

Trabajos Originales:

ESTUDIO HISTOPATOLÓGICO SOBRE EL EFECTO DE UNA NUEVA FORMULACIÓN DE ALENDRONATO ADMINISTRADO POR VÍA SUBCUTÁNEA*Recibido para arbitraje: 29/10/2007**Aceptado para publicación: 12/11/2008***Aramburú Guillermo, Aguzzi Alejandra, Hubert Sergio, Virga Carolina****Resumen**

Estudios previos han demostrado que los aminobisfosfonatos, como el alendronato de sodio es un potente inhibidor de la reabsorción ósea, incrementa la densidad mineral del hueso y reducen los riesgos en fracturas de mujeres posmenopáusicas. El objetivo de este estudio fue desarrollar e investigar una nueva formulación en base a Alendronato, para ser colocada en forma subcutánea en el sitio quirúrgico. **Materiales y métodos:** La fórmula farmacéutica fue preparada con una dosificación de 0,5 mg/Kg de peso, se le adicionó buffer especiales, con un pH final de 5,5 en medios estériles. El control fueron buffers sin principios activos. El efecto de alendronato se evaluó en ratas machos Wistar (de 9 semanas de edad y un peso 176-214 g, n=8 por grupo), las cuales fueron divididas en dos grupos uno control y otro problema, La droga se inyectó en forma subcutánea en tiempos 0, 7, 14 y 30 días. Los animales fueron anestesiados con una solución de Ketamina/xilazina. Se realizó en la tibia incisiones las cuales no fueron rellenadas. Todos los animales fueron sacrificados por sobredosis con éter. Los parámetros estudiados fueron evaluación histopatológica observando infiltración de células inflamatorias (ICI), número y morfología de osteoclastos, lagunas de reabsorción (superficie del osteoclasto) y actividad osteoclástica. El análisis estadístico se realizó con el test chi cuadrado. **Resultados:** Los datos obtenidos no revelan diferencias estadísticamente significativas entre el grupo control y el grupo alendronato con respecto a (ICI), número de osteoclastos y actividad osteoblástica. En cuanto a la morfología de osteoclastos, lagunas de reabsorción (superficie del osteoclasto) y actividad osteoclástica, las diferencias estadísticas fueron significativas entre los dos grupos, favoreciendo al grupo que utilizó alendronato. Tejido oseó en remodelado, con trabéculas conteniendo osteoblastos con osteocitos viables e importante actividad osteoblástica y osteoplástica. En cuanto a la actividad de fosfatasa alcalina las diferencias estadísticas fueron notorias entre los grupos. Los valores inclusive fueron variando con los días de tratamiento deduciendo la actividad ósea con los sucesivos tratamientos. Tiempo 0: 480,00 UI/I Tiempo 7: 500,00 UI/I Tiempo 15: 652,00 UI/I Tiempo 30: 824,00 UI/I **Conclusiones:** Estos estudios preliminares sugieren que el alendronato colocado en forma parenteral podría ser efectivo en la prevención de la pérdida ósea en las patologías óseas de la cavidad oral.

Palabras claves: Bisfosfonatos, Alendronato, Biopolímeros, remodelación ósea.**Abstract**

Previous studies have shown that aminobisphosphonates, such as alendronate sodium is a potent inhibitor of bone resorption, increases bone mineral density and reduce the risk of fractures in postmenopausal women. The objective of this study was to investigate and develop a new formulation based on Alendronate, to be placed in subcutaneously in the surgical site. **Materials and Methods:** The pharmaceutical formula was prepared with a dosage of 0.5 mg / kg, he added buffer special, with a final pH of 5.5 means sterile. The control buffers were no active ingredients. The effect of alendronate was evaluated in male Wistar rats (9 weeks of age and weighing 176-214 g, n = 8 per group), which were divided into two groups and one control another problem, the drug is injected in the form subcutaneous times 0, 7, 14 and 30 days. The animals were anesthetized with a solution of Ketamine / xilazina. We performed in the tibia incisions were not filled. All animals were sacrificed by overdose with ether. The parameters studied were watching histopathologic evaluation infiltration of inflammatory cells (ICI), the number and morphology of osteoclasts, gaps reabsorption (surface of the osteoclast) and osteoclast activity. Statistical analysis was performed with the chi-square test. **Results:** The available data do not reveal any statistically significant difference between the control group and the group with regard to

