



ARTÍCULOS ORIGINALES / Originals

DESARROLLO DE UN MODELO EXPERIMENTAL DE OSTEONECROSIS DE MAXILAR ASOCIADA AL TRATAMIENTO CRÓNICO CON AMINOBISFOSFONATOS

Mario Ricardo Davison,¹ Leonardo Lyardet,¹ Mariana Preliasco,¹ Graciela Yaful,² Perla Torres,² Francisco Durán,³ Gretel Gisela Pellegrini,³ Walther Zabala,⁴ Susana Noemí Zeni.^{3*}

¹Facultad de Odontología y ²Facultad de Veterinaria. Universidad Nacional de Río Negro. ³Laboratorio de Osteopatías Médicas. Hospital de Clínicas. INIGEM (CONICET-UBA). ⁴Cátedra de Histología, Facultad de Odontología, Universidad de Cuyo.

Resumen

La osteonecrosis de maxilar asociada a aminobisfosfonatos (BRONJ) constituye un efecto secundario del tratamiento crónico con los más potentes. Un modelo experimental permitiría determinar la patogenia de dicha alteración. La oveja presenta características orales y del metabolismo óseo similar al humano y permite realizar manipulaciones bucales. Se evaluaron cambios clínicos, remodelación ósea y masa ósea maxilar en ovejas hembras adultas tratadas con zolendronato (ZOL), durante 22 meses y utilizando dosis equivalente al tratamiento de neoplasias. Seis ovariectomizadas (OVX) recibieron ZOL; 5 OVX y 4 SHAM (control) recibieron solución fisiológica. Al inicio, 4 y 22 meses se evaluó calcemia, fosfatemia, *crosslaps* (CTX) y fosfatasa alcalina ósea. Al final, se evaluó contenido mineral óseo de la hemimandíbula superior (CMO: mg/cm²). Al final del estudio, CTX disminuyó significativamente en ZOL ($p < 0,05$) sin diferencias entre SHAM y OVX. En maxilar, los contenidos de Ca y P (g/g tejido) y CMO (g/cm²) disminuyeron en OVX vs. SHAM ($p < 0,05$) y solo Ca y CMO respecto de ZOL ($p < 0,05$). ZOL incrementó el contenido

de Ca y CMO, mientras que el de P permaneció significativamente disminuido respecto de SHAM. La sobrevida en SHAM y OVX fue del 100% y en ZOL 77% (2 muertes); 2 ovejas del grupo ZOL presentaron necrosis de maxilar. Conclusiones: fue posible obtener desarrollo de BRONJ por tratamiento crónico con ZOL, el cual redujo notablemente la resorción y, según la relación Ca/P, posiblemente haya afectado la mineralización ósea. **Palabras clave:** osteonecrosis de maxilar asociada a bisfosfonatos, ovejas, ácido zolendrónico, remodelación ósea, crosslaps.

Abstract

EXPERIMENTAL MODEL OF OSTEONECROSIS OF THE JAW ASSOCIATED TO CHRONIC TREATMENT WITH AMINOBISPHOSPHONATES

Bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw (BRONJ) is a complication of chronic treatment with the most powerful aminobisphosphonates (BPs). An experimental animal model would allow to determine the pathogenesis of this complication. Ewes ex-

*E-mail: snzeni@hotmail.com

hibit similar oral cavity characteristics and bone metabolism as humans, and they are suitable for oral cavity interventions. We examined herein the clinical manifestations, bone remodeling status, and maxillary bone mass in adult female ewes treated with zoledronate (ZOL) for 22 months. Six ovariectomized (OVX) ewes received ZOL; and 5 OVX and 4 SHAM animals received saline solution. At the start of the experiment, and at the 4 and 22 month-time points serum Ca, P, crosslaps (CTX), and bone alkaline phosphatase were measured. Bone mineral content (BMC) of the superior hemimandible was measured at the end of the experiment. At this time point, CTX was significantly decreased only in the ZOL group ($p < 0.05$). Ca and P content (g/g tissue) and BMC in the mandible were significantly decreased in

the OVX group compared to SHAM animals ($p < 0.05$) and only Ca content and BMC were decreased when compared to ZOL ($p < 0.05$). ZOL treatment increased the Ca content and BMC, whereas the P content remained low compared to the SHAM group ($p < 0.05$). All ewes from the SHAM and OVX groups and 77% of the animals from the ZOL group survived until the end of the experiment, whereas two ewes of ZOL group exhibited BRONJ. Conclusion: under our experimental conditions, it was possible to induce BRONJ by the chronic ZOL administration, which in turn induced a high reduction in bone resorption as well as possibly impaired bone mineralization, based on the Ca/P ratio in the mandible. **Key words:** bisphosphonates related osteonecrosis of the jaw, sheep, zoledronic acid, bone remodeling, crosslaps.

Introducción

Los bisfosfonatos (BP), análogos del pirofosfato, constituyen los principales agentes anticatabólicos utilizados en el tratamiento de las patologías óseas caracterizadas por una excesiva resorción osteoclástica. En este sentido se utilizan como terapia en osteoporosis posmenopáusica y enfermedad de Paget, y en el tratamiento de neoplasias tales como hipercalcemias tumorales o asociadas a metástasis óseas. Por su estructura presentan una gran avidéz por la fase mineral de hidroxapatita, a la que se unen en los sitios metabólicamente activos, suprimiendo la actividad osteoclástica.¹ La potencia farmacológica de los BP varía enormemente; en la actualidad, el ácido zoledrónico (ZOL) es el que presenta mayor potencia relativa, por lo cual, una vez incorporado al hueso, puede persistir en él hasta 10 años.² El uso crónico de dichos fármacos, especialmente los más potentes,

