

Evaluación de fosfatasa alcalina en ratas machos normales tratadas por vía subcutánea con bisfosfonatos

Evaluation of alkaline phosphatase in normal male rats treated with subcutaneously way of bisphosphonates

Virga C., Aguzzi A., De Leonardi A.

E-mail: aleceagu@yahoo.com.ar

Alejandra Aguzzi

Profesora Adjunta de la Cátedra de Farmacología y Terapéutica B

Facultad de Odontología- Universidad Nacional de Córdoba - Argentina

1,2Profesora Titular de la cátedra de Farmacología y Terapéutica "B"

Recibido: 20/01/2012

Aceptado: 23/03/2012

RESUMEN

El mantenimiento de las dimensiones del hueso alveolar tras la pérdida de elementos dentarios es esencial en lo que respecta a la restauración de los mismos con implantes dentales. Los bisfosfonatos, suprimen la resorción ósea por favorecer la apoptosis de osteoclastos y hasta podrían incrementar la masa ósea estimulando la maduración de precursores de osteoblastos. El objetivo del ensayo fue realizar la terapia con Alendronato (AL) y Pamidronato (PA), colocados por vía subcutánea en el modelo experimental y evaluar el comportamiento mineral en sangre. Materiales y métodos: Las fórmulas farmacéuticas fueron preparadas con una dosificación para AL de 0,5 mg/Kg de peso, y para PA de 0,6 mg/Kg. Se les adicionó buffer especiales, con un pH final de 5,5 en medios estériles. El control (C) fue solución fisiológica. El efecto de los bisfosfonatos se evaluó en ratas machos Wistar normales, las cuales se dividieron en tres grupos, uno control y dos problema, uno para cada droga. Se midió fosfatasa alcalina en sangre para analizar los cambios a nivel óseo. La comparación de los datos se realizó por análisis de la variancia a dos criterios de clasificación (tratamientos: controles, bisfosfonatos y tiempos de tratamiento: 0, 7, 15, 30, 60 y 90 días). Se consideraron diferencias significativas si $p < 0,05$. Resultados: El valor promedio obtenido en ratas púberes fue de 1425 UI/l; en ratas adultas normales tomadas como parámetro para estimar valores normales del marcador óseo en ratas fue de 51,03 UI/l. Los datos en los grupos experimentales mostraron que a los 7 días PA 1,48 más potente que AL, a los 15 días 1,37 mayor PA que AL; 30 días PA es 1,12 mayor que AL, a los 60 días 1,14 mayor y a los 90 días 1,07 mayor. Conclusiones: el modelo experimental con ratas machos sana y tratamiento semanal por vía subcutánea con AL y PA durante 12 semanas produjo variaciones significativas en las concentraciones minerales en sangre, revelando una acción inhibitoria en la actividad osteoclástica por parte de las drogas estudiadas.

Palabras claves: Marcadores óseos, bisfosfonatos, fosfatasa alcalina, remodelación ósea.

SUMMARY

Maintaining the size of the alveolar bone following the loss of dental elements is essential in regard to the restoration of those with dental implants. The bisphosphonates, suppress bone resorption by promoting osteoclast apoptosis and may even increase bone mass by stimulating the maturation of osteoblast precursors. The objective of the study was to conduct therapy with alendronate (AL) and pamidronate (PA), placed subcutaneously in the experimental model and assess the mineral behavior in blood. Materials and methods: The pharmaceutical formulations were prepared with an AL dosage of 0.5 mg / kg weight, and PA 0.6 mg / kg. Special buffer was added, with a final pH of 5.5 in sterile media. The control (C) was saline. The effect of bisphosphonates was assessed in normal Wistar male rats, which were divided into three groups: a control and two problems, one for each drug. Alkaline phosphatase were measured in blood to analyze changes at the bone. The comparison of the data was performed by analysis of variance with two criteria of classification (treatments: controls, bisphosphonates and treatment times: 0, 7, 15, 30, 60 and 90 days). Differences were considered significant if $p < 0.05$. Results: The average score in pubertal rats was 1425 IU / l, in normal adult rats taken as a parameter to estimate normal values of bone marker in rats was 51.03 IU / l. The data in the experimental groups showed that at 7 days 1.48 more potent than PA AL, at 15 days increased PA 1.37 AL; 30 days PA is 1.12 higher than AL, 60 days 1.14 major and 90 days 1.07 higher. Conclusions: The experimental model healthy male rats subcutaneously weekly treatment with LA and PA - rant du 12 weeks produced significant variations in mineral concentrations in blood, revealing an inhibitory action on osteoclast activity by the drug tested.