alendronate (ICI), number of osteoclasts and osteoblastic activity. In terms of the morphology of osteoclasts, gaps reabsorption (surface of the osteoclast) and osteoclast activity, the statistics were significant differences between the two groups, favoring the group that used alendronate. Tissue bone is remodeled, with trabeculae containing osteoblasts with osteocytes viable and important activity osteoblastic and osteoplastic. As for the activity of alkaline phosphatase statistics were glaring differences between the groups. The values were even varying with the day's treatment by deducting the activity of bone with successive treatments. Time 0: 480.00 IU / Time 7: 500.00 IU / Time 15: 652.00 IU / Time 30: 824.00 IU / I Conclusions: These preliminary studies suggest that alendronate placed in parenteral form could be effective in preventing bone loss in bone diseases of the oral cavity.

Keywords: Bisphosphonates, Alendronate, Biopolymers, bone remodeling.

Introducción

Diversas situaciones fisiológicas y/o patológicas pueden inducir la pérdida de tejido óseo. El hueso es una masa mineralizada que tiene un desarrollo y mantenimiento muy dinámico, donde están involucrados procesos muy complejos como ser crecimiento endocondral, modelación y remodelación. En tal sentido, se han propuesto diferentes biomateriales y drogas que serían capaces de desencadenar procesos biológicos, para iniciar la recuperación de tejido óseo perdido. (1)

Los bisfosfonatos, difosfonatos o bifosfonatos (BP), son nuevos fármacos de diseño, de gran utilidad en el diagnóstico y tratamiento de ciertas enfermedades metabólicas óseas. Estos fármacos constituyen una de las innovaciones terapéuticas más importantes de los últimos años en el control de la osteoporosis y de la enfermedad ósea de Paget. (2)

Los BP son compuestos sintéticos análogos a pirofosfatos y tienen gran afinidad por los cristales de la matriz mineralizada, permaneciendo allí mucho tiempo ejerciendo una potente disminución de la resorción ósea. La eficacia anti-resortiva de los diferentes BP radica en su cadena lateral que parte del átomo de carbono. Se ha demostrado que los BP, especialmente el alendronato, suprimen la resorción ósea por favorecer la apoptosis de osteoclastos, e inhibir su diferenciación durante su proceso de maduración. (3,4)

Los BP se unen al mineral óseo y pueden inhibir la resorción ósea por diversos mecanismos, actuando sobre el osteoclasto. Las diferentes generaciones de BP tienen efectos diferentes. Pueden producir toxicidad por formar análogos del ATP o inhibir la enzima farnesil pirofosfato sintetasa con la consecuente inhibición de la prenilación de proteínas. De esta manera los BP disminuyen la adherencia del osteoclasto a la matriz ósea y aumentan su apoptosis. La inhibición del proceso resortivo se acompaña de la acción osteoblástica que rellenan los túneles de reabsorción. De esta manera se observa un aumento de la masa ósea. La matriz ósea es un depósito de factores de crecimiento que se liberan cuando el osteoclasto degrada el hueso en el proceso de remodelación y, estos factores actúan sobre precursores de osteoblastos. (5)

Se sabe que el tratamiento con estas drogas aumenta la producción de hueso, es decir, el número de sitios en los que el hueso se remodela, además, la formación de hueso supera la reabsorción en estos sitios remodelados, y como consecuencia de ello se producen ganancias progresivas en la masa ósea. (4)

La fosfatasa alcalina es una enzima que se encuentra en todos los tejidos. Los tejidos con concentraciones particularmente altas son, entre otros: el hígado, los conductos biliares, la placenta y el hueso. Puesto que los tejidos enfermos o deteriorados liberan enzimas en la sangre, las mediciones de fosfatasa alcalina en suero pueden ser anómalas en muchas condiciones que incluyen la enfermedad ósea. (6)

Diversos estudios han demostrado que el uso de BP podría ser beneficioso en la prevención de la pérdida ósea en la enfermedad periodontal; de la misma manera, su aplicación tópica sería útil para incrementar

la cantidad periférica de hueso periimplantario; lo que demostraría su utilidad en la práctica odontológica. (7,8)

El objetivo de esta investigación fue analizar parámetros histopatológicos y valores de fosfatasa alcalina derivados del uso sistémico (in vitro) con alendronato, para prevenir la reabsorción ósea, posterior a la cirugía odontológica.