ha dado lugar a efectos colaterales negativos como la osteonecrosis de maxilar asociada al tratamiento crónico con BP (de sus siglas en inglés: BRONJ). Su frecuente localización podría deberse al estrés fisiológico al que se encuentra sometida dicha área ya que el maxilar, respecto del resto de los huesos del organismo, es una región particularmente susceptible de acumular BP. Este efecto se debe al hecho de que la remodelación ósea en maxilar es aproximadamente 10 veces más rápida que la que se produce en los huesos largos del esqueleto.³ Por otra parte, la fuerza masticatoria somete a los huesos maxilares a frecuentes microtraumatismos, lo cual estimula la remodelación.⁴ Asimismo, las manipulaciones dentales producen un microambiente único en el sentido de que se expone hueso al medio externo en presencia de una microflora oral que podría contribuir al desarrollo de infecciones. Los BP también afectan



el funcionamiento de las células epiteliales y de aquellas implicadas en la respuesta inmunitaria (p. ej., macrófagos y otras células del sistema inmunitario).⁵ Si bien el mecanismo patológico no está aún dilucidado, se postula que la pronunciada disminución de la remodelación ósea y la acción antiangiogénica de dichas drogas, junto a las manipulaciones dentales y el efecto sobre la respuesta inmunitaria, serían factores de riesgo que contribuirían al desarrollo de BRONJ.⁶

El estudio de la etiología de BRONJ en los seres humanos es complicado debido a la existencia de factores confundidores que usualmente son irrelevantes en modelos animales. Estos últimos proporcionan un material experimental uniforme y, si bien existen modelos de BRONJ, en la mayoría, si no en todos ellos, los animales no solo fueron expuestos a BP sino también a otros fármacos como glucocorticoides, lo cual puede adicionar factores de riesgo para dicha patología.⁷⁻⁹

La oveja es un animal mediano, dócil, fácil de mantener y manejar y relativamente barato comparado con otros animales del mismo tamaño. Dichos animales son aceptados como modelo experimental en el estudio de múltiples aspectos relacionados con la investigación del metabolismo óseo, por el hecho de presentar similitudes con el ser humano en cuanto a peso, tamaño y características mecánicas del esqueleto. Además es posible obtener una cantidad suficiente de muestras biológicas como sangre y orina y pueden realizarse múltiples extracciones de biopsias de cresta ilíaca.¹⁰ Otros factores hacen también efectivo su uso en el estudio de patologías orales. En este sentido, la oveja presenta molares y premolares y desarrolla periodontitis por bacterias orales patógenas similares a las del ser humano, y el maxilar es lo suficientemente grande como para permitir procedimientos quirúrgicos.^{11,12}

La hipótesis del presente estudio utilizando ZOL como monoterapia fue que los cambios orales que pudieran producirse se deberían

exclusivamente al efecto del tratamiento con el BP. En el presente estudio experimental se replicaron en ovejas hembras varios de los factores de riesgo asociados a los reportes clínicos de BRONJ: pérdida de masa ósea por caída en los niveles estrogénicos, administración intravenosa de un BP con elevada potencia relativa por un largo período de tiempo y manipulación oral por extracción dentaria. El objetivo fue evaluar la posibilidad de desarrollar BRONJ debido a la acumulación de BP en forma espontánea o por manipulaciones orales (extracción dental), tratando de dilucidar alguno de los mecanismos implicados en el desarrollo de la patología ósea, que preocupa a odontólogos y profesionales de la salud en general.

Materiales y métodos

Fármacos

El ácido zoledrónico (ZOL) fue gentilmente provisto por Gador Argentina (S.A.). Las dosis suministradas fueron equivalentes a las que se utilizan en estudios clínicos para el tratamiento de pacientes con mieloma.¹³ Una dosis mensual de 4 mg ZOL (equivalente a 66 µg/kg para un peso corporal de 60 kg) fue administrada en ayunas por inyección en la vena yugular. No se utilizaron supresores del sistema inmunitario ni ninguna otra droga que pudiera afectar el desarrollo de BRONJ.

La lidocaína al 2% se utilizó como suplemento de anestesia local para realizar la extracción dental solo en el caso de que fuera necesario.

Para realizar los procedimientos quirúrgicos se indujo anestesia general mediante inyección intramuscular de ketamina y xylacina (100 mg/kg y 5 mg/kg, respectivamente) (Holliday Scout S.A., Buenos Aires, Argentina), siguiendo el protocolo estandarizado para este tipo de intervención.¹⁴ Asimismo, en el proceso posoperatorio se utilizaron antibióticos en forma subcutánea (ampicilina, 12,5 mg/kg) y, cuando fue necesario, un analgésico para controlar el dolor

Animales

Se utilizaron 15 ovejas hembras adultas sanas de raza Corriedale, de la zona del Valle Medio, Río Negro, con una edad comprendida entre 3 y 5 años y un peso aproximado de 30 a 45 kg. Se ubicaron en la Chacra Experimental de la Universidad Nacional de Río Negro y se mantuvieron bajo condiciones extensivas. El agua y la alimentación fue suministrada "ad libitum", utilizando una dieta a base de pasturas coasociadas de alfalfa, gramíneas y agropiro para cubrir todos los requerimientos nutricionales de dichos animales.

En el presente estudio se observaron los lineamientos estándares aceptados, siguiendo las normas para el cuidado y uso de animales de experimentación en concordancia con las Guías Éticas Internacionales. Los animales fueron mantenidos, examinados y luego sacrificados por veterinarios autorizados para el manejo de animales por el Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria (SENASA), los que se encuentran regulados bajo estrictas normas sanitarias ambientales.

