



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO**

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

**"MODELO DE OSTEONECROSIS
ASOCIADA A BIFOSFONATOS"**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

CIRUJANO DENTISTA

PRESENTA

XIMENA VIDAL GUTIÉRREZ

DIRECTOR DE TESIS

DR. JOSÉ FRANCISCO GÓMEZ CLAVEL

DICTAMINADORES

DRA. CYNTHIA GEORGINA TREJO

DRA. SILVIA LETICIA VERDÍN TERÁN



Esta tesis fue apoyada por el proyecto PAPIME PE209312
LOS REYES IZTACALA, EDO. DE MÉXICO, FEBRERO 2013.

“...Porque te hago saber Sancho, que la boca sin muelas es como molinos sin piedra, y en mucho más se ha de estimar un diente que un diamante...”

Don Miguel de Cervantes Saavedra

Cuando inicié la carrera de Cirujano Dentista, encontré la tesis de mi mamá, la cual en las primeras páginas tenía esta cita de Don Miguel Cervantes Saavedra.

A partir de ese momento la frase se convirtió en una de mis favoritas y supe que mi título sería producto de un trabajo de tesis.

A la memoria de
Lorenzo Gutiérrez Cortés, Natalia Juárez Oidor,
Mario Vidal Sánchez, Felipa Mendoza Resendiz y
Paula Martínez.

Piedras angulares en mi vida.

AGRADECIMIENTOS

Es para mí un verdadero placer utilizar este espacio para expresar agradecimiento a todas las personas que han formado parte de mi vida, por todo lo que me han brindado y por su incondicionalidad, sin importar en dónde estén o si llegan a leer esto.

Quiero agradecer primeramente a mis padres, Yolanda Gutiérrez Juárez y Leandro Vidal Mendoza, por siempre creer en mí e impulsarme a lograr mis objetivos. Especialmente a mi mamá por acompañarme a lo largo de este camino y brindarme las bases para lograr lo que soy ahora.

A mi querida institución la Facultad de Estudios Superiores Iztacala UNAM, la cual me brindó lo mejor en esta etapa de mi vida, no solo académicamente, sino formándome como una profesionista que brinda un servicio a la comunidad.

Debo agradecer especialmente al Dr. José Francisco Gómez Clavel por permitirme realizar esta tesis bajo su dirección. Su apoyo y confianza en mi trabajo ha sido invaluable. Le agradezco el haberme facilitado siempre los medios suficientes para llevar a cabo todas las actividades propuestas durante el desarrollo de esta tesis.

Quiero expresar también mi más sincera gratitud a la Dra. Cynthia Georgina Trejo por su importante aporte y participación activa en el desarrollo de esta tesis, destacándose por su disponibilidad y paciencia.

Valoro de manera especial el apoyo brindado por la Dra. Silvia Leticia Verdín del Laboratorio de Inmunología por permitirme realizar parte de mi trabajo ahí. Debo agradecer su amabilidad y disponibilidad durante mi estancia. Muchas gracias por permitirme vivir una experiencia tan relevante en mi formación.

A mis amigas Karina, Beatriz y Laura que estuvieron a mi lado en los momentos más difíciles durante el camino.

Para mis compañeros del Laboratorio en Educación e Investigación en Odontología y del Laboratorio de Inmunología, sólo tengo palabras de agradecimiento, especialmente por los que me apoyaron a lograr mi meta.

A mi familia, por haber fomentado en mí el deseo de superación y el anhelo de triunfo en la vida.

A todos, espero no defraudarlos y contar siempre con su valioso apoyo, sincero e incondicional.

INDICE

AGRADECIMIENTOS	4
RESUMEN	7
ABREVIATURAS	9
INTRODUCCIÓN.....	11
TEJIDO ÓSEO	11
CÉLULAS ÓSEAS	14
DIFERENCIACIÓN OSTEOLÁSTICA.....	14
CÉLULAS OSTOGENITORAS	14
OSTEOLÁSTOS.....	15
OSTEOCITOS.....	18
OSTEOCLASTO	20
CÉLULAS DE RECUBRIMIENTO ÓSEO.....	22
MATRIZ EXTRACELULAR ÓSEA	22
OSIFICACIÓN DEL HUESO.....	24
TIPOS DE OSIFICACIÓN	25
OSIFICACIÓN INTRAMEMBRANOSA	25
OSIFICACIÓN ENDOCONDRA.....	26
OSTEONECROSIS	28
ETIOLOGÍA.....	29
DIAGNÓSTICO.....	30
TRATAMIENTO.....	33
BIFOSFONATOS	34
MÉCANISMO DE ACCIÓN.....	36
CLASIFICACIÓN	37
ÁCIDO ZOLEDRÓNICO:	39
EFFECTOS ADVERSOS DE LOS BIFOSFONATOS	40
BIFOSFONATOS Y ODONTOLÓGIA.....	42
OSTEONECROSIS MAXILAR ASOCIADA A BIFOSFONATOS	43
CLASIFICACIÓN	44
FACTORES DE RIESGO.....	45
CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS.....	47
DIAGNÓSTICO.....	48
SUGERENCIAS EN EL MANEJO DE PACIENTES BAJO TERAPIA CON BIFOSFONATOS.....	50
MODELO ANIMAL DE OSTEOCROSIS ASOCIADA A BIFOSFONATOS	52
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	54
JUSTIFICACIÓN	56
OBJETIVOS.....	57
HIPÓTESIS.....	58
MATERIALES Y MÉTODOS.....	59
METODOLOGÍA DE INVESTIGACIÓN.....	59
POBLACIÓN DE ESTUDIO Y FORMACIÓN DE GRUPOS.....	59
ADMINISTRACIÓN DEL MEDICAMENTO Y EXTRACCIÓN DEL SEGUNDO MOLAR SUPERIOR.....	60
TÉCNICA QUIRÚRGICA.....	61
MATERIAL Y EQUIPO	61
PROCEDIMIENTO	61
SACRIFICIO Y TOMA DE MUESTRAS.....	61
DISECCIÓN DEL MAXILAR	61

TREN DE ALCOHOLES.....	62
TECNICAS HISTOLÓGICAS.....	63
<i>TINCIÓN DE HEMATOXILINA–EOSINA</i>	63
TÉCNICA RADIOGRÁFICA.....	64
ANÁLISIS ESTADÍSTICO	64
ANÁLISIS MACROSCÓPICO	64
ANÁLISIS MICROSCÓPICO	65
RESULTADOS	66
NOMENCLATURA DE LOS GRUPOS TESTIGOS Y EXPERIMENTALES	68
COMPARACIÓN Y DESCRIPCIÓN MACROSCÓPICA ENTRE GRUPO TESTIGO Y EXPERIMENTAL.....	85
ANÁLISIS MACROSCÓPICO	89
COMPARACIÓN Y DESCRIPCIÓN MICROSCÓPICA ENTRE GRUPO TESTIGO Y EXPERIMENTAL	90
ANÁLISIS MICROSCÓPICO	94
ANÁLISIS ESTADÍSTICO	95
DISCUSIÓN.....	96
CONCLUSIONES	102
BIBLIOGRAFÍA	103
ANEXO 1	108
FIJADOR DE ZINC	108
LÍQUIDO RUYTER:.....	108
ANEXO 2	109
TÉCNICA DE HEMATOXILINA Y EOSINA.....	109
<i>HEMATOXILINA DE HARRIS</i>	109
<i>EOSINA ACIDIFICADA STOCK</i>	109

RESUMEN

Recientemente, se ha identificado a una nueva complicación en el tratamiento de patologías en las que la resorción ósea juega un papel importante como en la osteoporosis, el mieloma y el cáncer: La Osteonecrosis del Maxilar Asociada al Tratamiento con Bifosfonatos.

Los bifosfonatos son medicamentos que tienen como principal mecanismo de acción inhibir la función de los osteoclastos, se administran cuando el cáncer se ha diseminado a los huesos, para reducir el dolor y disminuir el riesgo de fracturas.

La Osteonecrosis Maxilar Asociada a Bifosfonatos (ONMAB) se caracteriza clínicamente por la presencia de hueso expuesto en la cavidad bucal que persiste por más de 8 semanas, y en algunos casos el tratamiento final conduce a la pérdida del maxilar o la mandíbula.

El mecanismo exacto que conduce a la osteonecrosis no es conocido, ya que no todos los pacientes que reciben bifosfonatos desarrollan la lesión, por lo que es importante desarrollar un modelo experimental de osteonecrosis para describir los cambios macroscópicos e histológicos que ocurren en los tejidos óseos.

El presente proyecto tiene como objetivo desarrollar un modelo experimental en rata de osteonecrosis maxilar asociada al uso de bifosfonatos por lo que se les administró 66µL (52.8 µg) de ácido zoledrónico por espécimen, a los 14 y 7 días previos a la extracción del segundo molar superior con una dosis total=104.16µg. Al día cero se realizó la extracción de los segundos molares maxilares. Los animales se sacrificaron los días 7, 14, 21 y 28 días posteriores a la intervención, los maxilares fueron fijados en Fijador de Zinc. Se realizaron tomas radiográficas coronales de las muestras de 28 días; todas las muestras se descalcificaron con ácido etilendiaminotetracético (EDTA) a pH 7.4 durante 7 días, hasta que radiográficamente se observó la completa descalcificación, las muestras se procesaron mediante la técnica histológica de rutina y se tiñeron con hematoxilina y eosina para ser observadas y fotografiadas con microscopía óptica.

El análisis de las características del alvéolo que se realizó a través de la prueba estadística de Fisher, nos muestra que las diferencias entre el grupo experimental y testigo son estadísticamente significativas ($p > 0.01$). Respecto a los resultados histológicos, las imágenes que obtuvimos no fueron de óptima calidad y no nos permitieron realizar un análisis de las características histomorfométricas de los tejidos involucrados debido a que las sales de Zinc produjeron una contracción en los tejidos. Sin embargo pudimos realizar un análisis histológico que muestra en el grupo experimental, lagunas osteocitarias vacías y una matriz ósea desorganizada.

De esta manera llegamos a las siguientes conclusiones: I) Las lesiones que se produjeron en las ratas están estrechamente relacionadas con las presentadas en

los pacientes que padecen ONMAB. II) El modelo propuesto de extracción del segundo molar maxilar en ratas tratadas con Ácido Zoledrónico en dosis total de 104.16µg, sí permite obtener lesiones de Osteonecrosis en el 100% de los casos. III) El modelo permite hacer un análisis de los cambios que ocurren alrededor de los tejidos involucrados en la extracción del segundo molar en 4 semanas, sin necesidad de extender los tiempos de estudio. IV) El Fijador de Zinc no es un buen fijador para muestras de tejido óseo.

ABREVIATURAS

A = (Adenine) Adenina

AAOMS = (American association of Oral maxillofacial surgery) Sociedad Americana de Cirujanos Maxilofaciles

ADN = Acido Desoxirribonucleico

ALP = (Alkaline Phosphatase) Fosfatasa Alcalina

ATP = (Adenosine TriPhosphate) Trifosfato de Adenosina

AZ = Acido Zoledrónico

BF = Bifosfonato

BMP = (Bone Morphogenetics Proteins). Proteínas Morfogenéticas de Hueso

Cbfa1= (Core-Binding Factor Alpha-1). Ligando del Factor Alfa 1

cT= (computerized Tomogrfy) Tomografía Computarizada

FDA = (Federal Drugs Administration) Administración Federal de Fármacos

FGF = (Fibroblastic Growth Factor). Factor de crecimiento fibroblástico

IGF = (Insuline Growth Factor). Factor de Crecimiento Insulínico

IL = (Interleukin). Interleuquina

MEC = (Extracellular Cellular Matrix). Matriz Extracelular

N-BF = Bifosfonatos Nitrogenados

ONM = Osteonecrosis Maxilar

ONMAB = Osteonecrosis Maxilar Asociada al uso de Bifosfonatos

Osx = (Sp7/Osterix). Sp7/Osterix

PPi = Bifosfonatos Simples

PTH = Hormona Paratiroidea

RANKL = (Receptor Activator for Nuclear Factor κ B Ligand). Receptor activador del ligando NF κ B o Factor de Diferenciación Osteoclástica

RM = Resonancia Magnética

TGF- β = (Transforming Growth Factor Beta). Factor de Crecimiento Transformante beta

TNF- β = (Tumor Necrosis Factor- α). Factor de Necrosis Tumoral- α

VEGF = (Vascular Endothelial Growth Factor). Factor de Crecimiento Endotelial Vascular

Wnts = Familia de los Factores Wingless

INTRODUCCIÓN

TEJIDO ÓSEO

El hueso, o tejido óseo, representa la mayor diferenciación entre los tejidos de sostén (Leeson, 1988). Su peculiaridad reside en que es uno de los pocos tejidos que fisiológicamente se mineralizan. (Cortina & Calderón, 2004)

Es un tejido rígido que constituye la mayor parte del esqueleto de los vertebrados superiores. Está formado por células y una matriz extracelular. Su principal componente orgánico, las fibras colágenas, forma un armazón de refuerzo, invisible en las preparaciones con los métodos usuales, pero demostrable en tinciones especiales. Estas fibras se unen en haces de unos 5µm de grueso mediante una sustancia de cemento. Las sales inorgánicas encargadas de dar dureza y rigidez al hueso incluyen fosfato de calcio (alrededor de 85%), carbonato de calcio (10%) y pequeñas cantidades de fluoruro de calcio y fluoruro de magnesio. Las fibras colágenas contribuyen en gran parte a la fuerza y resistencia del hueso. (Leeson, 1988)

El mineral óseo, cuyo principal componente es la hidroxiapatita ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) está dentro de las fibrillas colágenas como cristales de apatita. Estos cristales son de tamaño submicroscópico; los mayores miden alrededor de 400 Å de longitud y 30 Å de grueso. (Leeson, 1988)

El contenido de minerales del hueso aumenta en el curso del desarrollo, alcanzando al 75% del hueso de los seres humanos adultos. Si se examina microscópicamente un corte longitudinal de un hueso largo, de inmediato se distinguen dos tipos de tejido óseo: una capa externa dura de revestimiento de hueso compacto (denso o cortical), y hueso esponjoso (trabecular). No se puede establecer un límite preciso entre los dos tipos de tejidos óseos, y las diferencias entre ellos dependen sólo de la cantidad relativa de sustancia sólida y del tamaño y número de espacios en cada uno. Ambos contienen los mismos elementos histológicos. Las proporciones relativas entre estos dos tipos de hueso varían con las necesidades de resistencia o de ligereza en el peso. En un hueso largo típico, el cuerpo (*diáfisis*) está formado principalmente por hueso compacto que rodea a una cavidad medular (que contiene médula ósea). Las extremidades dilatadas o *epífisis* del hueso largo constan de hueso esponjoso cubierto por una delgada capa de hueso compacto. (Leeson, 1988)



FIGURA 1.1
Estructura del hueso

En los huesos planos del cráneo se aplican términos especiales a las estructuras comparables. Las dos capas paralelas de hueso compacto son las tablas externas e internas. Al hueso esponjoso entre ellas se le llama *diploe*. (Leeson, 1988)

La superficie externa del hueso compacto, excepto en las superficies articulares, está cubierta por una capa de tejido conectivo llamada *periostio*. El *endostio* reviste la cavidad medular y cubre al hueso esponjoso que la reviste. Cada una de estas capas tiene la capacidad histogénica para formar hueso.

El tejido óseo es penetrado por conductos y espacios vasculares, alrededor de los cuales se dispone la matriz en forma de capas o laminillas colocadas muy juntas. La matriz orgánica le confiere a los huesos alta resistencia a la tensión y la matriz mineral a la compresión, estas características previenen a los huesos de fracturas durante el desempeño de sus funciones mecánicas normales. (Cortina & Calderón, 2004)

Morfológicamente se distinguen dos tipos de hueso, cortical o compacto y trabecular o esponjoso. El hueso cortical se observa como una masa sólida, donde las láminas de matriz extracelular se disponen de manera concéntrica alrededor de conductos denominados de "Conductos de Havers", los cuales contienen tejido nervioso y vasos sanguíneos. En el hueso trabecular el tejido se dispone formando trabéculas, creando cavidades ocupadas por la médula ósea, la cual puede ser médula amarilla, compuesta principalmente por grasa, o médula roja donde se producen los precursores de las células sanguíneas. (Leeson, 1988)

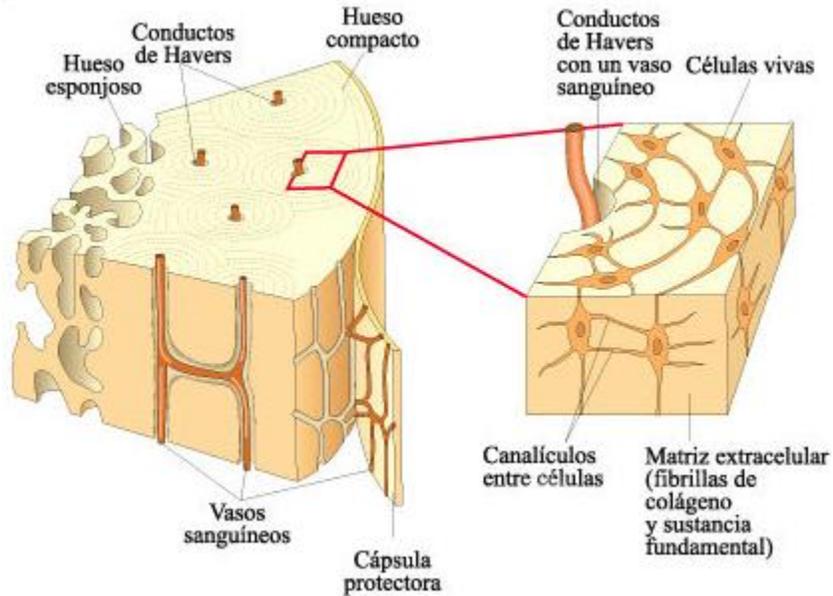


Figura 1.2
Morfología del hueso

Las superficies de los huesos largos, que forman parte de las articulaciones, están recubiertas por una capa de cartílago denominado articular, el resto de la superficie del un hueso está cubierta por capas de tejido conjuntivo formando el periostio y endostio, altamente vascularizados, a través de los cuales los vasos sanguíneos se distribuyen a todo el hueso para llevar a cabo su irrigación y de donde migran células precursoras óseas en procesos de reparación-regeneración. (Leeson, 1988)

Los huesos más irregulares (vértebras) constan de hueso esponjoso cubierto por una delgada capa de hueso compacto. (Cortina & Calderón, 2004)

Los huesos faciales, son huesos membranosos, completan el esqueleto facial. Se desarrollan por encima de la cápsula nasal y se denominan premaxilar, maxilares, cigomático y porción petrosa del hueso temporal. (Avery, 2007)

La mandíbula es el hueso más fuerte y grande del esqueleto facial. Es un hueso impar sin embargo se compone de una porción horizontal llamada cuerpo y una vertical llamada rama ascendente, forma parte de la Articulación temporomandibular. (Mayoral, 1977)

El maxilar superior se compone de dos huesos maxilares superiores que se encuentran en la línea media y están unidos por una sutura media. Este contribuye a la formación de la parte superior de la cara, nariz, órbitas y paladar duro, está formado por un cuerpo y cuatro apófisis. (Dunn, 1983)

CÉLULAS ÓSEAS

Aunque las células óseas constituyen sólo el 2 % del peso total de un hueso, son las responsables de su formación y mantenimiento durante la vida de un organismo. (Cortina & Calderón, 2004)

En el hueso se encuentran células derivadas del mesénquima (Cortina & Calderón, 2004), se reconocen cuatro tipos de células: osteoprogenitoras, osteoblastos, osteocitos y osteoclastos (Leeson, 1988) que son células que se originan por la fusión de monocitos de origen sanguíneo y que pertenecen al sistema de fagocitos mononucleares.

DIFERENCIACIÓN OSTEOLÁSTICA

Las células óseas se hallan dentro del propio tejido óseo, rico en células mesenquimales pluripotenciales indiferenciadas. Desde los trabajos de Friedenstein en 1976 se conoce que estas células mesenquimales pueden dar origen a cinco estirpes celulares distintas: osteoblastos, fibroblastos, condroblastos, adipocitos y mioblastos (Friedenstein, 1976), en respuesta a diferentes señales moleculares que inician la cascada de activación de diferentes genes (Harada S, 2003).

CÉLULAS OSTOGENITORAS

Las células osteoprogenitoras son células madre derivadas del mesénquima, las cuales tienen la capacidad de proliferar y diferenciarse a osteoblastos. Los factores que estimulan su diferenciación y los mecanismos moleculares, a través de los cuales se lleva a cabo este proceso, continúan siendo parte de las incógnitas por solucionar. Sin embargo, en el control transcripcional de la diferenciación de estas células a osteoblastos, se han identificado dos factores claves en el control de la expresión de múltiples genes correspondientes al desarrollo del fenotipo de osteoblastos, estos son “*Corebinding factor a “1” (Cbfa1)*” y “*Osterix (Osx)*”. (Karsenty, 2003)

Cbfa1 también conocido como *Runx 2*, es el marcador molecular más temprano y altamente específico de células del linaje osteoblástico. La expresión de *Cbfa1* es indispensable para la diferenciación de las células osteoprogenitoras en osteoblastos, como se demostró por su inactivación en animales experimentales en los que se observó la formación de esqueletos compuestos por cartílago con ausencia completa de hueso. (Karsenty, 2003)

La expresión de *Cbfa1* incrementa constantemente en las células osteoprogenitoras durante su diferenciación y se mantiene presente en osteoblastos diferenciados. (Andrew, 1995)

Como parte del control ejercido por *Cbfa1*, se ha identificado la regulación de la expresión de otros factores de transcripción como *Osx*, proteína que es expresada en las células osteoprogenitoras en diferenciación, su ausencia provoca un fenotipo similar, pero menos severo, al causado por la ausencia de *Cbfa1*. (Cortina & Calderón, 2004)

La diferenciación de las células osteoprogenitoras, es un proceso esencial para la formación, el crecimiento, remodelación y la reparación de los huesos.

Estas células son fusiformes con núcleos ovales o alargados y citoplasma escaso. Se encuentran cerca de las superficies óseas en la porción interna del periostio, en el endostio y en los conductos vasculares del hueso compacto, por ello en la literatura en ocasiones son denominadas como: “bone lining cell” o células del reborde óseo. Por microscopía electrónica se pueden identificar dos tipos de células osteoprogenitoras: uno (el preosteoblasto), que tiene algo de retículo endoplásmico y una región de Golgi poco desarrollada, da origen al osteoblasto, y el otro (el preosteoclasto), que tiene más mitocondrias y ribosomas libres, y mediante su unión a monocitos, da lugar al osteoclasto. (Leeson, 1988)

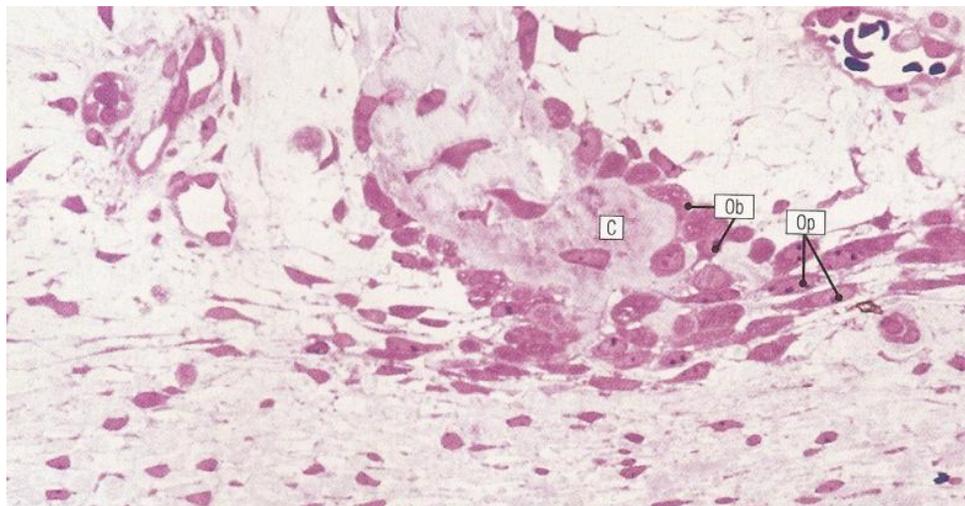


FIGURA 1.3.