Keywords: bone markers, bisphosphonates, alkaline phosphatase, bone remodeling.

INTRODUCCIÓN

Los bifosfonatos son análogos sintéticos del pirofosfato, un regulador endógeno del remodelado óseo. Se unen rápidamente a la hidroxiapatita ya que ellos alteran la carga superficial de la misma, ejerciendo un marcado efecto físico-químico sobre los cristales de hidroxiapatita. La composición iónica de la capa acuosa alrededor de los cristales en proceso de formación es cambiada por la repulsión del ortofosfato y la atracción del calcio. Esta alta afinidad por el mineral óseo, determina que a pesar de concentraciones sistémicas iniciales bajas, existen altas concentraciones locales en las lagunas de reabsorción osteoclástica¹⁻⁴.

No obstante, el mecanismo celular directo solo, puede explicar el efecto de los bifosfonatos sobre la reabsorción ósea inducida por osteoclastos. La ultraestructura de los osteoclastos de animales tratados con bifosfonatos, ha revelado una reducción en el volumen del borde plegado, así como anomalías en la estructura y actividad enzimática de los lisosomas. Ha sido demostrado que los bifosfonatos pueden afectar el pool de progenitores osteoclásticos en la médula ósea. Es posible que el efecto inhibitorio sobre los osteoclastos pueda ser: vía efectos sobre los osteoblastos, por prevención de secreción de factor estimulante de los osteoclastos o por estimulación de la producción de un factor inhibidor de los osteoclastos⁴⁻⁶.

El PA es un bifosfonato de los llamados aminobifosfonatos que contienen un grupo amino primario lo que le da 100 veces más potencia que los que no lo contienen. Corrientemente, han demostrado ser efectivos en desórdenes clínicos asociados con reabsorción ósea incrementada. Enfermedad de Paget, hipercalcemia de malignidad, osteoporosis y metástasis ósea^{7,8}.

Durante el proceso de reabsorción ósea son liberados a la sangre, marcadores bioquímicos producto de la actividad de los osteoblastos y osteoclastos. Estas sustancias reflejan diferentes estadios del proceso de reabsorción, su depuración metabólica y su sensibilidad son variables. La evaluación de los marcadores es basada en su capacidad para reflejar cambios en el metabolismo óseo inducido por drogas, permitiendo una medición no invasiva y secuencial del remodelado óseo⁹⁻¹¹.

El aumento en la producción de estas sustancias nos puede servir para predecir la pérdida ósea, es decir un incremento en el recambio óseo está estrictamente relacionado con un incremento de la pérdida ósea. No hay que olvidarse que el hueso no es un tejido inerte, sino muy por el contrario mantiene una gran actividad y son los marcadores óseos los responsables en alguna medida de cuantificar esa actividad^{12,13}.

La fosfatasa alcalina es el marcador clásico de formación ósea, favorece de varias maneras la mineralización. Aumenta localmente la concentración de fosfato inorgánico al hidrolizar la glucosa-1-fosfato formada por glucogenolisis y a otros ésteres del ácido fosfórico^{14,15}.

El objetivo del presente ensayo fue evaluar la fosfatasa alcalina en sangre para poder analizar la respuesta terapéutica del tratamiento con AL y PA administrados por vía subcutánea, dosificado semanalmente como tratamiento estratégico.