Diseño experimental

Con el objeto de disminuir los niveles estrogénicos y provocar osteopenia, 11 animales fueron sometidos a una ovariectomía (OVX) bilateral bajo anestesia general con monitorización cardíaca y respiratoria. Una vez que los ovarios fueron localizados, se los removió. Al resto de los animales (n=4) se les practicó una operación simulada (SHAM) y se los utilizó como control; los oviductos fueron ligados para prevenir embarazos accidentales durante el estudio. Para acceder al tracto reproductivo, el equipo de veterinarios practicó a cada animal una laparotomía en el flanco izquierdo.

Al segundo día poscirugía, los animales fueron divididos en grupos y tratados de acuerdo con el esquema siguiente:

1. OVX: animales OVX que recibieron solución fisiológica (SF) (n=5)
2. ZOL: animales OVX que recibieron ácido zoledrónico (n=6)

3. SHAM: animales controles SHAM que recibieron SF (n=4).

En ayunas y antes de la infusión de ZOL o SF se extrajo sangre de la vena yugular en forma mensual durante los primeros 6 meses de tratamiento y luego a intervalos de 3 meses. A los 12 meses a todos los animales se les realizó la exodoncia del 1.º molar superior bajo anestesia general.

El estudio continuó hasta los 22 meses cuando todos los animales fueron sacrificados por los veterinarios autorizados por el SENASA, siguiendo las guías de buenas prácticas experimentales. Al sacrificio se extrajeron los maxilares y las tibias a las cuales se les practicó Rx en el sitio de extracción del diente y, a ambas, densitometría ósea.

Metodología empleada

Evaluación clínica, peso corporal, estado dental y examen periodontal

La evaluación clínica fue llevada a cabo cada 3 días por el equipo de veterinarios, mientras que el peso corporal fue controlado semanalmente. En dicha evaluación se tomaron en cuenta el estado general y los cambios clínicos producidos en la mucosa oral, así como la posible pérdida de piezas dentarias.

Los secuestros óseos y el desarrollo de osteonecrosis fueron confirmados por odontólogos y patólogos veterinarios de la Universidad. Las evaluaciones odontológicas se realizaron macroscópicamente en forma trimestral hasta la exodoncia del primer molar y luego mensualmente hasta la finalización del estudio. Se adaptó la clasificación de Ruggiero y col. para determinar la presencia y estadio de BRONJ en los animales de experimentación utilizados en este estudio: estadio 0: falta de exposición de hueso necrótico pero presencia al final del estudio de cambios radiográficos tales como procesos apicales y secuestros óseos; estadio 1: hueso expuesto o necrótico o fístulas que lleguen al hueso sin signos de infección; estadio 2: hueso expuesto



o necrótico o fistulas que lleguen al hueso asociadas a infección evidente y eritema en la región de hueso expuesto con o sin drenaje purulento o signos de infección, y estadio 3: hueso expuesto o necrótico o fistulas que lleguen al hueso asociadas a infección evidente y eritema en la región de hueso expuesto con signos de infección y más de 1 de los siguientes hallazgos: hueso expuesto o necrótico con una extensión más allá de la región del hueso alveolar, fistula extraoral, osteólisis que se extiende al borde inferior del maxilar o piso de seno.¹⁵

Densitometría ósea

La densitometría de los maxilares se determinó "ex vivo" al final de la experiencia utilizando un densitómetro Lunar DPX Alfa, radiación Lunar Corp.[®], Madison, WI, Estados Unidos), provisto de un software para pequeños animales. Se evaluó el contenido mineral óseo (g/cm²).

Todas los maxilares fueron analizadas utilizando el mismo tipo de exploración. La precisión del software fue evaluada por la medición de un mismo maxilar cinco veces con reposición entre dos exploraciones en el mismo día. El coeficiente de variación del contenido mineral óseo (CMO) (g/cm²) fue del 3%.

Histología de cresta ilíaca

A los 4 meses y al final de la experiencia se realizó una biopsia de cresta ilíaca bajo condiciones estandarizadas. Cada biopsia ósea fue extraída con un sacabocado conformando una forma cilíndrica de 8 mm de diámetro. La biopsia se llevó a cabo a 1,5 cm del borde de la cresta ilíaca y a 2,5 cm del borde lateral de dicha cresta ilíaca. El material extraído fue procesado de acuerdo con los estándares actuales para lo cual fue fijado en formol *buffer* y descalcificado en EDTA 10% para su posterior inclusión en parafina. En cortes coloreados con hematoxilina-eosina y en un área determinada de hueso esponjoso se evaluó el volumen óseo (VO/VT) (%) como porcentaje

de tejido óseo en relación con el volumen total.

Determinaciones bioquímicas

En suero se evaluó calcemia por espectrofotometría de absorción atómica, a 423 nm, empleando cloruro de lantano (concentración de 6500 ppm) como supresor de interferencias. El equipo utilizado para la medición fue un espectrofotómetro de absorción atómica GBC 902 de doble haz con llama de aire-acetileno. El coeficiente de variación (CV) intraensayo fue de 0,9% y el interensayo de 1,2%. La fosfatemia se evaluó por colorimetría UV a 420 nm utilizando un ensayo comercial (BioSystems, Argentina), evaluando el desarrollo de color con un espectrofotómetro UV visible Metrolab 2100[®]. El CV intrasensayo fue de 1,3% y el CV interensayo de 2,9%. La fosfatasa alcalina ósea (FAO) se midió mediante un ensayo comercial (Fosfatasas Alcalinas, Wiener optimizado) previa precipitación de la isoforma ósea con lectina de germen de trigo, por espectrofotometría a 520 nm. La reactividad cruzada con la isoforma fosfatasa alcalina hepática fue inferior al 5%. Los CV intraensayo e interensayo fueron de 4-8% y 6-8%, respectivamente.

