



**UNIVERSIDAD NACIONAL DE CUYO
FACULTAD DE ODONTOLOGÍA**

**Trabajo de Tesis para optar al Título de
Doctor en Odontología**

**MODELO EXPERIMENTAL EN OVEJAS PARA EVALUAR
TRATAMIENTO CRÓNICO CON BISFOSFONATOS Y SU
RELACIÓN CON OSTEONECROSIS MAXILAR E IMPLANTES
DENTALES.**

**OD. MARIO RICARDO DAVISON
DIRECTOR: PROF.DRA. SUSANA N.ZENI
CODIRECTOR:PROF. DR. WALTHER ZAVALA**

Mendoza-Argentina- 2021

COMISION DE TESIS

DR. ALBERTO MARTIN

DR. SERGIO CARMINATI

DR.MIGUEL FORNÉS

TRIBUNAL DE TESIS

DEDICATORIA

A MIS PADRES

A MI FAMILIA

AGRADECIMIENTOS

Esta Tesis Doctoral es el resultado de varios años de constante estudio y trabajo, en los cuales he encontrado personas de grandes valores que me han brindado su apoyo, conocimiento y acompañamiento. Por esto, quisiera expresar mi más profundo agradecimiento a todos los que, de alguna forma u otra, me han ayudado a llevar a cabo mi trabajo.

En primer lugar, a la Dra. Susana Zeni y a el Dr. Walther Zavala (Directora y Co-Director de mi tesis, respectivamente) no solo por ser las guías de esta tesis, y abrirme las puertas de sus grupos de trabajo, brindándome la oportunidad de crecer, sino también por sus constantes palabras de apoyo.

Agradezco también a: Lic. Juan Carlos del Bello, rector de la UNRN, quién me abrió las puertas y me dio su apoyo para iniciar Investigación aplicada en la Carrera de Odontología. A la Lic Marta Borda, secretaria de investigación de la UNRN, por su ayuda incondicional. A la Carrera del Doctorado de la FOUN de Cuyo, por su acompañamiento. Al Dr. Rómulo Cabrini, por su interés, conocimiento y asesoramiento cuando lo consulte. Al Dr. Daniel Olmedo y la Dra.Sandra Renou por su trabajo desinteresado.

A todos mis maestros, Dres. Preliasco, Alfredo; Fernandez de Preliasco, Virginia; Sabelli, Carlos; Marcantoni, Mabel; Piovano, Susana; Bordoni, Noemi; Curbelo, Halina y Houssay, Alberto.

Una mención aparte a mi esposa la Dra. Mariana Preliasco, por su, conocimiento, que sin ello no hubiera sido posible, fue quién me empujó en mis momentos de flaqueza.

De cada uno he aprendido algo.

RESUMEN

MODELO EXPERIMENTAL EN OVEJAS PARA EVALUAR TRATAMIENTO CRÓNICO CON BISFOSFONATOS Y SU RELACIÓN CON OSTEONECROSIS MAXILAR E IMPLANTES DENTALES.

Antecedentes: La osteonecrosis de la mandíbula relacionada con los BFs (ONMBF) y el fracaso de los implantes dentales son dos efectos secundarios negativos del tratamiento crónico con aminoBP.

El objetivo general de la presente tesis fue desarrollar un modelo preclínico, utilizando como animal experimental a la oveja, con el fin de profundizar en el conocimiento de diferentes aspectos fisiopatológicos de la ONMBFs.

Métodos: Se utilizaron 15 ovejas , raza Corriedale, fueron divididas en tres grupos. Las ovejas fueron operadas con ovariectomía (OVX) u operación simulada (SHAM) y tratadas de la siguiente manera OVX (n=5): OVX más solución salina; ZOL (n=6): OVX más ácido zoledrónico y SHAM (n=4): SHAM más solución salina. Se extrajo el primer molar superior después de 1 año de tratamiento; se colocó con éxito un implante dental en todas las ovejas al segundo año; las ovejas fueron sacrificadas a los 2,4 años.

Resultados: SHAM y OVX mantuvieron con éxito los implantes mientras que se perdieron en todas menos en una de las ovejas ZOL. La mucosa oral cianótica aumentó como sigue SHAM < OVX < ZOL. Las ovejas ZOL (2/6) mostraron inflamación y hueso necrótico por *Actinomyces* spp en la región

mandibular. No se observaron diferencias en calcio, fosfato y 25OHD, mientras que fosfatasa alcalina ósea disminuyó de forma similar en los 3 grupos estudiados ($p < 0,05$); ZOL presentó CTX significativamente menor ($p < 0,05$) sin diferencias entre SHAM y OVX. OVX mostró los contenidos más bajos y ZOL los más altos de Ca y Pi en fémur y maxilar ($p < 0.05$). El volumen óseo (BV/TV%) de la cresta ilíaca similar al inicio y al mes 4. Al final SHAM y ZOL mostraron un BV/TV%, BMC y BMD en fémur proximal y hemi-mandíbula similares, y superior al grupo OVX ($p < 0.05$).

Conclusión: Las ovejas tratadas con ZOL con un esquema similar al de los pacientes con cáncer mostraron una amplia supresión del remodelado óseo, falta de oseointegración del implante que quedó y 2 de ellas desarrollaron ONMBFs.

Palabras clave: osteonecrosis de maxilar asociada a bisfosfonatos, remodelación ósea, implantes dentales, enfermedades óseas metabólicas, osteoporosis, ácido zoledrónico.

ABSTRACT

EXPERIMENTAL MODEL IN EWE TO EVALUATE CHRONIC TREATMENT WITH BIPHOSPHONATES AND ITS RELATIONSHIP WITH MAXILLARY OSTEONECROSIS AND DENTAL IMPLANT OSEOINTEGRATION.

Background: BPs-related osteonecrosis of the jaw (BRONJ) and dental implant failure are two negative side effects of chronic aminoBP treatment.

Methods: Sheep were OVX or SHAM operated and treated as follows OVX (n=5): OVX plus saline solution; ZOL (n=6): OVX plus zoledronic acid and SHAM (n=4): SHAM plus saline solution. The 1st superior molar was extracted after 1 year of treatment; a dental implant was successfully placed in all sheep at the 2nd year; sheep were sacrificed at 2.4 years.

Results: SHAM and OVX successfully maintained the implants. Cyanotic oral mucosa increased as follows SHAM < OVX < ZOL. ZOL ewe (2/6) showed inflammation and necrotic bone by *Actinomyces spp* at mandibular region. No differences in serum calcium, phosphate and 25OHD were observed while BALP similarly decreased in the 3 studied groups ($p < 0.05$); ZOL presented the lowest significant CTX levels ($p < 0.05$) without differences between SHAM and OVX. OVX showed the lowest and ZOL the highest Ca and Pi contents in femur

and maxilla ($p < 0.05$). Bone volume (BV/TV%) of iliac crest was similar at baseline and at month-4. At the end of the study, BV/TV%, proximal femur and hemi-mandible BMC and BMD was similar in SHAM and ZOL and significantly higher than OVX ($p < 0.05$).

Conclusion: ZOL-treated ewe with a schedule similar to cancer patients showed an extensively suppression of bone remodeling, the remaining dental implant failed to integrate and some of the ewe developed BRONJ.

Keywords: bisphosphonate-associated osteonecrosis of the jaw, dental implants, metabolic bone diseases, osteoporosis, zoledronic acid.

PUBLICACIONES

a En Congresos Nacionales

Lyardet L; Zeni SN; Davison MR; Preliasco M. ". Osteonecrosis: Modelo de desarrollo experimental en ovejas.". Presentado en el evento "Encuentro de estudiantes de Odontología". **Facultad de Odontología Universidad Nacional de Buenos Aires**. Argentina (Mayo 2015)

Davison MR, Lyardet L, Preliasco M, Yaful G, Torres P, Pellegrini GG y Zeni SN. Modelo experimental de osteonecrosis maxilar asociada al uso de aminobisfosfonatos (ONMBPS) por el tratamiento crónico con altas dosis de zolendronato en ovejas . **XXXII Reunión Anual de la Asociación Argentina de Osteología y Metabolismo Mineral (AAOMM)**. Actualizaciones en Osteología 11 (Supl 1): 55, 2015 (Resumen CI 31).

Avendaño ME, Poletto A, Davison MR, Bonanno MS, Zeni SN. Evaluación de la microarquitectura de la mandíbula de ovejas tratadas con bifosfonatos mediante tomografía computarizada de haz cónico. **XXXVII Reunión anual de la AAOMM**. Resumen 2. Año 2020. Actual Osteol 2020; 16 (SUPL I): pag.18.

b En Congresos Internacionales

Avendaño ME; Poletto A; Davison MR; Bonanno M; Zeni SN. "Assessment Of Jawbone Microarchitec- Ture In Bisphosphonate- Treated Sheep By Cone-Beam Computed Tomography". En **Medicina**, Argentina: Publicación de la Fundación Revista Medicina (Bs As). 2020. 0025-7680.

Davison MR; Lyardet L; Preliasco M; Yaful G; Torres P; Pellegrini G; Zeni SN. "Experimental model of Osteonecrosis of the jaw associated to bisphosphonates". Presentado en el evento "**The 4th Joing Meeting Of Ects And Ibms**". Antillas Neerlandesas (Abril 2015)

Davison MR, Lyardet L, Preliasco M, Yaful G, Torres P, Pellegrini GG y Zeni SN. La oveja como modelo experimental de osteonecrosis maxilar asociada al uso de aminobisfosfonatos (ONMBPs) Sociedad Argentina de Investigaciones Clínicas. Mar del Plata, 19-22 de noviembre de 2014. **Medicina** 75 (supl. II): 100-101 (Resumen 167), 2015. ISSN: 0025-7680.

c En Revistas con referato

Davison MR; Lyardet L; Preliasco M; Yaful G; Torres P; Bonanno M; Pellegrini G; Zeni SN. "Aminobisphosphonate-treated ewes as a model of osteonecrosis of the jaw and of dental implant failure". **Journal Of Periodontology**, 5 (2019): 1 - 10.

Davison MR; Lyardet L; Preliasco M; Yaful G; Torres P; Duran F; Pellegrini G;

Zabala W; Zeni SN. "DESARROLLO DE UN MODELO EXPERIMENTAL DE OSTEONECROSIS DE MAXILAR ASOCIADA AL TRATAMIENTO CRONICO CON AMINOBISFOSFONATOS". **Actualizaciones En Osteologia**, 13 (2017): 104 - 115.

ABREVIATURAS

%	Porcentaje
25 0HD	25 hidroxí vitamina D
AAOMS	Asociación Americana Cirujanos Orales y Maxilofaciales
ANOVA	Análisis de varianza
ASBMR	American Society For Bone And Mineral Research
ATP	Adenosin –Trifosfato
BFs	Bisfosfonatos
BV/TV	Volumen óseo por volumen de hueso
C	Carbono
Ca	Calcio
Ca/Pi	Relación Calcio fósforo en hueso
Cas	Calcio Sérico
CMO	Contenido mineral óseo
CTX	Crosslaps ó telopéptido de colágeno tipo I
CV	Coefficiente de variación
DE	Desvío estándar
dL	Decilitros
DMAb	Denosumab
DMO	Densidad mineral ósea
EDTA	Etilen diamintetraacético
ELISA	Ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas
FAL	Fosfatasa alcalina
FAO	Fosfatasa alcalina ósea
FDA	Federación Americana de alimentos y drogas
FOUBA	Facultad de Odontología de la Universidad de Buenos Aires
g	Gramos
HA	Hidroxiapatita
HCL	Acido clorhídrico
hs	Horas
I.V.	Inyección Intravenosa

kg	Kilogramos
L	Litros
mg	Miligramos
min	Minutos
mm	Milímetros
MMP2	Metaloproteinasa de la matriz
MRONJ	Osteonecrosis de maxilar asociada a medicamentos
nm	Nanómetro
O	Oxígeno
°C	Grados Celsius
ONM	Osteonecrosis maxilar
ONMBFs	Osteonecrosis maxilar asociada al uso de bisfosfonatos
ONMM	Osteonecrosis maxilar medicamentosa
OVX	Ovariectomia
Pi	Fosfato sérico
PPi	Pirofosfato
R1	Radical 1
R2	Radical 2
RANKL	Ligando de receptor activador para el factor nuclear K β
rpm	Revoluciones por minuto
SENASA	Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria
SHAM	Operación simulada
sPi	Fosfato sérico
UI	Unidades internacionales
VIH	Virus de la inmunodeficiencia humana
ZOL	Acido zoledrónico

INDICE DE CONTENIDOS

16 pag.	INTRODUCCIÓN
16 pag.	Generalidades
20 pag.	Mecánismo de acción de los BFs
22 pag.	Utilidad clínica y efectos adversos de los BFs
27 pag.	Incidencia y factores de riesgo para el desarrollo de ONMBFs.
32 pag.	Etiología de la ONMBFs
36 pag.	HIPOTESIS
38 pag.	OBJETIVOS
38 pag.	Objetivo General
38 pag.	Objetivos Específicos
40 pag.	METODOLOGÍA
40 pag.	Diseño
40 pag.	Animales
41 pag.	Drogas utilizadas
42 pag.	Diseño experimental

45 pag.	Análisis clínicos y antropométricos
45 pag.	Análisis Bioquímicos
46 pag.	Contenido mineral en hueso
47 pag.	Análisis histológicos
48 pag.	Análisis densitométricos
49 pag.	Estadística
50 pag.	RESULTADOS
50 pag.	Examen clínico y análisis antropométrico
53 pag.	Análisis Bioquímico
56 pag.	Contenido de Ca y Pi en hueso
58 pag.	Densidad mineral en hueso
59 pag.	Análisis histológicos
65 pag.	DISCUSIÓN
74 pag.	CONCLUSIONES
75 pag.	BIBLIOGRAFÍA
83 pag.	ANEXO
83 pag.	ANEXO I Informe Comité de Bioética

INTRODUCCIÓN

Generalidades:

En el humano, el pirofosfato (PPi) es liberado como un subproducto metabólico de distintas reacciones bioquímicas, por lo cual pueden ser detectados en varios tejidos, incluyendo sangre y orina (*Russell RG, 2006*). Estudios pioneros realizados a partir de 1960 demostraron que el PPi puede inhibir la calcificación y unirse a los cristales de hidroxapatita (HA) del hueso.

Los bifosfonatos (BFs) son derivados químicos estables del pirofosfato (PPi), cuya característica es presentar una elevada afinidad por los iones calcio (Ca) de la HA. Uno de los pasos más importantes hacia el uso clínico de los BFs fue que dichos compuestos, al igual que el PPi, pueden inhibir la disolución de los cristales de HA. Basado en este hallazgo, y mediante diversos modelos experimentales, se determinó que los BFs pueden inhibir la resorción ósea. Durante la década de 1970, los BFs comenzaron a utilizarse como agentes terapéuticos en patologías caracterizadas por una elevada resorción ósea.

Farmacológicamente, los BFs orales presentan baja absorción intestinal (1%-5%) pero una vez absorbidos, rápidamente desaparecen de circulación para ser retenidos en la matriz extracelular del hueso unido al mineral de HA, preferentemente en los sitios de remodelamiento activo (*Fleisch H, 1998*). Inicialmente su mecanismo de acción estuvo relacionado a sus efectos fisicoquímicos sobre el cristal de HA, pero actualmente se han confirmado efectos a nivel celular de gran importancia.

La vida media de los BFs en circulación es bastante corta, oscila entre 30 min y 2 h. sin embargo, una vez incorporados al hueso, pueden persistir en la matriz extracelular por más de 10 años, especialmente los más potentes. Esta característica constituye una variable determinante de su poder residual (Fusco V, 2016). Se estima que el 80% de los BFs es excretado por riñón y el 20% es retenido en hueso. Su baja absorción intestinal y sus efectos adversos sobre el trato digestivo, sobretodo irritación esofágica, llevó a que se desarrollaran nuevos BFs más solubles lo cual permitió que se administraran por la vía endovenosa.

Estructuralmente, los BFs son compuestos sintéticos análogos (PPi), un inhibidor endógeno de la mineralización. En los BFs, el O central del PPi es reemplazado por un átomo central de C al que se encuentran unidos dos grupos fosfato y dos cadenas laterales R1 y R2. El reemplazo del "O" por "C" los hace resistentes a la hidrólisis tanto bajo condiciones ácidas como por acción de pirofosfatasas. El grupo R1 es generalmente un hidroxilo, el cual determina la afinidad por el Ca de la HA, mientras que R2 varía, dando un amplio espectro de estructuras posibles, con diferentes potencias relativas (Figura 1).

Dependiendo de la estructura de R2 se los agrupa en dos clasificaciones generales.