Materiales y métodos

Preparación de la formulación

La fórmula farmacéutica fue preparada con una dosificación de alendronato de 0,5 mg/Kg de peso, en una concentración de 0,875mg/5 ml; se le adicionó Cloruro de Na 43,84 mg., Citrato de Na 3,61 mg. Y agua para inyectable c.s.p. 5 ml, el pH final fue de 5,5 en medios estériles. El control fueron buffers sin principios activos.

Experimentación con animales

Se tomaron 16 ratas Wistar machos de 9 semanas de edad, con un peso de 176-214 g, las cuales serán intervenidas quirúrgicamente en sus patas traseras.

Los animales fueron divididos en dos grupos (n=8) según el siguiente diseño experimental:

Grupo 1: (grupo experimental) la cavidad ósea realizada fue cubierta con el coágulo generado por la intervención quirúrgica, y se inyectó una dosis de 0,5 mg/Kg de alendronato por vía subcutánea en zona inguinal baja, a los tiempos (T) 0, 7, 14 y 30 días. (T0: inmediatamente luego de la intervención quirúrgica) (n:8)

- Grupo 1-a: Inyectado a T0, sacrificado T 0. (n:2)
- Grupo 1-b: Inyectado a T0 y T7, sacrificado a 7 días. (n:2)
- Grupo 1-c: Inyectado a T0, T7 y T14, sacrificado a los 14 días. (n:2)
- Grupo 1-d: Inyectado a T0, T7, T14 y T30, sacrificado a los 30 días. (n:2)

Grupo 2: (grupo control) las cavidades logradas fueron cubierta de la misma manera que el grupo experimental, y se inyectó solución sin principios activos inmediatamente posterior a la cirugía, a los T 0, 7, 14 y 30 días. Se hicieron subgrupos equivalentes a los del grupo 1.

En ambos grupos, previa anestesia general por vía intraperitoneal con una solución de Ketamina (8 mg.) y Xilazina (1,28 mg.) por 100 gr. de peso corporal, se depiló y se hizo la antisepsia de la región tibial con una solución de Cloruro de Benzalconio. Se realizó una incisión con bisturí y hoja N° 15, y posteriormente, se decoló, disecando la fascia subcutánea, los músculos y ligamentos con el fin de exponer la superficie externa de las tibias, en el área de la diáfisis ósea, según el modelo descrito por Cabrini y col.(9) Se realizó una cavidad de 1,5 mm de diámetro hasta llegar al hueso medular, con una fresa de carburo tungsteno, redonda de extremo cortante (N°6), mediante rotación manual para prevenir el sobrecalentamiento del hueso, con el probable daño tisular. Las cavidades no fueron rellenadas.

Luego de realizadas las intervenciones quirúrgicas, se recolocaron los planos en posición, y se suturaron las heridas con hilo reabsorbible. Los animales fueron tratados según normas universales de asepsia y no se administró otro tratamiento farmacológico.

Los animales fueron sacrificados por sobredosis con éter en los tiempos experimentales. Las tibias fueron resecadas, colocadas en frascos estériles y fijadas en formaldehído al 10% para luego ser incluidas en parafina. Se realizaron cortes a nivel de las cavidades quirúrgicas realizadas coloreando con hematoxilina y eosina (H/E) y método tricrómico de Masson para el análisis histopatológico correspondiente.

Los animales fueron mantenidos en jaulas con dieta balanceada y agua ad libitum, durante el período de tiempo experimental. El manejo de los animales fue realizado siguiendo los lineamientos del National Institute of Health (NIH) for the care and use of laboratory animals /Publication N. 85-23, Rev 1985.

Determinación de Fosfatasa Alcalina.