El telopéptido C-terminal del colágeno tipo I (β CTX) fue determinado mediante un inmunoensayo de competición proteica (Crosslaps, Nordic Bioscience Diagnostics A/S[®]). Dicho método es específico para el octapéptido del telopéptido C terminal de la cadena α 1 del colágeno tipo I (glu-lis-ala-his-aspgli-gli-arg = péptido CTX). La absorbancia se midió mediante un lector de microplacas (Microplate reader Metrolab 980[®]) a 450 nm. El límite de detección fue de 2,0 ng/ml. El CV intraensayo fue de 5,6 al 9,2% y el CV interensayo entre 10,5 y 14,8%.¹⁶

Estudios radiográficos

Al final del estudio se realizó una radiografía panorámica de la hemimandíbula izquierda de cada uno de los animales utilizando un equipo odontológico de Rx.

Análisis estadístico

Los datos se expresaron como media \pm error estándar (desvío estándar) o mediana, máximos o mínimos según la distribución de las muestras. La normalidad y la homogeneidad de las varianzas fueron evaluadas por la prueba de Kolmogorov-Smirnov y la de Levene, respectivamente. Los datos fueron analizados estadísticamente mediante ANOVA de un factor utilizando la prueba "ad hoc" de comparaciones múltiples para demostrar diferencias significativas entre los grupos. Para todos los análisis se utilizó el programa estadístico SPSS® (SPSS para Windows, 8.^a versión), considerando que dos muestras son diferentes cuando el valor de p fue $<0,05$.

Resultados

Examen clínico y análisis antropométricos

En los animales SHAM y OVX, la sobrevida fue del 100% mientras que en el grupo tratado con ZOL fue del 77% (4/6). La muerte de las dos ovejas ocurrió durante el último mes de la experiencia, en un caso por insuficiencia renal y en el otro por diarrea. El estado cianótico de las mucosas se incrementó en el siguiente orden: SHAM $<$ OVX $<$ ZOL (Tabla 1). En todos los animales de los grupos SHAM y OVX, la cicatrización en el sitio de extracción dentaria fue normal y luego de la intervención no se observó ulceración, hueso expuesto ni signos inflamatorios en el sitio de extracción o en otra región del maxilar. Contrariamente, en todos los animales

Tabla 1. Signos clínicos y datos antropométricos

	SHAM	OVX	ZOL
Peso corporal inicial (kg)	33 \pm 2	34 \pm 4	35 \pm 2
Peso corporal final (kg)	30 \pm 6	31 \pm 5	33 \pm 4
Peso de maxilar (g)	161,4 \pm 8,6	142,8 \pm 1,2**	185,1 \pm 9,7*,**
Mucosa cianótica (al año)	-	-/+	++
Sobrevida	100%	100%	77%
Necrosis de mandíbula	NO	NO	SÍ (2/6)

(*) : p $<$ 0,05 comparado con el grupo OVX+Vh (**) : p $<$ 0,05 comparado con el grupo SHAM.

del grupo ZOL existió un retraso en la cicatrización en el sitio de extracción dentaria; asimismo, signos inflamatorios y hueso necrótico por infección con especies de *Actinomyces* se observaron en 2/6 ovejas del grupo ZOL (33%) (véase Tabla 1). Respecto de los signos inflamatorios, es importante mencionar que solo pudieron evidenciarse luego del cuarto mes de realizadas las manipulaciones odontológicas. Asimismo, la presencia de hueso expuesto se observa en la figura 1. Por otra parte, la comparación de Rx panorámica realizada al final del estudio con la fotografía correspondiente mostró resultados compatibles (Figuras 1 y 2 C). En este sentido, si bien radiográficamente

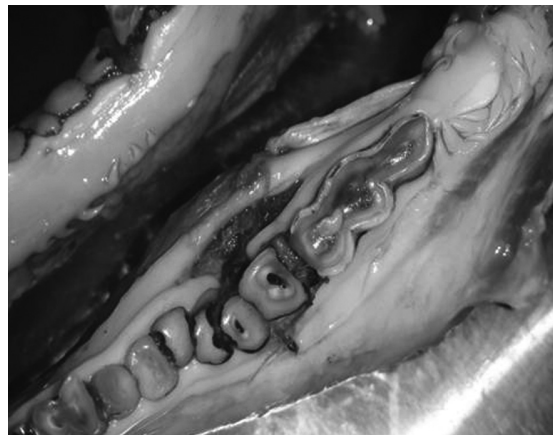


Figura 1. Foto del maxilar de las ovejas en la cual se observa la presencia de hueso expuesto e infección por *Actinomyces spp.*



no se pueden evaluar las corticales lingual y vestibular, se observa un comportamiento normal tanto en los animales SHAM como OVX, mientras que el análisis correspondiente a los animales con BRONJ mostraron un proceso apical que envuelve a los 3 molares inferiores, con disrupción de las corticales alveolares.

No se observaron diferencias en el peso corporal (PC) entre los tres grupos estudiados, tanto al inicio como al final del estudio. Al final del estudio, el peso del maxilar fue significativamente menor en el grupo OVX ($142,8 \pm 1,2$) ($p < 0,05$), sin diferencias entre los grupos SHAM y ZOL ($161,4 \pm 8,6$ y $180,1 \pm 9,7$) (véase Tabla 1).

