphonates (BPs) are chemically stable pyrophosphate composite analogues with a high affinity for hydroxyapatite, widely used for treating diseases that produce increases in bone resorption such as Paget's disease, and cancer-related bone diseases (both in patients with normal levels of serum calcium and in patients with tumor-induced hypocalcaemia). They are a basic treatment for osteoporosis and have also been used to treat some childhood skeletal diseases such as osteogenesis imperfecta (Aapro et al., 2008; Cheung & Glorieux, 2008). Although BPs are very effective in reducing bone loss, pain and several other skeletal clinical manifestations, they can induce adverse effects such as bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw (BRONJ) (Marx et al., 2005). BRONJ is defined as a condition characterized by non-healing exposed necrotic bone in the mandible or upper maxilla persisting for more than eight weeks in a patient who has taken or is currently taking a bisphosphonate, combined with an absence of head and neck radiation in the patient's history (Ruggiero et al., 2009). The American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons (AAOMS) in 2014 recommended changing the nomenclature of BRONJ; they favored the term medication-related osteonecrosis of the jaw (MRONJ). The change was justified to accommodate the growing number of osteonecrosis cases involving the maxilla and mandible associated with other antiresorptive and antiangiogenic therapies (Ruggiero et al., 2014).

Zoledronic acid (ZA) is a nitrogenous BP that has been developed exclusively for intravenous and not oral administration. The relatively long duration of its action is attributed to its high affinity for the center of farnesyl pyrophosphate synthetase (FPPS) action and its high capacity for attaching to bone mineral. However, ZA does not act exclusively on osteoclasts; recent research suggests that both osteocytes and osteoblasts may also be target cells for BPs in bone (Plotkin et al., 1999; Aguirre et al., 2006; Bonewald, 2007). Unlike BP's action on osteoclasts (whereby they induce apoptosis), in osteocytes the drugs inhibit apoptosis (Plotkin et al., 2006). ZA action on osteoblasts is controversial; while very low concentrations of BPs have been shown to stimulate osteoblasts in vitro (Rogers, 2003), high concentrations of ZA may reduce osteoblasts' migration capacity and cell viability (Koch et al., 2010; Walter et al., 2011).

Melatonin (MLT) (N-acetil-5-metoxitriptamina) is a neurohormone mainly synthesized and secreted by the pineal gland (mainly during the night-time part of the circadian cycle). Many of its effects differ from its primary neurohormonal functions and are due to its antiinflammatory properties, its ability to act as an effective free-radical scavenger, and its capacity to stimulate several antioxidant enzymes (Czesnikiewicz-Guzik et al., 2007). In relation to osteogenic activity, MLT has been shown to promote osteoblast maturation in vitro and prevent bone loss in vitro (Roth et al., 1999; Koyama et al., 2002; Satomura et al., 2007). In addition, it has been shown that physiological concentrations of melatonin boost alkaline phosphatase activity during the osteogenic differentiation processes of mesenchymal stem cells (Radio et al., 2006). Furthermore, it has recently been proved that MLT has a cytoprotective effect of MLT on human mesenchymal stem cells from periodontal ligament and bone marrow (Rodríguez-Lozano et al., 2015).

The aim of the present study was to evaluate the possible cytoprotective effects of MLT on ZA-treated human osteoblasts.

MATERIAL AND METHODS

Cell line

The study used human osteoblast-like HOB-c cells (PromoCell, Heidelberg, Germany) cultured in an osteoblast-specific medium, Osteoblast Growth Medium (PromoCell, Heidelberg, Germany) composed of Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) with 1%

penicillin/streptomycin/neomycin (PSN), 1% L-glutamine and 10% fetal calf serum (FCS) at

37°C, in an atmosphere of 95% oxygen and 5% CO₂. The medium was changed every other day.

Drug preparation

ZA was purchased from Intratade Chemical (Intratade Chemical GmbH, Muldestausee, Germany) and MLT was obtained from Sigma Aldrich (Sigma-Aldrich Chemistry, St. Louis, MO, USA). All manipulations with ZA and MLT were performed under subdued light.

The dose range was 1, 5, 10, 50, 100 and 300 µM of ZA following similar concentrations to those used by Walter et al. for the same cell line (Walter et al., 2011); and 1, 10, 50, 100 and 200 µM of MLT following similar concentrations to those used by Satomura et al., for human osteoblast cell lines in primary cultures obtained from 30 patients (Satomura et al., 2007).