MATERIALES Y MÉTODOS

Preparación de las formulaciones

PA fue proporcionado por Laboratorio Gador y AL por Laboratorio Elea. La fórmula farmacéutica se preparará con una dosificación de 0,5 mg/Kg de peso, para AL, y de 0,6 mg/Kg de peso para PA. Se le adicionó buffer especiales, con un pH final de 5,5 en medios estériles. El control fue buffer sin principios activos.

Prueba en animales de experimentación

Cuarenta y Ocho ratas macho de la línea Wistar de peso 160 ± 20 g, se dividieron en 3 grupos de 16 ratas cada uno. Un grupo fue grupo control (C). Los animales de este grupo recibieron semanalmente 0,3 ml/100 g de peso corporal de solución salina por vía subcutánea cercana a la intervención quirúrgica y agua corriente de red como agua de bebida. Otro grupo AL se le administró semanalmente 0,5 mg de AL/Kg de peso corporal de por vía subcutánea profunda en el miembro posterior izquierdo de una preparación PA de igual manera como se explicó en el diseño de la formulación.

Estos animales tuvieron acceso a agua corriente de red ad libitum. El tercer grupo se le suministró un tratamiento similar con PA durante el tiempo que duró el experimento.

Los animales se mantuvieron en bioterio en jaulas colectivas con alimento balanceado y agua de bebida ad libitum, a una temperatura de 22-26°C, con un ciclo luz-oscuridad: 12hs-12hs durante el tiempo que dure el experimento. El manejo de los animales siguió los lineamientos del National Institute of Health (NIH) para el uso y cuidado de animales de experimentación (Publication N. 85-23, Rev 1985).

Al inicio del experimento los animales fueron anestesiados con una solución de ketamina/xilazina en relación 8 mg/1.28mg respectivamente por cada 100 g de peso corporal. Previa asepsia del campo quirúrgico con yodopovidona, se realizó con bisturí Bard Parker y hoja N° 15 una incisión longitudinal en ambas tibias y se decoló la fascia hasta llegar a exponer el hueso. Con una fresa número 6 y a rotación manual para no producir necrosis ósea, se procedió a realizar una cavidad en la parte plana de cada tibia hasta llegar al hueso medular. Dicha cavidad no fue rellenada con ningún material y sólo se esperó la reparación por su propio coágulo. Luego de realizada las intervención quirúrgica, se recolocaron los planos en posición y se suturó la herida con hilo reabsorbibles.

Los animales fueron tratados según normas universales de asepsia. Al finalizar el experimento se realizó la eutanasia de los animales mediante inyección intracardiaca de cloruro de potasio, bajo anestesia general.

Las determinaciones se hicieron al comienzo del experimento y a los 7, 15, 30, 60, 90 días administrando cada 7 días la solución salina, AL y PA.

Los sacrificios para la toma de muestras fueron a los 15, 30, 60 y 90 días. En todos los tiempos, incluidos tiempo 0 y 7 días, se tomaron radiografías de ambas tibias y en tiempos 0, 7, 15, 30, 60 y 90 días se extrajo sangre por punción cardíaca para determinación de fosfatasa alcalina. La Tabla 1 muestra los grupos experimentales, los días de tratamiento, las muestras obtenidas y a los que se les realizó la eutanasia.

Días de tratamiento	0	7	15	30	60	90
Grupos						
Control	+PC	+PC	+PC	+PC	+PC	+PC
AL	+PC	+PC	+PC	+PC	+PC	+PC
PA	+PC	+PC	+PC	+PC	+PC	+PC