Análisis bioquímicos

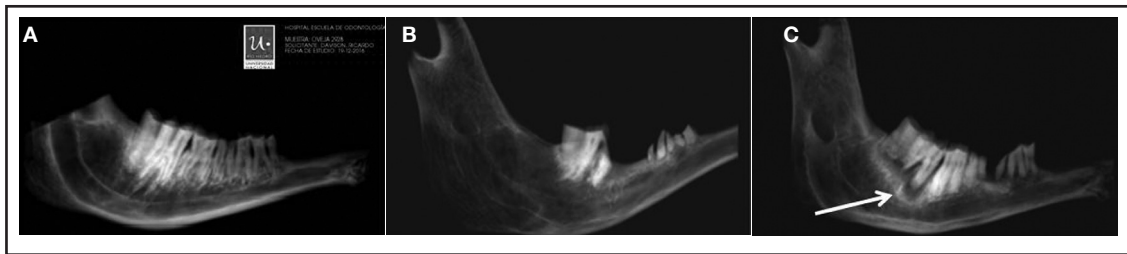
Todos los grupos presentaron similares valores bioquímicos al inicio del estudio, mientras que algunas diferencias significativas fueron observadas al 4.º mes de tratamiento y al final del estudio (Tabla 2). En los tres grupos, los niveles de Ca sérico (sCa) disminuyeron significativamente comparados con los niveles basales ($p < 0,05$), sin diferencias entre los 3 grupos al final de la experiencia. Los niveles de fosfatemia (P) se

incrementaron significativamente en el grupo OVX al 4.º mes de tratamiento, comparados tanto con los niveles basales como con los otros 2 grupos estudiados ($p < 0,05$). El P no mostró diferencias entre los grupos SHAM y ZOL al 4.º mes ni entre los tres grupos estudiados al final del estudio. En los tres grupos, los niveles de FAO mostraron una tendencia a ser menores al final del estudio, sin observarse diferencias significativas entre los distintos grupos (Tabla 2). Los niveles de CTX se incrementaron en los animales OVX al 4.º mes comparados tanto con los niveles basales como respecto de los otros dos grupos ($p < 0,05$); asimismo, los niveles de CTX del grupo OVX mostraron una reducción significativa al final del estudio comparados con el 4.º mes, aunque permanecieron significativamente mayores que los niveles basales ($p < 0,05$). Los niveles CTX disminuyeron significativamente en forma progresiva en el grupo de animales ZOL ($p < 0,05$). Al final de la experiencia, los niveles de CTX fueron significativamente menores en el grupo ZOL frente a los de los grupos SHAM y OVX ($p < 0,05$), los que no mostraron diferencias entre ellos.

Tabla 2. Determinaciones bioquímicas durante el estudio

	Basal	Al 4.o mes	Al final
Calcio sérico (mg/dl)			
SHAM	$9,7 \pm 0,1$	$9,5 \pm 0,2$	$9,2 \pm 0,3^*$
OVX	$9,1 \pm 0,3$	$9,4 \pm 0,2$	$8,9 \pm 0,4^*$
ZOL	$9,2 \pm 0,4$	$9,1 \pm 0,3$	$8,9 \pm 0,3^*$
Fosfato sérico (mg/dl)			
SHAM	$4,1 \pm 0,4$	$3,9 \pm 0,2$	$4,3 \pm 0,4$
OVX	$4,6 \pm 0,3$	$5,6 \pm 0,3^{***,***}$	$4,0 \pm 0,4\#$
ZOL	$4,7 \pm 0,5$	$4,9 \pm 0,2$	$4,0 \pm 0,2$
Fosfatasa alcalina ósea (mg/dL)			
SHAM	$66,0 \pm 4,2$	$64,7 \pm 9,2$	$51,5 \pm 3,1\#$
OVX	$65,0 \pm 4,7$	$69,3 \pm 5,1$	$58,3 \pm 0,6\#$
ZOL	$62,3 \pm 3,6$	$58,4 \pm 2,9$	$50,8 \pm 3,4\#$

(*) : $p < 0,05$ comparado con los niveles basales; (**) : $p < 0,05$ comparado con el grupo control; (***) : $p < 0,05$ comparado con el grupo ZOL (#) : $p < 0,05$ final vs. 4.o mes de tratamiento.



Figuras 2 A, B y C. Radiografías panorámicas correspondientes al maxilar inferior izquierdo de ovejas pertenecientes a los grupos SHAM (A), OVX (B) y tratada con ZOL (C). La flecha en la figura 2C señala el proceso apical.

Análisis en maxilar

Al 4.º mes de estudio, los porcentajes de Ca y P (g/100 g de tejido) fueron similares en OVX y ZOL, los que a su vez fueron significativamente menores que en el grupo control ($p < 0,05$). Al final del estudio, el contenido Ca y P (g/100 g de hueso) del maxilar del grupo OVX fue significativamente menor ($p < 0,05$) respecto del grupo control y solo el contenido de Ca respecto del grupo ZOL. El contenido de Ca fue significativamente mayor y el de P significativamente menor en el grupo ZOL respecto del control (Figura 3). La relación Ca/P en maxilar no mostró diferencias a los 4 meses; sin embargo, al final de la experiencia la relación fue similar en los gru-

pos OVX y control ($1,49 \pm 0,28$ y $1,41 \pm 0,34$, respectivamente), los cuales resultaron significativamente menores que en el grupo ZOL ($1,65 \pm 0,35$) ($p < 0,05$).

El CMO (mg/cm^2) en la hemimandíbula del grupo OVX fue significativamente menor, mientras que el del grupo ZOL fue significativamente mayor que el observado en los animales SHAM ($p < 0,05$) (Figura 4).

Los valores de VO/VT% a los 4 meses no presentaron diferencias entre los grupos estudiados. Al final de la experiencia el VO/VT% de los grupos SHAM y OVX fue significativamente menor que en el grupo ZOL (48 ± 5 y 47 ± 9 vs. 57 ± 7 , respectivamente; $p < 0,05$).