Micrografía de azul de toluidina muestra numerosas células osteoprogenitoras en forma de huso (Op) en el hueso del cráneo en desarrollo de un feto humano de 15 semanas. Derivado de células mesenquimales primitivas, están los osteoblastos (Ob), que son más grandes y más cuboidales. El osteoblasto ha comenzado a depositar colágeno, que forma parte de la matriz osteoide (C). (Stevens, 2006)

OSTEOBLASTOS

Los osteoblastos son las células encargadas de sintetizar, secretar y ordenar las proteínas que conforman la fase orgánica de la matriz extracelular ósea. (Leeson, 1988)

Los osteoblastos además regulan la mineralización, disponiendo de manera adecuada a las proteínas y formando pequeñas depresiones sobre la matriz, rodeadas por parte de su membrana plasmática que posee enzimas como fosfatasa alcalina (ALP) y pirofosfatasa, las cuales aumentan la concentración

local de fosfato y calcio, creando así centros de nucleación de las sales que constituyen la fase mineral. (Aubin, 1996)

Numerosos factores sistémicos y locales regulan la proliferación, diferenciación y metabolismo de los osteoblastos, mediante mecanismos moleculares. Entre ellos se encuentran hormonas, como la 1,25 dihidroxivitamina D (1,25(OH)₂D), la hormona paratiroidea (PTH), y las citocinas como las interleucinas (IL) 6 y 11, los factores transformantes del crecimiento beta (TGFβs) y las proteínas morfogénicas óseas (BMPs) (Aubin, 1996). Los osteoblastos pueden permanecer en las superficies del tejido óseo en su forma inactiva o ser rodeados por la matriz que producen y entonces diferenciarse en osteocitos. (Cortina & Calderón, 2004).

Durante el periodo de crecimiento se disponen en una capa epiteliode de células cúbicas o cilíndricas bajas. Se puede demostrar que las células están en contacto unas con otras mediante prolongaciones cortas y delgadas. El gran núcleo, que suele localizarse en la región basal, muestra un nucléolo muy notable. El citoplasma es basófilo en extremo debido a la presencia de nucleoproteína de ribosa, que se relaciona probablemente con la síntesis de componentes orgánicos de la matriz ósea (esto es, colágena I y glucoproteínas). Con métodos adecuados, se pueden observar un diplosoma y un aparato de Golgi bien desarrollado junto al núcleo. Las mitocondrias son abundantes y por lo general alargadas. El citoplasma contiene gránulos que se tiñen con la técnica de PAS y es probable que contengan precursores de los glucosaminoglucanos de la matriz. (Leeson, 1988)

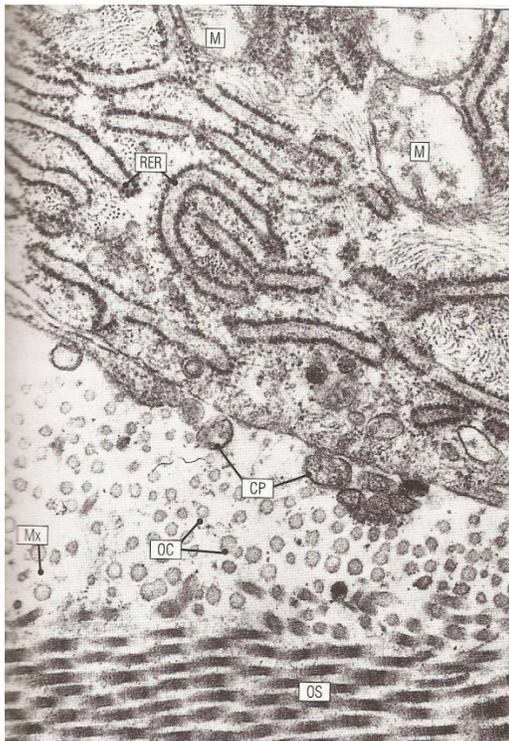


FIGURA 1.4

Micrografía electrónica de alta potencia muestra los rasgos característicos citoplásmicos de un osteoblasto activo. El citoplasma es rico en retículo endoplasmático rugoso (RER). Hay una prominente mitocondria (M) los precursores de las proteínas de colágeno y glicosaminoglucanos son sintetizadas en el RER y luego se envasan en el aparato de Golgi antes de la transferencia a la superficie de la célula en vesículas secretoras.

La superficie de la célula muestra numerosos procesos citoplásmicos (CP), particularmente en la cara en contacto con la existente osteoide (OS). Las vesículas secretoras descargan su contenido de esta superficie para formar las fibras de colágeno identificables osteoide (OC) Matriz extracelular (Mx). (Stevens, 2006)

Cuando dejan de producir sus productos particulares se aplanan y, al mismo tiempo, disminuye la basofilia citoplásmica, así como la cantidad de fosfatasa alcalina. (Leeson, 1988)

Los osteoblastos tienen muchas prolongaciones citoplásmicas digitiformes con abundantes microfilamentos que se extienden hacia la matriz ósea en desarrollo para hacer contacto con las prolongaciones de los osteoblastos vecinos. Estas prolongaciones son más evidentes cuando la célula empieza a rodearse de matriz ósea. (Leeson, 1988)

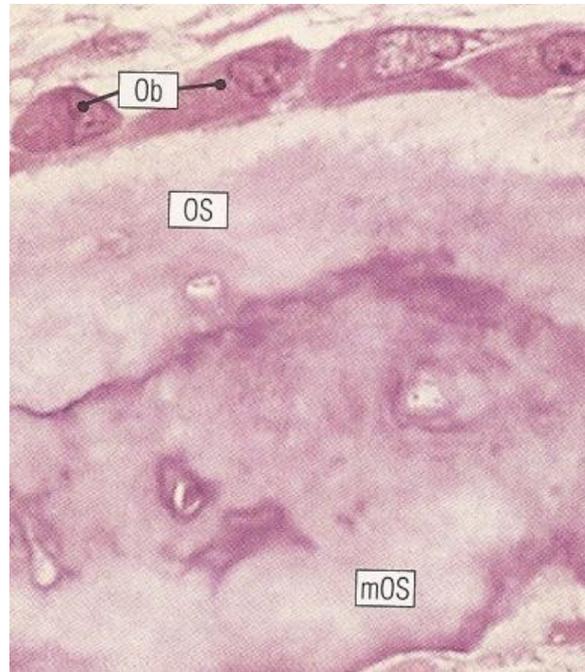


FIGURA 1.5

Micrografía de un azul de toluidina mostrando una sección activa de crecimiento óseo, se observa una fila de los osteoblastos (Ob) cuboides activos sintetizando y secretando matriz orgánica (osteoide OS), las células tienen citoplasma basófilo voluminoso debido a la síntesis de proteínas del retículo endoplásmico. Algo de osteoide está ligeramente mineralizado (mOS). (Stevens, 2006)

En la formación y la resorción de los huesos, son los osteoblastos los que ejercen la mayor parte del control.

Los osteoblastos no sólo producen las proteínas de la matriz extracelular ósea, sino que influyen en la maduración y la actividad de los osteoclastos. Muchos de los factores que sirven como estímulo primario para la resorción ósea, como la PTH, la IL-1, la IL-6 y el factor beta de necrosis tumoral (TNF- β), tienen efecto directo muy escaso o nulo sobre los osteoclastos; de hecho, son los osteoblastos los que poseen receptores para estas sustancias. Bajo la señal adecuada, los osteoblastos liberan un mediador soluble, inductor de la actividad de resorción de

los osteoclastos, denominado RANKL u ODF (ligando del receptor activador del factor nuclear κB o factor de diferenciación de osteoclastos). (Cortina & Calderón, 2004)

OSTEOCITOS

Las células óseas maduras u osteocitos son corpúsculos ovales aplanados con prolongaciones muy delgadas que se ramifican. Estas células se hallan en el tejido óseo en pequeñas cavidades llamadas lagunas entre las láminas de matriz ósea (la sustancia intercelular calcificada), y sus prolongaciones ocupan conductillos diminutos que penetran en las laminillas. Las prolongaciones de algunas células tienen acceso directo a los conductos vasculares, y como todas las células por medio de sus prolongaciones establecen contacto con las células vecinas, se establece un sistema de conductillos comunicantes por toda la matriz. Es por difusión a lo largo de estos conductos que las células efectúan sus intercambios de sustancias con la sangre, al evitarse la difusión a través de la matriz misma por la presencia de las sales inorgánicas. (Leeson, 1988)

Los osteocitos se localizan inmersos en la Matriz Extracelular (MEC) ósea dentro de espacios llamados lagunas osteocíticas, en donde están bañados por líquido tisular y conectado con otros osteocitos, con osteoblastos en la superficie del tejido óseo y con los conductos de Havers, a través de prolongaciones de su membrana que se extienden por una red de conductos denominados canalículos. En general, los osteocitos presentan un metabolismo menos activo que los osteoblastos y, aunque en forma limitada, tienen la capacidad de sintetizar y remover (resorber) MEC ósea. Los osteocitos son responsables del proceso de osteólisis osteocítica, en el cual se resorben las sales amorfas de calcio y de fosfato depositadas en la fase mineral de la MEC ósea y de esta forma la actividad de los osteocitos contribuye de manera importante a la homeostasis de calcio. (Guyton, 1998).

El osteocito, a semejanza del condrocito, ocupa una pequeña cavidad o laguna en la matriz, pero a diferencia del mismo no está aislada de las demás. Los osteocitos no se dividen, según lo prueba el hecho de que siempre se encuentra una sola célula en cada laguna. Tienen citoplasma con ligera basofilia en el que se puede demostrar que contiene gotitas de grasa, algo de glucógeno y gránulos finos semejantes a los que se hallan en los osteoblastos. El núcleo muestra cromatina nuclear condensada y se tiñe de color oscuro. Hay una reducción importante del retículo endoplásmico rugoso y del complejo de Golgi si se les compara con los osteoblastos. (Stevens, 2006)

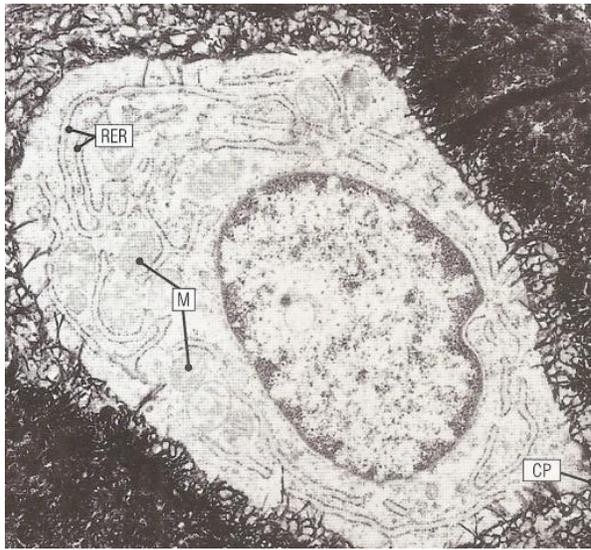


FIGURA 1.6
 Microfotografía electrónica de un osteocito recién atrapado. Se muestra parte del citoplasma en el cual se observa el retículo endoplasmático rugoso (RER) y la mitocondria (M) de los osteoblastos a partir de la que se deriva. Obsérvese una de sus prolongaciones citoplasmáticas (CP), estando el resto fuera de la sección. (Stevens, 2006)

Los osteocitos jóvenes están más cerca de las superficies óseas y en lagunas redondas. Los osteocitos maduros están en lagunas ovales o lenticulares. Las prolongaciones celulares de los osteocitos se extienden por distancias considerables en los conductillos, que irradian a partir de las lagunas. En los puntos de contacto entre las prolongaciones osteocíticas dentro de los conductillos se observan uniones comunicantes. Esto explica cómo pueden sobrevivir las células en un medio tan aislado. En el hueso maduro, las prolongaciones se pierden casi por completo. (Leeson, 1988)

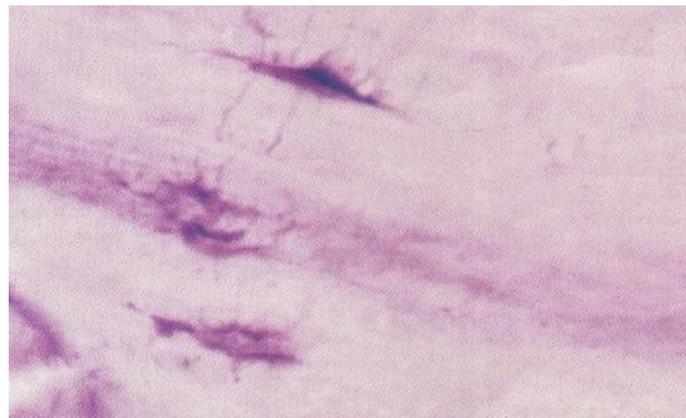


FIGURA 1.7
 Micrografía de un azul de toluidina de hueso que muestra osteocitos atrapados dentro de la matriz ósea mineralizada. Tenga en cuenta sus finos procesos citoplasmáticos, los cuales se encuentran en estrechos canales canaliculares de hueso mineralizado y obsérvese el enlace con otros osteocitos (Stevens, 2006)

OSTEOCLASTO

Los osteoclastos son las células responsables de la resorción ósea. Son células gigantes multinucleadas localizadas en las superficies de tejido óseo, dentro de las depresiones de resorción donde forman las llamadas lagunas de Howship. (Cortina & Calderón, 2004)

Estas células grandes (de 20 a 100µm de diámetro) y multinucleadas (de 2 a 50 núcleos) son un tipo de macrófago. Como los demás macrófagos, se desarrollan a partir de los monocitos que se originan en el tejido hemopoyético de la médula ósea. Estas células precursoras son liberadas desde el torrente sanguíneo y se reúnen en los lugares de resorción ósea, donde se fusionan para formar los osteoclastos multinucleados, que se fijan a las superficies de la matriz ósea y la corroen. (Leeson, 1988)

La parte de la membrana celular del osteoclasto que se encuentra en contacto con la superficie del tejido óseo, forma un espacio autocontinente, en donde son liberadas enzimas lisosomales, que permiten la lisis de las proteínas, así como ácido, que solubiliza las sales de la MEC ósea. (Cortina & Calderón, 2004)

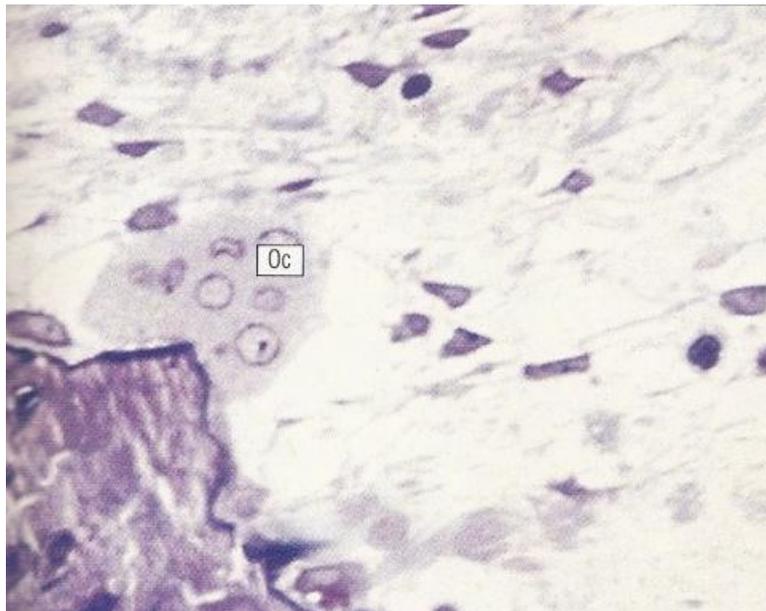


FIGURA 1.8.

Micrografía de un azul de toluidina que muestra un solo osteoclasto (OC), que se encuentra sobre una punta irregular de hueso antes de la reabsorción. En una etapa posterior ese hueso se habrá erosionado y nivelado como resultado de la actividad de los osteoclastos. (Stevens, 2006)

A menudo el citoplasma presenta un aspecto espumoso y aparece ligeramente basófilo y granuloso. Estos abundantes gránulos se tiñen con fosfatasa ácida, la enzima marcadora para lisosomas.

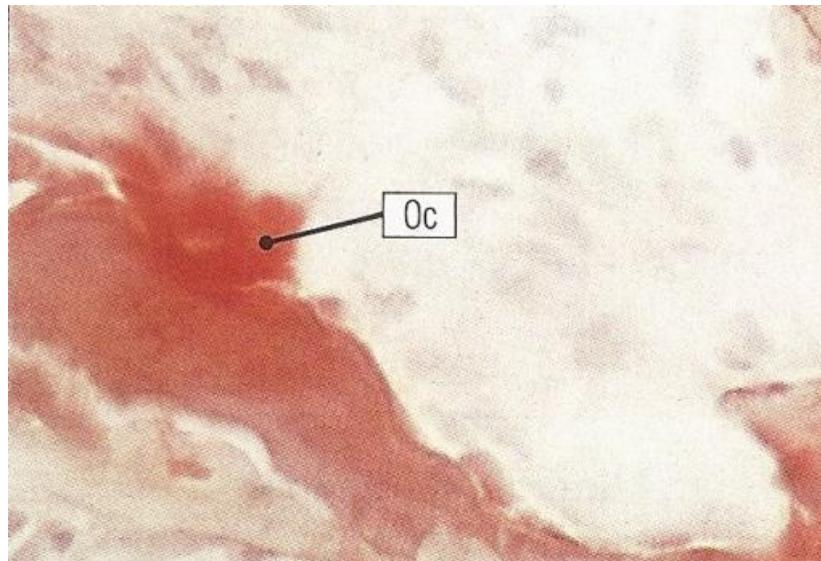


FIGURA 1.9.
Micrografía de una sección de hueso congelado demostrando abundante actividad fosfatasa ácida (rojo) en un osteoclasto (Oc) que está activamente erosionando la superficie del hueso. (Stevens, 2006)

Las micrografías electrónicas muestran que la superficie del osteoclasto que mira hacia la matriz tiene muchas prolongaciones citoplásmicas y microvellosidades, lo que se describe como borde rizado, que en apariencia facilita la resorción ósea. El borde rizado está rodeado por una zona de filamentos de actina que parece ser el lugar de adherencia de la célula a la superficie ósea. (Leeson, 1988)

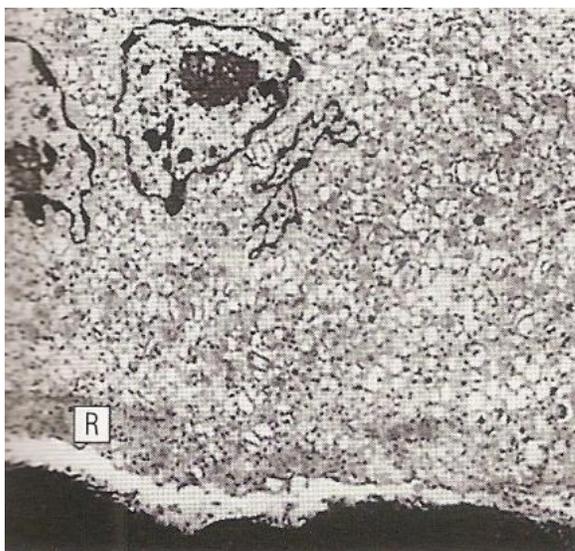


FIGURA 1.10.
Microfotografía electrónica de un osteoclasto, muestra riqueza en aparato de Golgi, lisosomas, vesículas secretoras y mitocondrias. En su interface con el hueso, existen protuberancias citoplásmicas altamente complejas de la superficie de los osteoclastos que aparecen como un borde rizado (R). (Stevens, 2006)

Mediante la resorción, se liberan factores (como TGFbs, ILs y BMPs) previamente depositados por los osteoblastos en la MEC, los cuales junto con algunas hormonas provenientes de otros tejidos (PTH y 1,25(OH) D), estimulan a los osteoblastos a depositar de nuevo matriz ósea en las zonas recién resorbidas, en una proporción similar al hueso que fue removido por los osteoclastos. Esta coordinación, entre las actividades de los osteoclastos y de los osteoblastos, permite mantener el equilibrio entre los procesos de remodelación (formación y resorción) determinándose así el estado óptimo de la masa esquelética. (Cortina & Calderón, 2004)

Cuando se completa el proceso de resorción, los osteoblastos desaparecen, probablemente por degeneración o regresión a su tipo de célula de origen. (Leeson, 1988)

CELULAS DE RECUBRIMIENTO ÓSEO

El hueso según Genneser, tiene una quinta célula que sería la célula de recubrimiento óseo, también llamada osteocito de superficie, aunque en realidad son originarios a partir de osteoblastos que se encuentran en reposo ya que han finalizado la formación de matriz ósea y recubren como una capa de epitelio plano simple todas las superficies óseas internas y externas, en las que no hay actividad de osteoblastos u osteoclastos. Tiene gran importancia, ya que descansa sobre una capa muy delgada de osteoide (matriz ósea no mineralizada) y la resorción ósea nunca ocurre sobre superficies recubiertas por osteoide o por colágena, por lo que es necesario eliminar esta capa antes de que los osteoclastos entren en contacto directo con el tejido óseo mineralizado y comiencen la resorción, la eliminación de la capa tiene lugar cuando las células de recubrimiento óseo se activan (posiblemente ante una señal de los osteocitos por vía de los nexos) y secretan la enzima colagenasa, necesaria para eliminar la capa superficial no mineralizada. Una vez degradado el osteoide de la superficie, las células de recubrimiento se retraen y dan paso a los osteoclastos. (Genneser, 2000)

MATRIZ EXTRACELULAR ÓSEA

Aunque en apariencia la sustancia extracelular del hueso es homogénea, tiene una estructura bien ordenada. Sus dos componentes principales son la matriz orgánica y las sales inorgánicas.

La porción orgánica (que representa alrededor de 35%) consta en su mayor parte de fibras osteocolágenas unidas en haces de unos 5 μm de grueso por una sustancia de cemento, que consta principalmente de glucosaminoglucanos (combinaciones de proteínas y polisacáridos) (Leeson, 1988).

La proteína más abundante es la colágena tipo I, que constituye aproximadamente el 90% de la matriz orgánica. Las fibras de colágena tipo I se disponen de manera paralela formando laminillas, las laminillas contiguas se alternan formando ángulos rectos, con lo que se produce un poro o hendidura de 400 Å entre las moléculas

de colágenas, En estos poros se deposita alrededor de 50% de los cristales de hidroxiapatita, confiriéndole al hueso su resistencia a las fuerzas tensionales. (Cortina & Calderón, 2004) (Leeson, 1988).

El resto de la matriz orgánica está compuesto principalmente por glicoproteínas, como la osteonectina y la fibronectina, proteínas con grupos g-carboxiglutámicos, como la osteocalcina, proteoglicanos, como el condroitín y el queratán-sulfato y citocinas como TGFbs y BMPs. Las proteínas de la matriz orgánica participan en la regulación de la mineralización, la migración, la proliferación y diferenciación celular, mediante la interacción entre proteínas de la MEC y las células y generando sitios de nucleación para las sales minerales. (Leeson, 1988). Las sustancias de naturaleza no colágenas más características de la matriz extracelular, son básicamente tres:

a) *Glucoproteínas:*

- Osteopontina: su función es similar a la fibronectina como mediador de agregación celular.
- Osteonectina: glucoproteína ácida que tiene gran afinidad por el colágeno, se trata de una proteína específica del hueso, al unirse a la fibra colágena y cristales.
- Sialoproteína ósea: su participación exacta en el mecanismo de la mineralización se desconoce aún; se cree que está asociada a la osteopontina y favorecería al receptor de la integrina en la superficie celular. Químicamente esta glucoproteína es rica en ácido aspártico, glutámico y glicina.
- Proteína morfogenética ósea (BMP): es una glucoproteína que promueve la síntesis de ADN y la proliferación celular.

b) *Proteínas con ácido gamma carboxi-glutámico:*

- Osteocalcina o proteína Gla ósea: es también secretada por los osteoblastos y se le considera una proteína de enlace del calcio al colágeno. La osteocalcina necesita de cofactores como vitaminas K, B y C para su función.
- Proteína Gla de la matriz: presente en la matriz ósea en la fase previa a la maduración, su concentración se ve estimulada por la vitamina D al inicio de la mineralización. Se le asocia a la regulación de la homeostasis del calcio.

c) *Proteoglucanos:*

Dentro de los proteoglucanos están: la decorina (PGII, se ha localizado en la matriz extracelular ósea próxima a los tendones) y el biglicano (PGI, se ha identificado en la proximidad de las células endoteliales en el proceso de síntesis y depósito de la matriz ósea). La función precisa de cada uno de los proteoglucanos se desconoce aún, pero son los encargados de favorecer y controlar el depósito de las sales de calcio.