- a. **BFs no nitrogenados o simples:** son aquellos BFs similares al PPi que no tienen nitrógeno o aminas en su grupo R2. Estos BFs de primera generación fueron los primeros compuestos en ser utilizados en la clínica práctica. En este grupo se encuentran el clodronato, el etidronato y el tiludronato

- b. BFs nitrogenados o aminoBFs:** son aquellos que contienen nitrógeno en su estructura R2, lo cual los hace más potente. En este grupo y en grado creciente de potencia podemos señalar al pamidronato, alendronato, olpadronato, ibandronato y zoledronato.

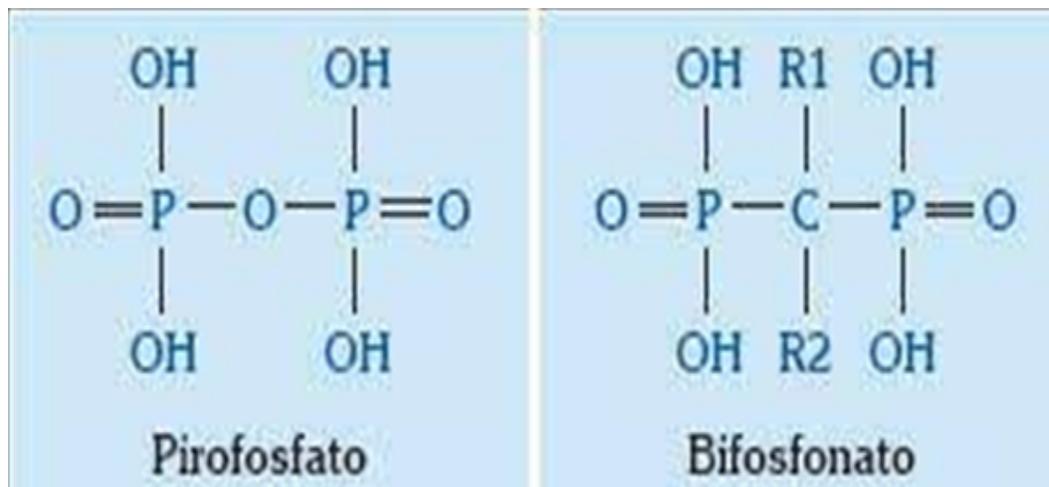


Figura 1: Estructura molecular del pirofosfato y de los bisfosfonatos.

El análisis de la relación entre estructura y potencia antirresortiva permitió establecer que si bien los grupos fosfatos e hidroxilos son esenciales para la afinidad de los BFs a la matriz ósea, la estructura del grupo R2 unido al C central es el principal determinante de la potencia de los BFs. La presencia de nitrógeno o grupos aminos en R2 aumentan la potencia antirresortiva de los BF entre 10 y 10.000 veces, respecto de aquellos que no contienen nitrógeno en su estructura (Figura 2).

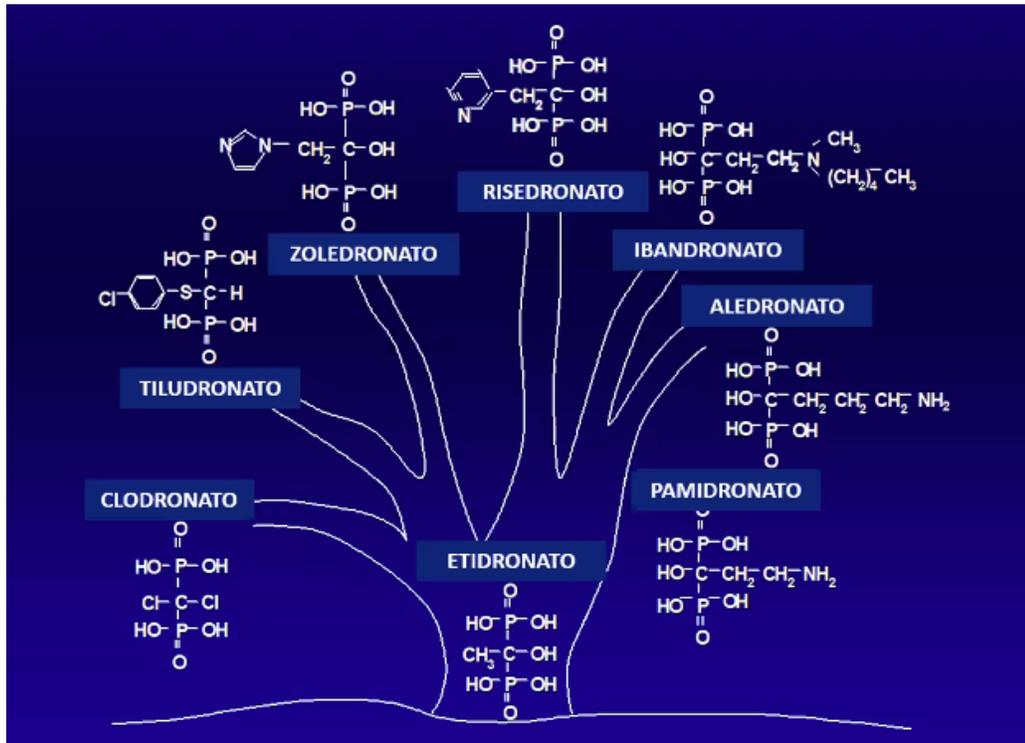


Figura 2: Clasificación de BF's en nitrogenados y no nitrogenados dependiendo de su estructura R. Extraído de Rogers MJ, 2000.

El primer BF's utilizado fue el etidronato en el cual sus grupos hidroxilos forman una estructura tridentada quelante de los iones Ca^{++} . Los cambios en el grupo metilo de R2 por incorporación de nitrógeno dieron lugar a los bisfosfonatos de segunda generación con un gran incremento en la potencia del compuesto para inhibir la resorción ósea. En este sentido, compuestos como el pamidronato y el alendronato presentan una potencia del orden de 10-100 veces mayor al etidronato. El desarrollo de compuestos con un nitrógeno terciario como ibandronato y olpadronato hace que sean aún más potentes, alcanzando una potencia relativa del orden de 10.000 veces o mayor. La introducción de grupos R2 con anillos conteniendo nitrógeno dieron lugar a los BF de tercera generación, como el residronato y zoledronato aumentando la

potencia relativa hasta 100.000 veces. Estos BFs son los actualmente más potentes (Figura 3) (Russell RE, 2006).

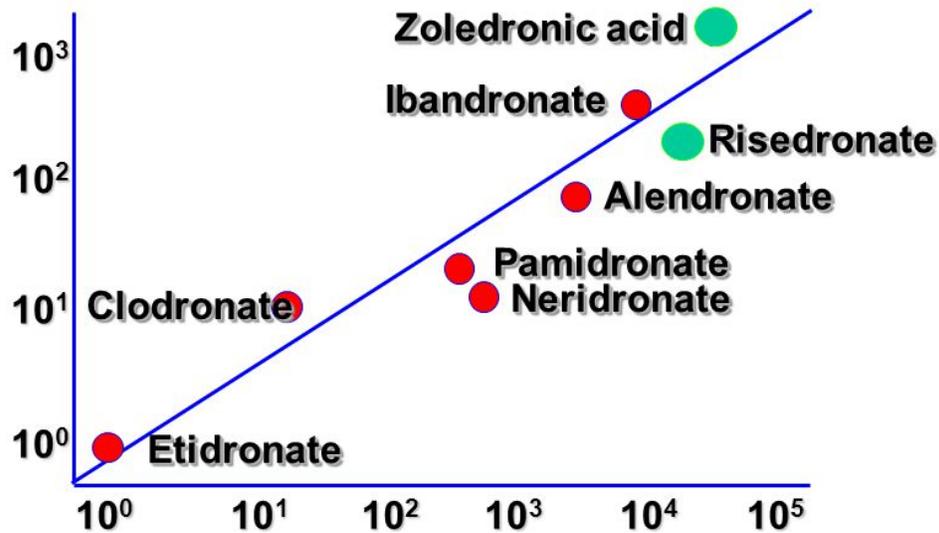


Figura 3: Potencia relativa de los BFs. Extraído de Coleman RE, 2001.

Mecanismo de acción de los BFs.

En el proceso de remodelamiento óseo cierto tipo de señales hace que al sitio lleguen los osteoclastos los cuales se ubican en la zona a resorber, la reconocen y se pegan al colágeno de la matriz extracelular a través de receptores de integrinas que reconocen cierta secuencia de aminoácidos del colágeno. Dicha unión, delimita la zona de resorción y permite la polarización de los osteoclastos. Como resultado de esto último, la célula resorptiva genera un ribete en cepillo destinado a aumentar la superficie, generando debajo de ella la laguna de resorción. Durante el proceso, el osteoclasto vuelca en dicha laguna ácido clorhídrico (HCl) que permite solubilizar el cristal de HA. Al mismo tiempo

vuelca enzimas líticas que degradan al colágeno siempre en el mismo sitio. Estos productos pasan a circulación y pueden evaluarse en sangre u orina constituyendo los marcadores bioquímicos de resorción como el telopéptido del colágeno tipo I, denominado Crosslaps o CTX.

En presencia de BFs, durante la liberación de HCl el pH disminuye en la laguna de resorción por debajo de 4.5, produciendo la disolución del cristal de HA con la consiguiente la liberación del BF unido. Este hecho aumenta su concentración del BFs en el medio. Mediante un mecanismo no del todo aclarado, que podría ser por endocitosis, los BFs son internalizados por los osteoclastos, y una vez en su interior estas drogas interfieren distintos pasos metabólicos, el cual va a depender del tipo de BF. En cualquiera de los mecanismos, el resultado final será una disminución en la actividad osteoclástica y la muerte celular, lo cual dará lugar a una disminución importante del proceso de resorción ósea (Figura 4).

Los BFs que no contienen nitrógeno son metabolizados por los osteoclastos incorporándose a análogos no hidrolizables del ATP, los cuales no podrán ser metabolizados posteriormente. La acumulación de dichos derivados del ATP son citotóxicos para los osteoclastos llevando a la inhibición de la función resorptiva y finalmente a la muerte celular.

Los BFs nitrogenados poseen una potencia superior en varios órdenes de magnitud para inhibir la resorción *in vivo* respecto de los BFs simples. Los aminoBFs no son metabolizados por el osteoclasto, por lo cual, su mecanismo de acción dentro de la célula es diferente al de los BFs que no contienen nitrógeno. Los aminoBFs se unen e inhiben a la farnesil-pirofosfato sintetasa, enzima clave de la vía del mevalonato, la cual constituye un paso crítico para la síntesis de colesterol, otros esteroides y lípidos isoprenoides. La consecuencia

final de dicha inhibición es la de impedir la prenilación de pequeñas GTPasas las cuales constituyen moléculas de unión, necesarias para la actividad celular, lo cual favorece la apoptosis del osteoclasto (Luckman SP, 1998).

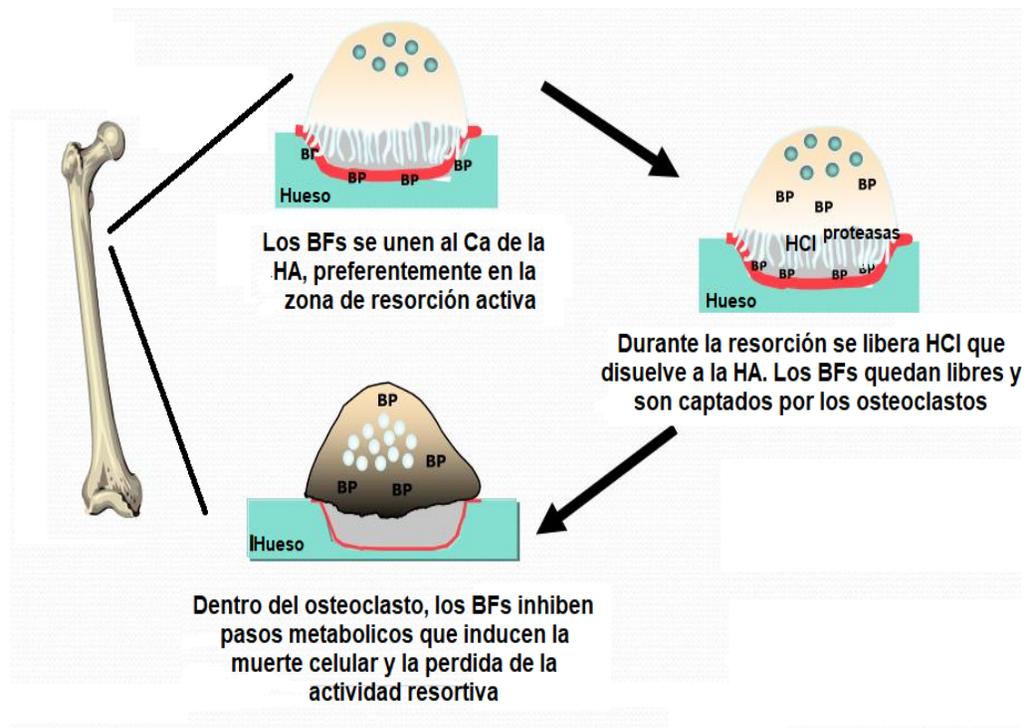


Figura 4: Mecanismo de acción de los BFs. Modificado de Russell RG, 2006.

Los BFs también pueden ser incorporados por los monocitos o macrófagos, células que, al igual que los osteoclastos, provienen de la progenie hematopoyética y son capaces de realizar endocitosis (Roelofs AJ, 2010).

Utilidad clínica y efectos adversos de los BFs.

Los trabajos clínicos iniciales sobre el uso de los BFs fueron realizados hace más de 60 años para el tratamiento de miositis ossificante progresiva y

enfermedad de Paget, siendo el etidronato el BF utilizado. A comienzos de 1970 comenzó el uso terapéutico de los BFs en oncología. En la actualidad su uso clínico se encuentra ampliamente establecido para el tratamiento y prevención de complicaciones esqueléticas asociadas al desbalance entre la formación y resorción ósea como ocurre en el mieloma múltiple o metástasis óseas debido a cáncer de mama, de próstata y de otros órganos. En osteoporosis primaria es el anticatabólico de elección por su efecto antirresortivo asociado a la reducción del proceso de remodelamiento óseo y por ende, pérdida de hueso lo cual conduce a un aumento en la densidad mineral ósea (DMO). También se utilizan en el tratamiento de osteoporosis secundarias como aquellas asociadas al uso de corticoides y de osteogénesis imperfecta en niños (Russell RGG, 2008).

Sin embargo, hace algunos años se han reconocido efectos colaterales potencialmente negativos asociados al uso crónico de los BFs, especialmente de aquellos más potentes. Uno de dichos efectos fue descrito por primera vez en el 2002 y lo constituye la osteonecrosis maxilar asociada al uso crónico de BFs (ONMBFs), cuyas manifestaciones clínicas son la exposición de huesos muertos maxilofaciales y fístulas sin cicatrizar (Rizzoli R, 2008). Esta patología alertó a los profesionales de la salud y en el año 2007 un consenso de la Asociación Estadounidense de Cirujanos Orales y Maxilofaciales (AAOMS) definió y estableció pautas para describir a la ONMBFs. Según la AAOMS se trataría de un área de hueso expuesto, en la región maxilofacial, que no cicatriza luego de 8 semanas de su identificación (tiempo requerido para la cicatrización de las partes blandas posterior a trauma, exodoncia y/o procedimiento quirúrgico), en sujetos que no hayan estado expuestos a terapia radiante en la región craneofacial (Khosla S, 2007). En 2009, la *American Society for Bone and Mineral Research (ASBMR)* amplió los conceptos sobre ONMBFs explicitando que los pacientes deben haber estado sometidos a

tratamiento con BFs orales o intravenosos (I.V.) por más de tres años (Ruggiero S, 2014).

La ONMM generalmente se presenta asintomática, a no ser que involucre alguna estructura nerviosa, en cuyo caso se podría observar manifestación de dolor. Los signos y síntomas que pueden o no estar presentes en la ONMM son: dolor, tumefacción, parestesias, supuración, ulceración de los tejidos blandos, comunicación bucosinusal, pérdida dentaria, secuestros óseos.

En cuanto a la imagen radiográfica es muy variada, y se extiende desde ausencia de lesiones hasta presencia de radiolucidez o radiopacidades (Khosla S, 2007; Sartori P, 2015 y Khan AA, 2017). En base a ello la presentación clínica de la ONM es variable y puede dividirse en diferentes estadios, los cuales se resumen en la tabla 1 (Ruggiero, 2014).

Respecto de la localización, en el 62.3% de los casos se localiza generalmente sólo en el maxilar inferior; en el 29.4% de los casos en el maxilar superior y en el 8.2% afecta a ambos maxilares (Picardo S, 2017) (Figura 5).