Previo antisepsia de la región torácica, con solución de cloruro de benzalconio, se realizó punción intracardiaca con aguja 40/5 y extracción de 0.2 ml de sangre, para la determinación bioquímica de fosfatasa alcalina por método colorimétrico.(9)

Los datos fueron procesados mediante análisis estadístico con el test de chi cuadrado.

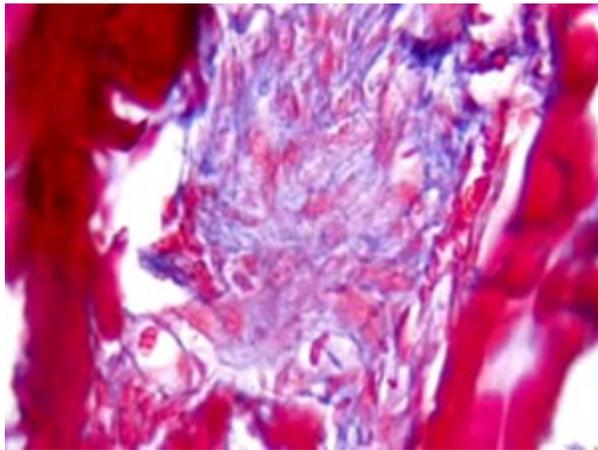
Resultados

En el grupo control se observa al T0: Tejido óseo con trabéculas con fenómenos de remodelación y laxo edema en el tejido intertrabecular (Foto a); T7: Tejido óseo con fenómenos incipientes de cicatrización con restos de trabéculas osteoides y óseas (Foto b). T14: Trabéculas en neoformación osteoides con zonas calcificadas con distribución irregular entrecruzadas algunas sin remodelado ni presencia de osteoclastos prominentes y con osteoplastos con osteocitos muy destacados, globuloides. Fibrosis joven entre las mismas (Foto c); y T30: Fibrosis joven en el centro de la imagen y en la periferia las trabéculas óseas irregulares con sendos osteoplastos con sus osteocitos y con actividad remodeladora con osteoclastos (Foto d).

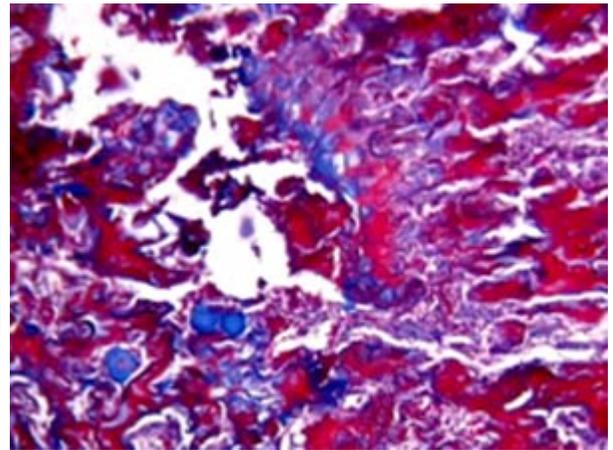
Mientras que en el grupo experimental se observó al T0: Tejido óseo con movilización leucocitaria intertrabecular, hay presencia tanto de osteoblastos como de osteoclastos en las trabéculas (Foto e); T7: Tejido óseo con restos de trabéculas fraccionadas necróticas en medio de infiltrados inflamatorios y hemorragia bien visible a la izquierda de la imagen (Foto f). T14: Presencia de neoformación ósea desde el área del periostio con fibrosis incipiente con poca a nula presencia de osteoclastos en la región (Foto g); y T30: Tejido óseo en remodelado, con trabéculas conteniendo osteoplastos con osteocitos viables e importante actividad osteoblástica (Foto h).

Los datos obtenidos no revelan diferencias estadísticamente significativas entre el grupo control y el grupo alendronato con respecto a número de osteoclastos y actividad osteoblástica. En cuanto a la morfología de osteoclastos, lagunas de reabsorción (superficie del osteoclasto) y actividad osteoclástica, las diferencias estadísticas fueron significativas entre los dos grupos, favoreciendo al grupo que utilizó alendronato.