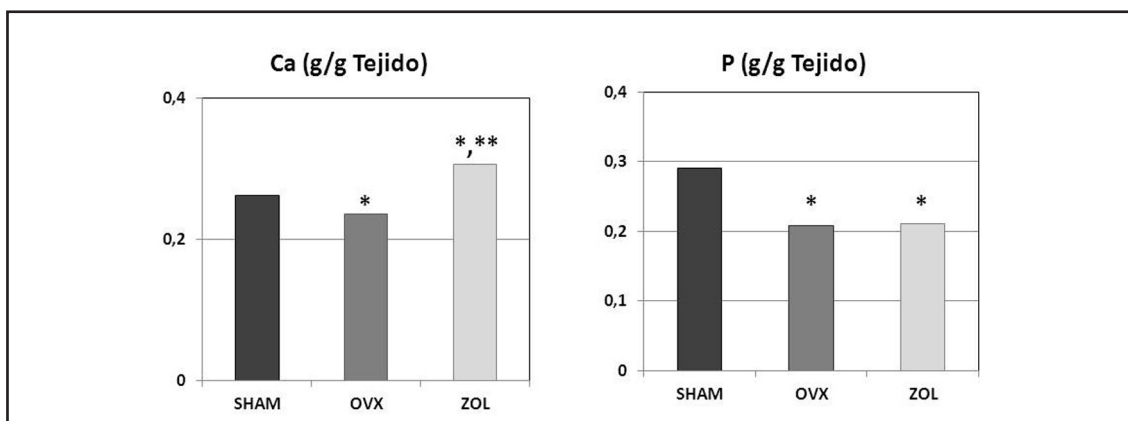


Figura 3. Contenido de Ca y P en maxilar al final del estudio.

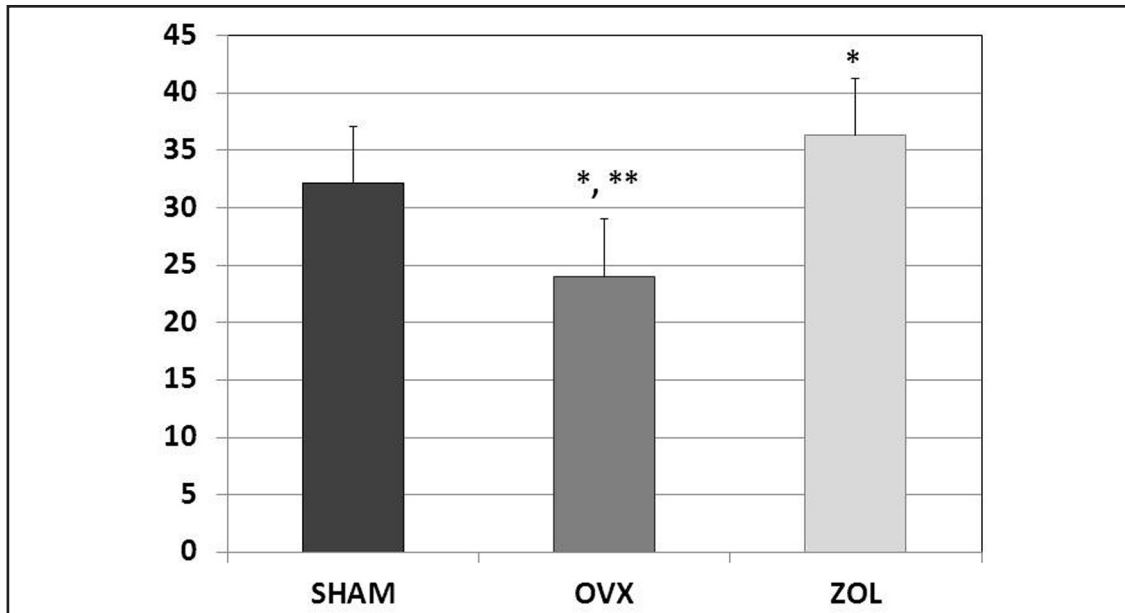


Figura 4. Contenido mineral óseo en la hemimandíbula izquierda por DXA "ex vivo". mg/cm².

Discusión

El tratamiento con BP para osteoporosis y otras patologías óseas es actualmente el de elección. Sin embargo, en los últimos años se han desencadenado efectos secundarios, entre los que se encuentra BRONJ, por el tratamiento crónico con BP, especialmente los más potentes. A pesar de las numerosas publicaciones que asocian los BP con la ONJ, el papel exacto de dichos fármacos en la patofisiología de tal condición aún permanece sin clarificar.¹⁷

La mayoría de los casos de BRONJ fueron inicialmente documentados en pacientes que recibían altas dosis de BP por vía endovenosa para el tratamiento/prevenición de neoplasias.¹⁸ Si bien la incidencia es hasta el momento escasa, se debe recordar que los BP son los fármacos antirresortivos que con mayor frecuencia se utilizan para el tratamiento de la osteoporosis. En consecuencia, dicha incidencia posiblemente aumente en el futuro, a medida que transcurra el tiempo, ya que uno de los factores implicados en el desarrollo de tales efectos negativos está relacionado con la duración del tratamiento con BP. En este

sentido, se ha documentado que existe un número creciente de casos de BRONJ en pacientes tratados con BP por osteoporosis.^{7,19}