En la cavidad bucal, la frecuente localización en los maxilares podría deberse al estrés fisiológico de las fuerzas oclusales al que se encuentran sometidas dichas áreas (Larroudé MS, 2009). Este hecho hace que el remodelamiento óseo en el proceso alveolar se vea incrementado una decena de veces respecto del hueso trabecular presente en el resto del esqueleto (Van den Wyngaert T, 2007).

ESTADIO	CARACTERISTICAS
Sin riesgo	Sin evidencia de hueso necrótico en pacientes bajo administración actual o reciente de drogas antirresortivas.
Estadio 0	Con hallazgo radiográfico de osteólisis, pero sin signos ni síntomas de necrosis
Estadio 1	Con signos clínicos de necrosis, aunque el paciente no manifieste sintomatología.
Estadio 2	Con signos y sintomatología de necrosis e infección, con secreción purulenta o sin ella.
Estadio 3	Con signos y sintomatología de necrosis: idém estadio 2, que involucre maxilar superior, piso del seno maxilar, evidenciando comunicación bucosinusal, comunicación bucosinusal, fístula cutánea o fractura patológica. En maxilar inferior: fístula cutánea, fractura patológica, anestesia en la zona inervada por el nervio maxilar inferior.

Tabla 1. Estadios de osteonecrosis maxilar asociada a BFs. *Ruggiero SL. 2007.*

En un principio, la mayor parte de los casos de ONMM reportados se encontraban asociados al tratamiento de neoplasias, en pacientes que se sometían a una intervención oral. Asimismo, estos pacientes estaban tratados con BFs en forma intravenosa y en altas dosis, como el ácido zoledrónico (Mehrotra B, 2009; Ruggiero SL, 2014; Voss PJ, 2015). Sin embargo, también han sido reportados casos por el uso de pamidronato en pacientes que se encuentran bajo tratamiento por mieloma múltiple o cáncer de mama durante un período mayor a tres años y luego de una intervención odontológica (Bagan JV,

2006). Si bien estos pacientes, generalmente, están tratados con glucocorticoides y quimiotácticos que afectan la vascularidad, más tarde se han reportado casos de ONM en pacientes osteoporóticos bajo tratamiento prolongado con BFs orales, como alendronato y residronato (Reid IR, 2009).

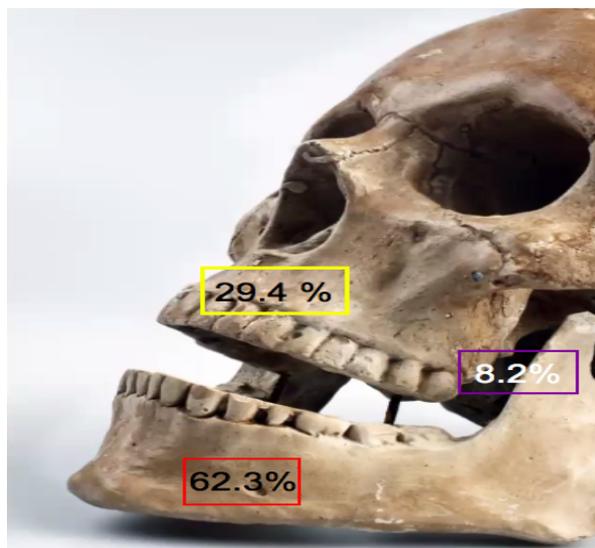


Figura 5: Localización frecuente de ONMM

A pesar de que la frecuencia reportada de padecer ONMBF no es elevada, sus efectos son graves, por eso su desarrollo es motivo de preocupación entre los profesionales que deben realizar tratamientos odontológicos invasivos, tales como cirugías, tratamientos periodontales, colocación de implantes, etc, en pacientes que reciben BFs. En este sentido, el implante dental es una herramienta óptima para el reemplazo de las piezas dentarías sin embargo, en general, es una técnica utilizada en adultos, en los cuales es común encontrarse con un hueso alveolar de mala calidad al momento de realizar la

práctica. Por ello, la cicatrización de la mucosa gingival post-extracción puede ocurrir en presencia de una infección subclínica y regiones de hueso necrótico en el alveolo subyacente. En mujeres posmenopáusicas osteopénicas el tratamiento oral más utilizado lo constituye los BFs, por ello, ante un implante dental, estas regiones podrían transformarse en focos para el desarrollo de ONMBFs en ausencia de otros factores de riesgo.

Por otra parte, según algunos autores, los BFs podrían retardar la consolidación de fracturas y disminuir el remodelamiento del callo óseo, lo cual afectaría la mineralización o las propiedades mecánicas, agravando el cuadro (Goodship A, 1994). En la actualidad existen controversias acerca del éxito de la oseointegración en pacientes tratados con BFs ya que el éxito de este tratamiento depende del aporte de nutrientes y de la actividad osteoclástica que permita la subsiguiente formación ósea alrededor del implante.

Incidencia y factores de riesgo para el desarrollo de ONMBFs.

Según los reportes internacionales la incidencia de ONMBFs en pacientes osteoporóticos tratados con BFs oscila entre los 0.001 y 0.01%, si se toma la población general (Khosla S, 2007). Sin embargo, en Argentina estudios recientes realizados en más de 25000 pacientes atendidos durante un periodo de 7 años en la Facultad de Odontología de la Universidad de Buenos Aires, se observó que la incidencia alcanzaba el 0.33% entre los sujetos tratados con BFs (Picardo S, 2017).

Existen numerosos factores de riesgo para el desarrollo de ONMBFs a los cuales los podemos dividir en tres tipos: factores asociados al tipo y dosis del BF utilizado, factores de riesgo sistémico y factores de riesgo locales.

El uso prolongado de BFs suprime el remodelamiento óseo, ya que, sin resorción no existe formación de nuevo hueso. El resultado de la inhibición de la resorción ósea es el desarrollo de un hueso hipodinámico, con una disminución en su competencia biomecánica. Esto se debe a que el hueso sigue incrementando la cantidad de mineral depositado por lo cual se vuelve quebradizo, incrementando el riesgo de fracturas. La medición de los marcadores bioquímicos de resorción ósea, como el CTX, es una de las formas más sencillas para evaluar el nivel de recambio óseo ya que una disminución marcada del mismo podría contribuir al desarrollo de ONMBFs (Lee CY y col, 2010).

Por otra parte, además de ser captados por los osteoclastos, los BFs también pueden ser incorporados por otros tipos de célula en los cuales induciría también la muerte celular. En este sentido, se sugiere que los BFs tendrían un efecto adverso sobre la integridad de la mucosa ligada al efecto pro-apoptótico ejercido sobre los queratinocitos del epitelio de revestimiento, aunque no está claro si es necesario que exista una alteración en la mucosa oral para el desarrollo de ONM. Los BFs también alteran la respuesta inmune a la infección por activación de las T-cells gama y delta, estimulando la producción de citoquinas proinflamatorias y posteriormente la depleción de células T (Roelofs AJ, 2010).

El hecho de que ciertos pacientes puedan padecerla y otros no, le confiere cierta susceptibilidad o resistencia al desarrollo de ONM. Se sugiere que existirían diferencias genéticas que modifican la susceptibilidad de los individuos al desarrollo de ONMBFs y que, posiblemente, el gen involucrado sería el que codifica para la enzima denominada metaloproteasa de la matriz 2 (MMP2). Asimismo ciertos polimorfismos del gen que codifica a una enzima

citocromo P450 dependiente, como la farnesil pirofosfatasa sintasa o CYP2C8, también apoyan la teoría de predisposición genética (Katz J y col, 2011).

Los factores de riesgo para el desarrollo de ONM debido a tratamientos concomitantes por comorbilidades se resumen en la tabla 2. Se han mencionado factores de riesgo relacionados al tratamiento como por ejemplo de inmunodepresión (VIH), bajos niveles de hemoglobina, terapia con corticoides por el padecimiento de enfermedades autoinmunes, diabetes mellitus, hipertensión, hiperlipemia, quimioterapia por patologías oncológicas severas, infección bucal, hepatitis crónica, y hábito de fumar, entre otras, son riesgos adicionales potenciales (Dodson T, 2015). Ciertos tratamientos pueden afectar negativamente al sistema inmune e incrementar la susceptibilidad a la infección.

Entre los factores locales ciertos hábitos son considerados como un factor de riesgo adicional. Entre ellos, la pobre higiene dental, la presencia de llagas por mal ajuste de las prótesis, las enfermedades dentales o periodontales y la extracción dentaria han sido asociadas al riesgo de padecer ONM (Tabla 2).

La vía de administración de las drogas anticatabólicas (oral, subcutánea, intravenosa) también ha sido considerada como un factor de riesgo para el desarrollo de ONM. Actualmente se considera más importante la dosis que las vías de su administración.

Debido a la lenta acumulación de los BFs orales se sugiere que no existiría hueso expuesto antes de los 3 años de tratamiento, aunque la incidencia y severidad aumentaría con cada año adicional de uso. En este sentido, se considera que el riesgo varía entre el 1% a los 12 meses de tratamiento hasta 11% a los 4 años de tratamiento. La ruta de administración intravenosa es considerada como un factor de riesgo mayor respecto de la administración oral. La dosis de BF acumulada puede ser estimada en base a la duración y

frecuencia de administración, lo cual sería un factor de riesgo adicional. En el caso de los BFs intravenosas y si sólo se considera al zoledronato, el riesgo aumenta al 21% a los 3 años de tratamiento.

DROGAS PRESCRIPTAS	ANAMNESIS MÉDICA	ANAMNESIS ODONTOLÓGICA
Agentes antiangiogénicos: bevacizumab, sunitinib, sorafenib, pazopanib y axitinib	Anemia	Prótesis fija o removible desadaptada
Agentes antirresortivos: bifosfonatos y denosumab	Artritis reumatoidea	Enfermedad periodontal
	Diabetes mellitus	Mala higiene bucal
	Edad avanzada	Procedimiento óseo maxilar invasivo
	Glucocorticoides	
	Tabaquismo	

Tabla 2. Factores de riesgo de osteonecrosis maxilar asociada al uso de BFs. (Escudero ND, 2011; Kuroshima L, 2019; Guelman R, 2020)

Recientemente, independientemente de su aplicación, las dosis han sido clasificadas en bajas y altas (Tabla 3), las primeras son indicadas para el tratamiento de la osteoporosis y las segundas, entre otras indicaciones, para el tratamiento de neoplasias (Picardo S, 2015).

DROGAS UTILIZADAS EN PATOLOGÍA METABÓLICA ÓSEA				
	Droga	Dosis	Vía de administración	Indicación
B A J A	Alendronato	70 mg semanal	Oral	Osteoporosis
	Risedronato	35 mg diario 150 mg mensual	Oral	Osteoporosis
	Pamidronato	60 mg trimestral	Intravenosa	Osteoporosis
	Ibandronato	150 mg mensual	Oral	Osteoporosis
	Ácido ibandronico	3 mg trimestral	Intravenosa	Osteoporosis
	Ácido zoledrónico	5 mg anual	Intravenosa	Osteoporosis - Enfermedad de Paget
	Denosumab	60 mg semestral	Subcutánea	Osteoporosis
A L T A	Pamidronato	90 mg mensual	Intravenosa	Eventos relacionados con el cáncer Mieloma múltiple
	Ácido Zoledrónico	4 mg cada 3 o 4 semanas	Intravenosa	Eventos relacionados con el cáncer
	Denosumab	120 mg mensual	Subcutánea	Eventos relacionados con el cáncer Tumor de células gigantes

Tabla 3. Dosis habituales de las drogas utilizadas en patología ósea metabólica.

(Nicolatou G, 2019; Guelman R, 2020)

Los primeros casos informados de ONM sólo se relacionaban con el uso de BFs de allí su denominación de ONM-asociada a BFs. Sin embargo, con el tiempo, se reportaron casos asociados a nuevas terapéuticas.

En 2010, se observó ONM por el tratamiento con el anticuerpo anti-RANKL denominado denosumab (DMAb). Posteriormente también se observó ONM por el tratamiento con anti-angiogénicos como el factor de crecimiento endotelial anti-vascular denominado bevizumab. Recientemente se ha informado que el anticuerpo anti-esclerostina denominado romosozumab también sería responsable de causar ONM. Por eso la AAOMS ha propuesto en su último consenso de 2014, el término general de ONM asociada al uso de medicamentos (MRONJ) (Ruggiero S, 2014).

En la actualidad, los más utilizados son los BF y el Dmab (Ruggiero S, 2014). El presente estudio se centró en la ONMBFs.

Etiología de la ONMBFs

A pesar del enorme esfuerzo realizado en relación a la investigación de la ONMBFs, su patogénesis no está aun totalmente dilucidada, aunque existe un consenso general sobre el hecho de que sería de etiología multifactorial (Otto S, 2020; Compston J, 2011).

La hipótesis actual respecto de la patogenia de la ONMMBFs es especulativa y ampliamente basada en estudio histológicos de especímenes humanos obtenidos de las lesiones cuando ya se encuentran presentes. Existen diversas teorías sobre su patogenia. Entre ellas, la exposición de hueso ha sido atribuida a alteraciones en el metabolismo óseo asociada a una disminución del remodelamiento del hueso que culminan con la necrosis del sitio en cuestión.

Aunque la mayoría de los pacientes reportados presentaron exodoncias dentarias o una lesión, aún existen controversias acerca de si es necesario un trauma local para que se genere ONM. Respecto de esto último, es necesario asumir que las exodoncias dentarias se producen en presencia de una infección crónica peri radicular y que producen fractura del hueso alveolar con retención y ocasionales restos radiculares. Este hecho expone al hueso a un medio rico en microorganismos lo que, por un lado induce un aumento en la velocidad del remodelamiento óseo y, por el otro, incrementa el riesgo de infecciones (Sook BW, 2006; Ferlito S, 2011).

La existencia de la patología en sitios edéntulos, sin historial de lesiones aparentes, sugiere que otros factores además de la carga mecánica pueden

contribuir a su patogénesis. En estos casos se considera que condiciones pre-existentes como patologías dentarias previas, terapia oncológica concomitante, reducción de la angiogénesis o sobre-infecciones inducirían la necrosis. Estudios histológicos recientes sugieren que la infección con *Actinomices* es un hallazgo común y que, dichos microorganismos contribuirían al desarrollo de procesos inflamatorios que no sanan. Sin embargo debe aún establecerse si la colonización por *Actinomices* es la causa de la ONMM o un hecho incidental. También se hipotetiza que la osteonecrosis podría producirse por la necrosis avascular de los tejidos debido al efecto anti-angiogénico de los BFs, disminuyendo el factor de crecimiento del endotelio vascular, produciendo una irrigación de los huesos maxilares insuficiente (Santini, D 2007; Misso G, 2012). Asimismo se postula que la disminución de la resorción ósea que ejercen los BFs contribuiría a la falla que ocurre en el remodelamiento óseo alrededor del alvéolo post-exodoncia. Se debe recordar que en condiciones de homeostasis ósea normal la resorción osteoclástica se asocia en tiempo y espacio a la formación osteoblástica, y ambas funciones son esenciales para reparar los microdaños que se producen por envejecimiento del tejido óseo.

El estudio de la etiología en humanos es complicado por la presencia de factores confundidores como dieta y hábitos, ejercicio, tratamientos concomitantes entre los que se encuentra glucocorticoides o quimioterapia, en pacientes con cáncer. Todos estos factores pueden controlarse utilizando modelos preclínicos en animales. La mayoría de los estudios relacionados al metabolismo óseo se realizan en la rata, animal de elección debido a su facilidad en cuanto a espacio, costo y sencillez. A pesar de ello, en el caso de buscar un modelo experimental para evaluar alteraciones en el metabolismo óseo oral, el uso de la rata es limitado. Por un lado el hueso cortical carece de sistemas Haversianos, la periodontitis es de rápida recuperación, los animales adultos presentan cementosis lo cual complica los procedimientos de

exodoncias dentarias y finalmente constituye un animal muy pequeño para permitir procedimientos quirúrgicos odontológicos. Asimismo el envejecimiento y metabolismo de las ratas se encuentra muy incrementado respecto del humano lo que hace difícil evaluar el impacto de la cronicidad en el proceso. Por ello, si fuera posible, sería interesante realizar este tipo de estudios en animales cuyo comportamiento a nivel oral y óseo sea lo más cercano posible al humano.