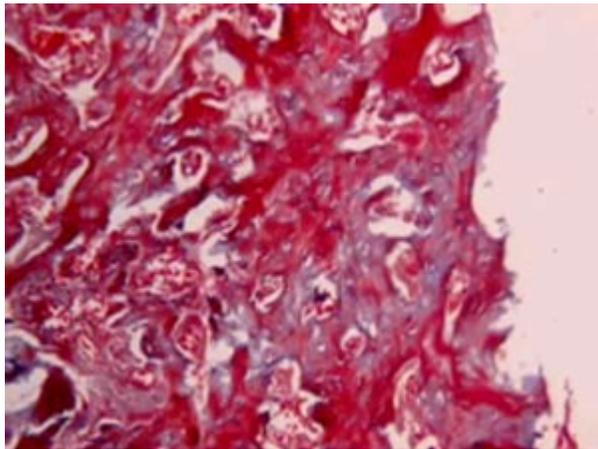
En cuanto a la actividad de fosfatasa alcalina las diferencias estadísticas fueron notorias entre los grupos. Los valores inclusive fueron variando con los días de tratamiento deduciendo la actividad ósea en el grupo experimental con los sucesivos tratamientos: Tiempo 0: 480,00 UI/I Tiempo 7: 500,00 UI/I Tiempo 15: 652,00 UI/I Tiempo 30: 824,00 UI/I.



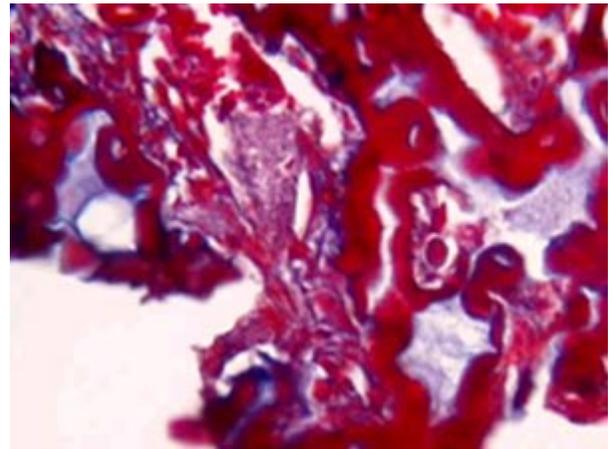
a.



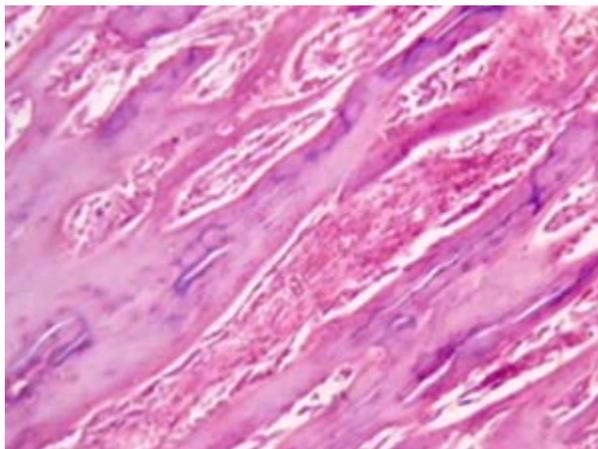
b.



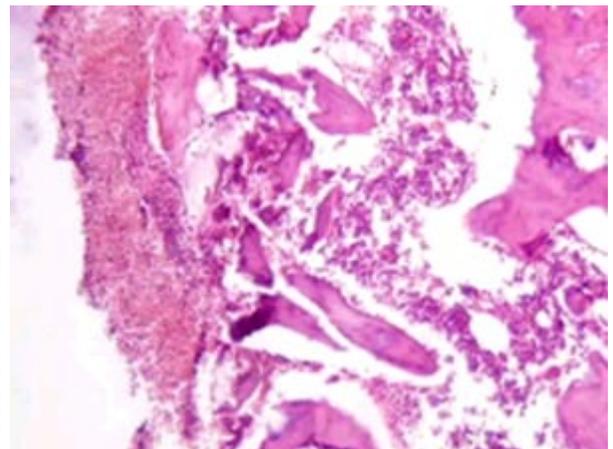
c.