Los GAG (glucosaminoglicanos) presentes en la matriz ósea son los siguientes: condroitinsulfato, dermatánsulfatos, heparánsulfato y el hialuronan (ácido hialurónico)

La fase mineral de la MEC ósea es abundante (70%) y está formada por el depósito, sobre el osteoide, de sales amorfas principalmente de fosfatos de calcio $[CaHPO_4 \text{ y } 4 Ca (PO_4)]$ y por cristales bien estructurados de hidroxiapatita $[Ca_5(PO_4)_3(OH)]$. Las sales amorfas son la principal fuente de recambio para la homeostasis mineral y la hidroxiapatita es el componente mineral óseo que proporciona dureza, confiriéndole al hueso su resistencia a las fuerzas de compresión. En la fase mineral también se encuentran sales de sodio, magnesio, potasio y carbonatos (Stevens, 2006) (Fernández, Hernández, & Alobera, 2011).

OSIFICACIÓN DEL HUESO

En la mineralización de los huesos se ven involucrados los fosfatos de calcio básicos y alrededor de otras 20 sales. Estas sales minerales, pueden depositarse en condiciones patológicas como los cálculos urinarios, cálculos biliares y cálculos dentales.

El líquido extracelular en el cuerpo, a partir del cual se precipitan los minerales, esta supersaturado con respecto a los fosfatos de calcio básicos.

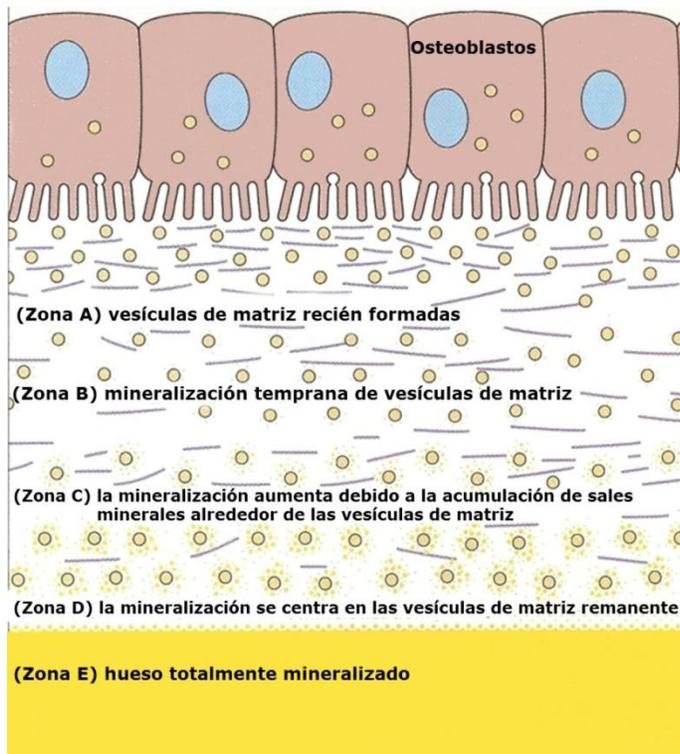


FIGURA 1.11.

Diagrama de los acontecimientos que se cree se producen en hueso recién formado. Inmediatamente después de la banda de osteoblastos irregulares se encuentra la zona (A) que tiene frescos depósitos de colágeno y glicosaminoglicano, que contienen vesículas de matriz recién formadas.

La siguiente es la zona (B) en la que los primeros cristales de hidroxiapatita son depositados en vesículas de matriz, y más allá encontramos la zona (C) en la que los focos de mineralización rápidamente aumentan debido a la acumulación de sales minerales. En la zona D los focos de mineralización se centran en las vesículas de matriz remanente, hasta que casi se han convertido completamente en canales. En la zona E la mineralización es completa y el colágeno subyacente se oculta. (Stevens, 2006)

TIPOS DE OSIFICACIÓN

En la etapa embrionaria el tejido óseo tiene su origen en la capa mesodérmica. Los huesos del cráneo se desarrollan a partir del mesodermo de la cresta craneo-neural, de las somitas surge el resto del esqueleto axial (columna vertebral, costillas y esternón) y el esqueleto apendicular (huesos de las extremidades) se forma a partir del mesodermo de la placa lateral (Cortina & Calderón, 2004)

El maxilar inferior o mandíbula se origina en la cara externa del cartílago de Meckel; este cartílago irá desapareciendo y el maxilar inferior crece hacia la línea media uniéndose sus extremos por la parte alveolar. Los órdenes inferiores se mantienen separados hasta el nacimiento cuando están presentes los huesecillos mentonianos que, al unirse formarán la eminencia del mentón. (Mayoral, 1977)

El maxilar superior se osifica en dos huesos separados que empiezan a unirse cerca del borde alveolar, uno de los huesos es el maxilar superior, propiamente dicho, y el otro es el hueso intermaxilar o premaxilar, el cual comprende los alvéolos de los incisivos, la parte anterior del paladar óseo y la porción anterior de la apófisis ascendente del maxilar superior. (Mayoral, 1977)

En la regulación de la osteogénesis embrionaria, participan factores parácrinos como: BMPs, TGFbs, la familia de factores Wingless (Wnts), factores de crecimiento de fibroblastos (FGFs) y factores Hedgehog. En el crecimiento, mantenimiento y reparación de los huesos, además de estos factores parácrinos, participan factores endocrinos (hormonas) como la PTH y la 1,25(OH) D (Columna vertebral, costillas y esternón). (Cortina & Calderón, 2004)

La osteogénesis, sucede a través de dos procesos: la osificación intramembranosa o directa y la endocondral o indirecta.

OSIFICACIÓN INTRAMEMBRANOSA

Ocurre por diferenciación directa de células del mesénquima en osteoblastos. Los huesos que se desarrollan en tejido conjuntivo sin intervención del cartílago. A este grupo pertenecen los huesos de la bóveda del cráneo: parietal, frontal, temporal y parte superior del occipital, los huesos de la parte superior de la cara, y el hueso del tímpano y el ala media de la apófisis pterigoides del esfenoides.

Los huesos membranosos en que el cartílago interviene en un estadio posterior en su osificación son la mandíbula y la clavícula.

El hueso membranoso proviene directamente de una condensación del mesénquima embrionario siendo, por tanto, más simple que el tipo endocondral, porque no tiene que preformarse en cartílago. Los huesos del cráneo, por ejemplo, se forman en un centro de osificación del tejido conjuntivo que produce las primeras trabéculas óseas las cuales se irradian llegando a formar una pequeña placa que irá creciendo después por aposición en sus bordes. El hueso esponjoso

primario se irá cambiando por hueso compacto en las superficies externa e interna. Cuando los huesos se van aproximando unos a otros, queda entre ellos una región de tejido conjuntivo que irá disminuyendo cada vez más hasta formar una sutura. (Mayoral, 1977)

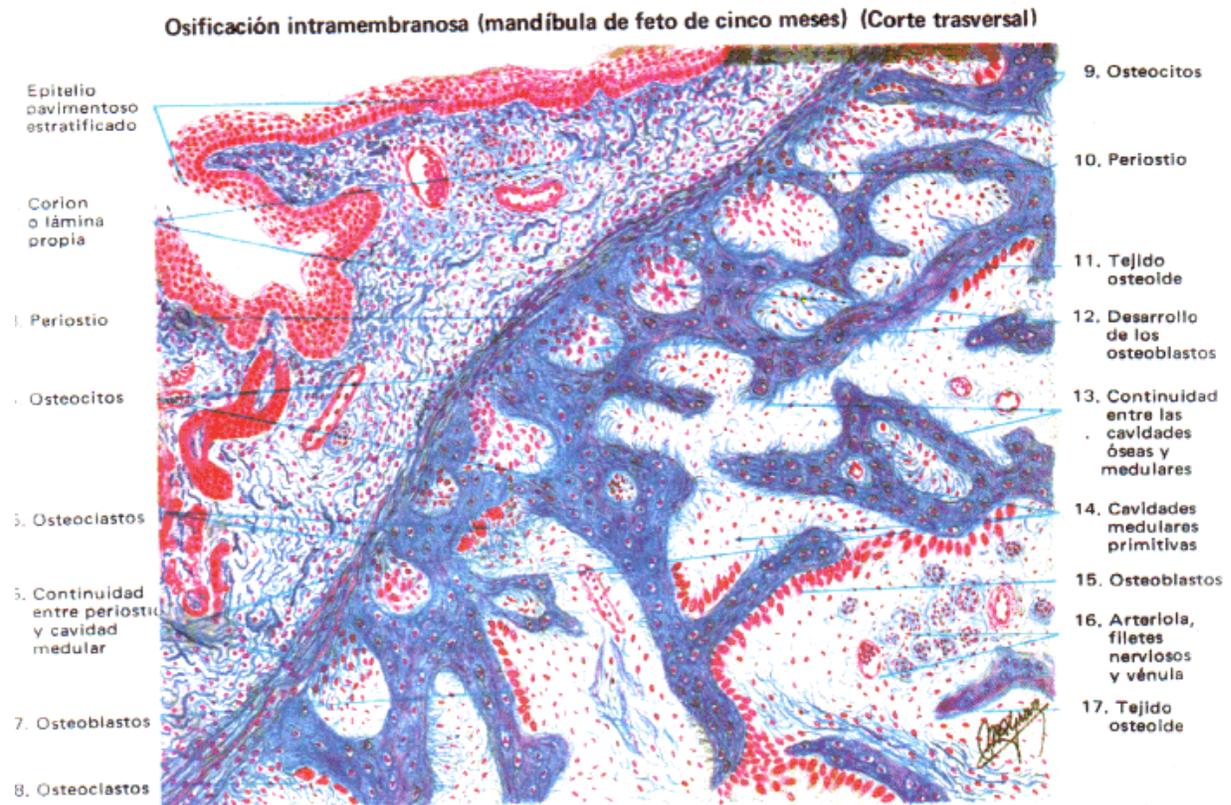


FIGURA 1.12.
Coloración: Mallory-Azán. 50x (Di Fiore, 1975)

OSIFICACIÓN ENDOCONDRALE

La condensación del mesénquima embrionario da origen a la proliferación intersticial de columnas de condrocitos. En el cartílago la matriz es producida y mineralizada por los condrocitos, los cuales posteriormente sufren hipertrofia y finalmente mueren por apoptosis.

El cartílago mineralizado, sirve como base para el depósito subcondral óseo, durante el cual las células del mesénquima se diferencian en osteoblastos. La presencia de osteoblastos coincide con la vascularización del centro de los sitios de osificación. Después de que se lleva a cabo la invasión vascular, los osteoclastos se hacen presentes, encargándose de la resorción e iniciando la remodelación del hueso recién formado. (Cortina & Calderón, 2004)

Constituyen en este grupo todos los huesos largos del esqueleto, y en el cráneo el etmoides, el cornete inferior y los que forman la base del cráneo: el esfenoides (cuerpo, alas menores y la base de las alas mayores), ala externa de la apófisis pterigoides, peñasco del temporal y la apófisis basilar y parte inferior del occipital. (Mayoral, 1977)

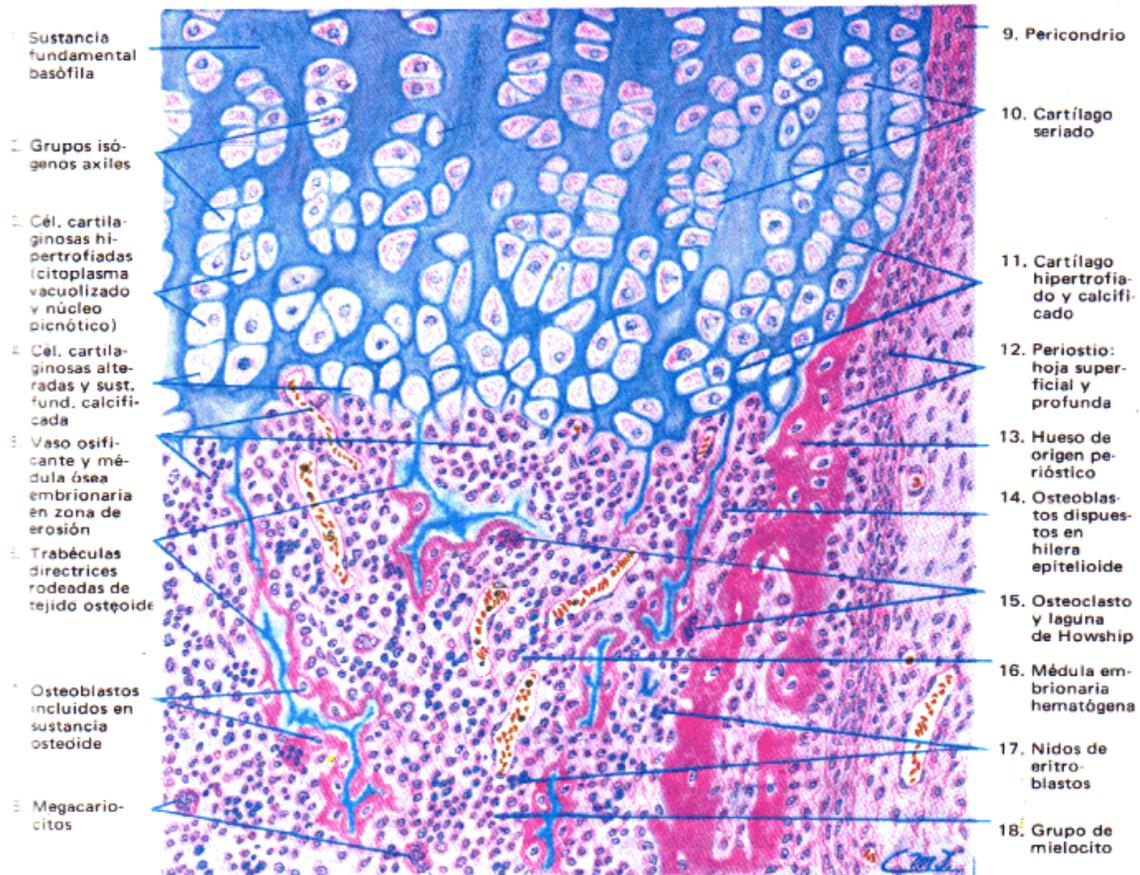


FIGURA 1.13.
Coloración: Hematoxilina-Eosina. 200x (Di Fiore, 1975)

OSTEONECROSIS

La osteonecrosis se refiere a la muerte *in situ* de hueso, es una enfermedad causada por la disminución de flujo sanguíneo en los huesos, la falta de sangre deteriora y destruye el hueso. (Khurana, 2009)

Según Hyllard y cols (Hyllard, 2012) cada año alrededor de 10.000 a 20.000 estadounidenses desarrollan osteonecrosis. Las personas que desarrollan esta patología (en EEUU.) están entre los 20 y 50 años, a menudo tienen factores de riesgo como: un historial de trauma grave, el uso de corticosteroides y consumo excesivo de alcohol (Instituto Nacional de Artritis y Enfermedades Musculoesqueléticas y de la Piel, 2009).

La osteonecrosis ocurre con mayor frecuencia en las caderas, rodillas, hombros y tobillos, pero se puede presentar en cualquier hueso o incluso en más de un hueso a la vez.

En la osteonecrosis, el hueso se deteriora más rápidamente y la regeneración ósea se retrasa por lo que las células óseas no son capaces de formar hueso nuevo a la misma velocidad del que se está perdiendo.

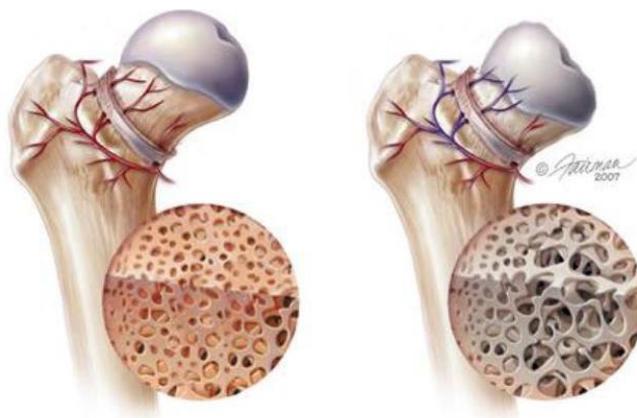


FIGURA 2.1

La imagen de la derecha muestra tejido muerto de hueso que presenta disminución de flujo sanguíneo. Esto puede producir dolor y colapso en áreas óseas. La imagen izquierda muestra hueso normal.

Existen dos formas principales de osteonecrosis:

- Medular donde la necrosis se extiende en la cavidad medular y el hueso trabecular, por lo general silenciosa.
- Cortico-medular donde la corteza también participa, esta puede ser dolorosa y progresiva.

ETIOLOGÍA

La patología de la osteonecrosis está bien resuelta, sin embargo la patogénesis sigue siendo un enigma. Puede estar relacionado con la interrupción del suministro de sangre al hueso, bien por el bloqueo, el trauma, o la presión intraósea mayor. (Khurana, 2009)

Markin en 1992 establece a la osteonecrosis como el resultado de diversos mecanismos tales como la interrupción mecánica de vasos, trombosis, daño o presión en la pared de un vaso o debido a una oclusión venosa. (Markin, 2008)

Tabla 1. Clasificación de Osteonecrosis según (Markin, 2008)		
Tipo de Osteonecrosis	Desorden que lo desencadena	Mecanismo
Osteonecrosis Traumática	Fractura	IMV, OV
Osteonecrosis Séptica	-	IMV, T, D/P-PV, OV
Osteonecrosis No traumática	Abuso de alcohol	
	Enfermedad de Caisson	T, D/P-PV
	Enfermedad de Gaucher's	D/P-PV
	Desordenes del tejido conectivo (artritis reumatoide o lupus eritematoso sistémico)	IMV, D/P-PV
	Arteritis o vasculitis	D/P-PV
	Hemoglobinopatía (enfermedad de células falciformes)	T
	Cuagulopatía	T, D/P-PV
	Daño por Radiación	D/P-PV
	Administración de corticoesteroides	IMV, T, D/P-PV, OV
	Lesiones del fémur relacionadas con la edad	D/P-PV
	Embarazo	OV
	Gota	Evento adverso
	Obesidad	OV??

Mecanismo patogénico:

IMV: Interrupción Mecánica de Vasos

T: Trombosis

D/P-PV: Daño o Presión en la Pared de un Vaso

OV: Oclusión Venosa

La osteonecrosis también puede ocurrir sin motivo aparente, aún si la persona no presenta otros problemas de salud. (Instituto Nacional de Artritis y Enfermedades Musculoesqueléticas y de la Piel, 2009). Actualmente el interés de los estudiosos de esta patología, se centra en mutaciones genéticas que conducen a una hipercoagulabilidad, la cual se traduce en microtrombosis y osteonecrosis cuando actúan ciertos factores ambientales (epigenéticos). Los pacientes que sufren la

llamada osteonecrosis idiopática, quienes probablemente tienen algún tipo de alteración de la coagulación que no ha sido identificada. (Lieberman, 2002)

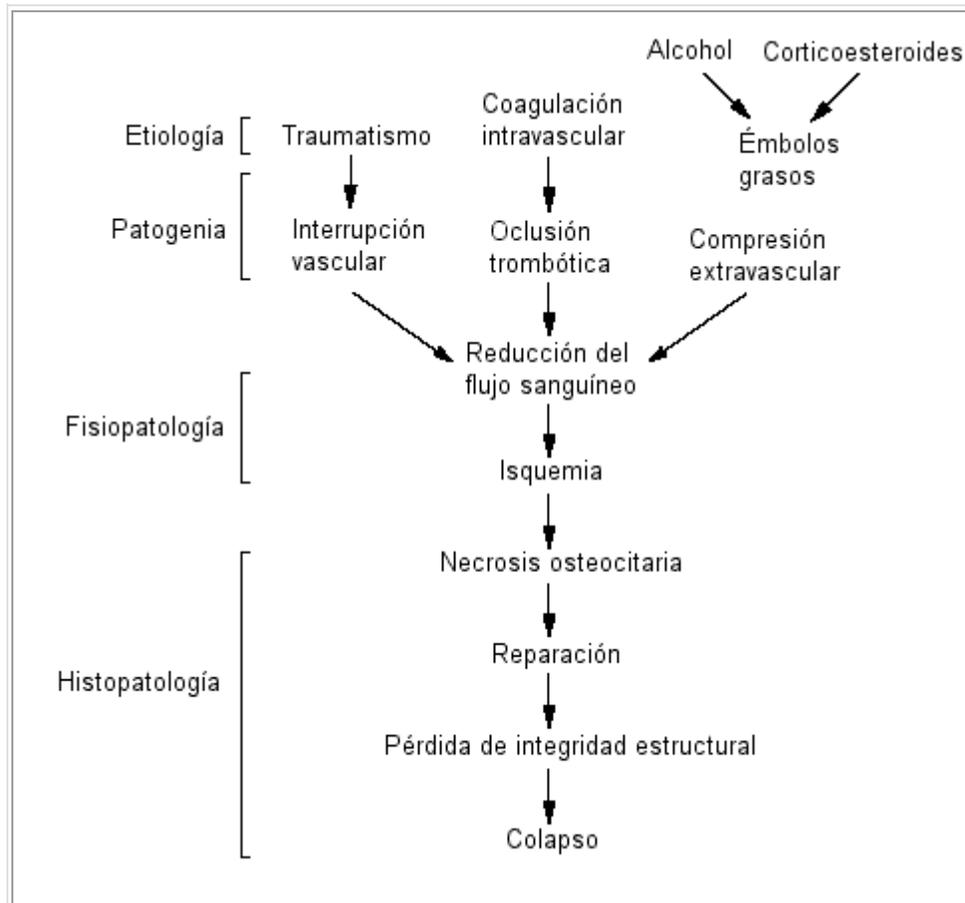


FIGURA 2.2:
 Un concepto sobre la patogenia de la osteonecrosis que unifica varias hipótesis. Muchas etiologías pueden contribuir a los mecanismos patogénicos de interrupción mecánica, oclusión trombótica o compresión extravascular. Todos estos mecanismos pueden disminuir el flujo sanguíneo, conduciendo a isquemia y subsiguientemente a la necrosis de los osteocitos. La presencia de hueso necrótico induce un proceso reparativo durante el cual la reabsorción de hueso excede a su producción, conduciendo a una pérdida de la integridad estructural de las trabéculas subcondrales y eventualmente al colapso subcondral. (Aaron, 1998)

DIAGNÓSTICO

Al comienzo, es posible que la osteonecrosis no tenga síntomas, a medida que la enfermedad avanza el dolor puede ir de leve a intenso. El tiempo que transcurre entre el comienzo de los síntomas y la pérdida de la función en la articulación puede ser de meses o más de un año. (Hylland, 2012)

La enfermedad se sospecha en base a la historia clínica del paciente, la exploración física, radiografías, y técnicas de análisis.