Los modelos animales son útiles para entender varios aspectos del mecanismo patológico de BRONJ, así como para establecer estrategias de prevención y tratamiento. Los modelos deberían indefectiblemente mimetizar la presentación clínica de dicho efecto secundario. La mayoría de las investigaciones en este campo han sido realizadas en ratas. Aunque dichos roedores son menos costosos y más fáciles de mantener, tienen varias desventajas. Una de ellas es que comúnmente existen cofactores adicionales en el desarrollo de BRONJ, que incluyen traumatismos dentales y enfermedad periodontal. En este sentido, la rata es demasiado pequeña como para llevar a cabo intervenciones orales, y los animales adultos, además, desarrollan cementosis, el hueso cortical no contiene sistema harversiano y no presentan recambio intracortical, el cual desempeñaría un papel importante en el desarrollo de BRONJ. La oveja es un animal mediano que presenta varias ventajas: genéticamente está más cercano al ser humano que

los roedores; la tasa metabólica es similar a la del hombre, presenta remodelación haversiana y, como la mujer, la oveja tiene menarca y ciclos ovulatorios frecuentes y regulares.²⁰ El metabolismo óseo de la oveja OVX se asemeja al de la mujer durante los primeros años de la menopausia y los productos de la actividad osteoblástica y osteoclástica (p. ej., osteocalcina, CTX) están claramente definidos. Respecto de la cavidad oral, la pérdida de hueso que se produce por OVX se acompaña de pérdida de hueso oral; además, las ovejas desarrollan periodontitis y, especialmente, son lo suficientemente grandes como para realizarles intervenciones odontológicas.^{7,10-12}

En la literatura se pueden encontrar varios modelos de BRONJ tanto en animales pequeños (roedores) como en animales medianos (perros, cerdos mini y ovejas); sin embargo, en todos ellos –a excepción de uno que no lo especifica fehacientemente–²¹ se coadministraron otros fármacos que adicionalmente podrían haber contribuido a aumentar la incidencia de BRONJ. El presente modelo experimental evaluó específicamente el papel del ZOL como monodroga, en los cambios asociados en la cavidad oral que pudieran producirse, al utilizar un esquema clínico similar al usado en pacientes oncológicos.¹³ Si bien no todos los animales desarrollaron BRONJ, pudo determinarse su presencia en dos de los animales tratados por largo tiempo con ZOL. El hecho de que ciertos animales desarrollaran BRONJ y otros no podría ser explicado por la susceptibilidad o resistencia individual al desarrollo de dicha patología o por diferencias genéticas en la homeostasis ósea en las diferentes ovejas, tal cual lo observado en los seres humanos. Es importante señalar que se observó BRONJ en maxilar, sitio de la cavidad oral donde no se efectuaron manipulaciones dentales previamente debido a que la extracción dentaria fue realizada en el maxilar superior. Por otra parte, la ausencia de dicha patología en los otros dos grupos que no recibieron BP sugiere un papel direc-

to del tratamiento con BP sobre la necrosis observada en la cavidad oral.

La patofisiología exacta del desarrollo de BRONJ aparenta ser multifactorial.²² La disminución del recambio óseo sería el mecanismo principal a través del cual los BP ejercen su efecto biológico. Esto determina que la supresión de la remodelación intracortical sería uno de los factores principales implicados en el desarrollo de BRONJ. Además del efecto de los BP sobre el *turnover* óseo, se debe recordar que el hueso alveolar presenta una mínima cobertura de mucosa para separar la cavidad oral de las bacterias allí presentes. Por lo cual, la extracción dentaria, la profundidad de caries, el traumatismo y la enfermedad periodontal son capaces de permitir que los patógenos alcancen la superficie del hueso y causen infecciones, tales como las comúnmente observadas en BRONJ.²³ Todos estos factores de riesgo podrían contribuir al desarrollo de BRONJ. En el presente estudio, los cambios observados en la cavidad oral durante el período experimental sugieren cierto grado de toxicidad. El examen local revela un retraso en la epiteliización completa del sitio de extracción dental en aquellos animales tratados con ZOL comparados con los otros dos grupos; sin embargo, no se observaron diferencias al final del estudio debido a la larga duración de la experiencia. Además, el epitelio gingival mostró un alto grado de inflamación al compararlo con los otros grupos que permanecieron al final del estudio, y más importante aún fue el hecho de que se observaron signos de hueso expuesto en 2 de los 6 animales tratados con ZOL, similar a BRONJ. Asimismo, dicha alteración presentaba infección con *Actinomyces*. La patología aquí estudiada se desarrolló en maxilar sin observarse signos de necrosis en otra región del esqueleto. El porqué del desarrollo de BRONJ en el maxilar podría ser explicado por varias razones. Dicho sitio y el hueso alveolar presentan una velocidad de recambio óseo varias veces superior al del resto



del esqueleto, lo cual implica una recaptación aumentada de BP.⁸ La aceleración de la remodelación podría, a su vez, aumentar la concentración en el epitelio oral a una suficiente como para generar efectos tóxicos.

La supresión del recambio en los animales tratados con ZOL ha sido confirmada en el presente estudio. El CTX es considerado en la actualidad como el biomarcador más específico y sensible para evaluar cambios en la resorción osteoclástica.²⁴ En concordancia con este hallazgo, tanto el contenido mineral como la biopsia de cresta ilíaca en el grupo ZOL evidenciaron niveles varias veces superiores al observado tanto en animales OVX no tratados como en los controles SHAM. Esta mayor masa ósea se acompañó de una posible alteración en el proceso de mineralización, ya que la relación Ca/P del grupo ZOL fue superior al de los otros dos grupos.

Conclusiones

Teniendo en cuenta los resultados del presente estudio, dentro del contexto de su diseño se observaron cambios sistémicos y orales del metabolismo óseo por el tratamiento con

ZOL en un esquema de dosis similar al que rutinariamente se realiza a los pacientes con cáncer. A pesar de que algunos aspectos del desarrollo de BRONJ deberían ser confirmados, los resultados de este estudio muestran la factibilidad de utilizar un modelo experimental en animales medianos para evaluar la patogenia de BRONJ asociada al tratamiento con bisfosfonatos.