Cell viability test (MTT)

The effect of increasing concentrations of ZA and MLT on the proliferation rate of human osteoblasts was evaluated using the MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5 diphenyl tetrazolium bromide) assay (MTT, Sigma-Aldrich Chemistry, St. Louis, MO, USA). The cells were cultured at a density of 3×10^3 cells/well in 96-microwell plates, after which ZA or MLT were added at different concentrations (1, 5, 10, 50, 100 and 300 µM of ZA; and 1, 10, 50, 100 and 200 µM of MLT).

At different time points after the start of treatment (24, 48 and 72 hours), the medium was eliminated and the cells were incubated with MTT (Sigma-Aldrich Chemistry, St. Louis, MO, USA) (1 mg/ml) for 4 hours, after which the non-metabolized MTT was discarded and 100 µl of DMSO was added to each well. Absorbance was measured in each well with an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), using a Multiskan MCC/340P plate spectrophotometer at a reading wavelength of 570 nm and a reference wavelength of 690 nm. Measurement was performed in triplicate.

To study the possible cytoprotective effect of MLT on ZA-treated human osteoblasts, all the concentrations of ZA (1, 5, 10, 50, 100 and 300 µM) were applied to HOB-c cells (PromoCell, Heidelberg, Germany) combined with the two concentrations of MLT that produced greater increases in cell viability.

Statistical analysis

Data were analyzed using the SPSS version 20.0 statistical software package (SPSS® Inc., Chicago, IL, USA). A descriptive study was made of each variable. The associations between different quantitative variables were studied using the one-way analysis of variance (ANOVA) for more than two samples, verifying in each case whether the variances were homogeneous.

Statistical significance was accepted for $p \leq 0.05$.

RESULTS

Effects of ZA upon HOB-c cell viability after 24, 48 and 72 hours incubation

As ZA concentration increased, human osteoblast viability reduced whether at 24, 48 or 72 hours incubation. The most cytotoxic concentrations were 100 and 300 μM at all the incubation times assayed. The lowest percentage of cells in comparison with control samples was seen at 24 hours with a ZA concentration of 300 μM , although without statistically significant difference ($p=0.138$) (Figure 1.A). At 48 hours, the lowest percentage of cells was seen with a ZA concentration of 100 μM de ZA, but without significant differences ($p=0.102$) (Figure 1B).

At 72 hours incubation, a greater reduction in osteoblast cell viability was seen at a ZA concentration of 300 μM , with statistically significant difference ($p<0.001$) (Figure 1C).

Effects of MLT upon HOB-c viability at 24, 48 and 72 hours of incubation

Although after 24 hours incubation with MLT, the greatest cell viability was obtained with a low dose of MLT, no significant differences were found in comparison with other concentrations ($p=0.446$). At 48 hours the greatest human osteoblast cell viability was observed at the maximum concentration of MLT (200 μM), with statistical significance ($p=0.033$). At 72 hours, the greatest cell viability was found at a concentration of 100 μM of MLT ($p=0.149$) (Figure 1.D-F).

Cytoprotective effects of MLT upon ZA-treated HOBc cells

MLT at concentrations of 100 and 200 μM appeared to have some cytoprotective effects on human osteoblasts treated with ZA at low concentrations (1 and 5 μM), at all incubation times (24, 48 and 72 hours), although statistical significance was only found in osteoblasts treated with 5 μM ZA at 24 hours incubation ($p=0.047$) (Figure 2).

However, at ZA concentrations ≥ 10 μM the possible cytoprotective effect of MLT was low at 24 hours incubation, with asignificant difference in comparison with ZA concentrations of 10 μM ($p=0.015$) (Figure 3), 100 μM ($p=0.024$) and 300 μM ($p=0.005$) (Figure 4).

DISCUSSION

BRONJ is a type of chemonecrosis of the jaws produced by bone antiresorptive drugs, such as intravenous oral bisphosphonates (Marx, 2003). Some authors (Junquera & Gallego, 2008; Bagan et al., 2009; Mawardi et al., 2009) have suggested that BRONJ can occur without bone exposure, its principal characteristics being the presence of fistulas, pain, and radiographic alterations. The first case series of osteonecrosis of the jaw was described in 2003 (Marx, 2003) but its etiopathogeny remains unclear. The main local factors that would appear to trigger BRONJ are surgical interventions performed in the oral cavity, particularly dental extractions, as well as the presence of dental and periodontal infections (Marx et al., 2005). BRONJ is far more frequently induced by intravenous BPs than by oral BPs (Bagan et al., 2009). It would appear that treatment by intravenous high strength BPs (nitrogenated), such as pamidronate and ZA, increase the risk of BRONJ; the level of risk is also influenced by the number of infusions and their duration (Stumpe et al., 2009; Boonyapakorn et al., 2008).