Estudios bioquímicos

Se realizó determinación de fosfatasa alcalina sobre muestras de sangre obtenidas por punción cardíaca. La determinación bioquímica de fosfatasa alcalina por método colorimétrico por el método optimizado. La sangre fue recolectada fresca no hemolizada. No requirió ningún aditivo. La determinación se realizó en un plazo inferior a las 6 horas de ser extraída. El procedimiento se realizó rotulando tres frascos marcados B (Blanco), S (Standard), y D (Desconocido). Se le adicionó 0,5 ml de sustrato a cada frasco. Se incubaron en baño de agua a 37°C unos minutos, al tubo S y D se les colocó 50 µl de sangre, se procedió a mezclar e incubar por un período de 10 minutos. Luego se agregó a todos los frascos el reactivo de color 2,5 ml. Se mezcló de inmediato y se leyó en espectrofotómetro a 520 nm. El aparato se llevó a 0 con agua destilada.

Punción cardíaca

Previa asepsia de la región torácica, con solución de cloruro de benzalconio, se realizó punción intracardíaca con aguja 25x0,8 mm y extracción de 2 ml de sangre utilizando heparina como anticoagulante. La sangre se centrifugó para eliminar las células rojas y blancas y el plasma será guardado a -20 °C.

Determinación de valores normales de Fosfatasa alcalina en ratas

Para estimar los valores normales de fosfatasa alcalina en ratas machos sanas se tomaron muestras de cinco animales línea Wistar de peso 160 ± 20 g; se promediaron los valores obtenidos.

Para poder correlacionar los datos registrados en animales con el comportamiento de este marcador óseo en humanos, se realizó un promedio de valores obtenidos de muestras de cinco animales púberes de peso 60 ± 20 g.

Estudios estadísticos

Se calculó las diferencias entre los grupos AL, PA y C apareándolos e (AL-PA), (AL-C), (PA-C) usando el Test T y comparando los resultados de este Test para muestras independientes en el tiempo, a los 0,7,15,30,60 y 90 días.

Para el análisis de datos, construcción de gráficas y análisis estadísticos se utilizará el software InfoStat.

RESULTADOS

El valor promedio obtenido en ratas púberes fue de 1425 UI/l; mientras que en las ratas adultas normales tomadas como parámetro para estimar valores normales del marcador óseo en ratas fue de 51,03 UI/l. (Tabla 2)

Valor RA	Valor RP
48,80 UI/l	1080 UI/l
58,56 UI/l	1680 UI/l
55,10 UI/l	1440 UI/l
54,90 UI/l	1500 UI/l
37,80 UI/l	
51,03 UI/l	1425 UI/l
Valor RA	Valor RP
48,80 UI/l	1080 UI/l
58,56 UI/l	1680 UI/l

Este experimental en ratas reproduce el comportamiento de fosfatasa alcalina en humanos, donde en los jóvenes los valores de este medidor se encuentran elevados por la fuerte actividad osteoblástica debido al crecimiento fisiológico.

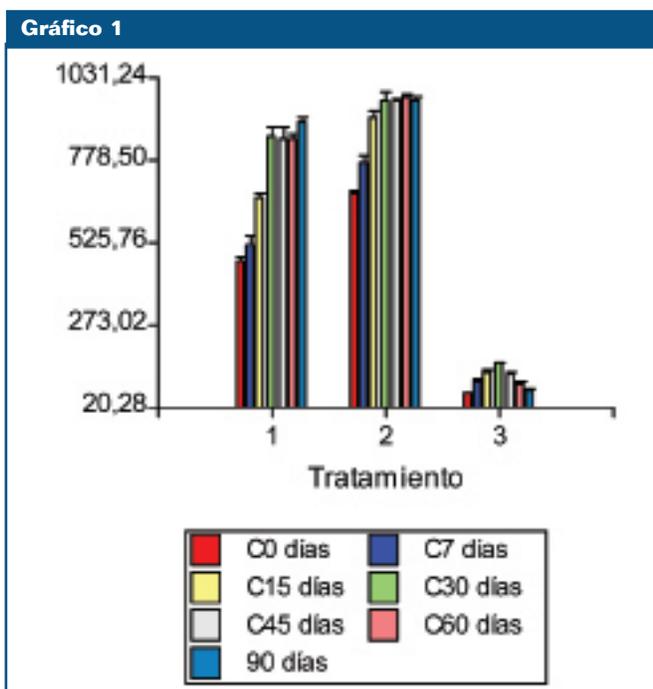
Los resultados aportan evidencia de importantes cambios metabólicos en el tejido óseo durante.