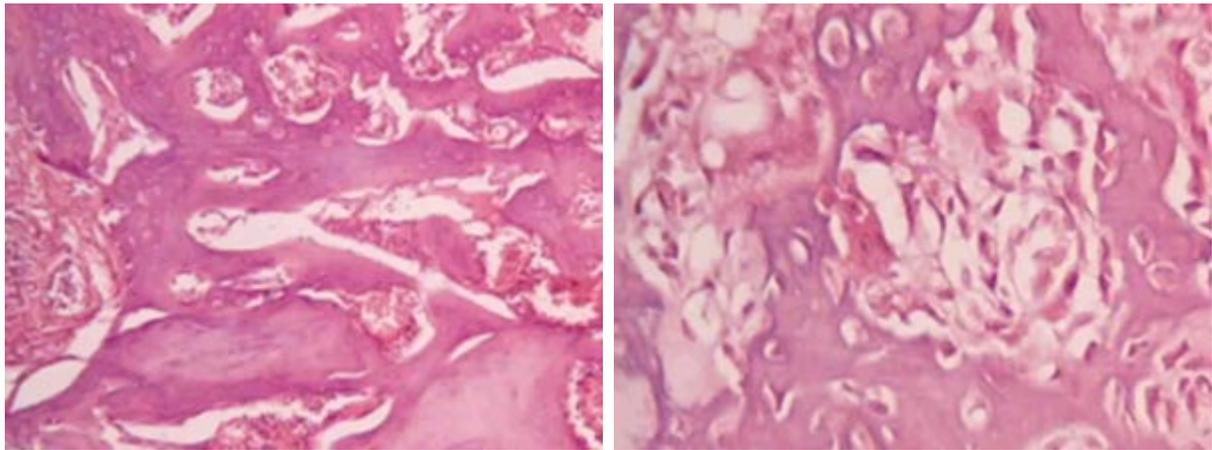
d.



e.



f.



g.

h.

Discusión

Diversos autores han observado osteonecrosis cuando se utiliza alendronato por vía oral, a diferencia de nuestro estudio que al usar la vía subcutánea no se encontró tal efecto.(10)

Es importante recalcar que nuestras investigaciones se realizan en animales machos sanos para poder transferir los resultados a la investigación clínica para el tratamiento de patologías óseas en cavidad oral en todo tipo de pacientes. A diferencia de otros autores que trabajan con estas drogas en procesos con patologías de base, como la osteoporosis, enfermedad de Paget; y sus modelos experimentales están dirigidos a animales con dichas patologías.(11)

Nuestro estudio coincide con los hallazgos de otros autores al examinar los efectos de alendronato sobre el tejido óseo a nivel histopatológico, con marcada actividad osteoblástica acompañada de disminución del número de osteoclastos; lo que se traduce en una mejora en la neoformación ósea.(12,13)

De la misma manera, hay estudios que determinaron que los BP, a nivel del osteoclasto, se unen a los cristales de apatita del hueso y que hay una acumulación de los bisfosfonatos debajo de los osteoclastos, esto hace que se reduzca la actividad osteoclástica cuando se altera el borde rizado del osteoclasto disminuyendo su superficie, de esta manera, decrece la descalcificación focal realizada por los ácidos orgánicos que se acumulan bajo sus bordes corrugados y la actividad enzimática. Al final del proceso se reduce el número de osteoclastos ya que se produce una apoptosis (muerte celular programada) de estas células.(14)

Por otro lado, según un estudio realizado por Grier y Wise¹⁵, los BP aumentaron el tamaño de los osteoclastos, incluyendo el número de núcleos, sugiriendo que el precursor de células mononucleares pueden aun fusionarse para formar osteoclastos a pesar de la reducida habilidad de estos osteoclastos para reabsorber hueso.

La determinación de fosfatasa alcalina en sangre es el marcador más útil de la actividad ósea; nuestros resultados al respecto, concuerdan con los de Walsh and col, quienes concluyen que la actividad de la fosfatasa alcalina se estabiliza en tratamientos con alendronato.(6)

Conclusiones

La administración subcutánea de alendronato en el modelo experimental propuesto fue efectivo tanto en inhibir la reabsorción ósea como en producir la neoformación ósea.

Este grupo de investigación sugiere que los datos obtenidos de alendronato son de un valor adicional en futuras pruebas de investigación para incluir a esta droga como un coadyuvante en los tratamientos odontológicos que requieren calidad ósea para su éxito clínico.