ZA is a third generation BP with a second nitrogen atom situated in a crucial position to produce a heterocyclic imidazol substitution group, responsible for its high strength and therapeutic relation; this makes it the most widely used drug for treating bone metastasis (Major & Coleman, 2001). It is a potent inhibitor of bone resorption, inhibits osteoclast proliferation, and

induces osteoclast apoptotic cell death (Coxon et al., 2000; Benford et al., 2001). This is because ZA inhibits FPPS and as a consequence impedes cell biosynthesis as, in absence of FPPS, FPP and geranylgeranyl pyrophosphate cannot be produced, resulting in the inhibition of the GTP-binding protein prenylation in osteoclasts. Low levels of prenylated GTP-binding proteins inhibit osteoclast activity and so induce apoptosis (Green, 2001).

But ZA's action does not act exclusively on osteoclasts, as recent studies suggest that both osteocytes and osteoblasts could be target cells for BPs in bone (Plotkin et al., 1999; Aguirre et al., 2006; Bonewald, 2007). Unlike their action on osteoclasts (whereby BPs induce their apoptosis), on osteocytes these drugs inhibit apoptosis (Plotkin et al., 2006), even in osteocytes whose apoptosis has been chemically induced by other substances such as glucocorticoids (Plotkin et al., 1999). It would appear that ZA at low concentrations could stimulate osteoblasts, while adverse effects have been observed at high concentrations such as reductions in cell viability and a decrease in migration capacity (Koch et al., 2010).

In the present study, as ZA concentrations increased, human osteoblast cell viability was reduced at all incubation times (24, 48 or 72 hours), with 100 and 300 μM concentrations proving the most cytotoxic. Walter et al., (Walter et al., 2011) used similar concentrations – 5, 50, 100, 200 and 500 μM – on the human osteoblast cell line HOB-c (PromoCell, Heidelberg Germany), finding that in relation to cell viability, ZA had a greater impact than the other BPs assayed in their study (clodronate, ibandronate and pamidronate). ZA reduced osteoblast cell viability as its concentration was increased. ZA was seen to have the same effect on osteoblast cell migration capacity, although the differences observed between ZA, pamidronate and ibandronate were not statistically significant.

MLT has been described as a cytoprotective and prosurvival agent that acts through both membrane receptor-dependent and independent mechanisms (Luchetti et al., 2014). The main functions performed by its antioxidant properties are that it stimulates antioxidant enzyme activity, promotes mitochondrial oxidative phosphorylation, reduces electron release, favors the gene expression of oxidation-reduction enzymes, and eliminates free radicals (Pieri et al., 1994; Cuesta et al., 2011; Sánchez et al., 2015). In this context, the three main mechanisms whereby MLT might show favorable effects on bone in relation to its action on osteoblasts are: the promotion of osteoblast differentiation and activity; increased osteoprotegerin expression by osteoblasts, thereby preventing the differentiation of osteoclasts; and the scavenging of free radicals generated by the osteoclast activity responsible for bone resorption (Sánchez-Barceló et al., 2010).

In the present *in vitro* study, after 24 hours incubation a low concentration of MLT (1 μM) obtained an increase in cell viability similar to that obtained with high concentrations (100 and 200 μM), at 48 and 72 hours incubation, but greater cell viability of human osteoblasts was observed at MLT concentrations of 100 and 200 μM . Authors such as Satomura et al., (Satomura et al., 2007) assayed the same concentrations as the present study – 1, 10, 50, 100 and 200 μM – on primary cultures of human osteoblasts obtained from 30 patients, finding that treatment with MLT promoted the proliferation of human osteoblasts in a dose-dependent manner at concentrations of between 50 and 200 μM . Liu et al., (Liu et al., 2011) tested the effect of MLT on cell viability of the human fetal osteoblast cell line, finding greater cell proliferation at high concentrations of MLT at 24, 48 and 72 hours incubation.

Lastly, analyzing the possible cytoprotective effects of MLT on ZA-treated HOBc cells, the present study found that 100 and 200 μM concentrations of MLT appeared to have a certain cytoprotective effect on human osteoblasts treated with low concentrations of ZA (1 and 5 μM) at all incubation times (24, 48 or 72 hours); but at ZA concentrations ≥ 10 μM the cytoprotective effect only occurred after a short incubation (24 hours), perhaps due to the stronger cytoprotective effect of ZA on osteoblasts.