El estadio de la osteonecrosis sugerido, basado en rayos X y resonancia magnética fueron propuestos por Mont. (Mont, 1995)

TABLA 2. ETAPAS DE OSTEONECROSIS Con base a estudios radiográficos (Steinber, 1995) (Mont, 1995)	
Etapa	Característica
0	Radiografía normal o no diagnóstico, gammagrafía ósea y resonancia magnética.
I	Radiografía normal, gammagrafía ósea anormal y / o resonancia magnética.
II	Anormal radiografía que muestra los cambios "quístico" y esclerótico en la cabeza femoral
III	Colapso subcondral producir una señal de media luna
IV	Aplanamiento de la cabeza femoral
V	Estrechamiento articular con o sin afectación en la cavidad de la pelvis
VI	Promover cambios degenerativos

Radiográficamente se observa el signo de la media luna, que consiste en el colapso subcondral del segmento necrótico. (Khurana, 2009) . Esta media luna se provoca debido a la poca densidad que presenta el hueso, haciendo visible la pérdida ósea en la zona.



FIGURA 2.3.
Una radiografía lateral de la cadera, donde se aprecia el signo de la media luna (Urbaniak, 1997)

La resonancia magnética es un método especialmente sensible. Exploraciones iniciales muestran una deficiencia de fotones en el sitio de la necrosis con hiperemia circundante. En cuestión de semanas, esto se convierte en un señal uniforme. Esto se reduce en ambas imágenes T1 y T2. Con el tiempo, esta señal

puede variar para reflejar que la revascularización se está produciendo. (Khurana, 2009)

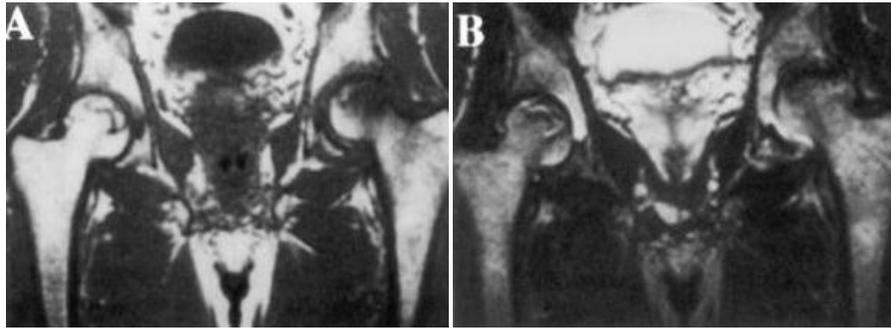


FIGURA 2.4.

A: Imagen de Resonancia Magnética (RMN) en T1 que muestra una pequeña lesión osteonecrótica en la derecha, una gran lesión en la izquierda y una pérdida de intensidad de la señal por debajo de la lesión en la izquierda.
B: Imagen de RMN en T2 de la cadera derecha donde se aprecia el signo de la doble línea; la línea oscura externa representa el reborde escleroso, mientras que la línea interna de alta intensidad de señal representa la hipervascularidad de la zona de reparación. (de Hoffman S, Kramer J, Plenk H, Kneeland JB. Imaging of osteonecrosis)

El diagnóstico de osteonecrosis se confirma mediante biopsia. El hueso necrótico se identifica por trabéculas óseas anucleadas a menudo en el contexto de infarto de médula. (Khurana, 2009)

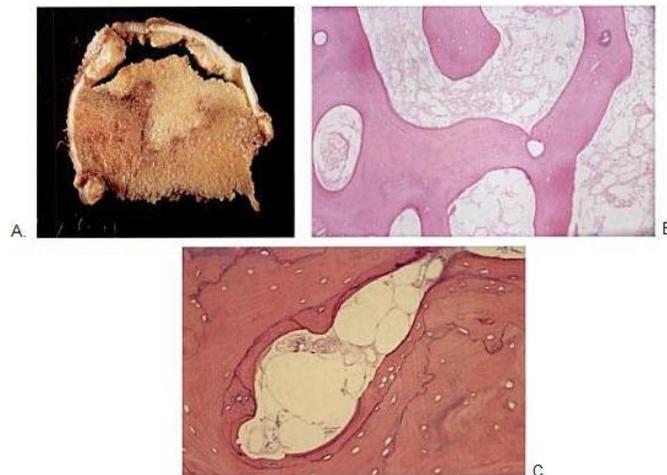


Figura 2.5.

(A) Se muestra hueso necrótico. **B.** Palidez microscópica (debido a una falta de intensidad en la tinción). El hueso carece de osteocitos en espacios lagunares (**B, C**) y también carece de remodelación de la superficie por los osteoblastos y los osteoclastos. (Vincent, 2008)

El tejido vascular de reparación fibroso prolifera de manera adyacente al hueso. La revascularización de hueso muerto se produce en unas pocas semanas.

Después ocurre la resorción osteoclástica, al mismo tiempo, los osteoblastos establecen hueso en la parte superior del fragmento necrótico. La siguiente etapa es impredecible, y probablemente depende de la localización y la extensión de los daños. Se puede culminar en la restitución (curación completa) o puede conducir a la continuación implacable del proceso de reparación que daña la integridad del hueso. Este segundo curso, conduce a fracturas, colapso del hueso subcondral, la desintegración del cartílago, y deformidad de las articulaciones. (Khurana, 2009)

TRATAMIENTO

El tratamiento ayuda disminuir las posibilidades de que el hueso de las articulaciones se destruya. Sin tratamiento, la mayor parte de los pacientes que padecen esta enfermedad, sufren de dolor fuerte y limitación de movimiento al cabo de los años. Para escoger el mejor tratamiento, el médico debe de valorar los siguientes factores:

- Edad del paciente
- La etapa en que se encuentra la enfermedad
- Cuánta osteonecrosis hay en el hueso y donde está localizada
- La causa, si se conoce.

Si la enfermedad viene como consecuencia del uso de alcohol o esteroides, el tratamiento podría no surtir efecto a menos que deje de usar esas sustancias. (Hylland, 2012)

Las metas del tratamiento para la osteonecrosis son fundamentalmente de prevención terciaria:

- Mejorar el uso de la articulación.
- Detener la lesión.
- Proteger los huesos y las articulaciones.
- Rehabilitar la articulación cuando es necesario.

A corto plazo el tratamiento implica la inmovilización, medicamentos anti-inflamatorios, ejercicios, y la limitación de movimiento (Khurana, 2009)

La perforación del segmento dañado se ha intentado en un esfuerzo para "descomprimir" la zona, y para llevar el suministro vascular a ella. Esto se puede combinar con una biopsia, entonces se considera que ambas medidas como diagnósticas y terapéuticas. A pesar de la popularidad de este procedimiento, hay muy poco beneficio en él. (Khurana, 2009)

La Estimulación Eléctrica de injertos vascularizados también se ha intentado, aunque los resultados de estos procedimientos sufren de escasos números suficientes para el análisis. Osteotomías de cadera han tenido popularidad de vez en cuando, sin embargo el resultado final es una articulación deformada y en última instancia puede requerir una prótesis. (Khurana, 2009)

BIFOSFONATOS

El primer bifosfonato (BF) se sintetizó en Alemania en 1865.

En 1966 Fleisch descubrió que los pirofosfatos inorgánicos prevenían la calcificación de los fluidos corporales mediante su unión a los cristales de hidroxiapatita. También reportó que las formas orales de pirofosfato son inactivadas por las fosfatasas secretadas en la mucosa gastrointestinal. En un intento por encontrar análogos del pirofosfato para prevenir la resorción ósea en ciertos padecimientos del metabolismo óseo, se estudiaron drogas como los difosfonatos ahora llamados bifosfonatos que toleraron la ruta oral. (Toranzo, 2009)

En 1969 Fleish publicó por primera vez sobre los bifosfonatos en el *Science and Nature*. Veinte años más tarde estos elementos fueron utilizados por primera vez como fármacos para disfunciones óseas (Jaimés M 2008)

Una vez que el valor clínico potencial de los BF fue apreciado en la década de 1970, los esfuerzos de investigación se centraron en el desarrollo de compuestos más potentes en la actividad antireabsortiva, pero sin capacidad para inhibir la mineralización. (Rusell, Watts, Ebetino, & Rogers, 2008)

Los bisfosfonatos, son fármacos inhibidores de la resorción ósea cuya estructura química es relativamente simple, ya que está formada por dos moléculas de fosfato unidas a un átomo de carbono. Son análogos sintéticos de los pirofosfatos inorgánicos pero, a diferencia de éstos, cuyo átomo central es el oxígeno, aquellos disponen de un átomo puente de carbono que les proporciona resistencia a la hidrólisis enzimática digestiva. (Arboleya & Alper, 2011)

Esta estructura principal P-C-P permite al BF enlazarse con avidez a los iones metálicos divalentes tales como Ca^{2+} , y como resultado los BFs se unen a las superficies minerales del hueso *in vivo*. (Wang, Goodger, & Progrell, 2003)

Está descrito que el grupo en posición R1, determina la afinidad del fármaco por los cristales óseos, mientras que el grupo en la posición R2, es responsable de la potencia y actividad farmacológica del mismo. (Cisterna, Yanine, & González, 2008)

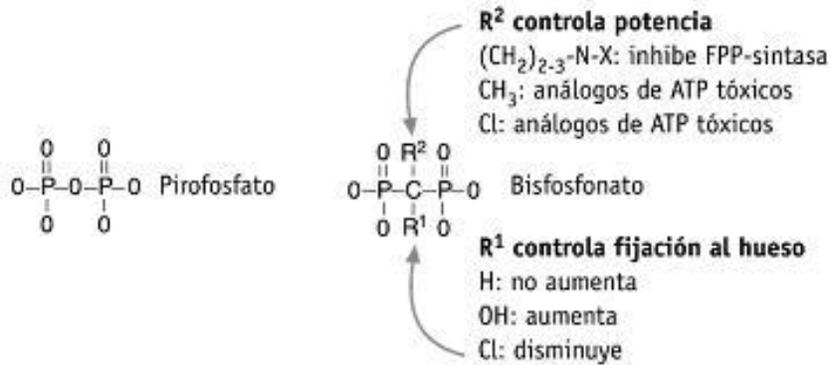


FIGURA 3.1.
Estructura general de los Bisfosfonatos (Cisterna, Yanine, & González, 2008)

Además, los dos radicales de carbono están directamente relacionados con la afinidad al tejido óseo y la actividad antirresortiva de cada molécula. La adición de un grupo amino a una de las cadenas ha permitido la síntesis de BF más potentes, que pueden utilizarse por vía oral en administración semanal o mensual (alendronato, risedronato e ibandronato) o por vía intravenosa (pamidronato, ibandronato y zoledronato). (Arboleya & Alper, 2011)

Esta afinidad a los huesos, seguido por su liberación localizada durante la resorción mediada por osteoclastos, explica por qué los BFs parecen tener un efecto altamente selectivo sobre los osteoclastos *in vivo*. (Coxon, 2006)

Los bifosfonatos (BF) son una clase de fármacos ampliamente indicados para la prevención y tratamiento de la osteoporosis postmenopáusica y la inducida por esteroides; la enfermedad de Paget del hueso, hipercalcemia maligna, mieloma múltiple, y las metástasis óseas asociadas con cáncer de mama, próstata, pulmón y otros tumores de tejidos blandos. (Landesberg Regina 2011)

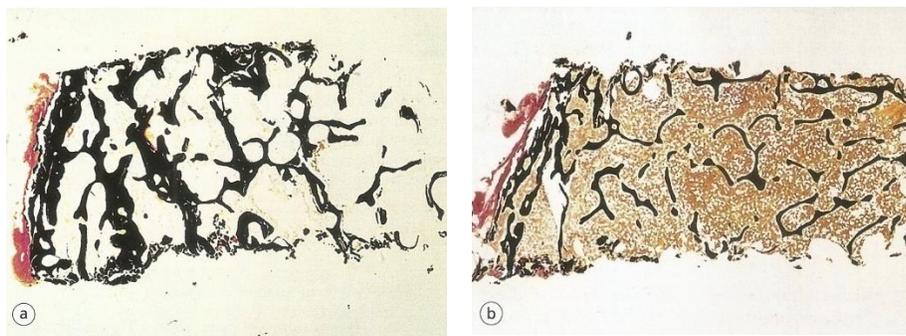


FIGURA 3.2.
Se muestra en a) la micrografía de una sección de resina de biopsia ósea de la cresta ilíaca que muestra hueso cortical y trabecular normal, teñidas con un método de plata, lo que hace que el hueso calcificado se muestran como negro. b) Micrografía de hueso de un paciente con osteoporosis. Comparándolas es evidente que la zona cortical es más estrecha y que las trabéculas son más delgadas. (Stevens, 2006)

El concepto sobre la efectividad de los BF sobre las enfermedades antes mencionadas, derivó de los estudios anteriores sobre pirofosfato inorgánico, donde se había encontrado que el plasma y la orina contienen compuestos que inhiben la precipitación de fosfato de calcio y que parte de que esta actividad inhibitoria era debida a este pirofosfato inorgánico, un compuesto que no se había descrito previamente en la literatura científica. Fue entonces cuando el pirofosfato demostró que afectaba *in vitro* la formación y disolución de los cristales de fosfato de calcio. Este efecto fue similar con el carbonato de calcio y, habían sido utilizados en detergentes. (Fleisch, 2009)

Desde que se demostró que el pirofosfato era un medicamento capaz de inhibir la calcificación ectópica *in vivo*, se sugirió que podría actuar como un regulador fisiológico de la calcificación, y quizá también de la descalcificación, aunque su concentración local está determinada por la actividad de pirofosfatasas locales. Debido a su falta de acción cuando se administra por vía oral, el pirofosfato se usa de forma terapéutica sólo en la gammagrafía. Esto llevó a buscar análogos que mostraran actividades físico-químicas similares, pero resistentes a la hidrólisis enzimática y, por tanto, que no se degraden metabólicamente, surgiendo así los BFs que cumplen con estas condiciones. (Jaimes, Oliveira, Olate, & Albergaria, 2008)

Berenson y cols. (1998) observaron que el uso de pamidronato mejoraba la supervivencia y disminuía las complicaciones óseas. Este y otros estudios llevaron a propugnar el uso de los BF o fármacos de forma indefinida. (Jaimes, Oliveira, Olate, & Albergaria, 2008)

MÉCANISMO DE ACCIÓN

El mecanismo mediante el cual los BFs inhiben la reabsorción ósea no está totalmente esclarecido. Se sabe que los BPs son incorporados por los tejidos mineralizados y son liberados durante la reabsorción producida por el recambio fisiológico del tejido óseo. En ese momento, son internalizados por los osteoclastos (Wang H. W., 2007).

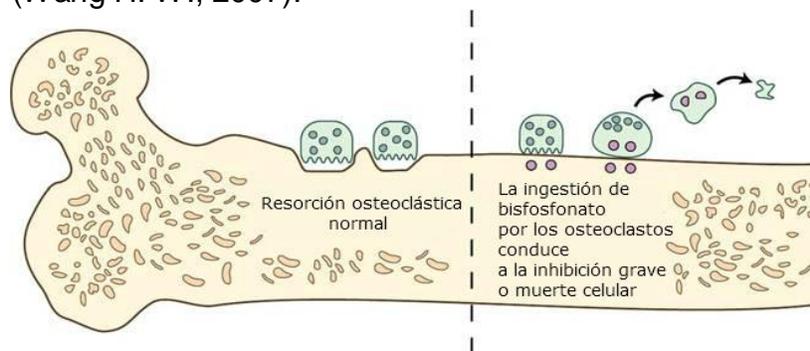


FIGURA 3.3.

La apoptosis de los osteoclastos (muerte celular individual) resulta de la capacidad de los bisfosfonatos, una vez ingeridos, para inhibir los sistemas internos enzimáticos. (Marx R. E., 2009)

Cuando los BPs no son nitrogenados, el osteoclasto los transforma en un análogo del ATP. Esta molécula inhibe las enzimas intracelulares ATP dependientes, lo que induce la apoptosis del osteoclasto. (Luckman S. C., 1998).

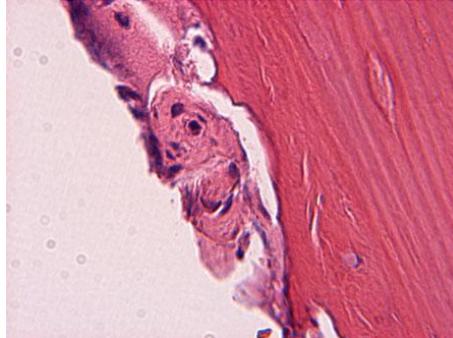


FIGURA 3.4.
Se observan los primeros efectos tóxicos de bisfosfonato en un osteoclasto. Se nota mayor tamaño de la célula, numerosos núcleos, desintegración y separación de la zona de sellado de las lagunas de Howship (Marx R. E., 2009)

Los BPs nitrogenados en tanto, además de inhibir las enzimas ATP dependientes, bloquean la ruta del mevalonato, responsable de la síntesis de colesterol. La inhibición de la ruta del mevalonato altera el citoesqueleto del osteoclasto, impidiéndole el transporte de vesículas intracelulares. Esto a su vez, imposibilita la formación del borde rizado, estructura esencial para la reabsorción ósea. (Luckman S. H., 1998). Estos mecanismos serán explicados en el siguiente apartado

CLASIFICACIÓN

Las diferencias entre los bifosfonatos pueden verse en el laboratorio y en la práctica clínica. Cada uno con bifosfonatos tiene un perfil único de la potencia y la unión con el hueso, los BFs según su mecanismo molecular pueden ser clasificados en dos grandes grupos:

- Los Bifosfonatos simples (PPI), como clodronato y etidronato, son metabolizados intracelularmente por enzimas aminoacil-tRNAsintetasas análogas de ATP, con la parte no hidrolizable P-C-P remplazándola por el grupo P-O-P en ATP. Y estos metabolitos que son del tipo AppCp se acumulan en el citosol de los osteoclastos e inducen la muerte celular, probablemente por que inhiben mediante enzimas ATP-inhidoras, nucleótidos como la adenina translocasa que es un componente de transición del poro de permeabilidad mitocondrial. La inhibición de esta adenina (ANT) por los catabolitos del tipo AppCCI2p del clodronato causan la hiperpolarización de la inercia de la

membrana mitocondrial causando la pérdida del potencial de membrana mitocondrial, liberando así al citocromo C e induciendo con ello la apoptosis. (Coxon, 2006)

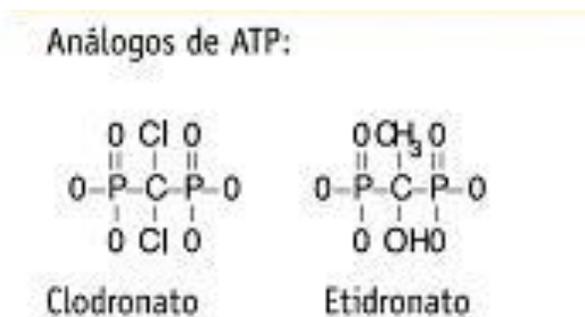


FIGURA 3.5.
Ejemplos de Bifosfonatos Simples
(Cisterna, Yanine, & González, 2008)

- Los Bifosfonatos nitrogenados (N-BFs), que tienen cadenas laterales más voluminosas que se caracterizan por un nitrógeno ya sea en una cadena de alquilo (por ejemplo, alendronato e ibandronato) o dentro de una estructura heterocíclica (por ejemplo, risedronato y zoledronato), no son metabolizados sistémicamente y se absorben mal por vía oral. (Coxon, 2006) (Toranzo, 2009).

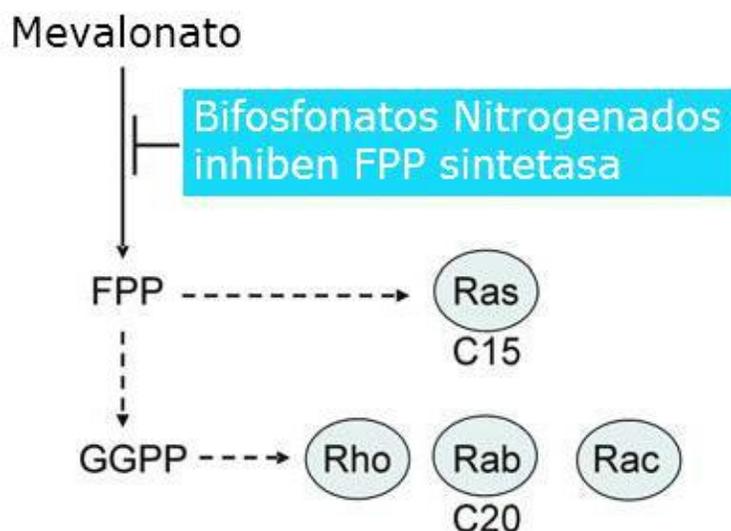


FIGURA 3.6.
Los N-BFs actúan inhibiendo sintasadifosfatofarnesil (FPP sintasa), una enzima de la vía del mevalonato, con lo que agotan células de lípidos fisoprenoides (FPP) y difosfatogeranilgeranil (GGPP), que son necesarios para la prenilación post-traduccional de pequeñas GTPasas, tales como las de las familias Ras, Rho y Rab. Debido a la prenilación es necesario para la localización de estas GTPasas a membranas subcelulares, se cree que los N-BF inhiben la resorción mediante la interrupción de la localización y la función de GTPasas que son esenciales para actividad de los osteoclastos y su supervivencia. (Coxon, 2006)

De la pequeña cantidad que se absorbe (0,06%), el 50% se excreta sin cambios por la orina, y el resto permanece unido al hueso, actuando a nivel local y luego se libera lentamente en el tiempo. El efecto acumulativo de los BF está dado

porque no sufren metabolismo y su vida media en el organismo es de 1-10 años. (Toranzo, 2009)

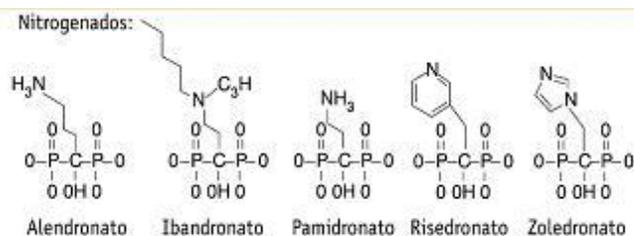


FIGURA 3.7.
Ejemplos de Bifosfonatos Nitrogenados (Sánchez, 2010)

Tabla 3. Bifosfonatos nitrogenados aprobados por la FDA (Patrick., 2007) (Wang H. W., 2007) (Sánchez, 2010) (Minutoli, 2011)					
Nombre genérico	Nombre comercial	Vía de administración	R1	R2	Potencia Relativa
Pamidronato disódico	Aredia®	Intravenosa	OH	(CH ₂) ₂ – NH ₃	x100
Aledronato sódico	Fosamax®	Oral	OH	(CH ₂) ₃ – NH ₃	x1000
Ibadronato	Boniva®	Oral/Intravenosa	OH	(CH ₂) ₂ – NH ₃ (CH ₂) ₄ – CH ₃	x5000
Ácido zoledrónico	Zometa®	Intravenosa	OH	CH ₂ –	x10000

ÁCIDO ZOLEDRÓNICO:

El ácido zoledrónico (AZ) es uno de los bifosfonatos más potentes que ha sido utilizado en estudios sobre hueso alveolar. Por lo que se explicará de forma más detallada Es un compuesto sintético modulador del calcio y metabolismo óseo.

Indicaciones:

- Está indicado en el manejo de las metástasis óseas de tumores sólidos malignos y las lesiones del mieloma múltiple. Las lesiones blanco a tratar pueden ser de tipo blástico, lítico o mixto.
- También está indicado en el manejo de la hipercalcemia paraneoplásica que acompaña a diversos tumores, así como en la profilaxis de la osteopenia causada por terapia de privación hormonal en el cáncer de próstata con falla hormonal a primera línea.
- Los pacientes con enfermedad de Paget también obtienen mejoría con el ácido zoledrónico.

Dosis:

- Para pacientes con cáncer y evidencia de destrucción ósea en radiografías simples o bien en mieloma múltiple, la aplicación de ácido zoledrónico a dosis de 4 mg en infusión de 15 minutos cada tres a cuatro semanas es el

esquema de elección. La preparación deberá diluirse en 100 ml de solución salina normal o glucosa al 5%.