Varios animales cumplen parcialmente este cometido (perros, gatos, cerdos mini, ovejas y monos), entre todos ellos, la oveja sería de suma utilidad por varias razones: 1) el tamaño y las características mecánicas del esqueleto son comparables al humano; 2) las ovejas adultas desarrollan remodelamiento óseo Haversiano y, ante la ovariectomía (OVX), los marcadores bioquímicos aumentan indicando un aumento del remodelamiento que lleva, no sólo a pérdida de hueso en el esqueleto axial y apendicular, sino también, periodontal; 3) genéticamente se encuentran más cercanas al hombre que las ratas y los ratones; 4) ovulan espontáneamente y tienen un perfil de hormonas sexuales similar a la mujer; 5) presentan una tasa metabólica similar al humano; 6) experimentan problemas esqueléticos relacionados con la edad, incluyendo pérdida de piezas dentarias; este hecho es importante para evaluar la oseointegración ante la colocación de implantes dentales; 7) desarrollan periodontitis, presentando bacterias patógenas similares a las que se encuentran en la enfermedad periodontal humana, incluyendo *Porphyromonas gingivalis* y *Bacteroides gingivalis*; 8) presentan premolares y molares con un periodonto similar al de los humanos; 9) son dóciles y fáciles de manipular; 10) su mantenimiento no es excesivamente costoso y de disponibilidad en cantidades adecuadas en la Patagonia Argentina; 11) su tamaño permite la implantación de prótesis dentales, la recolección de grandes cantidades de muestras de fluidos así como la toma de biopsias en distintos puntos del

esqueleto y, finalmente, 12) generalmente presentan menores problemas éticos para su uso que los animales domésticos y los monos (Sigrist I. 2007; Turner A, 2002; Newton BI, 2004). Si bien, la oveja ha sido utilizada como modelo experimental en osteoporosis, las investigaciones sobre oseointegración y alteraciones orales sólo han sido realizadas en muy pocos casos.

Por lo expuesto se desprende que la oveja se asemeja al humano en varios aspectos relacionados al metabolismo óseo pero, a la vez, presenta otras similitudes con el humano como el tamaño corporal, la flora oral y la presencia de premolares y molares. Todo ello permitiría utilizar las dosis habituales de BFs en los tratamientos clínicos así como poder realizar ciertas intervenciones orales que han sido consideradas como desencadenantes de la ONM inducidas. Contar con un modelo experimental que permita evaluar los principales factores implicados en el desarrollo de ONM sería fundamental para profundizar en el conocimiento de los mecanismos y los factores principalmente predisponentes para el desarrollo de ONM.

HIPOTESIS

Si bien la patogénesis de la ONMBFs no se encuentra totalmente dilucidada no existen dudas de que ocurre por combinación de múltiples factores. El uso de un modelo experimental en el que prácticas odontológicas sean fáciles de realizar permitiría ampliar los conocimientos sobre los posibles mecanismos de la ONMBFs.

Entre los mecanismos propuestos para el desarrollo de ONMBFs se encuentran:

1. **Disminución drástica del remodelamiento óseo:** el tratamiento prolongado con BPs da lugar a una disminución importante del recambio de hueso con incremento en el riesgo de microfracturas, debido al efecto apoptótico de estas drogas sobre los osteoclastos. Cambios en el remodelamiento óseo puede ser evaluado de manera dinámica por la medición bioquímica de los marcadores óseos o estática por técnicas histológicas, y por densitometría ósea.

El hueso maxilar presenta una embriología diferente al esqueleto axial. Especialmente el hueso maxilar presenta un remodelamiento varias veces superior al axial. Este hecho puede dar lugar a efectos diferentes a nivel del hueso maxilar y fémur.

2. **Alteración de los procesos de reparación celular:** los BFs no sólo inducen la muerte de los osteoclastos sino de otras progenies celulares.

Por ello, los BFs podrían alterar la supervivencia y actividad de otras células que se encuentran en el microambiente oral como osteoblastos, células vasculares, fibroblastos y queratinocitos lo que contribuiría al disturbio del proceso de reparación luego de una injuria del sitio en cuestión. Estas alteraciones pueden ser evaluadas mediante técnicas radiográficas e histológicas.

3. **Inhibición de la angiogénesis:** Los BFs inhiben la angiogénesis evitando la neo-formación vascular indispensable para la reparación del alvéolo post-extracción o el mecanismo de oseointegración que pueda conducir a una necrosis ósea avascular. El examen de los tejidos blandos orales puede determinar la presencia de posibles efectos de los BFs sobre este punto.
4. **Efecto negativo sobre la actividad infecciosa local:** los BFs pueden conducir a cambios en el comportamiento y/o excesivo crecimiento de ciertas bacterias orales como los actinomicetes que afectarían la actividad infecciosa a nivel oral. Preparados histológicos permitiría determinar la presencia de *Actinomicetes*.
5. **Acumulación de microfracturas por disminución del remodelamiento óseo:** El tratamiento con BFs retrasaría e inhibiría la oseointegración con un riesgo aumentando de pérdida del implante dental. El escaso recambio afectaría la estructura y biomecánica del hueso maxilar. Este hecho se vería especialmente alterado ante intervenciones odontológicas por la exposición al microambiente bucal.

OBJETIVOS

Objetivo general

El objetivo general de la presente tesis fue desarrollar un modelo preclínico, utilizando como animal experimental a la oveja, con el fin de profundizar en el conocimiento de diferentes aspectos fisiopatológicos de la ONMBFs y al mismo tiempo evaluar las dificultades en la oseointegración ante un implante dental, en periodos cortos de la intervención.

Objetivos específicos

Para cumplir con el objetivo general se llevaron a cabo los siguientes objetivos específicos:

- Obtención del modelo experimental de pérdida de masa ósea mediante la ovariectomía (OVX) bilateral en el animal.
- Evaluar los cambios clínicos que se producen en el animal en función del tiempo, por el tratamiento con un potente BF.
- Evaluar el efecto sobre el metabolismo óseo de los maxilares y del esqueleto axial y apendicular mediante densitometría ósea, radiología e histología
- Evaluar el efecto sobre el metabolismo fosfo-cálcico y óseo tanto a nivel sistémico como oral por la evaluación de la homeostasis fosfo-cálcica y los cambios bioquímicos en la formación y resorción ósea
- Evaluar el posible pasaje de un hueso alveolar normal a una condición patológica ante:

- a. una intervención odontológica (exodoncia del 1er. Molar superior).
 - b. la colocación de un implante dental.
- Evaluar el éxito del implante en función del tiempo (de 0 a 120 días)

METODOLOGIA

El protocolo fue realizado con aprobación Comité Ética del Hospital de Clínicas de la Universidad Nacional de Buenos Aires. (ver Anexo I).

Diseño:

Experimental, longitudinal

Animales:

Se utilizaron 15 ovejas hembra 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 entre 35-40 kg.

Los animales se ubicaron en la Chacra Experimental de la Universidad Nacional de Río Negro y se mantuvieron bajo condiciones extensivas (Figura 6).

Las ovejas recibieron agua y se alimentaron “*ad libitum*” con una dieta en base a pasturas, las cuales se co-asociaron de alfalfa, gramíneas y agropiro. Cuando el veterinario lo consideró necesario, se realizó suplementación alimentaria, con maíz o sorgo ensilado y así cubrir todos sus requerimientos nutricionales del animal.



Figura 6: Animal de estudio y condiciones en que se realizó el mantenimiento

Drogas utilizadas:

El BF ensayado en esta tesis fue ácido zoledrónico (ZOL), que corresponde en la actualidad al BF más potente, gentilmente sedido por GADOR S.A. El esquema y la dosis utilizada en el presente estudio fueron equivalentes al que se utiliza en el tratamiento de pacientes con mieloma. En base a ello, la dosis suministrada fue de 4 mg ZOL/mes (equivalente a 66 ug/kg de peso corporal) (Clemons MJ 2006). La forma de administración del BF fue por vía endovenosa, forma en que el ZOL se administra en la práctica clínica.

La anestesia general utilizada para realizar la ovariectomía (OVX) fue clorhidrato de ketamina y xilacina (100 mg/kg y 5 mg/kg, respectivamente) (Holliday Scout SA, Bs As, Argentina), inyectado en forma intramuscular, siguiendo el protocolo estandarizado para este tipo de intervención (Fini M, 2002).

Para el procedimiento dental, y cuando fue indispensable se administró cloruro de lidocaína 2%, como anestesia local suplementaria.

En el postoperatorio se administró el antibiótico ampicilina 12 mg/kg en forma subcutánea.

Diseño experimental:

Con el objeto de disminuir los niveles estrogénicos y provocar osteopenia, un total de 11 animales fueron sometidos a ovariectomía bilateral por cirujanos veterinarios bajo anestesia general. Para ello se les realizó una laparotomía la cual permitió acceder al aparato reproductivo. A este grupo de animales se los denominó OVX. Al resto de los animales (n=4) se les practicó una operación simulada (SHAM) en la cual se localizaron los ovarios y se les practicó una ligadura de los oviductos para prevenir preñez accidental durante el estudio. La cirugía fue realizada con control cardíaco y respiratorio bajo procedimientos estándares (Fini M, 2002).

Dos días después de la cirugía los animales OVX se dividieron en 2 grupos, mientras que el tercer grupo fue constituido por los animales sometidos a una operación simulada (SHAM), correspondiente el control.

Todos los animales fueron identificados con caravanas según el tratamiento que deberían recibir. Dicho tratamiento se realizó durante un período de 28 meses:

1. **Grupo OVX:** ovejas OVX tratadas con solución fisiológica (n=4)
2. **Grupo ZOL:** ovejas OVX tratadas con ZOL (n=6). Durante el período de estudio este grupo logra acumular altas dosis del BF en la matriz extracelular del hueso.

3. **Grupo SHAM:** ovejas controles con operación simulada tratadas con solución fisiológica, con el mismo esquema de administración que el ZOL (n=4).

Un esquema del diseño experimental puede observarse en la Figura 7.

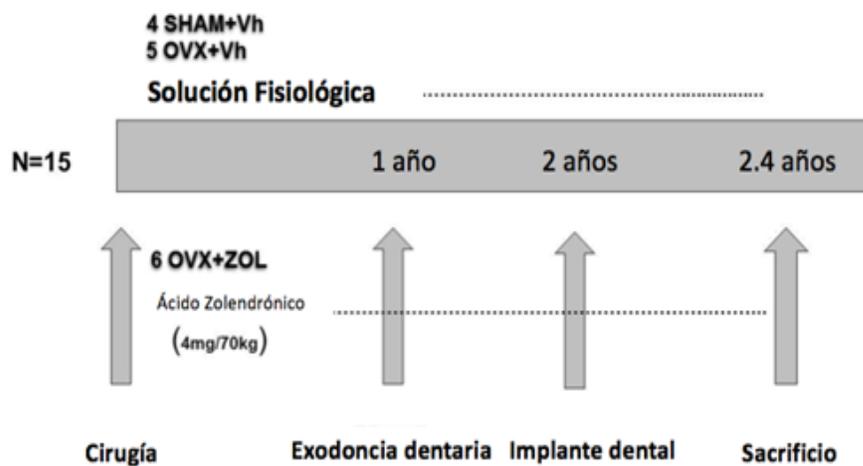


Figura 7: Diagrama del diseño experimental

A los 12 meses (1 año), todos los animales fueron anestesiados, con el objeto de practicarles una biopsia ósea de cresta ilíaca y someterlos a la exodoncia del 1er. molar superior por el grupo de odontólogos. El procedimiento fue realizado bajo anestesia general a cargo del equipo veterinario de cirugía (Figura 8).

La biopsia ósea fue obtenida de la cresta ilíaca izquierda. El sitio donde se practicó la extracción de la misma estuvo ubicado a 1,5 cm del borde de la cresta y a 2,5 cm del borde lateral del borde pélvico.



Figura 8: Procedimiento quirúrgico. (A,C): ovariectomía y (B,D): obtención de biopsia ósea

A los 24 meses (2 años) todos los animales fueron sometidos a un implante dental, utilizando implantes de titanio roscado (diámetro: 3,75 mm y longitud: 8,5 mm) (EFEDEA, Megagen Ltd., Korea), bajo anestesia general. Para ello, se creó un defecto óseo (1,6mm x 2 mm) cerca del sitio de la exodoncia dentaria utilizando una fresa de fisura (Figura 9).

A los 28 meses (2,4 años) finalizó la experiencia. Los animales fueron sacrificados por el equipo de veterinarios autorizados por el Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria (SENASA), siguiendo las guías de buenas prácticas experimentales.

Posteriormente al sacrificio, se extrajeron los maxilares, las mandíbulas y los fémures para estudios radiológicos, densitométricos, bioquímicos e histológicos.

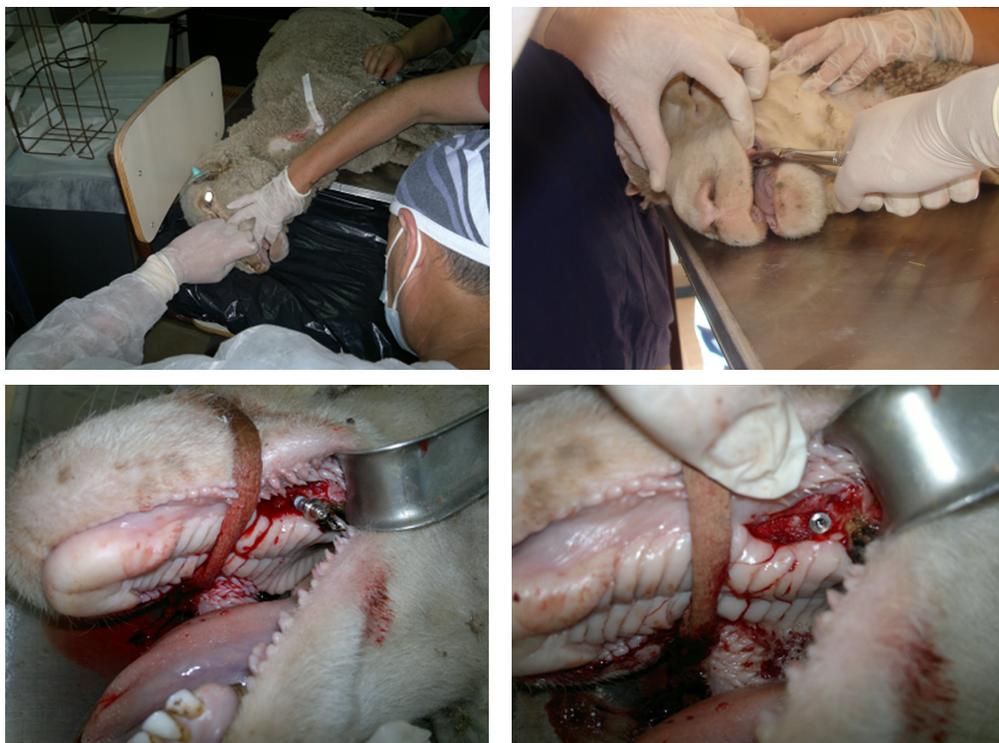


Figura 9: Extracción dentaria (12 meses) e implante dentario (24 meses)

Análisis clínicos y antropométricos

El comportamiento animal, los cambios macroscópicos de la mucosa oral, la permanencia del implante y el peso corporal fueron evaluados semanalmente por los veterinarios en forma ciega. Los veterinarios también evaluaron el grado de inflamación oral, el cual fue clasificado según grados crecientes en normal, medio o severo, incluyendo la presencia de úlceras y/o de hueso necrótico.

Análisis Bioquímicos:

Posteriormente a la extracción sanguínea, el suero fue separado del paquete de glóbulos por centrifugación a 6500rpm durante 10 min. El suero fue guardado a - 20°C hasta su análisis.

El calcio sérico (Cas) (mg/dL) se determinó mediante espectrofotometría de absorción atómica utilizando una longitud de onda de 423 nm y utilizando cloruro de lantano (concentración 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 fosfato sérico (Pis) (mg/dL) se determinó mediante un método colorimétrico UV-visible a 340 nm de longitud de onda, utilizando un kit comercial (Wiener SA).

La fosfatasa alcalina ósea (FAO) (UI/L) se determinó colorimétricamente, utilizando un kit comercial (Fosfatasa Alcalina optimizada de Wiener SA) que evalúa la actividad de FAL total. Para ello, la isoforma ósea fue precipitada con lectina de germen de trigo. La reactividad cruzada con la isoforma hepática de la FAL fue inferior al 5%.

El nivel de 25hidroxivitamina D (25OHD) (ng/mL) se determinó mediante un ensayo competitivo de unión a proteínas basado en el uso de ligandos radiomarcados (¹²⁵I RIA Kit, DiaSorin, Stillwater, MN, USA).

Los niveles séricos del telopéptido carboxi-terminal de colágeno tipo I (CTX) fueron evaluados mediante un inmunoensayo de competición proteica (ELISA) (Nordic Biosciencie Diagnostics A/S). El CV intraensayo para este ensayo fue del 6%.