The present study's main limitation was the impossibility of comparing the results with other research, as no previous scientific evidence as to the cytoprotective effect of MLT on human osteoblasts treated with ZA has been published. Nevertheless, Rodríguez-Lozano et al.,

(Rodríguez-Lozano et al., 2015) studied the possible cytoprotective effect of MLT on ZA-treated human mesenchymal stem cells from periodontal ligament (PDLSCs) and bone marrow (BMSCs) with similar findings to the present study. In their in vitro study, doses of 100-300 μ M MLT were enough to decrease the number of apoptotic BMSCs in culture or increase their proliferation up to 30 μ M ZA, while PDLSCs doses \geq 300 μ M of MLT only protected up to 5 μ M concentration of ZA.

Various preventative therapies have been proposed recently to prevent BRONJ from developing in high-risk situations, for example, following dental extraction. These include treatment with plasma rich growth factors (PRGF). An in vitro study by Anitua et al., (Anitua et al., 2016) showed that ZA had a cytotoxic effect on both human gingival fibroblasts and human alveolar osteoblasts, but the addition of PRGF suppressed the negative effects of ZA.

CONCLUSION

In conclusion, the present results suggest that MLT has a cytoprotective effect on ZA-treated human osteoblasts and might represent a promising alternative preventative measure against BRONJ in high-risk patients.

Conflict of interest

We wish to confirm that there are no known conflicts of interest associated with this publication and there has been no significant financial support for this work that could have influenced its outcome.

REFERENCES

Aapro M, Abrahamsson PA, Body JJ, Coleman RE, Colemer R, Costa L, et al: Guidance on the use of bisphosphonates in solid tumours: recommendations of an international expert panel. *Ann Oncol* 19: 420-432, 2008.

Aguirre JI, Plotkin LI, Stewart SA, Weinstein RS, Partiff AM, Manolagas S, et al: Osteocyte apoptosis induced by weightlessness in mice and precedes osteoclasts recruitment and bone loss. *J Bone Miner Res* 21: 605-615, 2006.

Anitua E, Zalduendo M, Trova M, Orive G: PRGF exerts a cytoprotective role in zoledronic acid-treated cells. *Clin Oral Investig* 20: 513-521, 2016.

Bagan JV, Jimenez Y, Diaz JM, Murillo J, Sanchis JM, Poveda R: Osteonecrosis of the jaws in intravenous bisphosphonate use: proposal for a modification of the clinical classification. *Oral Oncol* 45: 645-646, 2009.

Bagan J, Scully C, Sabater V, Jimenez Y: Osteonecrosis of the jaws in patients treated with intravenous bisphosphonates (BRONJ): A concise update. *Oral Oncol* 45: 551-554, 2009.

Benford HL, McGowan NW, Helfrich MH, Nuttall ME, Rogers MJ: Visualization of bisphosphonate-induced caspase-3 activity in apoptotic osteoclasts. *Bone* 28: 465-473, 2001.

Bonewald LF: Osteocytes as dynamic multifunctional cells. *Ann N Y Acad Sci* 1116: 281-290, 2007.

Cheung MS, Glorieux FH: Osteogenesis imperfect: update on presentation and

management. *Rev Endocr Metab Disord* 9: 153-160, 2008.

Coxon FP, Heldrich MH, Van't Hof R, Sebti S, Ralston SH, Hamilton A: Protein geranylgeranylation is required for osteoclast formation, function, and survival: inhibition by bisphosphonates and GGTI-298. *J Bone Miner Res* 15: 2467-1476, 2000.

Czeniskiewiz-Guik M, Konturek SJ, Loster B, Wisniewska G, Majewski S: Melatonin and its role in oxidative stress related diseases of oral cavity. *J Physiol Pharmacol* 58(Suppl. 3): 5-19, 2007.

Cuesta S, Kireev R, García C, Forman K, Escames G, Vara E, et al: Beneficial effect of melatonin treatment on inflammation, apoptosis and oxidative stress on pancreas of a senescence accelerated mice model. *Mech Ageing Dev* 132: 11-12, 2011.

Green JR: Chemical and biological prerequisites for novel bisphosphonate molecules: results of comparative preclinical studies. *Semin Oncol* 28(2 Suppl 6): 4-10, 2001.

Junquera L, Galleo L: Nonexposed bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws: another clinical variant?. *J Oral Maxillofac Surg* 66: 1516-1517, 2008.

Koch FP, Yekta SS, Merkel C, Ziebart T, Smeets R: The impact of bisphosphonates on the osteoblast proliferation and Collagen gene expression in vitro. *Head Face Med* 6: 12, 2010.