Los datos de fosfatasa alcalina en los grupos experimentales mostraron que a los 7 días PA 1,48 más potente que AL, a los 15 días 1,37 mayor PA que AL; 30 días PA es 1,12 mayor que AL, a los 60 días 1,14 mayor y a los 90 días 1,07 mayor. (Tabla 3).

Al comparar los grupos experimentales se encontraron diferencias estadísticamente significativas (0 días p=0,002, 7 días p=0,009, 15 días p=0,005, 60 días p=0,06, 90 días p=0,02) a los 30 días no hubo diferencias significativas entre PA y AL (p=0,08).

Los grupos experimentales comparados con el grupo C presentan diferencias estadísticamente significativas en todos los tiempos, siendo más marcada la diferencia para PA. A diferencia en los tiempos 60 y 90 días donde ambos grupos (AL y PA) se comportan igual (p=0,0001) (Gráfico 1)

Tabla 3						
Alendronato		Pami	Pami	Control	Control	
Tiempo 0:	480,00 UI/I	462,00 UI/I	672,00 UI/I	680,00 UI/I	62,00 UI/I	58,00 UI/I
Tiempo 7:	500,00 UI/I	538,00 UI/I	756,00 UI/I	786,00 UI/I	104,00 UI/I	99,00 UI/I
Tiempo 15:	652,00 UI/I	674,00 UI/I	896,00 UI/I	924,00 UI/I	135,00 UI/I	128,00 UI/I
Tiempo 30:	824,00 UI/I	872,00 UI/I	934,00 UI/I	980,00 UI/I	160,00 UI/I	156,00 UI/I
Tiempo 45:	824,00 UI/I	868,00 UI/I	951,00 UI/I	964,00 UI/I	127,00 UI/I	120,00 UI/I
Tiempo 60:	853,00 UI/I	838,00 UI/I	964,00 UI/I	977,00 UI/I	98,00 UI/I	89,00 UI/I
Tiempo 90:	905,00 UI/I	887,00 UI/I	968,00 UI/I	954,00 UI/I	74,00 UI/I	67,00 UI/I



DISCUSIÓN Existe evidencia de que los bifosfonatos tienen un efecto directo en la reducción de resorción osteoclástica de hueso. Un estudio de Greenspan y col demostró que el AL, en bajas concentraciones promueve la formación de los precursores de los osteoblastos en forma temprana¹⁷.

Los bifosfonatos constituyen análogos químicos del pirofosfato inorgánico. La molécula de pirofosfato inorgánico se compone de dos átomos de fósforo y uno de oxígeno (P-O-P). Dicha molécula, presente en el plasma y líquido extracelular, tiene como función la inhibición del depósito de minerales en la matriz orgánica de los tejidos. En el hueso el osteoblasto produce la fosfatasa alcalina; enzima que pertenece a la familia de las pirofosfatasa y cuya función es degradar el pirofosfato inorgánico permitiendo de esta manera la deposición de minerales en la matriz colágena del hueso. Sin embargo, los bifosfonatos difieren en su estructura química con el pirofosfato inorgánico, que a diferencia presentan dos átomos de fósforo unidos entre sí por un átomo de carbono (P-C-P), lo que les confiere por un lado resistencia a la degradación por parte de la fosfatasa alcalina, y por otro dos enlaces libres que per-

miten la adición de cadenas laterales; que según su composición, le otorgan al bisfosfonato diferentes propiedades químicas así, el grupo hidroxilo de una de sus cadenas laterales, es el responsable de la gran afinidad de los bisfosfonatos por los cristales de hidroxapatita del hueso. El pirofosfato es un sustrato de fosfatasa alcalina, la cual lo degrada favoreciendo la mineralización ósea¹⁸.