- Se deberá realizar de manera conjunta con la terapia antineoplásica habitual. La iniciación de manejo en pacientes con gammagramas óseos anormales y radiografías simples normales es considerada una indicación de manejo con ácido zoledrónico. Una vez iniciada la terapia, ésta debe ser sostenida hasta que la respuesta clínica alcanzada sea satisfactoria.
- Para pacientes con hipercalcemia asociada a enfermedad maligna una dosis única de 4 mg en infusión de 15 minutos está indicada. Deberán ser monitorizados el estado de hidratación antes y después del tratamiento. Se puede iniciar una segunda aplicación en pacientes, en los cuales no se logró la normalización de los valores de calcio. Este deberá ser con un intervalo de siete días entre el tratamiento inicial y el segundo. La dosis de la segunda aplicación es de 4 mg.
- Profilaxis de deprivación ósea en pacientes con tratamiento por cáncer de próstata: Una dosis de 4 mg aplicados de forma convencional cada tres semanas. (Sanofi-Aventis, 2012)

EFFECTOS ADVERSOS DE LOS BIFOSFONATOS

En general, estos fármacos (Bifosfonatos) son bien tolerados, rara vez producen efectos secundarios clínicamente significativos, tales como síntomas gastrointestinales a bifosfonatos orales, creatinina sérica elevada, fiebre transitoria de bajo grado y artralgias cuando los medicamentos son inyectables. (Kühl, Walter, Acham, Pfeffer, & Lambrecht, 2012)

Los bifosfonatos orales como el alendronato, risedronato e ibandronato se utilizan principalmente para el tratamiento de la osteoporosis, éstos se han asociado con eventos adversos relacionados con el tracto gastrointestinal, tales como náuseas, vómitos, dolor epigástrico y dispepsia, debido a la irritación de la mucosa de la parte superior del tracto gastrointestinal. De hecho, varios casos de esofagitis con erosiones o ulceraciones esofágicas asociados con el uso de alendronato se notificaron a través de la vigilancia posterior a la comercialización de estos fármacos. (Levine, 2000)

Otros efectos secundarios son el hiperparatiroidismo secundario y la hipocalcemia, dolor musculoesquelético, la osteonecrosis maxilar, las fracturas atípicas de la diáfisis femoral y eventos oculares. El efecto secundario ocular más común es la conjuntivitis no es específica. (Fraunfelder, 2003) Sin embargo, los efectos oculares secundarios más graves son la uveítis y escleritis, ambos de los cuales requieren la interrupción del tratamiento con bisfosfonatos (French, 2008)

En el caso de los BF intravenosos hay un ligero aumento del riesgo de alteraciones electrolíticas, pero no lo suficiente para garantizar un seguimiento regular. Además, se puede presentar insuficiencia renal crónica, ya que los fármacos se excretan mucho más lentamente. (Minutoli, 2011)

La respuesta inflamatoria frente a los bifosfonatos o fluctuaciones en los niveles de calcio en la sangre se sugieren como posibles mecanismos para que se presente la fibrilación auricular. (Minutoli, 2011)

En 2002, la FDA recibió reportes de varios pacientes con cáncer tratados con BFs por vía intravenosa como zoledronato, que desarrollaron osteonecrosis maxilar (ONM) (Edwards, 2008). En esta condición, el tejido óseo en los maxilares a menudo no cicatriza después de un trauma menor, como lo es una extracción dental, dejando el hueso expuesto. (Kühl, Walter, Acham, Pfeffer, & Lambrecht, 2012)

El riesgo de desarrollar ONM asociada con bifosfonatos orales, parecía insignificante, sin embargo parece que aumenta cuando la duración del tratamiento supera los 3 años. Este marco de tiempo puede acortarse en la presencia de ciertos aspectos, tales como el uso crónico de corticosteroides. (King, 2008)



FIGURA 3.8. Los efectos adversos de los bifosfonatos son clasificados como comunes, raros y emergentes (Minutoli, 2011)

BIFOSFONATOS Y ODONTOLOGÍA

En algunos estudios se administró bifosfonatos de forma tópica, oral e inyectada localmente en el hueso. En las conclusiones de todos estos estudios se ha obtenido un efecto inhibitor del movimiento ortodóntico. (Igarashi, 1994)

Según un estudio realizado por Grier y Wise en 1998, el uso de Pamidronato, inhibe el tiempo de erupción dental en ratas tanto en incisivos como en molares, también se observó el aumento de tamaño en 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 para resorber hueso. (Grier, 1998)

Reportes publicados en la última década ubican a la Osteonecrosis Maxilar como un efecto secundario grave al uso de Bifosfonatos. La Osteonecrosis Maxilar Asociada a Bifosfonatos (ONMAB), es una complicación significativa en pacientes tratados con Bifosfonatos, ésta puede causar exposición de hueso necrótico y se presenta generalmente después de una cirugía dentoalveolar simple. (Ruggiero S. M., 2004)

OSTEONECROSIS MAXILAR ASOCIADA A BIFOSFONATOS

La osteonecrosis ha sido asociada a una gran variedad de causas en pacientes con cáncer, incluyendo quimioterapia, radioterapia, corticoterapia, y recientemente, medicación (o terapia con) bifosfonatos (Martins CM, 2007)

La osteonecrosis fue vista por primera vez en el siglo XIX en trabajadores de la industria de los fósforos, causada por exposición crónica al fósforo y a principios del XX se le denominó fosfonecrosis (Wang, Goodger, & Progrell, 2003). Esto fue comunicado en 1845 por Lorinser. Éste hecho histórico nos proporciona una base para ligar el fenómeno de la osteonecrosis maxilar directamente con el uso de bifosfonatos. Además, en 1995 una referencia histórica nos menciona que Starck y Epker (Starck, 1995) en un reporte de caso, describen la falla de implantes osteointegrados después de terapia a base de bifosfonatos por osteoporosis. Sin embargo, ese artículo no describe la osteonecrosis como un efecto directo del uso de bifosfonatos y los autores refieren que es difícil establecer la falla del implante basados en un caso individual. (Ruggiero & Fantasia, 2006)

En el año 2003 Marx, fue el primero en reportar 36 casos de individuos que desarrollaron una exposición ósea a nivel de los maxilares. Estas lesiones de etiología desconocida, no respondían favorablemente a los tratamientos médicos ni quirúrgicos. No obstante, los individuos afectados tenían en común, haber recibido terapia con Bifosfonatos. (Marx R. , 2003)

Marx y Stern relataron que los pacientes con mieloma múltiple que reciben pamidronato podrían desarrollar necrosis avascular de los maxilares. Diversas publicaciones informan sobre pacientes que procuraron tratamiento para necrosis ósea intraoral que ocurrió espontáneamente después de extracciones dentales o trauma oral. Estos pacientes presentaron una historia de malignidad primaria, que incluye mieloma múltiple, carcinoma de mama y próstata, siendo tratados con pamidronato intravenoso o ácido zoledrónico. (Marx R. , 2003)

La Osteonecrosis Maxilar Asociada a Bifosfonatos (ONMAB) ha sido definida por la Asociación Americana de Cirugía Oral y Maxilofacial, como un área expuesta del hueso en la región maxilofacial que no sana en un lapso de 8 semanas después del diagnóstico médico en un paciente que recibía o había estado expuesto a Bifosfonatos (BPs), sin antecedentes de radioterapia en la cabeza y el cuello. (Vescovi, y otros, 2011) (Ruggiero S. L., 2009)

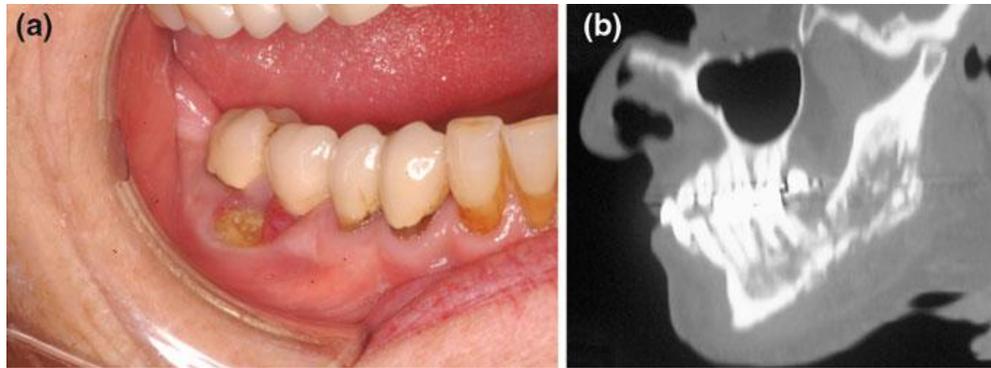


FIGURA 5.1.
a) Hueso expuesto del uso Fosamax (Aledronato Sódico). b) Amplia osteólisis debida a una infección secundaria de Fosamax inducida por la osteonecrosis de la mandíbula (Minutoli, 2011)

El inconveniente de los BFs es que al alterar la cantidad y calidad del hueso y su vascularización producen problemas de necrosis y subsecuentemente infección especialmente en la mandíbula. Se han encontrado colonias de *Actinomyces* en algunos casos de osteonecrosis y osteoradionecrosis en pacientes con cáncer, lo cual sugiere, que estos microorganismos podrían ser los agentes causales de infección. (Ruggiero & Fantasia, 2006)

El efecto acumulativo de los BF está dado porque no sufren metabolismo. Su vida media en el cuerpo humano es de 1-10 años. (Toranzo, 2009)

La ubicación más frecuente de la ONM se da en mandíbula, luego en el maxilar y en menor medida en ambos huesos simultáneamente (Lam, 2007). Marx en una muestra de 119 casos de ONM reportó que el 68,1% presentaba lesiones en la mandíbula, el 27,7% en el maxilar y el 4,2% en ambos maxilares en forma simultánea. El mismo estudio señala que en el 73,1% de los casos se registraron hallazgos radiográficos compatibles con una combinación de osteólisis y esclerosis ósea (Marx R. S., 2005)

CLASIFICACIÓN

Ruggiero propuso un sistema de clasificación clínica de ONMAB en el 2006 (Ruggiero & Fantasia, 2006):

- Etapa 1: enfermedad caracterizada por la exposición del hueso que se encuentra asintomático, sin evidencia de inflamación del tejido adyacente o regional significativa o infección. Se reconoce que los pacientes pueden tener síntomas de dolor antes de la aparición de alteraciones radiológicas sospechosas de osteonecrosis o evidencia clínica de hueso expuesto.
- Etapa 2: enfermedad que se caracteriza por el hueso expuesto con dolor asociado, con el adyacente o regionales de tejidos blandos infección inflamatoria hinchazón o secundaria.

- Etapa 3: enfermedad caracterizada por la exposición del hueso asociada a dolor, inflamación de los tejidos blandos adyacentes o regional inflamatoria o infección secundaria que es difícil de manejar con un tratamiento antibiótico por vía oral o intravenosa.

Sin embargo en 2009, la Asociación Americana de Cirujanos Orales y Maxilofaciales (AAOMS), identificó cinco categorías diferentes para ONMAB (Ruggiero S. L., 2009) como se puede ver en la Tabla 4.

TABLA 4. CATEGORIA PARA ONMAB (Ruggiero S. L., 2009)	
ÉTAPA	CARACTERÍSTICAS
"En peligro"	No hay evidencia de hueso necrótico en pacientes tratados con bifosfonatos por vía oral o intravenosa
Etapa 0	No hay evidencia clínica de hueso necrótico, no existen hallazgos clínicos específicos ni síntomas.
Etapa 1	Hueso expuesto y necrótico, los pacientes son asintomáticos y no hay evidencia de infección.
Etapa 2	Hueso expuesto y necrótico, los pacientes presentan dolor y existe evidencia clínica de infección.
Etapa 3	Hueso expuesto y necrótico, los pacientes presentan dolor, infección, y uno o más de los siguientes: El hueso necrótico y expuesto se extiende más allá de la región de hueso alveolar (es decir, borde inferior y la rama de la mandíbula, seno maxilar y hueso malar en el maxilar superior), resultando en una fractura patológica, fístula extraoral, comunicación oral nasal y osteólisis que se extiende hasta el borde inferior de la mandíbula o el piso del seno.

FACTORES DE RIESGO

Los estudios han demostrado que los pacientes expuestos a altas dosis acumulativas de bifosfonatos tienen un riesgo mayor de desarrollar ONM. Por esta razón, la incidencia de la ONM ha sido mucho mayor en los pacientes con cáncer que en los pacientes con trastornos óseos benignos como la osteoporosis y la enfermedad de Paget. Además, la mala salud bucal, extracciones dentales, y otros traumas en la cavidad oral son factores críticos para el desarrollo de la ONM. (Landesberg Regina, 2011)

Es importante destacar que los beneficios del tratamiento con bisfosfonatos en pacientes con enfermedad ósea metastásica y metabólicos han sido importantes. Por lo tanto, los bifosfonatos deben seguir siendo una parte importante de la terapia de estas enfermedades, solo que la atención debe centrarse en la prevención de la ONM por medio de la detección y el manejo de la enfermedad dental antes del tratamiento con bifosfonatos. (Landesberg Regina, 2011)

La mayoría de los casos de ONMAB se presentan tras la realización de extracciones dentales (Ruggiero S. M., 2004). Mavrokokki reporto que el 73% de los casos de ONM en Australia fueron posteriores a una exodoncia (Mavrokokki, 2007). Otros factores desencadenantes de ONM pueden ser la colocación de

implantes dentales, una cirugía periapical, una cirugía periodontal o una prótesis desajustada que traumatice los tejidos. No obstante, la aparición de estas lesiones también puede ser espontánea (Marx R. S., 2005).

Los factores de riesgo relacionados con la aparición de ONMAB se simplifican de la siguiente manera: (American Dental Association Council on Scientific, 2006)

1. Factores relacionados con el fármaco:
 - Potencia del Bifosfonato: Los más potentes como el pamidronato y zolendronato son los que presentan más riesgo de inducir Osteonecrosis Maxilar.
 - Duración del tratamiento: La ONM suele presentarse en pacientes que han tomado Bifosfonatos intravenosos incluso por un tiempo inferior a 1 año (9,3 meses para el ácido Zoledrónico y 14,1 meses para el pamidronato). En cambio, en los BFs orales este tiempo aumenta, llegando a superar los 3 años con un tiempo medio de consumo de 5 ó 6 años (rango: 3,3-10,2 años).

2. Factores Locales:
 - Cirugía dentoalveolar (exodoncias, implantes dentales, cirugía periapical y periodontal, etc.).
 - Trauma por prótesis completas/parciales.
 - Anatomía local (torus mandibulares o palatinos grandes y multilobulados, cresta milohioídea). La ONM es más común en la mandíbula que en el maxilar (proporción 2:1).
 - Abscesos periodontales/odontogénicos.

3. Factores Generales:
 - Terapias coadyuvantes: los pacientes en tratamiento concomitante con corticoesteroides parecen tener un mayor riesgo de ONM.
 - La patología de base: los pacientes con mieloma múltiple presentan el mayor riesgo de ONM seguidos por los pacientes con cáncer de mama.
 - Otros factores o enfermedades concurrentes: alcohol, tabaco, diabetes, raza, edad, quimioterapia, higiene oral deficiente, etc.

La anatomía del hueso alveolar, tanto en mandíbula y maxilar está cubierta por una delgada capa de tejido conectivo y epitelio llamada periostio, y por lo tanto las estructuras orales son constantemente sometidas a diversas tensiones, que pueden ser fisiológicas (por ejemplo, la masticación), iatrogénicas (por ejemplo, procedimientos dentales), o inflamatorias (por ejemplo, enfermedad periodontal o caries). Esta combinación de estrés constante, no sólo predispone a la mucosa a un trauma, lo que lleva a la exposición de hueso, pero es probable que exija un aumento en la compensación metabólica incluyendo la remodelación ósea. Estas características ponen en riesgo a la cavidad oral de adquirir ONMAB, además de que se encuentra colonizada por una flora microbiana compleja, mucha de la cual son organismos patógenos. La íntima relación de los dientes en las mandíbulas permite una puerta de entrada para los microbios y otros productos de la

inflamación en el hueso subyacente, una situación que no se encuentra en ninguna otra parte del cuerpo. El papel de los microorganismos específicos en el desarrollo de la ONM no está completamente resuelto aún. (Landesberg Regina, 2011)

Borromeo sugiere registrar la prevalencia de retraso en la curación dental y la ONM que se produce en ausencia de uso de bifosfonatos, esperando estimar el verdadero riesgo de estos trastornos en asociación con la exposición a los bifosfonatos. (Borromeo, Brand, Clement, McCullough, Thomson, & Flitzanis, 2011)

CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS

Los hallazgos clínicos en pacientes ONMAB incluyen la exposición de tejido óseo no vital, rodeado por una mucosa inflamada y edematosa en la boca. Esta situación se puede prever en los pacientes que describen una sensación vaga de malestar o dolor en la zona afectada.

Marx propuso una clasificación clínica de la exposición ósea en la ONMM, descritos en la Tabla 5. Una vez que el hueso está expuesto, queda permanentemente expuesta sin posibilidad de resolución espontánea, incluso si los BFs se suspenden. (Vescovi, y otros, 2011)

Tabla 5. Características clínicas de la ONMAB (Marx R. E., 2009)		
Etapa	Características	
Etapa 1a	Exposición ósea indolora >1 cm.	
Etapa 1b	Exposición ósea sin dolor <1 cm.	

Etapa 2a	Zona expuesta >2 cm asociada con dolor y/o signos clínicos de infección.	
Etapa 2b	Área expuesta <2 cm asociada con el dolor y/o signos clínicos de infección.	
Etapa 3a	Múltiples áreas de exposición ósea sin signos clínicos de la osteólisis, fístulas, o fracturas patológicas.	
Etapa 3b	Área de exposición del hueso <3 cm o áreas con signos clínicos de osteólisis o fístulas, o fractura patológica.	

IMÁGENES TOMADAS DE (Vescovi, y otros, 2011)

DIAGNÓSTICO

El diagnóstico de ONMAB, es principalmente clínico y se establece generalmente en una etapa tardía de la enfermedad, ya que los pacientes suelen acudir a la atención médico-odontológica cuando la etapa de osteonecrosis es ya sintomática (Véase Tabla 5)

En el diagnóstico de la ONMAB, los estudios imagenológicos tienen un papel importante, ya que determinan la extensión de la enfermedad, permitiendo un diagnóstico temprano, también es posible identificar la diferencia entre lesiones de ONM excluyéndola de otros padecimientos como las fracturas y nos ayuda como auxiliar en la evaluación de la lesión antes de someterla a procedimientos

quirúrgicos orofaciales. Sin embargo la evaluación de la lesión de ONMAB siempre deberá estar vinculada con hallazgos clínicos (Mazziotti, 2011)

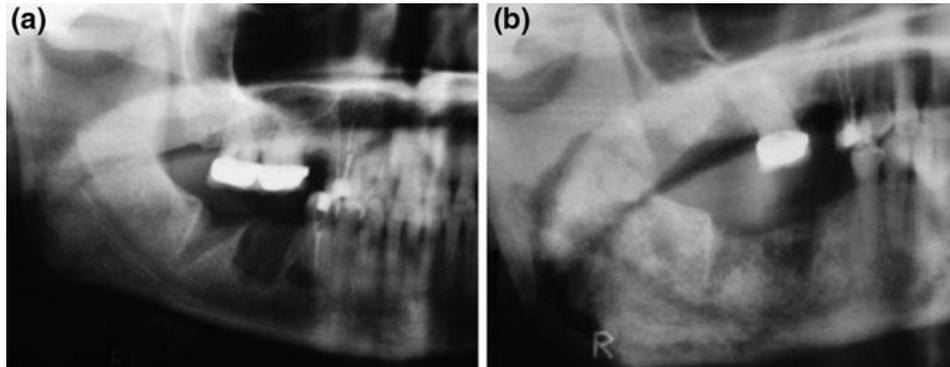


FIGURA 5.2.

Seguimiento radiográfico de un paciente sometido a una extracción dental
a) radiografía panorámica 1 mes después de la extracción.

b) radiografía panorámica 1 año después de la extracción.

Se observa retraso en la cicatrización visible en una comparación de las dos imágenes. Tenga en cuenta la trabeculación medular espesa y desordenada, con engrosamiento cortical y una típica apariencia "de algodón" (Mazziotti, 2011)

La radiografía panorámica es la técnica más utilizada en casos de ONM, mientras que la tomografía computarizada y resonancia magnética son adecuadas para evaluar el compromiso óseo, además de ofrecer la ventaja de que los procesos destructivos pueden observarse en alta resolución. La gammagrafía ósea en especial, proporciona una herramienta para la detección de las primeras etapas de la ONM. (Mazziotti, 2011)

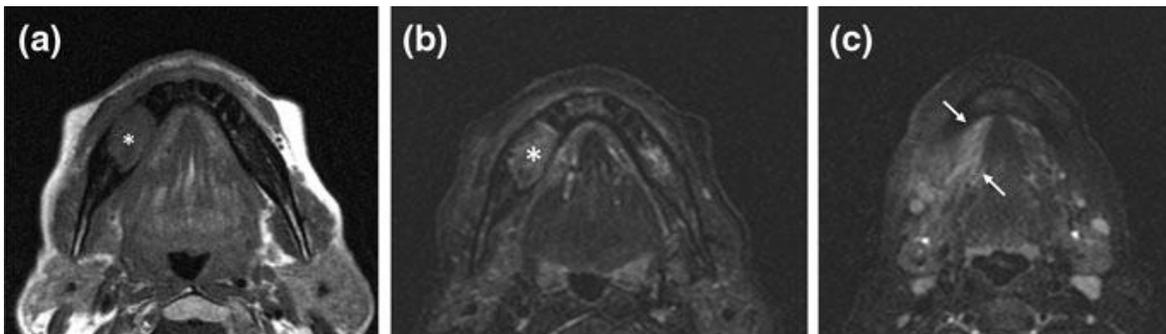


FIGURA 5.3.

Resonancia Magnética (RM) de un paciente con ONMAB.

a) En T1 se observa una lesión hipointensa grande (*) que afecta la mandíbula del lado derecho.

b) En RM axial, el foco osteonecrotico es ligeramente hiperintenso.

c) En RM caudal, se muestra la participación de las partes blandas perióseas. (Mazziotti, 2011)

Aunque los cambios óseos asociados con la ONMAB son evidentes con imágenes de diversas modalidades, los resultados suelen ser inespecíficos. En la actualidad, la función primordial de la imagen es demostrar el grado de la enfermedad antes de la intervención quirúrgica y complicaciones como fracturas patológicas. Es

importante para el radiólogo estar al tanto de esta entidad y que incluya a la ONM en el diagnóstico diferencial de los pacientes con antecedentes de tratamiento con bisfosfonatos, a fin de evitar biopsias innecesarias con resultados potencialmente peligrosos. (Mazziotti, 2011)

En cuanto al diagnóstico diferencial en pacientes tratadas con Bisfosfonatos, la enfermedad metastásica en los maxilares es una de las principales preocupaciones. Los tumores primarios más comunes que producen metástasis maxilar o mandibular son los de mama, riñón, próstata, pulmón y cánceres de estómago. La linfadenopatía también puede estar presente, en la presencia de ganglios linfáticos necróticos pueden apoyar el diagnóstico de la enfermedad metastásica. (Mazziotti, 2011)

La osteomielitis de los maxilares es otra enfermedad importante que debe diferenciarse de las lesiones relacionadas con bifosfonatos. La osteomielitis puede desarrollarse como resultado de la infección odontogénica, lesión focal después de la extracción dental, una fractura complicada o como secuela de la inmunodeficiencia (es decir, en pacientes con mieloma múltiple). (Mazziotti, 2011)

SUGERENCIAS EN EL MANEJO DE PACIENTES BAJO TERAPIA CON BIFOSFONATOS

Los objetivos del tratamiento para los pacientes con un diagnóstico establecido de ONMAB es eliminar el dolor, controlar la infección de los tejidos blandos y duros, y minimizar la progresión o aparición de la necrosis del hueso. (Ferrara, 2011)

La American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons (AAOMS) estableció en 2009 parámetros para el manejo de pacientes bajo terapia con BF y pacientes con ONM (Ruggiero S. L., 2009):

En pacientes tratados con BF Intravenosos, se deben evitar procedimientos que involucren exposición del hueso y tratar con endodoncia los órganos dentarios no restaurables.