Contenido mineral en hueso:

Se evaluó el contenido de Ca y Pi obtenido en el material resultante de la generación del defecto óseo creado para colocar el implante. Para ello se pesó el material y se lo mineralizó en ácido clorhídrico concentrado hasta obtener un líquido amarillento claro, límpido sin el contenido de residuos.

Posteriormente se llevó al volumen adecuado con agua bidestilada y se evaluaron ambos minerales utilizando las mismas técnicas a las empleadas en los estudios bioquímicos en suero.

Al final del estudio, se obtuvo una pequeña muestra representativa de hueso esponjoso y cortical de maxilares y fémures, y el material restante se almacenó a - 20° para futuros análisis. Las muestras obtenidas se secaron en estufa a 100 °C durante 72 hs y se desgrasaron en una solución de cloroformo-metanol (3:1) durante 2 semanas. Las muestras desgrasadas se secaron a 100 °C y se pesaron (Denver Instrument, EE. UU.). A continuación se mineralizaron en un tubo de vidrio que contenía una mezcla de ácido clorhídrico/ácido nítrico (1:1) hasta obtener un líquido amarillento límpido. Luego de llevarlas a un volumen adecuado con agua bidestilada, se procedió a la determinación de Ca y Pi como fue explicado en la evaluación del defecto óseo.

Análisis histológicos

a) *Análisis sobre hueso decalcificado*

Las biopsias de la cresta ilíaca y de un trozo de maxilar superior de la región donde se procedió a colocar los implantes fueron fijados en formalina-PBS durante 24 hs, se descalcificaron en EDTA al 10% y se embebieron en parafina. Se obtuvieron secciones de hueso (7 - 8 µm de espesor) y se tiñeron con hematoxilina-eosina para un examen microscópico posterior, en forma ciega por el mismo operador.

Las secciones se micro-fotografiaron (AXIOSKOP, Carl 9 ZEISS) y la imagen digitalizada (Image-Pro plus 4.5) se utilizó para realizar las mediciones histológicas. Se determinó el volumen óseo (BV/TV%),

definido como el porcentaje de hueso esponjoso dentro del área total medida (*Parfitt A, 1987*).

b) *Análisis sobre hueso sin decalcificar*

Se tomó el maxilar superior del animal tratado con ZOL en el cual permaneció el implante para evaluar óseo-integración. La muestra fue remitida en formol al 10% al Laboratorio para el Estudio de Biomateriales. Cátedra de Anatomía Patológica. FOUBA. Dicha muestra fue fotografiada, radiografiada y procesada para su inclusión en resina acrílica. Se obtuvieron tres cortes por desgaste transversales al eje mayor del implante con el sistema EXAKT de corte (EXAKT 300 CP-Precision Parallel Control, Germany. Los cortes fueron desgastados y pulidos con el sistema de desgaste EXAKT (Germany) y teñidos con Azul de toluidina.

Se realizó la observación histológica mediante microscopía óptica de las preparaciones histológicas y se obtuvieron microfotografías.

Análisis Densitométricos:

La densidad mineral ósea (DMO) y el contenido mineral óseo (CMO) de las hemi-mandíbulas y fémures fueron evaluados "ex vivo" por DXA utilizando un software diseñado específicamente para animales pequeños (DPX Alpha, Small Animal Software, Lunar Radiation Corp. Madison WI. Todos los huesos fueron escaneados usando un mismo tipo de procedimiento. El fémur proximal se analizó sobre la imagen del hueso en la pantalla, utilizando una ventana (ROI) para cada segmento.

La precisión del software para determinar la DMO se evaluó midiendo una pieza de hueso cinco veces después de reposicionarla entre exploraciones tanto en el mismo día como en días diferentes (*Zeni, 2000*) Los coeficientes

de variación (CV) fueron de 0.8% para la DMO de mandíbula y fémur; del 3.0% para CMO y del 3.2% para DMO del fémur proximal.

Todos los análisis fueron realizados en forma ciega por el mismo técnico con el fin de minimizar la variación inter-observador.

Estadística

Los datos se expresaron como media \pm desviación estándar (DE). La normalidad y la homogeneidad de las varianzas se evaluaron utilizando la prueba de Shapiro Wilk y la prueba de Levene, respectivamente. Se utilizaron la prueba de chi cuadrado y ANOVA para detectar diferencias en porcentajes y medias, respectivamente. El análisis se realizó con el paquete SPSS 19 para Windows y los resultados se consideraron significativos a un valor de $P < 0,05$.

RESULTADOS

Examen clínico y análisis antropométrico:

La supervivencia de los animales fue del 100% en los grupos SHAM y OVX, y del 77% (4/6) en el grupo ZOL. La causa de la muerte se debió a insuficiencia renal y diarrea, y ambas muertes ocurrieron durante el último mes del estudio por lo cual pudieron incluirse en el tratamiento de los resultados.

La Figura 10 muestra fotografías del área de implante en los tres grupos estudiados. Las ovejas SHAM (A) y OVX (B) mantuvieron con éxito sus implantes, mientras que solo una de las ovejas ZOL (C) lo conservó, el resto de los animales perdieron los implantes al final del estudio. El grupo ZOL también muestra cambios mandibulares compatibles con osteonecrosis (Figura 10).

El estudio sobre la mucosa oral mostró que el grado de cianosis aumentó entre los grupos en el siguiente orden: SHAM <OVX <ZOL. La cicatrización de la herida del sitio de la exodoncia dentaria transcurrió sin incidentes en los tres grupos estudiados.

Ni el grupo de control ni el de OVX mostraron ulceración, hueso expuesto o signos de inflamación en el sitio de la exodoncia o en otras regiones. Sin embargo, 2/6 (33%) de las ovejas del grupo ZOL presentaron inflamación severa con hueso expuesto y necrótico (similar a ONMBFs) asociado con infección por *Actinomyces* spp. en la región mandibular (Figura 10).

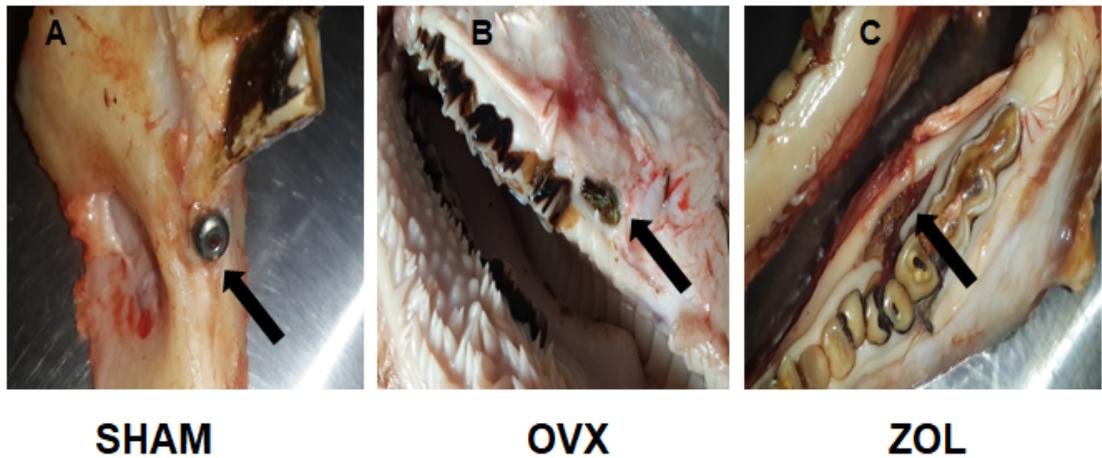


Figura 10: Fotografías del maxilar superior. Las flechas indican el sitio del implante. Se observa el éxito en SHAM y OVX y el fracaso y cambios mandibulares en ZOL.

En la Figura 11 se observan las imágenes radiográficas correspondientes a los tres grupos experimentales. La radiografía del maxilar superior derecho de los grupos SHAM (D) y OVX (E) muestra que no existieron cambios estructurales en el hueso alveolar que rodea el implante. Asimismo, puede observarse que las ovejas OVX (E) muestran un área de radio-opacidad reducida en la zona del implante.

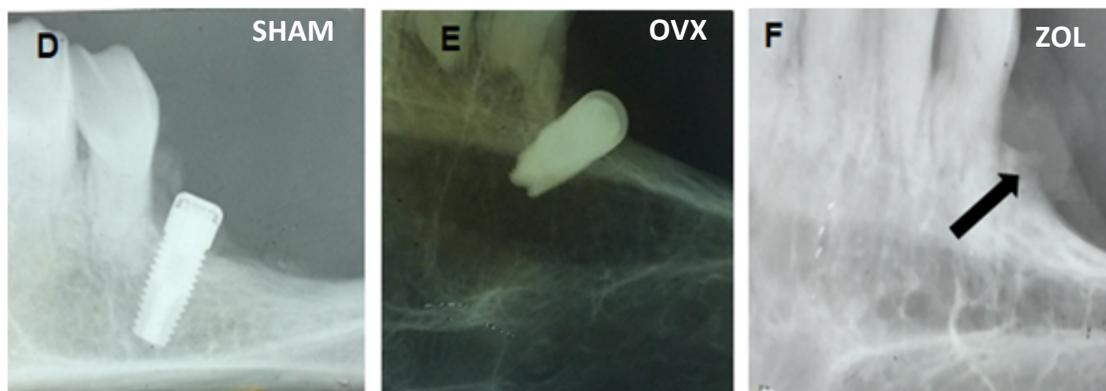


Figura 11: Radiografía del maxilar superior derecho de los tres grupos estudiados. La flecha indica presencia de un sequestró óseo.

Sin embargo, en el grupo ZOL (F) se evidencia no sólo la pérdida de implante sino, además, cambios estructurales óseos. La flecha señala la presencia de un secuestro óseo en el sitio de la exodoncia dentaria de un animal del grupo ZOL que no conservó su implante.

En la Figura 12 se observa las tomografías panorámicas de los maxilares inferiores izquierdos de las ovejas SHAM, OVX y ZOL. En dicha figura se observan hallazgos similares a los encontrados en la evaluación de las radiografías de la Figura 11. Es decir, una menor radio-opacidad en el grupo OVX respecto de los otros dos grupos.



Figura 12: Tomografía computada del maxilar inferior de los tres grupos estudiados

El peso corporal de los tres grupos estudiados fue similar tanto al principio como al final del estudio. El peso del maxilar y del fémur al final del estudio presentó el valor significativamente más bajo en el grupo OVX ($p < 0.05$); no se observaron diferencias significativas en el peso del fémur entre los grupos SHAM y ZOL. Sin embargo, el peso del maxilar inferior fue significativamente mayor en el grupo ZOL respecto del grupo SHAM ($p < 0.05$) (Tabla 4)

Determinación	SHAM	OVX	ZOL
Peso corporal final (Kg)	33.00±2.00	34.00±4.00	35.00±2.00
Peso corporal final (Kg)	30.00±6.00	31.00±5.00	33.00±4.00
Peso maxilar inferior (g)	178.40±4.00	142.80±1.20*	185.10±9.70*, **
Peso fémur (g)	114.00±5.50	106.40±8.80*	119.60±3.50**

Tabla 4. Peso corporal, peso de los maxilares inferiores y peso de los fémures. (*): $p < 0.05$ respecto del grupo SHAM y (**): $p < 0.05$ respecto del grupo OVX (media \pm DE).

Análisis Bioquímico:

La Tabla 5 muestra los resultados correspondientes al análisis bioquímico de los ensayos efectuados en las muestras séricas de los tres grupos estudiados a los tiempos: basal, 4 meses y 28 meses de la experiencia.

Al inicio de la experiencia, los niveles séricos de Ca (Cas), Pi (sPi) y 25OHD no mostraron diferencias significativas entre los tres grupos estudiados.

La calcemia mostró una tendencia a disminuir en su valor a lo largo de la experiencia respecto de los niveles basales, aunque sin alcanzar diferencias significativas ($p < 0,057$). La calcemia no mostró diferencias significativas entre los 3 grupos de estudio.

Grupos	Basal	4 meses	28 meses
Calcio sérico (mg/dL)			
SHAM	9.7±0.1b	9.5±0.2b	9.2±0.3a
OVX	9.1±0.3a,b	9.4±0.2b	8.9±0.4a
ZOL	9.2±0.4a,b	9.1±0.3a,b	8.9±0.3a
Fosfato sérico (mg/dL)			
SHAM	4.1±0.4b	3.9±0.2a	4.3±0.4b
OVX	4.6±0.3c	5.6±0.3d	4.0±0.2b
ZOL	4.7±0.5c	4.9±0.2c	4.0±0.2b
25hidroxivitamina D (ng/mL)			
SHAM	20.5±2.7a,b	18.3±3.1a	27.4±6.7c
OVX	22.6±6.4b	17.6±1.8a	29.5±6.2c
ZOL	24.6±6.9b	18.5±1.1a	29.1±2.8c

Tabla 5. Calcemia, fosfatemia y 25hidroxi-vitamina D, al inicio del estudio (basal), a los 4 meses post-cirugía y a los 28 meses, tiempo final de la experiencia. Letras diferentes indican diferencias significativas con un $p < 0.05$ (media \pm DE).

Los niveles de sPi no mostraron cambios significativos a lo largo de toda la experiencia en el grupo SHAM. Los niveles de sPi en el grupo OVX aumentó significativamente a los 4 meses ($p < 0.05$) y luego disminuyó hasta alcanzar los niveles basales, al final del estudio. Los niveles de sPi en el grupo ZOL a los 4 meses de estudio, no mostraron cambios significativos respecto del nivel basal; sin embargo, dichos niveles disminuyeron significativamente al final de la experiencia ($p < 0.05$). Al comparar los niveles de sPi, a los 4 meses se observó un aumento estadísticamente significativo en el siguiente orden: SHAM>ZOL>OVX ($p < 0.05$); sin embargo, no se observaron

diferencias significativas en los niveles de sPi entre los tres grupos, al final del estudio.

Todos los grupos mostraron una ligera disminución en los niveles de 25OHD en el período basal y 4to. mes de experiencia (cambio de estación anual de verano y otoño). Los niveles de 25OHD aumentaron significativamente entre el 4to. mes y el final de la experiencia (cambio de estación anual de primavera a verano) ($p < 0.05$). Al comparar los niveles de 25OHD entre los 3 grupos, no se observaron diferencias significativas en ninguno de los tres meses estudiados (Tabla 5).

La tabla 6 muestra los resultados de los dos marcadores óseos estudiados: FAO como marcador de formación y CTX como de formación.

En todos los grupos, los niveles de FAO disminuyeron a lo largo del estudio, alcanzando valores significativamente más bajos al final de la experiencia ($p < 0.05$). Al comparar los 3 grupos entre si se observó que, los niveles de FAO basales no mostraban diferencias entre ellos. A los 4 meses, el grupo ZOL presentaba los niveles de FAO significativamente más bajos ($p < 0.05$), sin diferencias entre SHAM y OVX. Al final de la experiencia, el grupo OVX presentaba el nivel significativamente más alto de FAO ($p < 0.05$), sin diferencias significativas entre los grupos SHAM y ZOL.

Los niveles de CTX del grupo SHAM no mostraron diferencias significativas a lo largo de toda la experiencia.

Los niveles de CTX en las ovejas OVX aumentaron significativamente entre el periodo basal y el 4to. mes ($p < 0.05$); luego disminuyeron alcanzado niveles significativamente menores respecto del 4 mes, aunque significativamente mayores que el nivel basal ($p < 0.05$).

Grupos	Basal	4 meses	28 meses
Fosfatasa Alcalina Ósea (UI/L)			
SHAM	66.0±4.2d	64.7±9.2d	51.5±1a
OVX	65.0±4.7d	69.3±5.1d	58.3±0.6b
ZOL	62.3±6.9c,d	58.4±2.9b,c	50.8±3.4a
Telopéptido C-Terminal del colágeno Tipo I (CTX) (ng/mL)			
SHAM	432±33c	495±27c	544±19c
OVX	474±21c	826±32e	670±42d
ZOL	501±23c	355±15b	271±47a

Tabla 6. Marcadores de formación y resorción ósea, FAO y CTX respectivamente. Letras diferentes indican una diferencia estadísticamente significativa de $p < 0.05$ (media \pm DE)

Los niveles de CTX en el grupo ZOL disminuyeron significativamente a lo largo de la experiencia ($p < 0.05$). Al comparar los 3 grupos entre sí, se observó que, basalmente no existían diferencias en el nivel de CTX entre los tres grupos estudiados; al 4to. mes y final de la experiencia, el grupo OVX presentaba el nivel de CTX significativamente más alto y el grupo ZOL el nivel significativamente más bajo ($p < 0.05$) (Tabla 6)

Contenido de Ca y Pi en huesos

La Tabla 7 muestra los resultados del análisis del contenido de Ca y Pi en el defecto óseo realizado en mandíbula y del trozo de maxilar inferior, normalizada por peso corporal.