Se ha demostrado bisfosfonatos interactúan con fosfatasa alcalina, estimular o inhibir la actividad de la enzima, dependiendo de la dosis y de la vía de administración¹⁹.

El marcador de formación ósea evaluado fue la fosfatasa alcalina. Se encontró incrementada desde el inicio del estudio tanto para AL como para PA., lo que pueden explicarse por el efecto farmacológico del medicamento, como inhibidor de la actividad osteoclástica.

En los primeros tiempos experimentales PA demuestra mayor efectividad que AL, siendo a los 30 días de tratamiento 12,8% más efectivo, mientras que al final del tratamiento (60 y 90 días) ambas drogas registran valores sin diferencias estadísticamente significativas.

Altundal H y Gursoy B demostraron que AL colocado en forma subcutáneo diariamente, causó un aumento significativo de la osteocalcina sérica, los niveles de fosfatasa alcalina y el número de osteoblastos histopatológicamente²⁰.

Estos resultados no son coincidentes con los de trabajos donde no se encontraron diferencias en los niveles séricos de Ca, fosfatos y fosfatasa alcalina entre ratas controles y ovariectomizadas cuando el principio activo fue administrado por vía oral²¹.

Es conocido que este marcador bioquímico de plasma está presente en el proceso de formación del hueso y es producida por los osteoblastos y sus precursores; participa en la formación de hueso y en el proceso de mineralización. Otro estudio encontró una disminución significativa en los marcadores de formación ósea en todos los pacientes tratados con prednisona, independientemente de AL. El Al administrado por vía oral, contrarrestó el aumento de los marcadores de resorción ósea inducida por el tratamiento con glucocorticoides²².

Este marcador bioquímico de remodelación ósea ha demostrado estar presente en ambas drogas con valores altos, lo que indicaría la efectividad en la reparación ósea de los procesos odontológicos. Futuras investigaciones aportarán datos complementarios para soportar esta hipótesis.