- En pacientes tratados con BF orales, no existe contraindicación para realizar cirugía dentoalveolar si los han utilizado por menos de 3 años. Pacientes con menos de 3 años de tratamiento con BF orales más esteroides y pacientes con más de 3 años de uso de BF orales suspender los BF por 3 meses y reiniciarlos después de la completa curación ósea.
- El tratamiento de pacientes en Estadio 1 de ONM (exposición de hueso necrótico asintomáticos, sin datos de infección) consiste en realizar enjuagues con gluconato de clorhexidina al 0.12%.
- El tratamiento en pacientes en Estadio 2 de ONM (exposición de hueso necrótico con dolor y evidencia de infección) consiste en administración de antibióticos (penicilina, cefalexina, clindamicina o fluoroquinolona de primera generación) y enjuagues con gluconato de clorhexidina al 0.12%.
- El tratamiento en pacientes en Estadio 3 de ONM (exposición de hueso necrótico con dolor, infección, fractura patológica, fístula extraoral u

osteolisis) consiste en debridación quirúrgica, resección ósea, antibioticoterapia y extracción de órganos dentarios sintomáticos.

MODELO ANIMAL DE OSTEONECROSIS ASOCIADA A BIFOSFONATOS

Antes de 2009 no se ubican reportes de un modelo experimental en animales, por lo que un grupo de trabajo de la American Society for Bone and Mineral Research recomendó: “es necesario y esencial, desarrollar un modelo animal apropiado para determinar el mejor manejo terapéutico de los pacientes con osteonecrosis de los maxilares”. (Khosla, 2007)

Sonis y cols., (2009) fueron los primeros en proponer un modelo de osteonecrosis en ratas a las que les aplicaron por vía subcutánea dexametasona en dosis de 1 mg/kg durante 7, 14 o 21 días antes de la extracción de los tres molares maxilares, los animales también de manera previa recibieron por vía subcutánea dosis semanales de ácido zoledrónico (AZ) en los días -14,-7 y -1. Los animales que recibieron los dos medicamentos desarrollaron lesiones expuestas de hueso necrótico en porcentajes que variaron del 60 al 100% dependiendo de la localización y el esquema específico de dosificación. También hicieron un grupo al que solo aplicaron AZ los días 7 y uno antes de la extracción y en el que el porcentaje de la lesión solo apareció en el 60 %. (Sonis S. W., 2009)

Biasotto y cols. (2009) administraron por vía endovenosa 0.04 mg de AZ una vez a la semana durante 5 semanas, después de la segunda semana realizaron la extracción de un molar maxilar, después de 7 semanas los animales fueron sacrificados y el 100% de ellos presentaron falta de cicatrización, aumento de la lesión y hueso expuesto.

Burr y Allen (2009) describen la aparición de áreas necróticas con osteocitos inviábiles y la ausencia de canalículos en los maxilares de perros Beagle que fueron tratados con AZ durante uno a tres años o con AZ durante 6 meses, sin la exposición de hueso característico de la ONMAB.

Hokugo (2010) utiliza ratas a las que administra AZ en dosis de 35 mg/kg por vía endovenosa cada dos semanas, las ratas recibían dos dosis previas a la extracción y posteriormente dependiendo de la fecha de sacrificio algunos grupos recibían hasta tres dosis después de la extracción, reportaron la presencia de hueso expuesto solo en el 14.3% de los animales tratados con AZ.

Bi y cols. (2010) desarrollaron un modelo de osteonecrosis maxilar en ratones a los que previamente a la extracción del primer molar les administraron por vía intraperitoneal dexametasona (5 mg/kg de peso, semanalmente), AZ (125 g/kg de peso; dos veces por semana) o docetaxel (25 mg/kg de peso, semanalmente) o sus combinaciones. Después de la extracción, los diferentes fármacos o su combinación se siguieron inyectando durante 3 o 12 semanas. Los especímenes a los que se les inyectó AZ no mostraron lesiones en tejidos blandos (hueso expuesto) en tanto que los que recibieron dexametasona con AZ sólo el 27 %, y

los que recibieron la combinación de los tres fármacos (AZ, dexametasona y docetaxel) el 100 %.

Aghaloo y cols. (2011) desarrollaron un modelo de osteonecrosis asociado a enfermedad periodontal, el cual consistió en colocar un alambre de ligadura alrededor de la corona del primer molar de ratas a las que administraron AZ en dosis de 66microgramos por kg de peso tres veces por semana durante tres semanas previo al procedimiento de la colocación del alambre. Equivalente a la dosis mensual que se aplica a un paciente con cáncer par el control de las metástasis óseas. El AZ se siguió aplicando durante 12 semanas después de la colocación de la ligadura. El modelo permite el desarrollo de osteonecrosis a nivel histológico, aunque falla en conseguir la exposición ósea.

Ali-Erdem y cols. (2011) desarrollaron un modelo de inducción de ONMAB en ratas a las que administraron tres dosis de dexametasona (día cero, siete y catorce) de de manera simultánea de una a tres dosis de 7.5 microgramos de AZ. En el día 15 les realizaron las extracciones de los tres molares maxilares y /o mandibulares. 28 días después de las extracciones los animales fueron sacrificados.

En 2011 López-Jornet y cols., evalúan el efecto profiláctico de la penicilina en dosis de 0.1 ml/kg de peso en la aparición de lesiones óseas expuestas asociadas a la aplicación de dexametasona (1 mg/kg) y pamidronato (3mg/kg tres veces por semana) y a la extracción de molares maxilares o mandibulares. En el grupo testigo (sin antibiótico) el porcentaje de lesiones con hueso necrótico expuesto fue de 34.6%, mientras que en el grupo que recibió la terapia antibiótica tres días antes de las extracciones y después durante 4 días, solo el 9.61% desarrolló la osteonecrosis sin la cicatrización de la mucosa.

Pautke y cols. (2012) utilizan minicerdos a los que administran por vía endovenosa 0.05 mg/kg de AZ de manera semanal y durante seis semanas antes de la extracción, después siguieron aplicando el bifosfonato durante diez semanas, todos los animales presentaron hueso expuesto.

Como podemos observar de los resultados de los modelos de la osteonecrosis maxilar asociada a los bifosfonatos reportados en la literatura, hay una gran variabilidad en los diseños, coadministración de dexametasona, tiempos de medicación previa a la extracción, medicación postextracción, el tipo de animales (rata, ratón, perro y mini cerdos) (Sonis y cols.,2009 Biasotto y cols.,2009), así como en los parámetros tisulares observados, cambios histológicos y mediciones de la presencia de osteoclastos, viabilidad de osteocitos, presencia de lagunas osteocitarias vacías.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En los últimos años, ha habido numerosos informes de casos, un número limitado de estudios retrospectivos y un pocos estudios prospectivos que sugieren un vínculo entre la terapia de BF y la ONM, sin embargo, una causa definitiva y efecto entre la dos aún no se ha establecido. Muchas de las preguntas acerca de la incidencia, etiopatogenia, y la historia natural de esta enfermedad todavía necesitan ser respondidas.

El uso de bifosfonatos es parte de la terapia actual que se utiliza en pacientes que desarrollan cánceres que dan metástasis óseas, el uso más frecuente es en el mieloma múltiple, cáncer de mama y cáncer prostático, por otro lado, los bifosfonatos también son usados en el tratamiento de la osteoporosis.

En análisis realizados en México se ha estimado una prevalencia de osteoporosis de 16% en mujeres de 50 y más años de edad. Guzmán y cols, en un estudio realizado en el norte de la ciudad de México, observaron una prevalencia de osteoporosis de 10.4% en mujeres de 50 y más años.

Las enfermedades más frecuentemente asociadas a osteoporosis fueron hipertensión arterial y diabetes tipo 2. El 14.7% de las mujeres con osteoporosis fue positiva a tabaquismo. Se encontró antecedentes de fracturas en 8.8% de las personas con osteoporosis como consecuencia de una caída. También se ha observado una mayor prevalencia de osteoporosis conforme aumenta la edad.

Aunque la mayoría de los Bifosfonatos son prescritos por internistas, hematólogos, urólogos y ginecólogos, la literatura sobre ONMAB se publica en revistas de odontología general, cirugía oral, maxilofacial y de cráneo. Esto no es sorprendente ya que los pacientes que sufren de ONMAB se dirigen a los dentistas o los cirujanos orales y maxilofaciales para el tratamiento.

Desde 2003 se han reportado al menos 865 casos de ONM. El 96% de estos casos se asocian con administración intravenosa de pamidronato y zoledronato, mientras que el 3% se han asociado con bifosfonatos orales, especialmente el alendronato. La mandíbula se ha visto mayormente afectada con 63% a 68% de los casos, 24% a 28% el maxilar, y 4.2% ambos maxilares. La región posterior de la mandíbula en el área de molares es el sitio más frecuente con 65% de los casos.

Aunque la incidencia exacta de ONM es desconocida, se estimó en 2006, que el riesgo en pacientes tratados con BF orales es de 0,7 personas por cada 100.000 y por año de exposición a Alendronato (BF oral más prescrito). Esta incidencia es mucho menor comparada con los BF endovenosos (0,8-12%), pero en cambio la prescripción del fármaco es mucho mayor (en 2005, se realizaron más de 39 millones de prescripciones de BF orales en USA) por lo que su prevalencia en BF orales ha ido aumentando progresivamente debido que se emplea principalmente

para el tratamiento de una enfermedad relativamente común como es la osteoporosis.

En el año 2009 la incidencia de osteonecrosis en pacientes tratados por los Servicios de Oncología Médica y Cirugía Maxilofacial en el periodo de 1998 a 2006 del Hospital Central “Dr. Ignacio Morones Prieto” de San Luis Potosí, fue baja con sólo 7 casos en un periodo de 9 años, contrario a las estadísticas de los Estados Unidos por ejemplo, en el que existe un mayor uso de estos medicamentos y el volumen de pacientes es también mayor. Se estima que cada año se prescriben 30 millones de Bifosfonatos solo en Estados Unidos.

JUSTIFICACIÓN

A lo largo de la historia diversos modelos en invertebrados y vertebrados han sido usados en la investigación científica para obtener información de aspectos bioquímicos, fisiológicos y morfológicos de los seres vivos en general, y desde el punto de vista de las ciencias relacionadas o que surgen de la medicina, estos modelos han permitido entender al ser humano en salud y enfermedad, descubrir los mecanismos de enfermedad y los métodos para prevenirlas, así como la producción, desarrollo y evaluación de fármacos ,que sería imposible realizar directamente en los humanos.

A pesar de que los investigadores desarrollan continuamente modelos no animales, la investigación de enfermedades multigénéticas complejas y los ensayos terapéuticos requieren ser probados en modelos animales. Se reconoce de manera general que en ausencia de datos en humanos, la investigación en animales en muchos casos puede ofrecer aproximaciones y predicciones de las respuestas humanas.

En el caso de la Odontología, una amplia variedad de modelos animales han sido utilizados para obtener información y poder comprender la biología oral y craneofacial, así como la etiopatogenia, identificación y prevención de patologías orales, o la evaluación de nuevas terapias

De esa manera al realizar el modelo en ratas de ONMAB buscamos obtener un modelo que reproduzca las características que se han identificado en humanos, para que este modelo sea útil en investigaciones que busquen probar medidas preventivas y terapéuticas efectivas.

OBJETIVOS

- ❖ Desarrollar un modelo experimental en rata de Osteonecrosis Maxilar Asociada al uso de Bifosfonatos (ONMAB).
 - Estudiar las características histopatológicas presentes en las ratas previamente tratadas con Bifosfonatos (BF).
 - Comparar las características histológicas de la zona donde se realizó la intervención quirúrgica en ratas tratadas con Acido Zoledrónico vs. las ratas del grupo Control, en los tiempos de estudios de 7, 14, 21 y 28 días.
 - Evaluar nuestro modelo experimental en rata de ONMAB como un posible modelo traslacional al ser humano.

HIPÓTESIS

Las ratas que han sido tratadas con Ácido Zoledrónico desarrollarán osteonecrosis en el maxilar después de un procedimiento de extracción dental, como sucede en el ser humano.

MATERIALES Y MÉTODOS

METODOLOGÍA DE INVESTIGACIÓN

Investigación experimental, de casos y testigos

POBLACIÓN DE ESTUDIO Y FORMACIÓN DE GRUPOS

Se utilizaron 24 ratas machos adultas de la cepa Wistar, con un peso entre 250 ± 50g criadas y mantenidas en el bioterio de la FES Iztacala. Con una temperatura de 21° - 27°, una humedad de 45 – 55% en un fotoperiodo de 12/12 hrs con acceso *ad libitum* al agua y alimento.

El manejo ético de los animales de experimentación de este proyecto, se ajustó a la norma mexicana (NOM-062-ZOO-1999) sobre el manejo de animales de laboratorio, y de acuerdo con los estándares establecidos por el consejo de Bioética de la FES Iztacala.

Las ratas se distribuyeron aleatoriamente en 8 grupos, cada uno de 3 ratas (n=3).

Tabla 6. Descripción de grupos de estudio			
GRUPOS	DESCRIPCIÓN		
Grupo 1	Testigo	Extracción dental (día cero)	Sacrificio 7 días post-extracción dental
Grupo 2			Sacrificio 14 días post-extracción dental
Grupo 3			Sacrificio 21 días post-extracción dental
Grupo 4			Sacrificio 28 días post-extracción dental

Tabla 7. Descripción de grupos de estudio			
GRUPOS	DESCRIPCIÓN		
Grupo 5	Experimental	Se administró dosis de ácido zoledrónico a los -14 y -7 días de la extracción dental (día cero)	Sacrificio 7 días post-extracción dental
Grupo 6			Sacrificio 14 días post-extracción dental
Grupo 7			Sacrificio 21 días post-extracción dental
Grupo 8			Sacrificio 28 días post-extracción dental

ADMINISTRACIÓN DEL MEDICAMENTO Y EXTRACCIÓN DEL SEGUNDO MOLAR SUPERIOR

La dosis se seleccionó de acuerdo a estudios experimentales previos (Aghaloo T. L., 2011).

A los grupos 5, 6, 7 y 8 se les administró 66µL (52.8 µg) de ácido zoledrónico (AZ) por espécimen, vía intramuscular a los 14 y 7 días previos a la extracción del segundo molar superior con una dosis total= 104.16µg.

Previo a la extracción dental se anestesió a las ratas con coctel que contenía Clorhidrato de Ketamina (60mg/kg) y Xilazina (7mg/kg), mediante una inyección intramuscular. Utilizando el siguiente cuadro de dosificación:

Dosis de Clorhidrato de Ketamina

$$\begin{array}{ccc}
 60\text{mg} \text{ — } 1000\text{mg} & & 100\text{mg} \text{ — } 1\text{mL} \\
 X \text{ — } \text{Peso del animal} & \longrightarrow & \text{Resultado — } X \text{ mL}
 \end{array}$$

Dosis de Xilazina

$$\begin{array}{ccc}
 7\text{mg} \text{ — } 1000\text{mg} & & 20\text{mg} \text{ — } 1\text{mL} \\
 X \text{ — } \text{Peso del animal} & \longrightarrow & \text{Resultado — } X \text{ mL}
 \end{array}$$

Al día cero se realizó la extracción de los segundos molares maxilares utilizando instrumental modificado con este fin.

TÉCNICA QUIRÚRGICA

MATERIAL Y EQUIPO

- Mesa de disección
- Hilo cáñamo
- Pinza tipo mosco
- Explorador de uso dental
- Bolitas de algodón
- Pinzas de curación
- Elevador recto (modificado para su uso en el animal de experimentación)

PROCEDIMIENTO

Después de aplicar la anestesia, se sujetaron las extremidades del espécimen a la mesa de disección; posteriormente se colocó un amarre en los incisivos superiores para facilitar la apertura de la cavidad oral.

Se retrajo la mandíbula junto con la lengua con un hilo cáñamo, con una pinza tipo mosco se realizó la retracción de los carrillos.

Se efectuó la sindesmotomía del segundo molar superior derecho con ayuda de un explorador de uso dental. Se utilizaron pequeñas bolitas de algodón tomadas con unas pinzas de curación para realizar el secado y limpieza del campo operatorio.

Se luxó y extrajo el segundo molar superior con ayuda de un elevador recto (modificado para su uso en el animal de experimentación).

Se verificó la correcta hemostasia del sitio de la extracción.

Se dejó al animal en recuperación, hasta que dio señales de haber concluido la fase anestésica y entonces era llevado a su estancia correspondiente.

SACRIFICIO Y TOMA DE MUESTRAS

Los animales se sacrificaron por sobre-exposición a CO₂.

Los maxilares se disecaron con el procedimiento descrito a continuación:

DISECCIÓN DEL MAXILAR

1. Se cortó tejido blando para desarticular la mandíbula
2. Ya desarticulada, se procedió a exponer el maxilar
3. Se cortó alrededor el tejido blando (fondo de saco) y la parte anterior (zona incisiva) se realizó un corte eliminando de la muestra a los incisivos
4. Posteriormente se terminó de disecar el maxilar cortando los huesos de la base de cráneo.

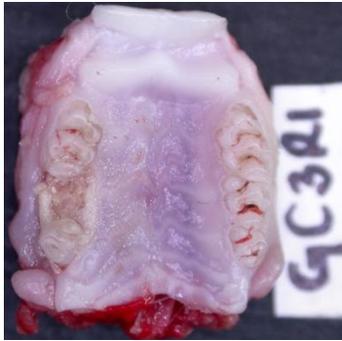


FIGURA 6.1. Disección del maxilar de rata.

A continuación fueron fijados en Fijador de Zinc. Las muestras se fijaron con un volumen de 20 veces mayor con respecto a la muestra por 24 horas, se cambió el fijador y se dejó 48 hrs. más.

Se descalcificaron con Ácido Etilendiaminotetracético (EDTA) a pH 7.4 durante 7 días, hasta que radiográficamente se observó la completa descalcificación.



FIGURA 6.2. Del lado derecho observamos la descalcificación del maxilar de rata utilizando EDTA. Del lado izquierdo se muestra la verificación radiográfica de la completa descalcificación.

Una vez descalcificados los tejidos fueron deshidratados con alcohol etílico de concentración creciente, con las siguientes especificaciones:

TREN DE ALCOHOLES

- | | |
|----------------|----------------|
| 1. OH 70° | 2hrs |
| 2. OH 80° | 2hrs |
| 3. OH 90° | 2hrs |
| 4. OH 100° | 1hr |
| 5. OH Butílico | Máximo 72 hrs. |

Posteriormente se llevó a cabo la inclusión con parafina.

- | | | |
|----------------|--------|----------------|
| 1. Parafina I | 24 hrs | fundida a 60°C |
| 2. Parafina II | 24 hrs | fundida a 60°C |

Finalmente se orientaron las muestras y fueron incluidas en bloque, se eliminaron excesos de parafina con una navaja de hoja fina.



FIGURA 6.3 Muestra incluida en bloque

Se realizaron cortes sagitales de 7 μm de grosor en micrótomo LEICA RM2235, con un gotero se aplicó bajo los cortes la cantidad suficiente de líquido de Ruyter para que flotarán, se colocaron en la parrilla LEICA HI1220 y se extendieron. **(VER ANEXO 1)**

TECNICAS HISTOLÓGICAS

TINCIÓN DE HEMATOXILINA–EOSINA

Para la elaboración de estos **(VER ANEXO 2)**

Las muestras fueron desparafinadas e hidratadas con xilol y un tren descendente de alcoholes hasta llegar a agua corriente, se tiñó con Hematoxilina de Harris y posteriormente con Eosina, se continuó con la deshidratación de las muestras.

- **DESPARAFINAR E HIDRATAR**
 - Xilol 1 5 minutos
 - Xilol 2 5 minutos
 - OH 100° 2 minutos
 - OH 90° 2 minutos
 - OH 80° 3 minutos
 - OH 70° 3 minutos
 - H₂O 5 minutos

- **TEÑIR**
 - Hematoxilina 7 minutos
 - Agua Lavar
 - OH ácido Lavar
 - Agua Lavar
 - Agua amoniacal Lavar
 - Eosina 5 minutos
 - Agua Lavado rápido

- DESHIDRATAR
 - OH 70° 3 minutos
 - OH 80° 3 minutos
 - OH 90° 2 minutos
 - OH 100° 2 minutos
 - Xilol 2 5 minutos
 - Xilol 1 5 minutos

Posteriormente se montaron con resina sintética (Entellan®). Se observaron los tejidos al microscopio óptico LEYCA DM500 y se tomaron microfotografías con el programa LEYCA LAS-EZ

TÉCNICA RADIOGRÁFICA

Realizamos radiografías en un aparato homologado (Corix 70 Plus – USV – MM) a 60-70Kv y en un tiempo de 0.24 segundos como parámetros estandarizados en todos los grupos de estudio.

Se obtuvieron las imágenes radiográficas de los maxilares disecados el día del sacrificio, en todos los grupos de la semana 4, esto porque los cambios radiográficos resultaron visibles en este momento del estudio.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El análisis estadístico se realizó con el software estadístico SPSS 10 para Windows utilizando prueba estadística de Fisher. La significación estadística se estableció en * $p < 0.01$.

ANÁLISIS MACROSCÓPICO

Los parámetros utilizados para determinar macroscópicamente si el espécimen presentaba características propias de ONMAB fueron las siguientes:

Tabla 8. Parámetros macroscópicos					
	Alvéolo cerrado	Alvéolo abierto	Exposición de hueso	Fractura de hueso	Pérdida de dientes adyacentes
Sano	X				
Osteonecrosis maxilar		X	X	X	X

ANÁLISIS MICROSCÓPICO

Los parámetros utilizados para determinar microscópicamente si el espécimen presentaba características propias de Osteonecrosis Maxilar fueron las siguientes:

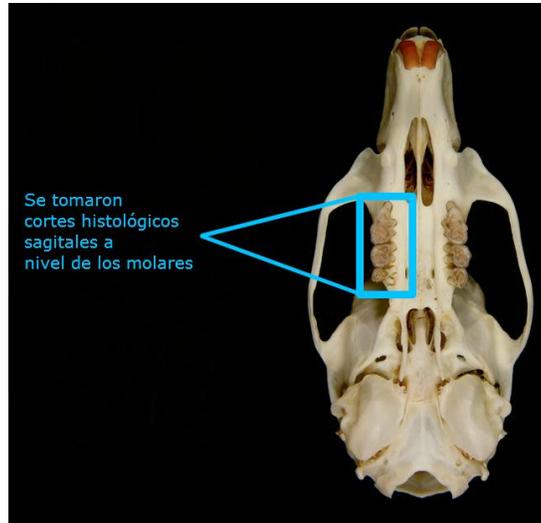


Tabla 9. Vista general de cortes y división del corte para su estudio	
	ZONA 1: Corona del primer molar
	ZONA 2: Espacio que dejó la extracción del segundo molar
	ZONA 3: Corona del tercer molar
	ZONA 4: Raíces del tercer molar
	ZONA 5: Alvéolo y tejido adyacente correspondiente a la extracción del segundo molar. Zona de más interés..
	ZONA 6: Raíces del primer molar

Tabla 10. Parámetros microscópicos				
	Lagunas Osteocitarias		Matriz Ósea	
	Osteocitos	Acelular	Organizada	Dispersa
Sano	X		x	
Osteonecrosis maxilar		X		X

RESULTADOS

Las ratas testigo sacrificadas en el día 7 muestran un alvéolo en el que se observa la formación de epitelio para cerrar el defecto óseo. En las ratas del grupo experimental se observa que la lesión se extiende más allá de los bordes del alvéolo y se observa la presencia de hueso necrótico expuesto (el procedimiento de extracción es más difícil ya que la densidad ósea es mayor por lo que ocurrió fractura de los ápices radiculares).

Dos ratas del grupo testigo sacrificadas en el día 14 muestran el cierre del alvéolo, la formación de epitelio; en cambio en la rata uno, se observa una zona de exposición ósea con una acumulación de dentritus. En el grupo experimental de Bifosfonato sacrificadas en el día 14 después de la extracción, se observan en los dos especímenes los alvéolos abiertos con amplias zonas de exposición ósea.