Koyama H, Nakade O, Takada Y, Kaku T, Lau KH: Melatonin at pharmacologic doses increases bone mass by suppressing resorption through down-regulation of the RANKL-mediated osteoclast formation and activation. *J Bone Miner Res* 17: 1219-1229, 2002.

Luchetti F, Canonico B, Bartolino D, Arcangeletti M, Ciffolilli S, Murdolo G, et al: Melatonin regulates mesenchymal stem cell differentiation: a review. *J Pineal Res* 56; 382-397, 2014.

Major PP, Coleman RE: Zoledronic acid in the treatment of hypercalcemia of malignancy: results of the international clinical development program. *Semin Oncol* 28: 17-24, 2001.

Marx RE: Pamidronate (Aredia) and Zoledronate (Zometa) induced avascular necrosis of the jaws: a growing epidemic. *J Oral Maxillofac Surg* 61; 1115-1117, 2003.

Marx RE, Sawatari Y, Fortin M, Broumand V: Bisphosphonate-induced exposed bone (osteonecrosis/osteopetrosis) of the jaws: risk factors, prevention, and treatment. *J Oral Maxillofac Surg* 63: 1567-1575, 2005.

Mark RE, Sawatari Y, Fortin M, Broumand V: Bisphosphonate-induced exposed bone (osteonecrosis/osteopetrosis) of the jaws: risk factors, recognition, prevention, and treatment. *J Oral Maxillofac Surg* 63: 1567-1575, 2005.

Mawardi H, Treister N, Richardson P, Anderson K, Munshi N, Faiella RA, et al: Sinus tracts – and early sign of bisphosphonate-associated osteonecrosis of the jaws?. *J Oral Maxillofac Surg* 67: 593-601, 2009.

Pieri C, Marra M, Moroni F, Recchioni R, Marcheselli F: Melatonin: a peroxy radical scavenger more effective than vitamin E. *Life Sci* 55: PL271-276, 1994.

Plotkin LI, Weinstein RS, Parfitt AM, Roberson PK, Manolagas SC, Bellido T: Prevention of osteocyte and osteoblast apoptosis by bisphosphonates and calcitonin. *J Clin Invest* 104: 1363-1374, 1999.

Plotkin LI, Manolagas SC, Bellido T: Dissociation of the pro-apoptotic effects of

bisphosphonateds on osteoclasts from their anti-apoptotic effects on osteoblasts/osteocytes with novel analogs. *Bone* 39: 443-452, 2006.

Radio NM, Doctor JS, Witt-Enderby PA: Melatonin enhances alkaline phosphatase activity in differentiating human adult mesenchymal stem cells grown in osteogenic medium via MT2 melatonin receptors and the MEK/ERK (1/2) signaling cascade. *J Pineal Res* 40: 332-342, 2006.

Rodríguez-Lozano FJ, García-Bernal D, Ros-Roca Mde L, Algueró Mdel C, Oñate-Sánchez RE, Camacho-Alonso F, et al: Cytoprotective effect of melatonin on zoledronic acid-treated human mesenchymal stem cells in vitro. *J Craniomaxillofac Surg* 43: 855-862, 2015.

Rogers MJ: New insights into the molecular mechanisms of action of bisphosphonates. *Curr Pharm Des* 9: 2643-58, 2003.

Roth JA, Kim BG, Lin WL, Cho MI: Melatonin promotes osteoblast differentiation and bone formation. *J Biol Chem* 274: 22041-22047, 1999.

Ruggiero SL: Emerging concepts in the management and treatment of osteonecrosis of the jaw. *Oral Maxillofac Surg Clin North Am* 25: 11-20, 2013.

Ruggiero SL, Dodson TB, Fantasia J, Goodday R, Aghaloo T, Mehrotra B, et al: American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons position paper on medication –related osteonecrosis of the jaw--2014 update. *J Oral Maxillofac Surg* 72: 1938-1956, 2014.

Sánchez A, Calpena AC, Clares B: Evaluating the Oxidative Stress in Inflammation: Role of Melatonin. *Int J Mol Sci* 16: 16981-7004, 2015.

Stumpe MR, Chandra RK, Yunus F, Samant S: Incidence and risk factors of bisphosphonate-associated osteonecrosis of the jaws. *Head Neck* 31: 202-206, 2009.

Walter C, Pabst A, Ziebart T, Klein M, Al-Nawas B: Bisphosphonates affect migration ability and cell viability of HUVEC, fibroblasts and osteoblasts in vitro. *Oral Dis* 17: 194-199, 2011.