REFERENCIAS

1. Reszka AA, Rodan GA. Mechanism of action of bisphosphonates. *Curr Osteoporos Rep* 2003; 1:45-52.
2. Liberman UA. Long-term safety of bisphosphonate therapy for osteoporosis: a review of the evidence. *Drugs Aging* 2006; 23:289-98.
3. Bone HG, Hosking D, Devogelaer JP, Tucci JR, Emkey RD, Tonino RP, et al. Ten years' experience with alendronate for osteoporosis in postmenopausal women. *N Engl J Med* 2004; 350:1189-99.
4. Rogers MJ, Gordon S, Benford HL, Coxon FP, Luckman SP, Monkkinen J, Frith JC. Cellular and molecular mechanisms of action of bisphosphonates. *Cancer* 2000;86:2961-78.
5. Boivin GY, Chavassieux PM, Santora AC, Yates J, Meunier PJ. Alendronate increases bone strength by increasing the mean degree of mineralization of bone tissue in osteoporotic women. *Bone* 2000; 27:687-94.
6. Jeffcoat MK. Safety of oral bisphosphonates: controlled studies on alveolar bone. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2006; 21:349-53.
7. Younes H, Farhat G, el-Hajj Fuleihan G. Efficacy and tolerability of cyclical intravenous pamidronate in patients with low bone mass. *J Clin Densitom* 2002; 5:143-9.
8. Ventin MD, Leon C. Pamidronato en la enfermedad metastásica ósea. *AVFT*. 2004; 23(1):18-24.
9. Woltge HW, Seibel ML. Biochemical markers to survey bone turnover. *Clin Rheum Dis* 2001; 27:49-80.
10. Christgau S, Bitsch-Jensen O, Bjarnson N, et al. Serum CrossLaps for monitoring the response in individuals undergoing antiresorptive therapy. *Bone* 2000; 26:505-511.
11. Gamero P, Somay Rendu E, Duboeuf P, Delmars Pierre. Markers of bone turnover predict postmenopausal forearm bone loss over 4 years, the OFELY Study. *J Bone Miner Res* 1999; 14: 1614-1621
12. Cremers S, Gamero P. Biochemical markers of bone turnover in the clinical development of drugs for osteoporosis and metastatic bone disease: potential uses and pitfalls. *Drugs*. 2006; 66(16):2031-58.
13. Brown JE, Cook RJ, Major P, Lipton A, Saad F, Smith M, Lee KA, Zheng M, Hei YJ, Coleman RE. Bone turnover markers as predictors of skeletal complications in prostate cancer, lung cancer, and other solid tumors. *J Natl Cancer Inst*. 2005 Jan 5; 97(1):59-69.
14. Lipton A, Costa L, Ali SM, Demers LM. Bone markers in the management of metastatic bone disease. *Cancer Treat Rev* 2001; 27:181-5.
15. Lenora J, Ivaska KK, Obrant KJ et al. Prediction of bone loss using biochemical markers of bone turnover. *Osteoporos Int* 2007; 18: 1297-305.
16. Ross PD, Kress BC, Parson RE et al. Serum bone alkaline phosphatase and calcaneus bone density predict fractures: a prospective study. *Osteoporos Int* 2000; 11: 76-82.
17. Greenspan SL, Resnick NM, Parker RA. Early changes in biochemical markers of bone turnover are associated with long-term changes in bone mineral density in elderly women on alendronate, hormone replacement therapy, or combination therapy: a three-year, double-blind, placebo-controlled, randomized clinical trial. *J Clin Endocrinol Metab*. 2005; 90(5):2762-7
18. Mornet E, Stura E, Lia-Baldini AS et al. Structural evidence for a functional role of human tissue nonspecific alkaline phosphatase in bone mineralization. *J Biol Chem* 2001; 276: 31171-8.
19. Watts NB, Jenkins DK, Visor JM, Casal DC, Geusens P. Comparison of bone and total alkaline phosphatase and bone mineral density in postmenopausal osteoporotic women treated with alendronate. *Osteoporos Int*. 2001; 12(4):279-88.
20. Altundal H, Gursoy B. The influence of alendronate on bone formation after autogenous free bone grafting in rats. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2005; 99(3):285-91.
21. Brem, J.J.; Trulls, H.E.; Ortíz de Rus, M.L.; Lanari Zubiaur, A.E.; Picot, J.A.; Benítez, W.; Brem, J.C.: Densidad ósea y concentración de minerales en sangre y huesos de ratas ovariectomizadas tratadas con alendronato. *Rev vet* 2006;17(2):88-93.
22. Adachi JD, Saag KG, Delmas PD, Liberman UA, Emkey RD et al. Two-year effects of alendronate on bone mineral density and vertebral fracture in patients receiving glucocorticoids: a randomized, double-blind, placebo-controlled extension trial *Arthritis Rheum*. 2001 Jan; 44(1):202-11.



Experto en Mercadeo Farmacéutico
Coordinador Académico: Prof. Andrés Reyes Polanco

ESTUDIA en ESPAÑA
desde VENEZUELA

DIRIGIDOS A PROFESIONALES UNIVERSITARIOS

Título propio de la Universidad de Alcalá, con una carga académica de 30 créditos ECTS (750 horas lectivas), aprobado por la Comisión de Postgrado y supervisado por el Instituto de Calidad Español - ICE.

El alumno es jurídica y académicamente matriculado y estudiando en la Universidad de Alcalá.

Culminados con éxitos los estudios, el alumno recibe el título de Experto en... por la Universidad de Alcalá, firmado por el Rector y legalizado con la Apostilla de La Haya, tiene valor académico universal.

En ningún caso está cursando una "especialidad venezolana", ni obtiene título alguno de la República Bolivariana de Venezuela.

Información: (0212) 881.19.07 / css212518@gmail.com