A los 24 meses de estudio se analizó el contenido de Ca y Pi (g/100 g de tejido) en el material obtenido del defecto óseo creado en el maxilar superior para colocar el implante. Los resultados de la Tabla 7 muestran que tanto el

contenido de Ca como de Pi presentaron valores significativamente más bajos en las ovejas OVX, en comparación con las de los grupos SHAM y ZOL ($p < 0.05$). La relación Ca/Pi no mostró diferencias significativas entre los grupos (Tabla 7).

Determinación del contenido	Tiempo (meses)	SHAM	OVX	ZOL
Ca Maxilar sup. (g/100g)	24	17.10±2.00	15.60±1.70*	16.80±0.00**
Pi Maxilar sup. (g/100g)	24	14.70±0.60	13.20±0.20*	13.80±0.80**
Ca/Pi (en Maxilar sup.)	24	1.18±0.04	1.14±0.13	1.15±0.06
Ca Mandíbula (g/100g)	28	17.30±1.60	14.50±0.70*	18.30±1.50**
Pi Mandíbula (g/100g)	28	15.2±2.4	11.7±3.2*	14.1±1.1**
Ca/Pi (en Mandíbula)	28	1.49±0.28	1.41±0.34	1.65±0.35*.**

Tabla 7. Contenido de Ca y Pi normalizada por peso corporal en la muestra maxilar superior al realizar el implante y en la mandíbula al final de la experiencia. (*): $p < 0.05$ respecto de SHAM y (**): $p < 0.05$ respecto de OVX (media ± DE)

Al final del estudio (mes 28), el contenido de Ca y Pi (g/100 g de hueso) del maxilar inferior (mandíbula) fue significativamente menor en el grupo OVX, respecto tanto del grupo SHAM como del grupo ZOL ($p < 0.05$). Si bien los valores de Ca fueron más altos en el grupo ZOL respecto del grupo SHAM, dichos valores no alcanzaron niveles de significación estadística ($p = 0.063$). Por otra parte no se observaron diferencias en el contenido de Pi entre los grupos SHAM y ZOL. La relación Ca/Pi no presentó diferencias significativas entre los grupos SHAM y OVX; sin embargo, dicha relación fue

significativamente mayor en el grupo ZOL respecto tanto de SHAM como del grupo OVX ($p < 0.05$) (Tabla 7).

La tabla 8 muestra el contenido en fémur de Ca y Pi (mg/100g de tejido) de los tres grupos estudiados, al final del estudio.

El contenido de Ca y Pi fue significativamente menor en el grupo OVX tanto respecto de SHAM como de ZOL ($p < 0.05$), mientras que ambos contenidos en el grupo ZOL fueron mayores que en el grupo SHAM, sin alcanzar diferencias estadísticamente significativas ($p = 0.055$ y 0.061 , respectivamente). La relación Ca/Pi en el fémur fue similar en los tres grupos estudiados (Tabla 8).

Determinación del contenido	Tiempo (meses)	SHAM	OVX	ZOL
Ca Femur (g/100g)	28	14.00±1.40	10.50±3.10*	15.40±2.6**
Pi Femur (g/100g)	28	9.20±0.60	8.40±0.80*	10.20±0.90**
Ca/Pi	28	1.28±0.08	1.26±0.16	1.22±0.09

Tabla 8. Contenido de Ca y Pi normalizada por peso corporal en fémur al final de la experiencia. (*): $p < 0.05$ respecto de SHAM (Media ± DE)

Densidad mineral en hueso

La Tabla 9 muestra la DMO y el CMO en fémur y hemi-mandíbula de los tres grupos estudiados, al final del estudio.

El CMO y la DMO en fémur total y proximal, y en hemi-mandíbula fueron significativamente menores en el grupo OVX, en comparación con las ovejas de los grupos SHAM y ZOL ($p < 0.05$). La DMO y CMO del fémur total no difirieron significativamente entre los grupos SHAM y ZOL; sin embargo, dichos parámetros en el fémur proximal y en hemi-mandíbula fueron significativamente mayores en el grupo ZOL respecto del grupo SHAM ($p < 0.05$) (Tabla 9).

Determinación	SHAM	OVX	ZOL
DMO Fémur Total	0.480±0.026	0.370±0.035*	0.457±0.019**
CMO Fémur Total	36.99±3.28	27.18±2.60*	34.00±2.01**
DMO Fémur Proximal	0.733±0.052	0.587±0.047*	0.830±0.052*,**
CMO Fémur Proximal	10.32±0.74	8.25±0.62*	11.81±0.97*,**
DMO Hemi-mandíbula	0.210±0.020	0.166±0.040*	0.255±0.026*,**
CMO Hemi-mandíbula	32.10±9.14	24.00±6.08*	42.27±3.20*,**

Tabla 9. Densidad mineral ósea (DMO) (DMO) y contenido mineral óseo (CMO), en hemi-mandíbula y fémur. (*): $p < 0.05$ respecto de SHAM y (**): $p < 0.05$ respecto de OVX (Media \pm DE)

Análisis histológicos

La Figura 13 muestra las secciones histológicas de las crestas iliacas al inicio del estudio donde se observa similar % BV/TV y número de trabéculas

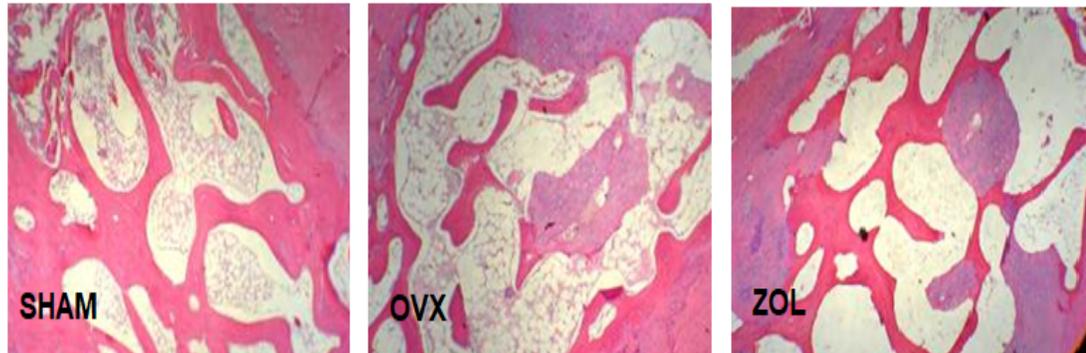


Figura 13: Secciones histológicas de la cresta ilíaca al inicio del estudio. Las microfotografías se tiñeron con hematoxilina eosina, Magnificación 40 X. El hueso trabecular se tiñe de rojo (1)

La Figura 14 muestra las crestas ilíacas de los tres grupos de estudio, al final del periodo experimental. Los resultados mostraron que % BV/TV de la cresta ilíaca fue significativamente menor en las ovejas OVX ($14.1 \pm 2.5\%$) en comparación con los grupos SHAM ($22.4 \pm 2.6\%$) y ZOL ($27.3 \pm 1.3\%$) ($p < 0.05$) y en el grupo ZOL respecto del SHAM ($p < 0.05$). Asimismo, puede observarse que el menor número y grosor trabecular lo presenta el grupo OVX, mientras que las ovejas ZOL presentaron un grosor trabecular mayor que las ovejas SHAM.

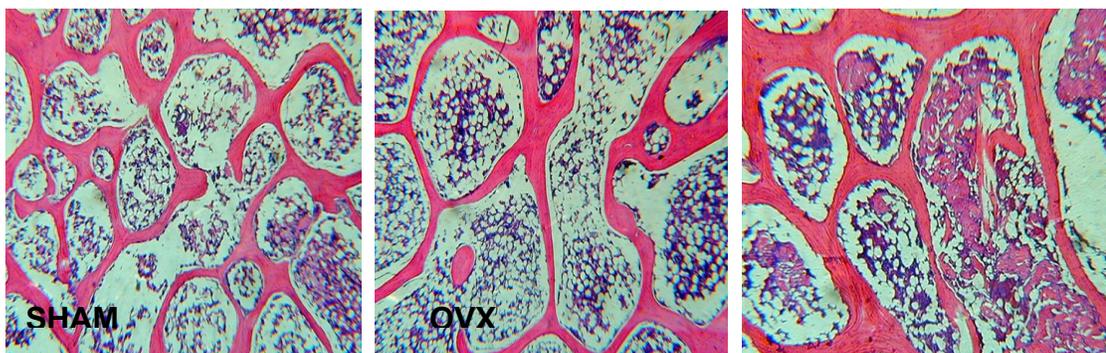


Figura 14: Secciones histomorfológicas de la cresta ilíaca al final del estudio. Las microfotografías de la cresta ilíaca se tiñeron con hematoxilina eosina. Las trabéculas se identifican por su tinción en rojo. Magnificación 40X.

Las Figuras 15 A y 15 B muestran la histología de los maxilares superiores con dos aumentos diferentes. Las ovejas SHAM y OVX mostraron un espacio bien definido con hendiduras (similar a las roscas de los implantes). Se observó (1) tejido óseo trabecular, (2) tejido conectivo y (3) áreas tapizadas con epitelio. Las ovejas OVX mostraron el área del implante limitada por (3) epitelio estratificado; (1) se observó un tejido óseo trabecular bien formado y (2) tejido conectivo. En el grupo ZOL se observa el área del implante donde se evidencia la falta del mismo. Dicha área se cubrió de (1) tejido óseo trabecular, (2) tejido conectivo.

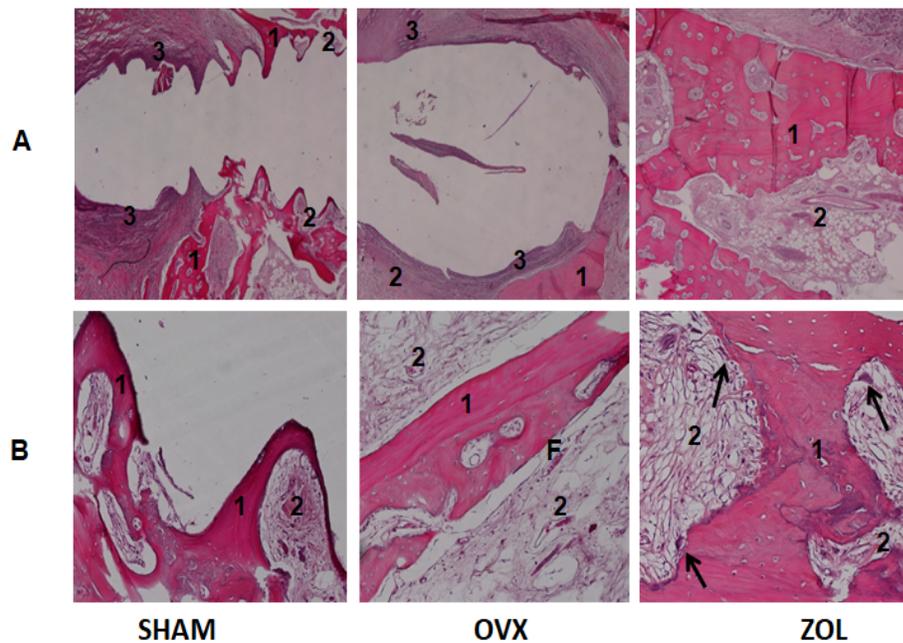


Figura 15: Microfotografías de los maxilares superiores de los tres grupos teñidas con hematoxilina eosina. (A) Magnificación 20X y (B) Magnificación 100 X. (1) tejido óseo trabecular de apariencia pagetoide; (2) tejido conectivo. Las flechas en el grupo ZOL señalan osteoclastos apoptóticos gigantes.

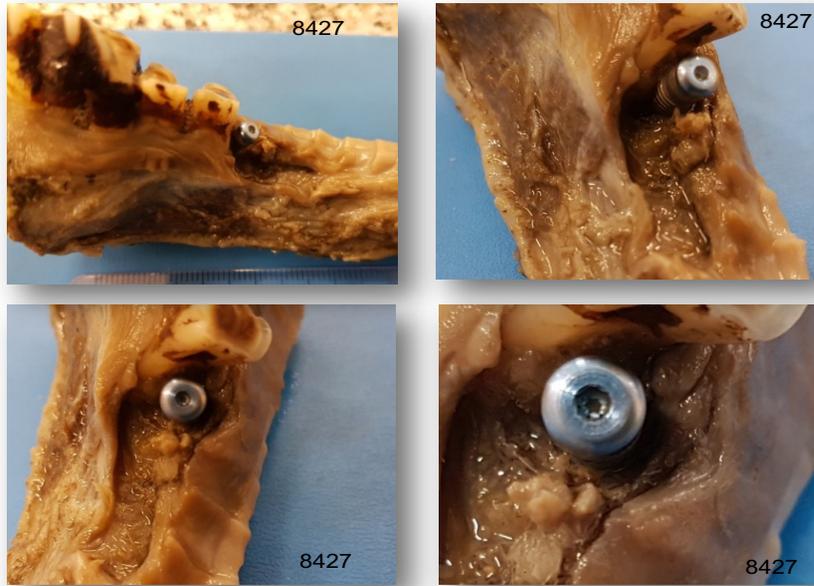


Figura 16: Macrofotografías del maxilar superior de la oveja tratada con ZOL que conservó el implante.

En la Figura 16 se observa la macrofotografía del implante en 4 ángulos distintos de la única oveja del grupo ZOL que conservó su implante.

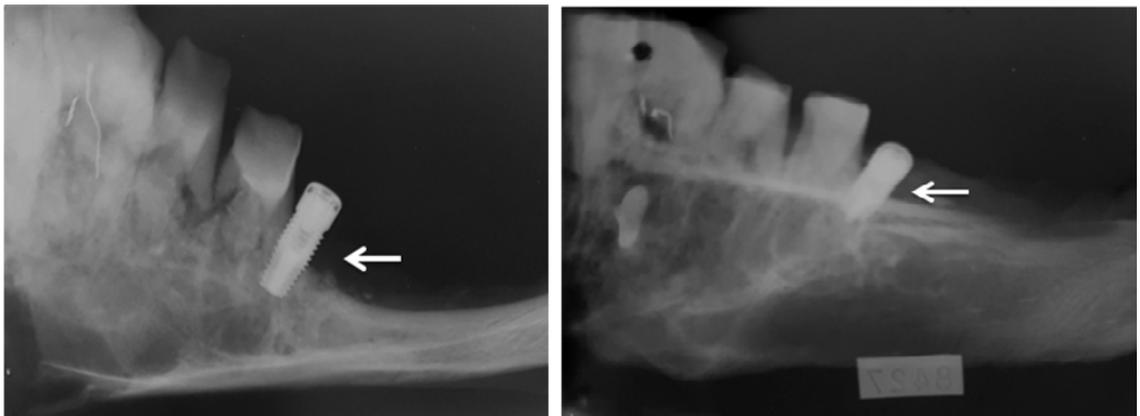


Figura 17: Radiografía del maxilar superior de la oveja tratada con ZOL que conservó el implante.

En la Figura 17 se observan dos imágenes radiográficas con distintos ángulos de la única oveja del grupo ZOL que conservó su implante. En ambas radiografías, la flecha señala la pérdida de tejido óseo peri-implante.

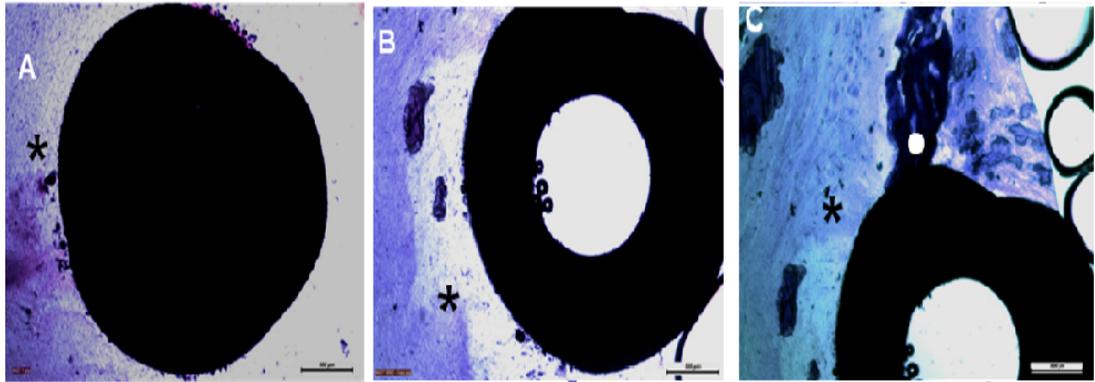


Figura 18: Tres microfotografías donde se puede apreciar el implante en negro, tejido blando de aspecto fibroso (*) y una escasa área de tejido óseo de tipo laminar (o). Cortes por desgaste. Tinción con Azul de toluidina. Magnificación Original X25

La Figura 18 muestra la histología de los cortes coronales del área del implante en contacto con tejido blando de aspecto fibroso*.