Las ratas testigo sacrificadas en el día 21 muestran diferentes grados de cicatrización, las ratas 2 y 3 muestran el cierre del alvéolo con formación de epitelio, mientras que la rata 1 muestra las tablas vestibulares y la falta de cicatrización. Las ratas del grupo al que se le administraron Bifosfonato y fueron sacrificadas al día 21, muestran un alvéolo abierto, con presencia de hueso expuesto y necrótico, uno de los especímenes muestra fractura y otro perdió el tercer molar.

En las ratas del grupo testigo sacrificadas en el día 28, dos de las ratas muestran el cierre del alvéolo con una completa formación de epitelio, la rata 3 muestra una amplia zona de exposición ósea, pérdida del tercer molar. Radiográficamente se observa radiopacidad en las zonas de extracción lo que nos indica formación de hueso, además en la rata 3 se observan los ápices radiculares palatinos del segundo molar. En las ratas del grupo experimental sacrificadas en el día 28, se observan los alvéolos abiertos con exposición ósea en hasta los bordes del alvéolo, en la rata 2 se muestra una formación parcial de epitelio, en la rata 3 ocurrió la pérdida del tercer molar. Radiográficamente se observan en las zonas de extracción, zonas radiolúcidas, lo que nos indica una falla o disminución de la osteogénesis que sí ocurre en el grupo testigo.

El análisis de las características del alvéolo se realizó a través de la prueba estadística de Fisher y nos muestra que las diferencias entre el grupo experimental y testigo son estadísticamente significativas ($p > 0.01$)

En lo que respecta a los resultados histológicos, no obtuvimos buenas imágenes que nos permitieran hacer un análisis de las características histomorfométricas de los tejidos involucrados porque se decidió utilizar como agente fijador sales de Zinc, con el objetivo de preservar la reactividad inmunogénica de los tejidos y poder realizar determinaciones inmunohistoquímicas de moléculas relacionadas con la respuesta inflamatoria. Desgraciadamente los tejidos se contrajeron y se

perdieron las relaciones histotopográficas, como por ejemplo, el epitelio y algunas células óseas como osteoclastos.

Sin embargo el análisis histológico muestra en el grupo experimental, lagunas osteocitarias vacías y una matriz ósea desorganizada

NOMENCLATURA DE LOS GRUPOS TESTIGOS Y EXPERIMENTALES

Tabla 11. Nomenclatura de Grupos Testigos

Grupo Testigo	Día 7	Día 14	Día 21	Día 28
	GC1R1	GC2R1	GC3R1	GC4R1
	GC1R2	GC2R2	GC3R2	GC4R2
	GC1R3	GC2R3	GC3R3	GC4R3

Tabla 12. Nomenclatura de Grupos Experimentales

Grupo Experimental	Día 7	Día 14	Día 21	Día 28
	GB1R1	GB2R1	GB3R1	GB4R1
	GB1R2	GB2R2	GB3R2	GB4R2
	GB1R3	GB2R3	GB3R3	GB4R3

Tabla 13.1
Grupo Testigo Semana 1

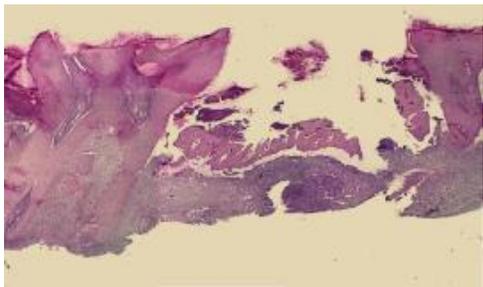
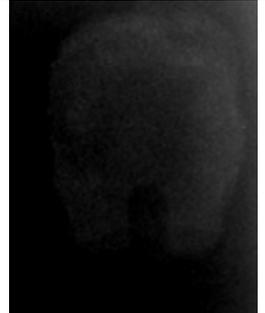
Nombre	Post-sacrificio	Descalcificación	Verificación de descalcificación rx	Micrografía panorámica de hematoxilina y eosina a 4x
GC1R1				
GC1R2				
GC1R3		-		

Tabla 13.2
Grupo Testigo Semana 2

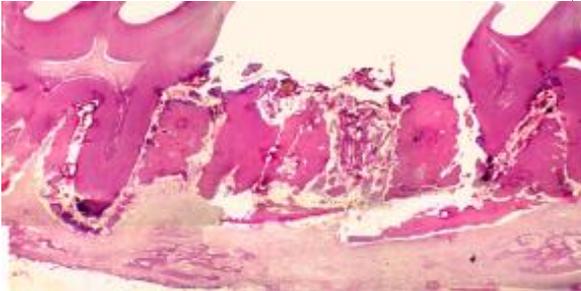
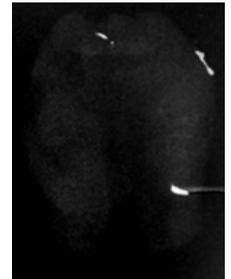
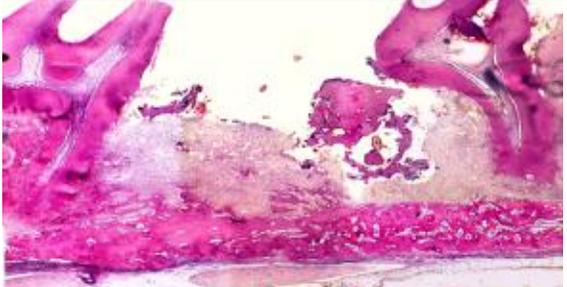
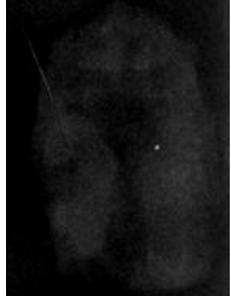
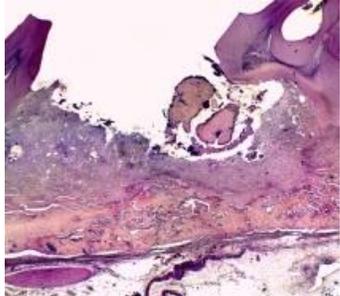
Nombre	Post-sacrificio	Descalcificación	Verificación de descalcificación rx	Micrografía panorámica de hematoxilina y eosina a 4x
GC2R1				
GC2R2				
GC2R3				

Tabla 13.3
Grupo Testigo Semana 3

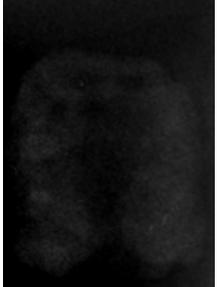
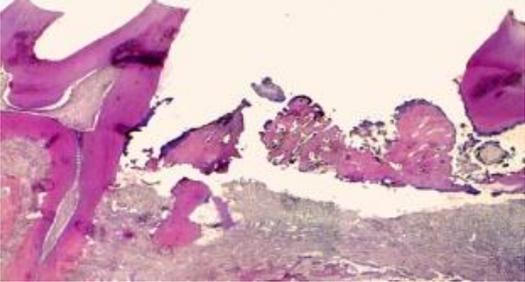
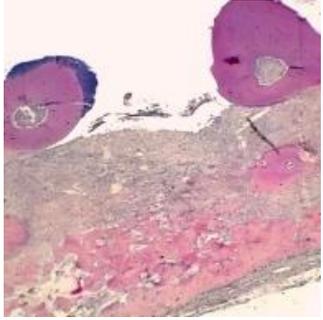
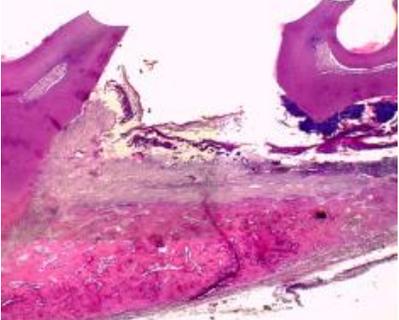
Nombre	Post-sacrificio	Descalcificación	Verificación de descalcificación rx	Micrografía panorámica de hematoxilina y eosina a 4x
GC3R1				
GC3R2				
GC3R3				

Tabla 13.4
Grupo Testigo Semana 4

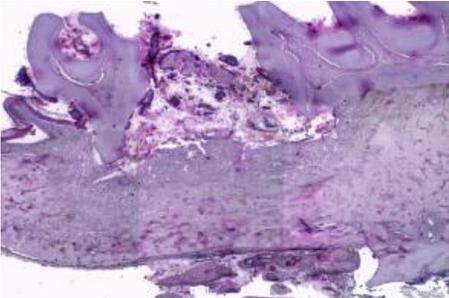
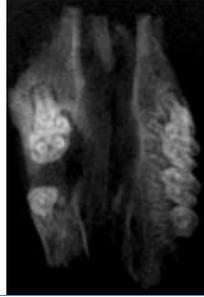
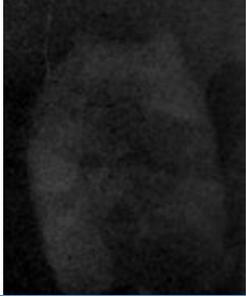
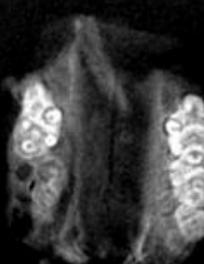
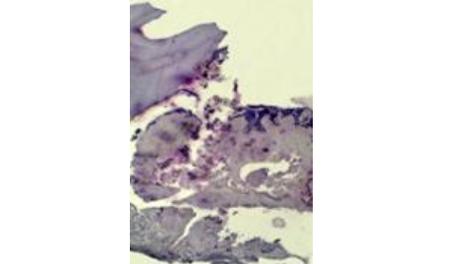
Nombre	Post-sacrificio	Estudio radiográfico	Descalcificación	Verificación de descalcificación rx	Micrografía panorámica de hematoxilina y eosina a 4x
GC4R1					
GC4R2					
GC4R3					

Tabla 14.1
Grupo Experimental Semana 1

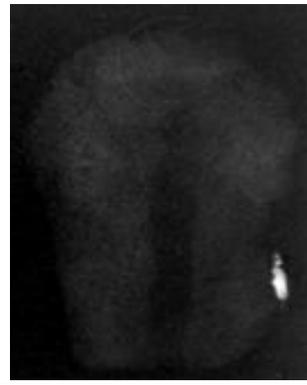
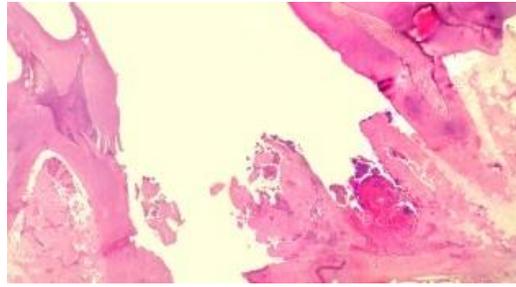
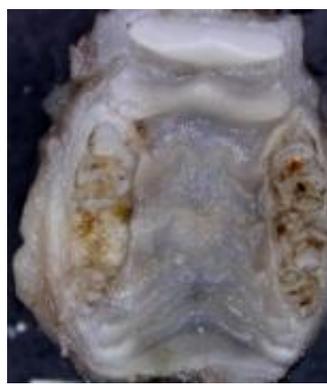
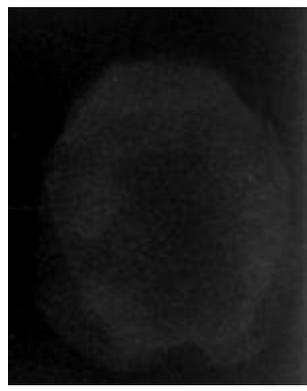
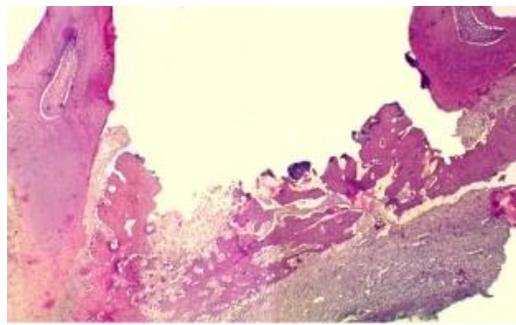
Nombre	Post-sacrificio	Descalcificación	Verificación de descalcificación Rx	Micrografía panorámica de Hematoxilina y Eosina a 4x
GB1R1				
GB1R2				

Tabla 14.2
Grupo Experimental Semana 2

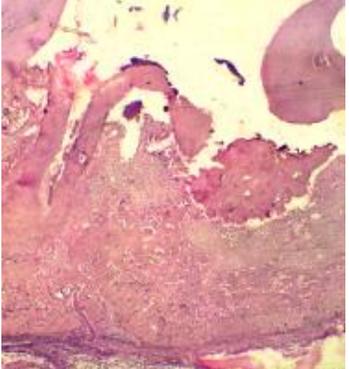
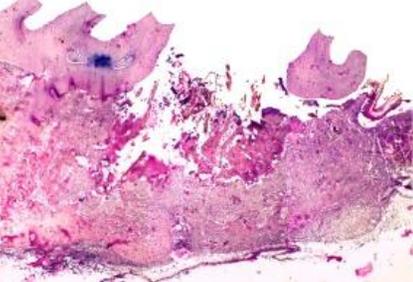
Nombre	Post-sacrificio	Descalcificación	Verificación de descalcificación Rx	Micrografía panorámica de Hematoxilina y Eosina a 4x
GB2R1				
GB2R2				

Tabla 14.3
Grupo Experimental Semana 3

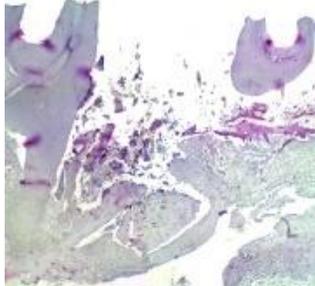
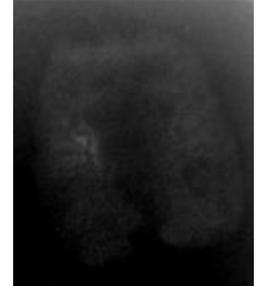
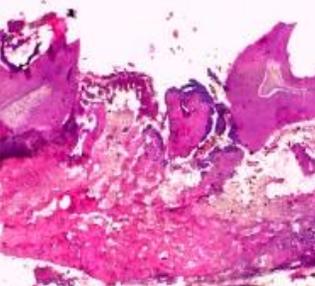
Nombre	Post-sacrificio	Descalcificación	Verificación de descalcificación Rx	Micrografía panorámica de Hematoxilina y Eosina a 4x
GB3R1				
GB3R2				
GB3R3				

Tabla 14.4
Grupo Experimental Semana 4

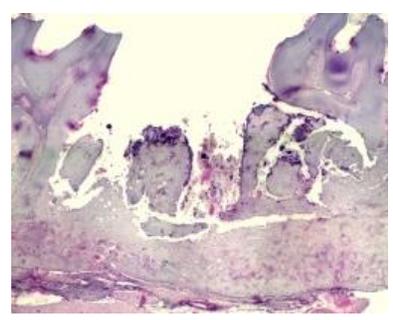
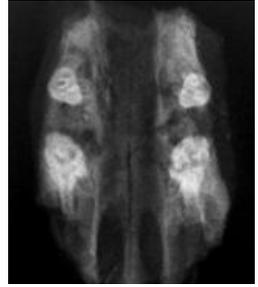
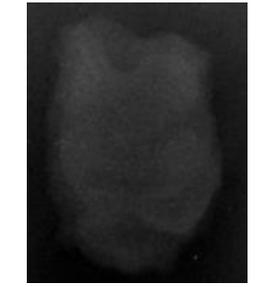
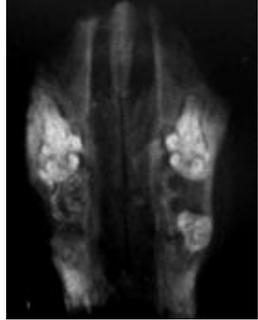
Nombre	Post-sacrificio	Estudio Radiográfico	Descalcificación	Verificación de descalcificación Rx	Micrografía panorámica de Hematoxilina y Eosina a 4x
GB4R1					
GB4R2					
GB4R3					

Tabla 15.1 Micrografías de Hematoxilina y Eosina
Grupo Control-Semana 1

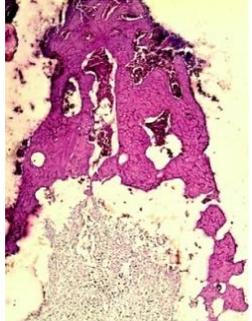
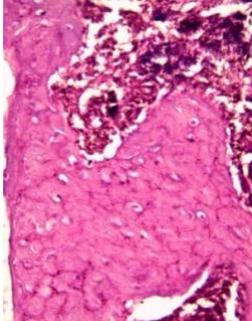
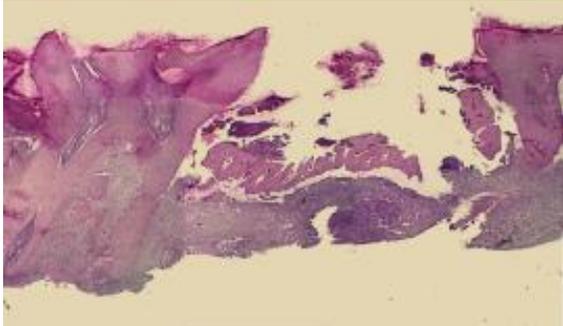
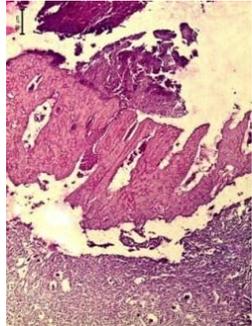
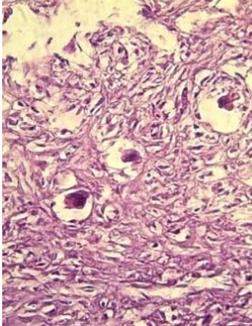
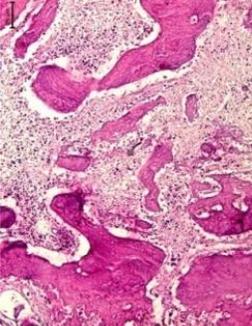
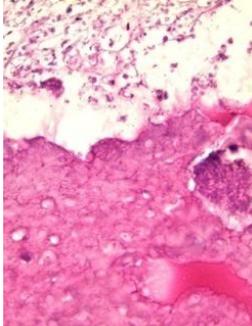
Nombre	Panorámica 4x	10x	40x
GC1R1			
GC1R2			
GC1R3			

Tabla 15.2 Micrografías de Hematoxilina y Eosina
Grupo Control- Semana 2

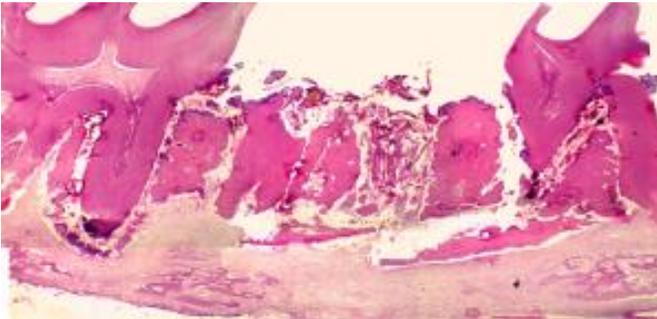
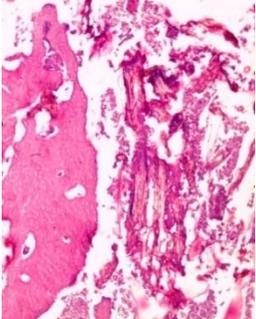
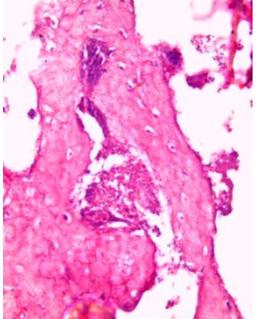
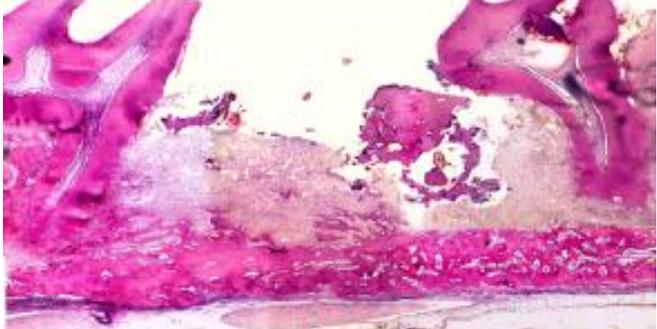
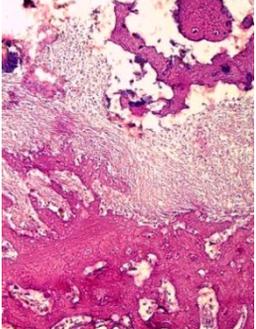
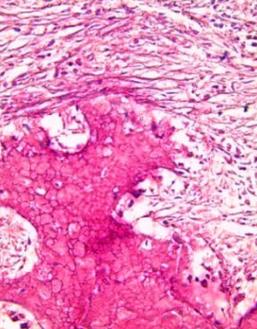
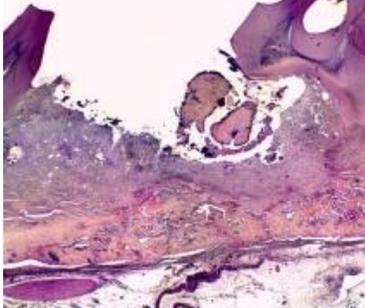
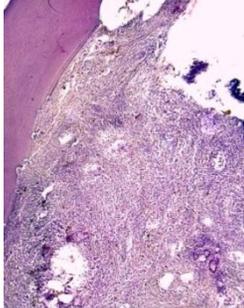
Nombre	Panorámica 4x	10x	40x
GC2R1			
GC2R2			
GC2R3			

Tabla 15.3 Micrografías de Hematoxilina y Eosina
Grupo Control-Semana 3

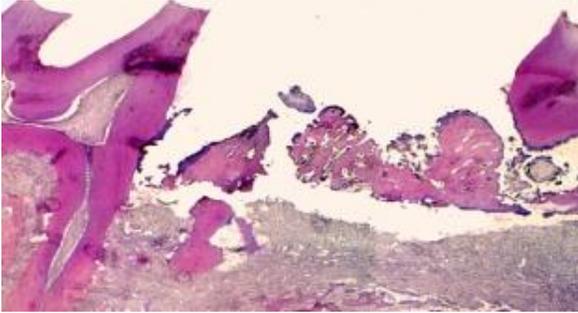
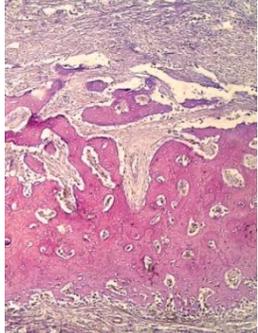
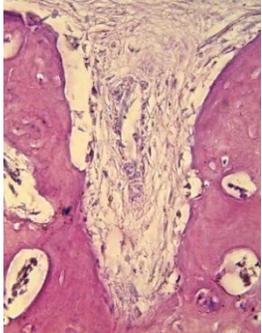
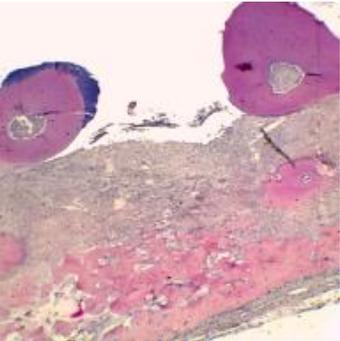
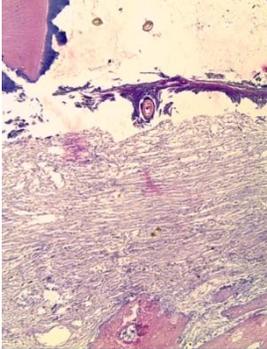
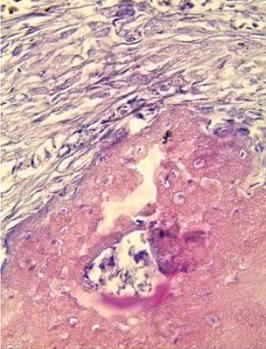
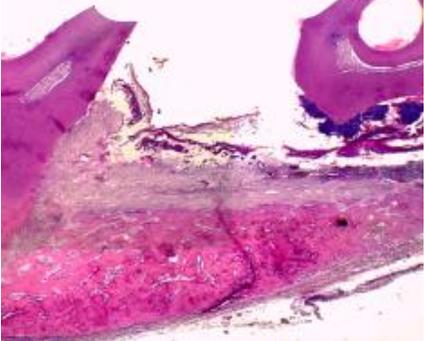
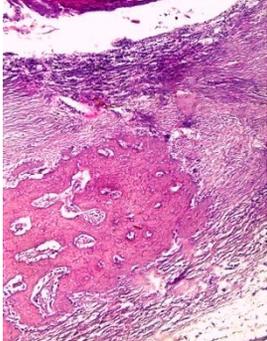
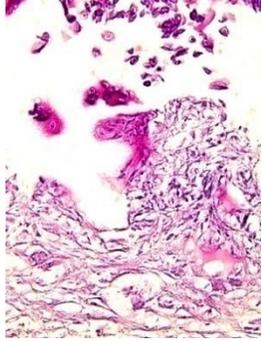
Nombre	Panorámica 4x	10x	40x
GC3R1			
GC3R2			
GC3R3			