Agradecimientos

Las determinaciones bioquímicas fueron realizadas por la técnica de laboratorio Julia Somoza y las densitometrías por el técnico de Bioterio Ricardo Orzuza. Este estudio es parte de la tesis de doctorado del odontólogo Mario R. Davison (Universidad Nacional de Cuyo). El estudio ha sido parcialmente subsidiado por el CONICET y por el PICTO 2010-0181.

Conflicto de intereses: los autores no tienen conflicto de intereses que declarar.

Recibido: agosto 2016.

Aceptado: abril 2017.

Referencias

1. Russell RG, Watts NB, Ebtino FH, Rogers MJ. Mechanisms of action of bisphosphonates: similarities and differences and their potential influence on clinical efficacy. *Osteoporos Int* 2008; 19:733-59.
2. Cheng A, Daly CG, Logan RM, Stein B, Goss AN. Alveolar bone and the bisphosphonates. *Aust Dent J* 2009; 54 (Suppl 1):S51-61.
3. Wen D, Qing L, Harrison G, Golub E, Akintoye SO. Anatomic site variability in rat skeletal uptake and desorption of fluorescently labeled bisphosphonate. *Oral Dis* 2011; 17(4):427-32.
4. Huja SS, Fernandez SA, Hill KJ, et al. Remodeling dynamics in the alveolar process in skeletally mature dogs. *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol* 2006; 288:1243-9.
5. Pazaianas M. Osteonecrosis of the jaw and the role of macrophages. *J Natl Cancer Inst* 2011; 103: 232-40.
6. Wimalawansa SJ. Insight into bisphosphonate-associated osteomyelitis of the jaw: pathophysiology, mechanisms and clinical management. *Expert Opin Drug Saf* 2008; 7(4):491-512.
7. Allen MR, Burr DB. Mandible matrix necrosis in beagle dogs after 3 years of daily oral bisphosphonate treatment. *J Oral Maxillofac Surg* 2008; 66(5):987-94.
8. Senel FC, Kadioglu Duman M, Muci E, et al. Jaw bone changes in rats after treatment with zoledronate and pamidronate. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2010; 109(3):385-91.
9. Kasai T, Pogrel MA, Hossaini M. The progno-

- sis for dental implants placed in patients taking oral bisphosphonates. *J Calif Dent Assoc* 2009; 37:39-42.
10. Newton BI, Cooper RC, Gilbert JA, Johnson RB, Zardiackas LD. The Ovariectomized Sheep as a Model for Human Bone Loss. *J Comp Path* 2004; 130:323-6.
 11. Reinwald S, Burr D Review of non-primate, large animal models for osteoporosis research. *J Bone Miner Res* 2008; 23(9):1353-68.
 12. Johnson RB, Gilbert JA, Cooper RC, et al. Effect of estrogen deficiency on skeletal and alveolar bone density in sheep. *J Periodontol* 2002; 73(4):383-91.
 13. Clemons MJ, Dranitsaris G, Ooi WS, et al. Phase II trial evaluating the palliative benefit of second-line zoledronic acid in breast cancer patients with either a skeletal-related event or progressive bone metastases despite first-line bisphosphonate therapy. *J Clin Oncol* 2006; 24(30):4895-900.
 14. Fini M, Giavaresi G, Rimondini L, et al. Titanium alloy osseointegration in cancellous and cortical bone of ovariectomized animals: histomorphometric and bone hardness measurements. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2002; 17:28-37.
 15. Ruggiero SL, Dodson TB, Fantasia J, et al. American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons position paper on medication-related osteonecrosis of the jaw-2014 update. *J Oral Maxillofac Surg* 2014; 72(10): 1938-56. Erratum in: *J Oral Maxillofac Surg* 2015; 73(9):1879. *J Oral Maxillofac Surg* 2015; 73(7):1440.
 16. Zeni S, Wittich A, Di Gregorio S y col. Utilidad clínica de los marcadores de formación y resorción ósea. *Acta Bioquím Clín Latinoam* 2001; 35:3-36.
 17. Treister NS, Sook-Bin Woo. Bisphosphonate-associated osteonecrosis of the jaws. In: Rosen CJ, Compston JE, Lian JB (eds). *Primer on the Metabolic Bone Diseases and Disorders of Mineral Metabolism*. 7th ed, Chapter 107. Hoboken, NJ: John Wiley & Sons, Inc, 2009. pp. 505-9.
 18. Woo SB, Hellstein JW, Kalmar JR. Systematic review: bisphosphonates and osteonecrosis of the jaws. *Ann Intern Med* 2006; 144:753-61.
 19. Shane E, Goldring S, Christakos S, et al. Osteonecrosis of the Jaw: More Research Needed. *J Bone Miner Res* 2006; 21:1503-5.
 20. Thorndike EA, Turner AS. In search of an animal model for postmenopausal diseases. *Front Biosci* 1998; 3:c17-26.
 21. Voss PJ, Stoddart M, Ziebart T, et al. Zoledronate induces osteonecrosis of the jaw in sheep. *J Craniomaxillofac Surg* 2015; 43(7):1133-8.
 22. Ruggiero SL, Drew SJ. Osteonecrosis of the jaws and bisphosphonate therapy. *J Dent Res* 2007; 86: 1013-21.
 23. Khan AA, Morrison A, Hanley DA, et al. International Task Force on Osteonecrosis of the Jaw. Diagnosis and management of osteonecrosis of the jaw: a systematic review and international consensus. *J Bone Miner Res* 2015; 30(1):3-23.
 24. Scariano JK, Garry PJ, Montoya GD, Wilson JM, Baumgartner RN. Critical differences in the serial measurement of three biochemical markers of bone turnover in the sera of pre- and postmenopausal women. *Clin Biochem* 2001; 34:639-44.