La Figura 19 muestra un corte más apical y de mayor magnificación. Se observa tejido blando de aspecto fibroso en forma periférica al implante * y escasa área de tejido óseo de tipo laminar en contacto con la superficie del implante °.

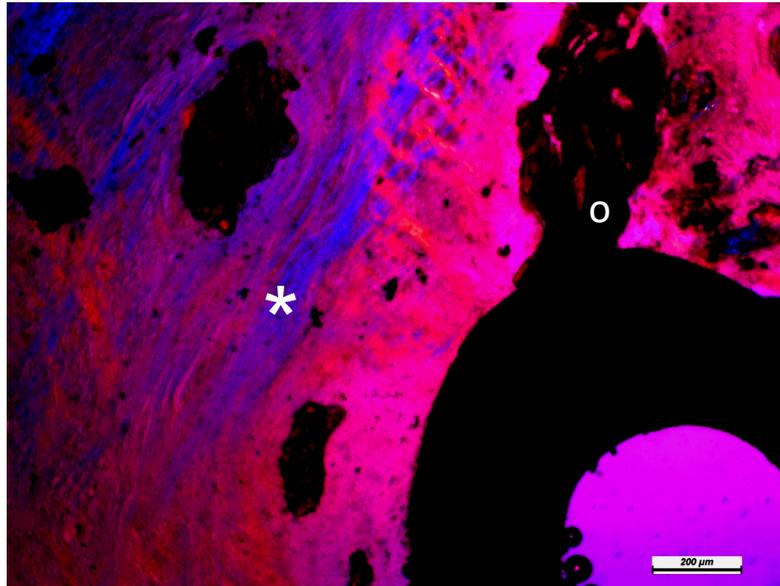


Figura 19: Corte histológico más apical de la zona del implante. Tejido blando (*) de aspecto fibroso periférico al implante y escasa área de tejido óseo de tipo laminar (o) en contacto con la superficie del implante. Cortes por desgaste. Azul de toluidina. Magnificación Original X50. Polarización.

DISCUSIÓN

En la actualidad, el tratamiento con BFs para la osteoporosis y otras patologías óseas, tanto orales como inyectables, es muy frecuente (Russell R, 2008). La potencia farmacológica de los BFs varía enormemente, siendo el ZOL el fármaco que, en la actualidad, presenta la mayor potencia relativa; por lo cual, una vez incorporado al hueso puede persistir en él hasta 10 años (Cheng A, 2009). Sin embargo, en pacientes que recibieron terapia con BFs por más de tres años se han reportado una serie de casos relacionados a dos tipos de efectos adversos que preocupan a los odontólogos: ONMBFs y problemas de óseo integración de los implantes dentales, que muchas veces llevan a la pérdida del mismo (Woo S, 2006).

Los primeros esbozos de ONMBFs se hicieron evidentes a comienzo del año 2000. En 2002, luego de 9 meses de la aprobación del uso del ZOL para prevenir eventos esqueléticos relacionados a oncología, la Administración Americana de Alimentos y Drogas (FDA) decidió recibir reportes voluntarios de los médicos tratantes relacionado a los efectos adversos resultantes de su uso. Dichos informes describían distintos efectos severos y tóxicos a nivel de los maxilares producidos en 9 pacientes tratados con el BF por cáncer. Hacia 2006, más del 90% de los pacientes que desarrollaron ONMBFs correspondían a sujetos oncológicos tratados con altas dosis del BFs endovenoso (Edwards BJ, 2008). En el año 2008 y de acuerdo a los datos de la FDA, el 93% de las ONMBFs se asociaban al tratamiento crónico con altas dosis de BFs por vía endovenosa, principalmente utilizadas en pacientes oncológicos (Division of Drug Risk Evaluation, 2008), y similares a las utilizadas en el presente estudio. Más adelante se describió el desarrollo

de también este tipo de patología dentaria relacionada al uso de BFs orales por más de tres años, y en algunos casos sin intervenciones orales.

La fisiopatología exacta de ONMBFs no ha sido dilucidada por completo, aunque existe consenso general de que sería de tipo multifactorial en el cual convergirían varios de los efectos ejercidos por los BFs. En este sentido, los efectos de los BFs respecto a la disminución del recambio óseo, la reducción en la angiogénesis y la alteración en los procesos inmunitarios se encuentra bien documentados (Ruggiero SL, 2014). Si bien la osificación de los maxilares es similar al que ocurre en el resto del esqueleto, el remodelamiento óseo del hueso maxilar es aproximadamente 10 superior, debido a los diferentes estímulos homeostáticos ejercido por estructuras mesodérmicas, ectodérmicas y piezas dentarias (Zahrowski JJ, 2007; Allen MR, 2011). Este hecho hace que los BFs se concentren altamente en los maxilares, cuyo resultado es la inducción de una intensa reducción en el remodelamiento óseo, lo cual constituye una de las explicaciones fundamentales para la exclusiva predisposición por dicho sitio a padecer ONMBFs. Las características anti-angiogénicas de los BFs con isquemia localizada y la consecuente necrosis ósea de la región afectada lo cual podría también explicar, parcialmente, el desarrollo espontáneo de ONMBFs (Ruggiero SL, 2014). Estudios de la histopatogénesis de las lesiones de ONMBFs evidencian detritus celulares, colonias bacterianas y gran infiltrado inflamatorio, así como la presencia de trabéculas escleróticas necróticas y más delgadas que lo normal, con aspecto de mosaico. Dicho aspecto es similar a la de un hueso con características pagetoides (Paparella ML, 2014; Wehrhan F, 2011). En este sentido, se debe recordar que el hueso alveolar se encuentra separado de la microflora oral por una fina capa de tejido mucoso. La falta de contacto entre el trabeculado y la médula ósea bloquea la nutrición del tejido óseo; en un primer momento en forma aséptica pero la exposición del hueso al medio bucal séptico podría generar una infección secundaria debido a la patogenicidad de la microbiota presente en dicho sitio

(Si Huei L, 2014). En este sentido, las exodoncias dentarias, las caries profundas, los traumatismos y la enfermedad periodontal podrían permitir que ciertos patógenos alcancen la superficie ósea y penetren, provocando una infección lo cual es comúnmente observada en ONMBFs (Khan A, 2015).

La evidencia clínica sugiere que el tratamiento prolongado con BFs podría alterar la oseointegración provocando la pérdida del implante o la pérdida de la función de un implante oseointegrado (de Freitas N, 2016). En este sentido, la oseointegración presenta una fase de remodelación ósea, en la cual se produce la renovación del hueso, incluyendo a la del hueso en contacto con la superficie del implante, ambos afectados por el tratamiento con BFs. Por lo tanto, dado que los BFs reducen significativamente el recambio óseo, no es de extrañar que la oseointegración pueda verse comprometida o que la posterior pérdida de integración pueda ocurrir después de la colocación exitosa del implante (Goss A, 2010).

El estudio de la etiología de ONMBFs en humanos es complicado debido a la existencia de factores confundidores que usualmente son irrelevantes en modelos preclínicos. Por ello, los modelos animales son sumamente importantes para comprender diversos aspectos del mecanismo patológico que se produce ante el tratamiento con BFs y que podría dar lugar a los dos efectos adversos antes mencionados, así como para establecer estrategias de prevención y control de la patología. La mayoría de las investigaciones básicas en este campo se han realizado en ratas (Pautke C, 2012). Si bien los pequeños animales, como los roedores, son menos costosos y fáciles de alojar, también presentan una serie de desventajas. Las ratas no sólo son demasiado pequeñas para permitir varios procedimientos quirúrgicos orales, sino que, además, los animales adultos desarrollan cementosis (Lovschall H, 2002; Gomez P, 2012). Por otro lado, el hueso cortical de rata carece de Sistema de Havers y no experimenta un recambio intracortical, que

parecería jugar un papel importante en el desarrollo de ONMBFs (Pautke C, 2012). En cambio, las ovejas son animales grandes y son un modelo preclínico adecuado por diversas razones. En este sentido, se encuentran genéticamente más cerca de los humanos que las ratas y los ratones; su tasa metabólica es más cercana a la del hombre (0,22 frente a 0,21); tienen proceso de remodelación ósea haversiana y, al igual que las mujeres, tienen menarca y ciclos ovulatorios regulares y frecuentes (Thorndike E, 1996). La pérdida de hueso que se produce en las ovejas OVX luego de la cirugía se asemeja al de las mujeres durante la posmenopausia temprana. En este sentido, dichas ovejas presentan una disminución importante de la DMO luego de 12 meses o más, posteriores a la cirugía (Turner A, 2002). Además es posible obtener una cantidad suficiente de muestras biológicas tales como sangre y orina y pueden realizarse múltiples extracciones de biopsias de cresta iliaca. En sangre, los productos de actividad de osteoblastos y osteoclastos (por ejemplo, fosfatasa alcalina ósea, osteocalcina y CTX) se encuentran claramente definidos (Newton B, 2004). En cuanto a la cavidad bucal de la oveja, la pérdida de masa ósea sistémica posterior a la OVX se acompaña de pérdida ósea en la cavidad bucal. Además, la oveja puede desarrollar periodontitis y son animales suficientemente grandes como para poder realizar intervenciones dentales (Reinwald S, 2006; Johnson R, 2002; Turner A, 2002).

Se han evaluado muchos modelos de ONMBFs y falta de éxito en la colocación de implantes en animales pequeños (roedores) (Senel F, 2010) y grandes (perros, cerdos pequeños y ovejas) (Allen M, 2008; Pautke P, 2012; Voss P, 2015). Dichos estudios mostraron la presencia de regiones necróticas en la cavidad oral después del tratamiento con BFs. Sin embargo, en todos los estudios, excepto en uno (Voss P, 2015) se co-administraron otros fármacos que podrían haber contribuido a aumentar la incidencia de ONMBFs y /o el fracaso del implante. En la presente tesis, se evaluaron los cambios orales exclusivamente asociados al tratamiento por largos periodo

de tiempo con ZOL, utilizando un régimen similar al utilizado para pacientes con cáncer (Clemons M, 2006).

Como se mencionara previamente, el hueso mandibular y alveolar son sitios de altísima captación y acumulación de BFs, debido a que la elevada tasa de remodelado óseo en dichos huesos las cuales alcanzan cifras varias veces superiores a las observadas en otros sitios esqueléticos (Senel F, 2010). Se ha sugerido que esta mayor captación local de BFs daría como resultado que una elevada concentración del fármaco en el epitelio oral con efectos directamente tóxicos en dicho tejido. En el presente estudio, los cambios observados en la cavidad oral durante el período experimental sugieren cierto grado de toxicidad. De hecho, las ovejas tratadas con ZOL mostraron un retraso en la epitelización del alveolo post-extracción, en comparación con los grupos restantes, durante el primer mes posterior a la exodoncia dentaria. Sin embargo, la epitelización del sitio de las exodoncias fue similar en todos los grupos al final del estudio, probablemente debido a la larga duración del experimento.

Por otra parte, el epitelio gingival de las ovejas tratadas con el BF mostró un grado de inflamación comparativamente más alto durante todo el estudio y, lo que es más importante, 2 de las 6 ovejas tratadas con ZOL mostraron signos de hueso oral expuesto similar al ONMBFs, sin signos de necrosis en otro sitio esquelético. El hallazgo de que algunos animales hayan desarrollado ONMBFs y otros no podría deberse a la susceptibilidad o resistencia individual a desarrollar dicha patología, o a diferencias genéticas en la homeostasis ósea entre ovejas, como ocurre en humanos. La ONMBFs puede ocurrir en el maxilar o en la mandíbula, pero a menudo se observa en la mandíbula. En el presente estudio, el desarrollo de ONMBFs se produjo en la mandíbula y no en el maxilar superior, sitio donde se efectuó la exodoncia dentaria y se alojó el implante dentario. Se debe recordar que tanto la mandíbula como el maxilar superior están directamente expuestos al

interior de la cavidad bucal y que, además, están cubiertos sólo por una fina mucosa oral y, por lo tanto, son susceptibles a lesiones por inflamación debido a una infección dentaria o incluso a la masticación. En este sentido, cabe destacar que en el sitio de la región necrótica se produjo infección por *Actinomyces* spp. Por esa razón, es muy probable que los procedimientos odontológicos invasivos efectuados en el presente estudio puedan haber propagado fácilmente la infección dentaria a través del epitelio delgado, lo cual pudo haber jugado un papel crucial en el desarrollo de ONMBFs en la mandíbula.

Por otra parte, se observó pérdida del implante en el 80% de las ovejas tratadas con el BF (5 de las 6 ovejas), mientras que todos los implantes permanecieron en su lugar en los animales controles u OVX, sin tratamiento antirresortivo. Asimismo es de destacar que el estudio histológico del implante en la oveja OVX tratada con ZOL mostró carencia de oseointegración, tal como se describe en las observaciones clínicas. Probablemente, la falta de oseointegración haya sido la responsable de la falla y caída de los implantes en el resto de las ovejas tratadas con ZOL.

Es sabido que la supresión del recambio óseo aumenta la edad media del tejido esquelético lo cual afecta las propiedades biomecánicas del hueso. Ambas condiciones patológicas estudiadas aquí están asociadas a una supresión excesiva y prolongada del recambio óseo causado por el tratamiento crónico con BFs. Este efecto fue confirmado en el presente estudio mediante estudios bioquímicos, histológicos y densitométricos. En este sentido, los resultados de la presente tesis confirmaron una intensa supresión del remodelamiento óseo en los animales tratados con ZOL. Es de destacar que CTX se considera en la actualidad como uno de los marcadores bioquímicos de resorción más específico y sensible para evaluar cambios en la resorción osteoclástica (Scariano JK, 2001; Vasikaran S, 2011). La intensa reducción en el remodelamiento óseo podría haber

afectado las propiedades biomecánicas del tejido. En concordancia con esto, los estudios bioquímicos de contenido de Ca y Pi en mandíbula mostraron valores superiores en los animales tratados con ZOL respecto de los animales OVX, como se esperaba, pero además también respecto de los controles SHAM. Esta mayor masa ósea estuvo acompañada de una posible alteración en el proceso de mineralización, ya que la relación Ca/Pi mandibular del grupo ZOL fue superior al de los otros dos grupos. Estas observaciones diferenciaron el comportamiento del hueso mandibular respecto del femoral, ya que en este último, si bien -como se esperaba- los contenidos fueron superiores en los animales tratados con BFs, los valores no mostraron diferencias entre los animales tratados con ZOL y SHAM. Este efecto fue corroborado mediante el estudio de volumen óseo en la cresta iliaca la cual mostró valores similares en el grupo ZOL y control. Por otra parte, los estudios de densidad y contenido de hueso tanto del maxilar como del fémur proximal mostraron un comportamiento similar al del contenido mineral ya que en los animales tratados con BFs se obtuvieron cifras varias veces superiores respecto del grupo OVX pero también respecto del control. Finalmente se debe puntualizar en el fémur total los cambios en densidad y contenido mineral fueron similares en el grupo tratado y control. Los hallazgos diferentes entre el fémur total y proximal se debe a que el fémur entero presenta un alto porcentaje de hueso cortical mientras que el fémur proximal es más rico en hueso trabecular, metabólicamente más activo que el hueso cortical, de allí que las diferencias hayan sido más notorias.

La toxicidad renal y la diarrea se describieron como efectos secundarios del tratamiento con ZOL. La toxicidad renal se ha identificado como una complicación del tratamiento con 4 mg de ZOL, y aunque las causas del deterioro renal son multifactoriales, la necrosis tubular aguda ha sido descrita como uno de los potenciales mecanismos (Chang J, 2003). Basándome en el hecho de que los BFs se excretan inalterados a través de los riñones, los efectos celulares similares a los documentados en el

osteoclasto podrían explicar los posibles mecanismos de las nefropatías observadas después de tiempos de infusión prolongados con ZOL (Markowitz G, 2003). Una lesión tubular tóxica asociada al ZOL no podría ser descartada como una de las posibles causas de muerte de la oveja por insuficiencia renal observada en el presente estudio.