Bibliografía

1. Bone HG, Hosking D, Devogelaer JP, Tucci JR, Emkey RD, Tonino RP, Rodriguez-Portales JA, Downs RW, Gupta J, Santora AC, Liberman UA. 2004. Ten years ´experiencie with alendronate for osteoporosis in postmenopausal women. *N Engl J Med* 350: 1189-1199.
2. Leu C-T, Luegmayer Eva, Freedman LP, Rodan GA, Reszka AA. Relative binding affinities of bisphosphonates for human bone and relationship to antiresorptive efficacy. *Bone* 38: 628-636. 2006.
3. Fleish H. 1998. Bisphosphonates: mechanism of action. *J Clin Endocrinol Metab* 19: 80-100.
4. Plotkin LI, Weinstein RS, Parffit AM, Roberson PK, Manolagas SC, Bellido T. 1999. Prevention of osteocyte and osteoblast apoptosis by bisphosphonates and calcitonin. *J Clin Invest* 104: 1363-1374.
5. Nancollas GH, Tang R, Phipps RJ, Henneman Z, Gulde S, Wu W, Mangood A, Russell RGG, Ebetino FH. Novel insights into actions of bisphosphonates on bone: differences in interactions with hydroxyapatite. *Bone* 38: 617-627. 2006
6. Kuru L, Griffiths GS, Petrie A, Olsen I. Alkaline phosphatase activity is upregulated in regenerating human periodontal cells. *J Periodont Res* 34: 123-127. 1999.
7. Shoji K.,Horiuchi H.,Shinoda H. (1995) .Inhibitory effects of a bisphosphonate(risedronate) on experimental periodontitis in rats. *J.Periodontal Res.* Jul ; 30(4) : 277-84 .
8. Villoria C. Efectos de bisfosfonatos sobre el hueso y su repercusión sobre el movimiento ortodóncico. *Acta Odont Ven* 42(1):12-15. 2004
9. Cabrini, et al. Histomorphometry of initial bone healing around zirconium implants in rats. *Implant Dent.* 1993 Winter; 2(4):264-7.
10. Ruggiero SL, Mehrotra B, Rosenberg TJ, Engroff SL. Osteonecrosis of the jaws associated with the use of bisphosphonates: a review of 63 cases. *J Oral Maxillofac Surg.* 62: 527-34. 2004.
11. Seedor J, Quartuccio H, Thompson D, et al: The bisphosphonate (MK -217) inhibits bone loss due to ovariectomy in rats. . *J Bone Min Res* 1991; 6: 339-46.
12. Meraw SJ, Reeve CM. Qualitative analysis of peripheral peri-implant bone and influence of alendronate sodium on early bone regeneration. *J Periodontol.* 70(10): 1228-1233. 1999.
13. Yaffe A, Izkovich M, Earon Y, Alt I, Lilov R. Local delivery of an amino bisphosphonate prevents the resorptive phase of alveolar bone following mucoperiosteal flap surgery in rats. *J Periodontol.* 68:884-889. 1997.
14. Weinstein R.,Chen J.,Powers C., Stewart S.,Landes R., Bellido T., Jilka R.,Parfitt M.,Manolagas S. Promotion of osteoclast Survival and antagonism of bisphosphonate-induced osteoclast apoptosis

by glucocorticoids. J.Clin. Invest. 109(8):1041-1048. 2002.

15. Grier RL, Wise GE. Inhibition of tooth eruption in the rat by a bisphosfonate . J Dent Res. 77(1),8-15. 1998.

16. Walsh JP, Ward LC, Stewart GO, Will RK. A randomized clinical trial comparing oral alendronate and intravenous pamidronate for the treatment of Paget's disease of bone. Bone 34(4):747-54. 2004.

NOTAS

- Los osteoblastos son las células encargadas de la síntesis de la sustancia orgánica, como colágeno y glicoproteínas de la matriz ósea. La matriz recién sintetizada y aún no calcificada, cercana a la célula, se llama **osteoide**.
- Los osteocitos se encuentran en lagunas formadas por matriz calcificada, denominadas **osteoplasto**.