Otro de los efectos secundarios del tratamiento con ZOL son las alteraciones cardiovasculares. En dichas alteraciones se observa aumento del riesgo de episodios de fibrilación auricular como consecuencia de una alteración en la concentración de iones intracelulares y en las propiedades proinflamatorias, profibróticas y antiangiogénicas de los BFs (Demirtas D, 2017). En este sentido, según la escala de causalidad de la Organización Mundial de la Salud (OMS), el tratamiento prolongado con ZOL es una causa probable de diarrea aguda grave con la consiguiente hipopotasemia (Kuchay M, 2017). Dicho desequilibrio electrolítico está relacionado con la fibrilación auricular, lo cual aumenta el riesgo de insuficiencia cardíaca, mortalidad cardíaca y mortalidad total. En base a ello, es muy probable que la diarrea observada en la segunda oveja pudiera haber provocado el mencionado efecto cardiovascular adverso y la muerte del animal.

En conclusión, dentro del contexto del diseño del presente estudio, fue posible observar que en las ovejas OVX tratadas con uno de los BFs más potentes en la actualidad se produjeron cambios en el metabolismo óseo sistémico y oral comparables a los que se producen en seres humanos tratados con un esquema similar al que se administra rutinariamente a los pacientes neoplásicos. La remodelación ósea se suprimió en gran medida y el implante dental no logró oseointegrarse mientras se desarrollaba ONMBF en algunas de las ovejas tratadas. Estos datos hacen avanzar nuestra comprensión de cómo el tratamiento con BFs en forma crónica afecta los huesos del esqueleto oral y sugieren que la oveja puede ser un modelo útil para estudiar la patogénesis de la ONMM. Aunque es necesario confirmar

algunos aspectos de los dos efectos secundarios orales estudiados aquí, los resultados del presente estudio mostraron la viabilidad de este modelo animal grande para evaluar los problemas de implantes orales y la patogénesis de la ONMM asociada al tratamiento con BFs.

CONCLUSIONES

Bajo las condiciones experimentales utilizadas en ovejas ovariectomizadas tratadas con un BF de gran potencia como el ZOL, utilizando un esquema similar de dosis al que rutinariamente se realiza a los pacientes con cáncer se observó hallazgos similares a los reportados en la literatura:

1. una intensa disminución en el remodelamiento óseo.
2. Alteración de los procesos de reparación celular en etapas tempranas.
3. Efecto negativo sobre la actividad infecciosa local
4. Gran porcentaje de pérdida de implantes dentales
5. Desarrollo de secuestros óseos y ONMBFs en algunas de las ovejas

Aunque son necesarios más estudios, estos resultados muestran la factibilidad de lograr un modelo experimental en animales grandes para evaluar la patogenia de la osteonecrosis de maxilar asociada al tratamiento con bifosfonatos destinados fundamentalmente a la prevención.

BIBLIOGRAFIA

Allen MR, Burr DB. Mandible matrix necrosis in Beagle dogs after 3 years of daily oral bisphosphonate treatment. J. Oral Maxillofac Surg. 2008; 66:987-994.

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

Baga JV. Jaw osteonecrosis associated with bisphosphonates: Multiple exposed areas and its relationship to teeth extractions. Study of 20 cases. Oral Oncology.2006; 42:327-329.

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; 24:4895-4900.

Clemons MJ, Dranitsaris G, Ooi WS, Yogendran G, Sukovic T, Wong BY, 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; 24:4895-4900.

Coleman RE. [Metastatic bone disease: clinical features, pathophysiology and treatment strategies](#). Cancer Treat Rev. 2001; 27:165-176.

Compston J. Pathophysiology of atypical femoral fractures and osteonecrosis of the jaw. Osteoporos Int. 2011; 22:2951-2961.

Chang JT, Green L, Beitz J. Renal failure with the use of zoledronic acid. *N Engl J Med.*2003; 349:1676–1679.

Cheng A, Daly CG, Logan RM, Stein B, Goss AN. Alveolar bone and the bisphosphonates. *Aust Dent J.* 2009; 54 Suppl 1: S51-61.

De-Freitas NR, Lima LB, de-Moura MB, Veloso-Guedes CC, Simamoto-Júnior PC, de-Magalhães D. Bisphosphonate treatment and dental implants: A systematic review. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.*2016; 21:644-651.

Demirtas D, Billir C, Dermitas AO, Enging H. The effects of zoledroni acid on ECG: a prospective study on patients with bone metastatic cancer. *Clin Cases Miner Bone Metab.*2017;14:35-39.

Dodson TB. The frequency of medication related osteonecrosis of the jaw and its associated risk factors. *Oral Maxillofac Surg Clin North Am.* 2015; 27: 509-516.

Edwards BJ, Gounder M, McKoy JM et al. Pharmaco vigilance and reporting oversight in US FDA fast-track process: bisphosphonates and osteonecrosis of the jaw. *Lancet Oncol* 2008; 9:1166-1172.

Escudero ND, Mandalunis PM. Influence of bisphosphonate treatment on medullary macrophages and osteoclasts: an experimental study. *Bone Marrow Res.*2012: Article ID 526236.

Ferlito S, Puzzo S, Liardo C. Preventive protocol for tooth extractions in patients treated with zoledronate: a case series. *J Oral Maxillofac Surg.*2011;69(6):e1-4.

Fini M, Giavaresi G, RimondiniL, Giardino R. 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.

Fusco V, Santini D, Armento G, Tonini G, Campisi G. Osteonecrosis of jaw beyond antiresorptive (bone-targeted) agents: new horizons in oncology. *Expert Opin Drug Saf.* 2016; 15 (7):925-935.

Gómez PA, Cabrini RL. Anatomic variations of the root canal of the rat according to age. *Acta odontol latinoam.* 2004; 17:39-42.

Goodship AE, Walker PC, Mc Nally D, Chambers T, Green JR. Use of a bisphosphonate (pamidronate) to modulate fracture repair in ovine bone. *Ann Oncol.* 1994; (7):53-55.

Goss A, Bartold M, Sambrook P, Hawker P. The nature and frequency of bisphosphonate-associated osteonecrosis of the jaws in dental implant patients: a South Australian case series. *J Oral Maxillofac Surg.* 2010;68:337-343.

Guelman R et al. Osteonecrosis de los maxilares asociada a medicamentos (ONMM). *Actual. Osteol.* 2020,16(3):232- 252.

Johnson RB, Gilbert JA, Cooper RC, et al. Effect of estrogen deficiency on skeletal and alveolar bone density in sheep. *J Periodontol.* 2002; 73:383-391.

Katz J, Gong Y, Salmasinia D, Hou W, Burkley B, Ferreira P, Casanova O, Langae TY, Moreb JS. Genetic polymorphisms and other risk factors associated with bisphosphonate induced osteonecrosis of the jaw. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2011; 40(6):605-611.

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

Khan AA, Morrison A, Kendler DL, Rizzoli R, Hanley DA, Felsenberg D et al. Case-based review of osteonecrosis of the Jaw (ONJ) and application of the international recommendations for management from the international task force on ONJ. *J Clin Densitom.* 2017; 20(1):8-24.

Khosla S, et al. Bisphosphonate-associated osteonecrosis of the jaw: report of a task force of the American Society for Bone and Mineral Research. *J Bone Miner Res.*2007; 22:1479-1491.

Kuchay MS, FarroquiKJ,Mithal A. Acute severe diarrhea and hyponatremia after zoledronic acid infusion: an acute phase reaction. *Clin Cases Miner Bone Metab.*2017; 14:101-104.

Kuroshima S, et al. Medication related osteonecrosis of the jaw: a literatura review. *J. Oral Biosci.*2019; 61:99-104.

Larroudé MS, Vinocur L, Moggia MS, et al. Osteonecrosis de maxilar y bisfosfonatos. Revisión de la literatura a propósito de dos casos clínicos. *Revista Argentina de Osteología.*2009; 8:11-21.

Lee CY, Suzuki JB. CTX Biochemical Marker of Bone Metabolism. Is It a Reliable Predictor of Bisphosphonate-Associated Osteonecrosis of the Jaws After Surgery? Part II: A Prospective Clinical Study. *Implant Dent.*2010; 19:29-38.

Lovschall H, Fejerskov O, Josephsen K. Age-related and site-specific changes in the pulpodentinal morphology of rat molars. *Arch Oral Biol.*2002; 47:361-367.

Luckman SP, Hughes DE, Coxes FP, Russell RG, Rogers MJ..Nitrogen containing bisphosphonates inhibit the mevalonate pathway and prevent post translational prenylation of GTP binding proteins. *J Bone Miner Res.*1998; 13 : 581-589.

Markowitz GS, Fine PL, Stack JI et al. Toxic acute tubular necrosis following treatment with zoledronate (Zometa).*Kidney Int.*2003; 64:281-289.

Mehrotra B. Bisphosphonates-Role in cancer therapies. J Oral Maxillofac Surg.2009; 67:19-26.

Misso G, Porru M, Stoppacciaro A. et. al. Evaluation of the in vitro and in vivo antiangiogenic effects of denosumab and zoledronic acid. Cancer BopI Ther.2012; 13:1491-1500.

Newton BI, Cooper RC, Gilbert JA, Johnson RB, Zardiackas LD.The Ovariectomized Sheep as a Model for Human Bone Loss. J Comp Pathol.2004; 130:323-326.

Nicolatou-Galitis O, Schiødt M, Mendes RA, Ripamonti C, Hope S, Drudge-Coates L, Niepel D, Van den Wyngaert T. . Medication related osteonecrosis o the jaw: definition and best practive for prevention, diagnosis, and treatment. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol.2019: 127:117-135.

Otto S, et al. Bisphosphonate related osteonecrosis of the jaw: is pH the missing part the pathogenesis puzzle? J Oral Maxillofac Surg. 2010; 68:1158-1161.

Pamer C. Posmarketing safety assessment of Osteonecrosis of the Jaw. Oncologic Drug Advisory Committee, FDA.2008. Disponible en: http://www.fda.gov/ohrms/dockets/ac/05/slides/2005-4095S2_03_02-FDA-Pamer,C.

Paparella M L, Brandizzi D, Santini Araujo E, et al. Osteonecrosis of the Jaw Associated with Bisphosphonates. A. Histopathological Study of 24 Cases. JMS Dent 2014; 2: 1037.

Parfitt AM, Drezner MK, Glorieux FH, et al. Bone histomorphometry: standardization of nomenclature, symbols, and units: report of the ASBMR Histomorphometry Nomenclature Committee. J Bone Miner Res.1987; 2:595–610.

Pautke C, Kreutzer K, Weitz J, et al. Bisphosphonate related osteonecrosis of the jaw: a minipig large animal model. *Bone*.2012; 51:592–599.

Picardo SN, Rey EA. Osteonecrosis of the jaw in patients undergoing long-term treatment with bisphosphonates: incidence and associated characteristics. *J Clin Med Case Stud*. 2017; 2:48-54.

Picardo SN, Rodríguez Genta SA, Rey EA. Osteonecrosis maxilar asociada a bifosfonatos en pacientes osteoporóticos. *Rev EspCirugía Oral Maxilofac*.2015; 37:103-107.

Reid IR, Cundy T. Osteonecrosis of the jaw. *Skeletal Radiol*. 2009; 38:5-9.

Reinwald S, Burr D. Review of nonprimate, large animal models for osteoporosis research. *J Bone Miner Res*.2008; 23:1353-1368.

Rizzoli R, Burletn, Cahall D, et al. Osteonecrosis of the jaw and bisphosphonate treatment for osteoporosis. *Bone*.2008; 42:841-847.

Rogers MJ, Gordon S, Benford HL, Coxon FP, Luckman SP, Monkkonen J, Frith JC. Cellular and molecular mechanisms of action of bisphosphonates. *Cancer*. 2000; 88(12 Suppl):2961-2978.

Ruggiero SL, Drew SJ. Osteonecrosis of the jaws and bisphosphonate therapy. *J Dent Res*. 2007; 86(11):1013-1021.

Ruggiero SL, DodsonTB, Fantasia J, Goodday R, Aghaloo T, Mehrotra B, O’Ryan F. American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons position paper on medication-related osteonecrosis of the jaw – 2014 update. *J Oral Maxillofac Surg*.2014; 72:1938-1956.

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

Russell, RGG. Watts NB, Ebetino FH, Rogers MJ. Mechanisms of action of bisphosphonates: similarities and differences and their potential influence on clinical efficacy. *Osteoporosis international.* 2008; 19,733-759.

Santini D, et al. Repeated intermittent low dose therapy with zoledronic acid induced an early, sustained, and long-lasting decrease of peripheral vascular endothelial growth factor levels in cancer patients. *Clin Cancer Res.* 2007; 13:4482-4486.

Sartori P, Rajcovich G, Taborda N, Saleme Daza M.C., Nally C. Osteonecrosis del maxilar inferior por bifosfonatos. Presentación de caso. *Rev Argent Radiol.* 2015; 79(1):40-46.

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: 639-644.

Si Huei L, Chan RC, Chang SS, et al. Use of bisphosphonates and the risk of osteonecrosis among cancer patients: a systemic review and meta-analysis of the observational studies. *Support Care Cancer.* 2014; 22:553-560.

Sigrist IMC, Gerhardt M, Alini E, Schneider, Egermann M. The long-term effects of ovariectomy on bone metabolism in sheep. *J Bone Miner Res.* 2007; 25: 28–35.

Sook BW, Hellstein J, Hohn RK. Systemic Review: Bisphosphonates and osteonecrosis of the jaws. *Ann Intern Med.* 2006; 144:753-761.

Thorndike EA, Turner AS. In search of an animal model for postmenopausal

diseases. *Front Biosci.*1998; 3:17-26.

Turner AS. The sheep as a model for osteoporosis in humans. *Vet J.*2002; 163:232-239.

Van der Waal I. Bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws. *Tijdschr Tandheelkd.*2012; 119(4):206-211.

Vasikaran S, Eastell R, Bruyère O, et al. Markers of bone turnover for the prediction of fracture risk and monitoring of osteoporosis treatment: a need for international reference standards. *Osteoporos Int.*2011; 22: 391-420.

Voss PJ, Stoddart M, Ziebart T, et al. Zoledronate induces osteonecrosis of the jaw in sheep. *J Craniomaxillofac Surg.*2015; 43:1133-1138.

Wehrhan F, Stockmann P, Nkenke E, et al. Differential impairment of vascularization and angiogenesis in bisphosphonate associated osteonecrosis of the jaw-related mucoperiosteal tissue. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.*2011; 112: 216-221.

Woo SB, Hellstein JW, Kalmar JR. Systematic review: bisphosphonates and osteonecrosis of the jaws. *Ann Intern Med.*2006; 144:753-761.

Zahrowski, J. J. Bisphosphonate treatment: an orthodontic concern calling for a proactive approach. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.*2007; 131:311-320.

ANEXO

ANEXO 1: Informe Comité de Bioética



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
COMITE DE ETICA DEL HOSPITAL DE CLINICAS
Av. Córdoba N° 2351 – Piso 11 - Ciudad de Buenos Aires - ARGENTINA

Juan Carlos Tealdi
Director
Médico, Bioética

Buenos Aires, 26 de diciembre de 2016.-

Miguel Chaves Zambrano
Director Adjunto
Médico, Terapia Intensiva

A: Investigadora Principal, Susana Zeni del Laboratorio de Osteopatías Metabólicas, INIGEM (UBA/CONICET)

María Luisa Pfeiffer
Coordinadora Académica
Filosofía, Bioética

REF: Protocolo titulado “Modelo Experimental en ovejas para evaluar tratamiento crónico con Bisfosfonatos (BPs) y su relación con osteonecrosis maxilar (ONM) e implantes dentales”

Silvina Casabé
Secretaría Administrativa

Adriana Abud
Trabajadora Social

Juan José Etchepareborda
Médico, Fertilidad

DOCUMENTACIÓN PRESENTADA: Proyecto de investigación

Gloria Genoud
Psicóloga Clínica

Daniel Goldenberg
Médico, Farmacología Clínica

VISTA la documentación detallada relacionada con el estudio de referencia, la cual fue evaluada por la Comisión de Investigación de este comité en su reunión del día 20 del corriente,

Marcelo Gorga
Médico, Neuropediatría

Norma Muras
Enfermera, Cuidados Paliativos

Mario Romero
Enfermero, Terapia Intensiva

ESTE COMITÉ aprueba la documentación presentada para su implementación en el Hospital de Clínicas de la Universidad de Buenos Aires

Alfredo Raúl Semberoiz
Médico, Clínica Médica

Adjuntos
Marta Bigliardi
Docente, Bioquímica

Verónica Kostov
Docente, Filosofía

Andrea Catanzaro
Abogada

Asesores
Ma. del Carmen Bacqué
Médica, Transplante Renal

Alfredo Ortiz Frágola
Médico, Psiquiatría

Graciela Prece
Socióloga, Salud y Sociedad

Paula Siverino Bavio
Abogada, Derechos Humanos


Juan Carlos Tealdi
Director