Tabla 15.4 Micrografías de Hematoxilina y Eosina
Grupo Control-Semana 4

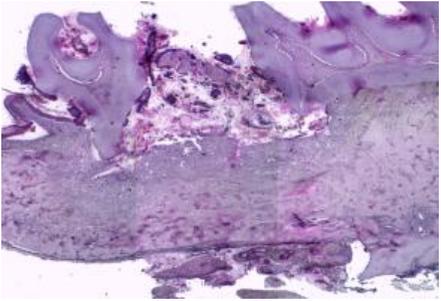
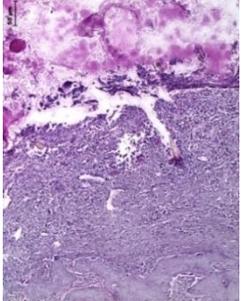
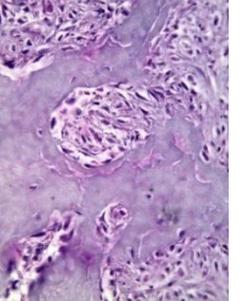
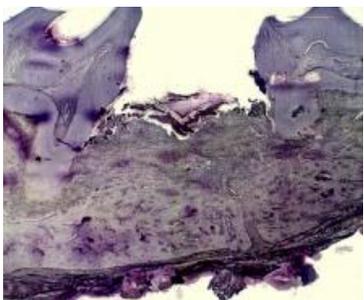
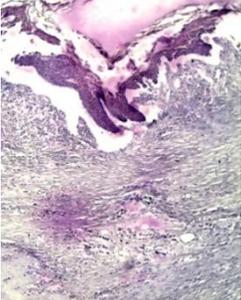
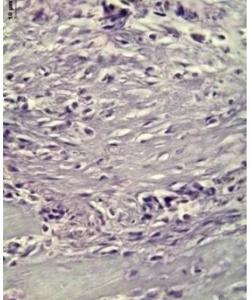
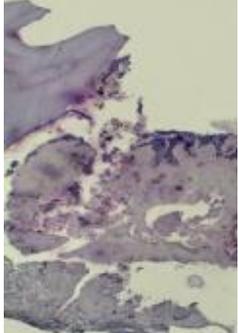
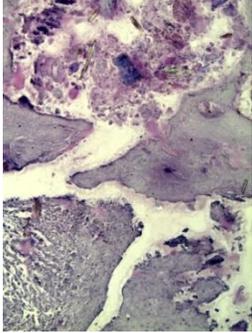
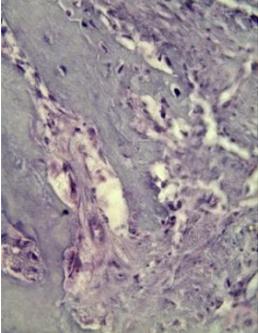
Nombre	Panorámica 4x	10x	40x
GC4R1			
GC4R2			
GC4R3			

Tabla 16.1 Micrografías de Hematoxilina y Eosina
Grupo Experimental-Semana 1

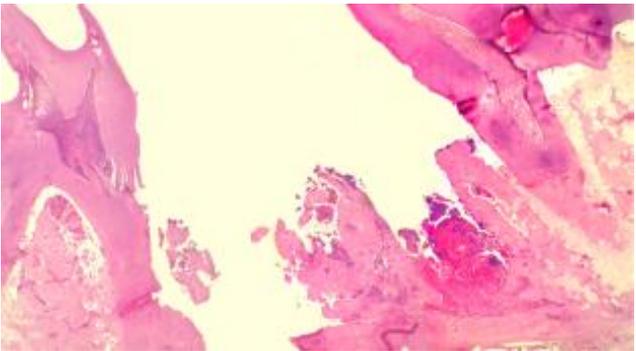
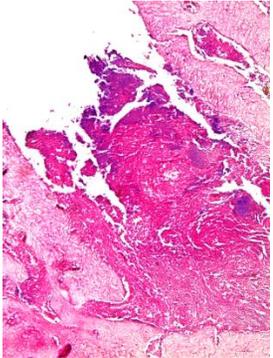
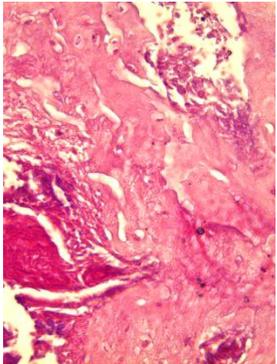
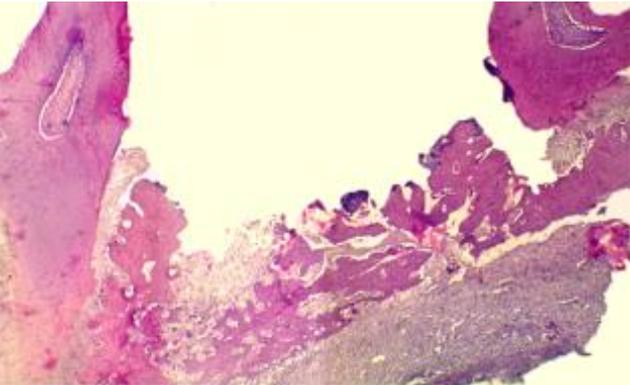
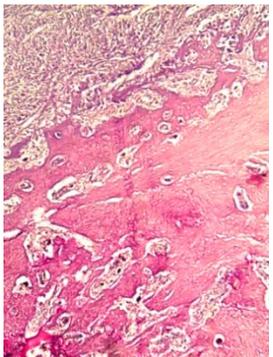
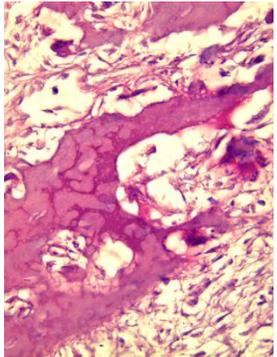
Nombre	Panorámica 4x	10x	40x
GB1R1			
GB1R2			

Tabla 16.2 Micrografías de Hematoxilina y Eosina
Grupo Experimental-Semana 2

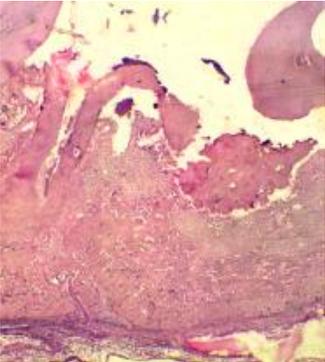
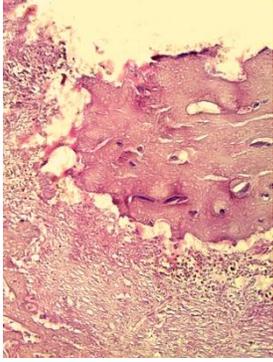
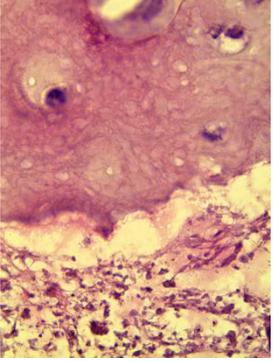
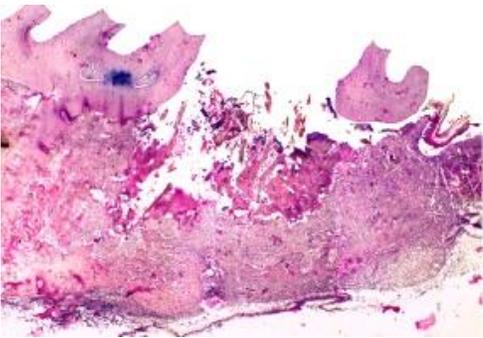
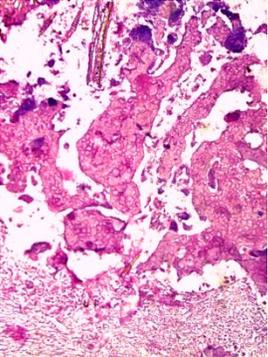
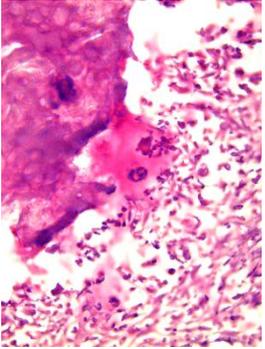
Nombre	Panorámica 4x	10x	40x
GB2R1			
GB2R2			

Tabla 16.3 Micrografías de Hematoxilina y Eosina
Grupo Experimental-Semana 3

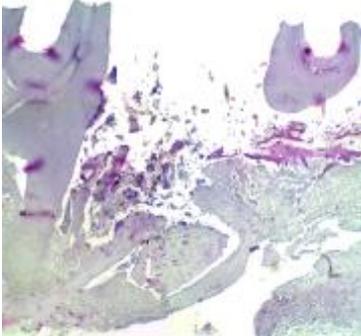
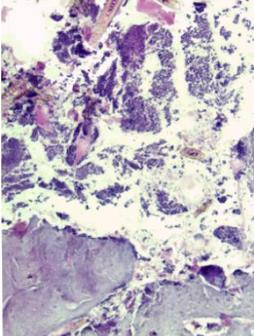
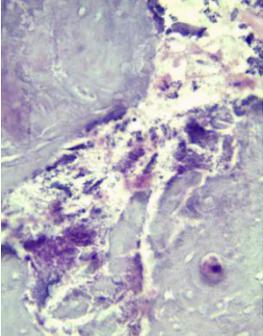
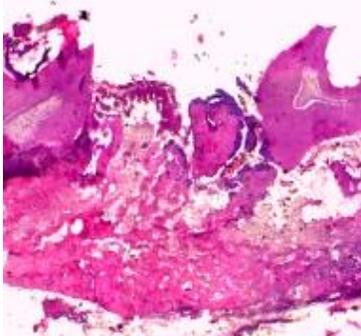
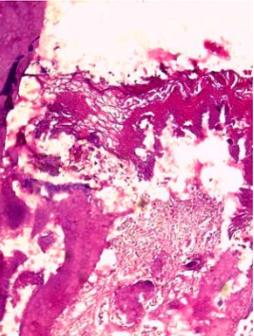
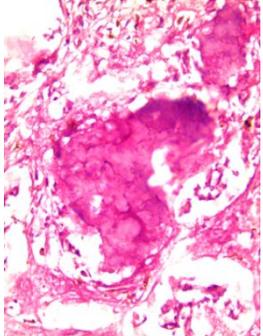
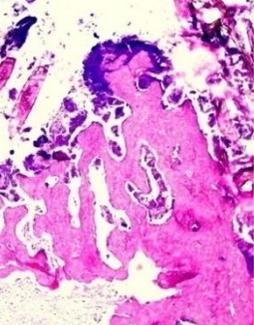
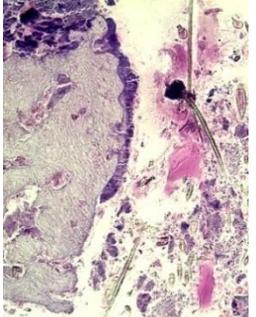
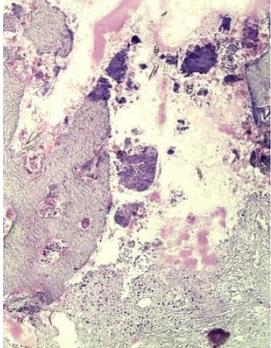
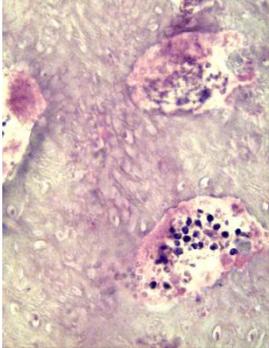
Nombre	Panorámica 4x	10x	40x
GB3R1			
GB3R2			
GB3R3			

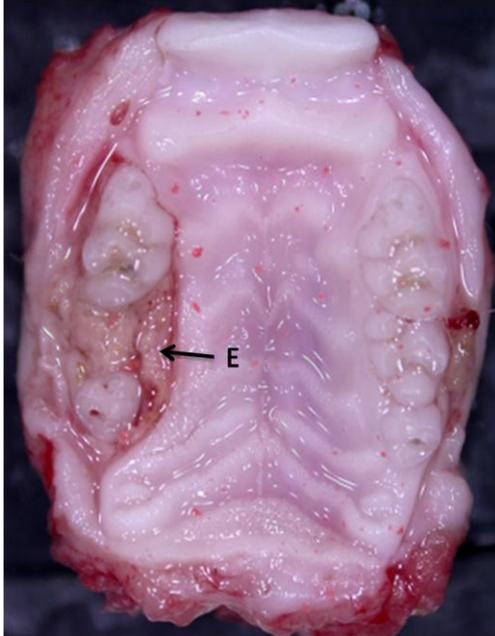
Tabla 16.4 Micrografías de Hematoxilina y Eosina
Grupo Experimental

NOMBRE	Panorámica 4x	10x	40x
GB4R1			
GB4R2			
GB4R3			

COMPARACIÓN Y DESCRIPCIÓN MACROSCÓPICA ENTRE GRUPO TESTIGO Y EXPERIMENTAL

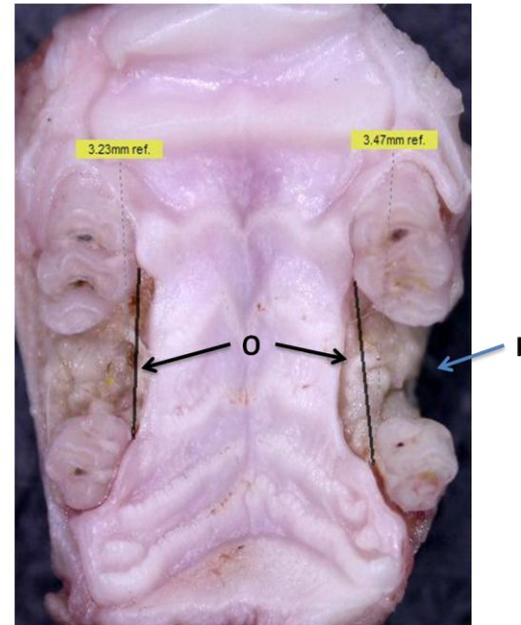
Semana 1

Grupo Testigo



En este espécimen se realizó la extracción del segundo molar maxilar derecho. En la zona de la extracción se observó un alvéolo con formación de epitelio (**E**) que se extiende hasta la zona palatina del tercer molar, no se observó exposición de hueso.

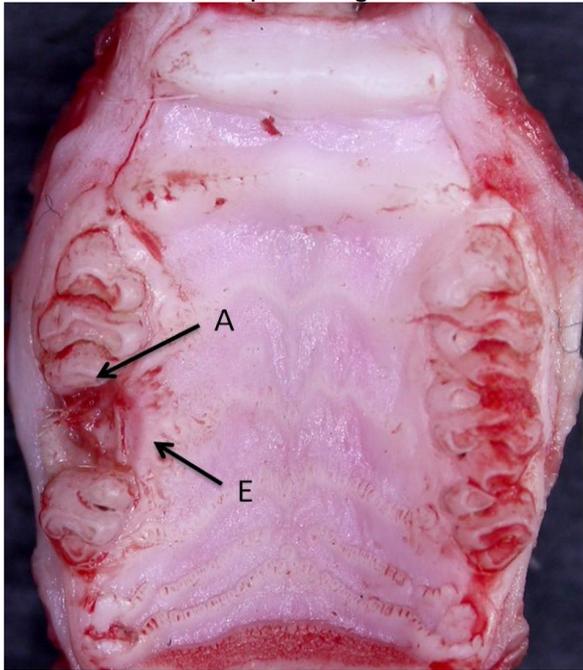
Grupo Experimental



En este espécimen se realizó la extracción bilateral de los segundos molares maxilares. En la zona de la extracción del lado derecho, se observó un alvéolo abierto, con exposición ósea (**O**) de 3.23 mm, que involucra la parte disto-palatina del primer molar, la porción mesio-palatina del tercer molar, hasta la parte vestibular de los mismos; en la extracción del lado izquierdo, se observó fractura (**F**) del hueso en la porción vestibular, con una extensión de 3.47 mm., además de ausencia de epitelio vestibular, se observa la misma extensión de hueso palatino expuesto que el lado derecho, y en ambos lados hay presencia de restos alimenticios.

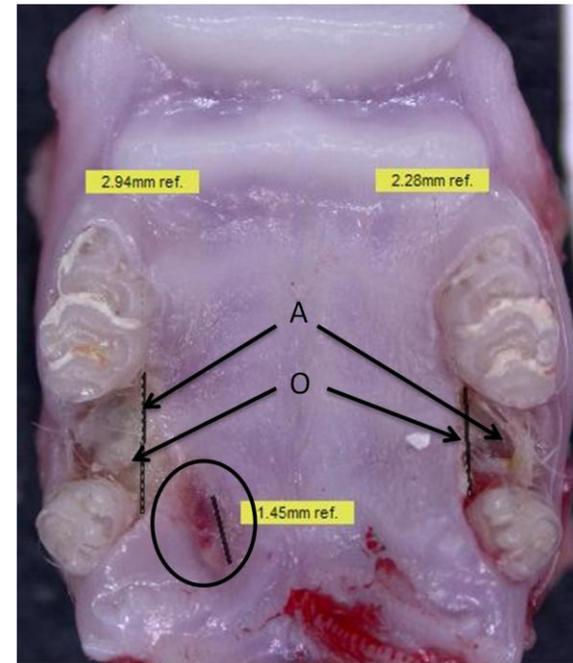
Semana 2

Grupo Testigo



En este espécimen se realizó la extracción del segundo molar maxilar derecho. En la zona de la extracción se observó un alvéolo cerrado con presencia de alimento (**A**) y formación de epitelio (**E**).

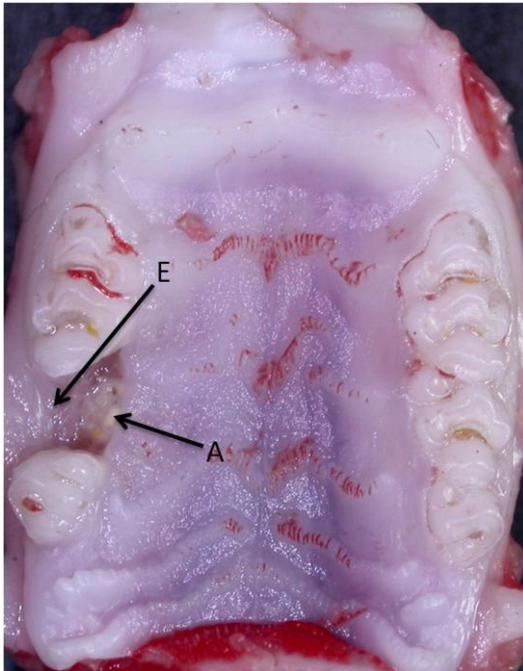
Grupo Experimental



En este espécimen se realizó la extracción bilateral de los segundos molares maxilares. En la zona de la extracción del lado derecho, se observó un alvéolo, con exposición ósea (**O**) de 2.94 mm, que se extiende hasta la parte mesio-palatina del tercer molar, y presenta restos alimenticios (**A**), en la zona disto-palatina adyacente al tercer molar se observó una falta de continuidad en el epitelio, presenta eritema y exposición ósea de 1.45 mm. De extensión; en la zona de la extracción del lado izquierdo, se apreció exposición ósea (**O**) de 2.28 mm. sin presencia de epitelio y se observó restos alimenticios (**A**).

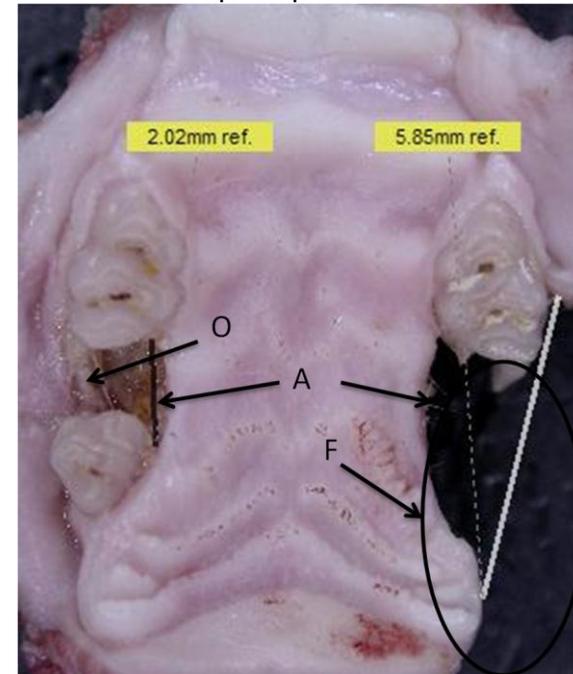
Semana 3

Grupo Testigo



En este espécimen se realizó la extracción del segundo molar maxilar derecho. En la zona de la extracción se observó un alvéolo con formación de epitelio (**E**) que cubría en su totalidad el alvéolo, con presencia de restos alimenticios (**A**)

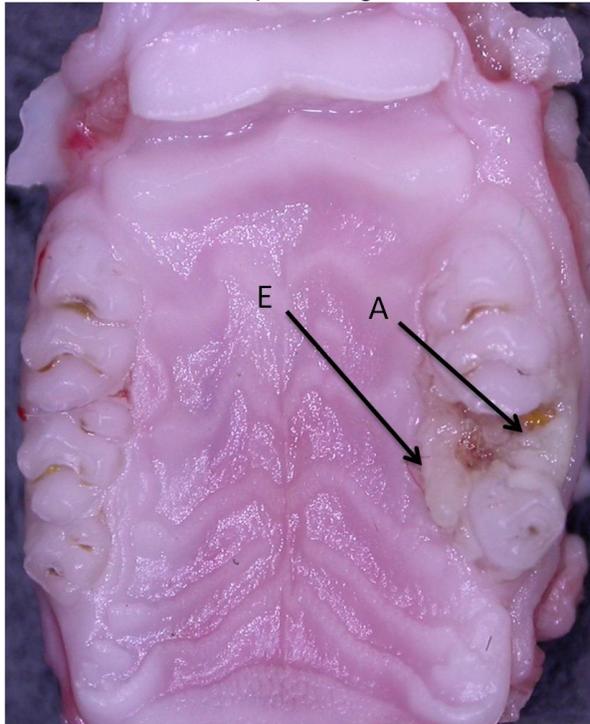
Grupo Experimental



En este espécimen se realizó la extracción bilateral de los segundos molares maxilares. En la zona de la extracción del lado derecho, se observó un alvéolo con exposición ósea (**O**) de 2.02 mm. en los márgenes del mismo, con presencia de restos alimenticios (**A**); en la zona de la extracción del lado izquierdo, se aprecia una evidente Fractura (**F**) de 5.85 mm de extensión desde distal del primer molar hasta la zona retromolar con restos alimenticios, sin presencia de epitelio en la zona.

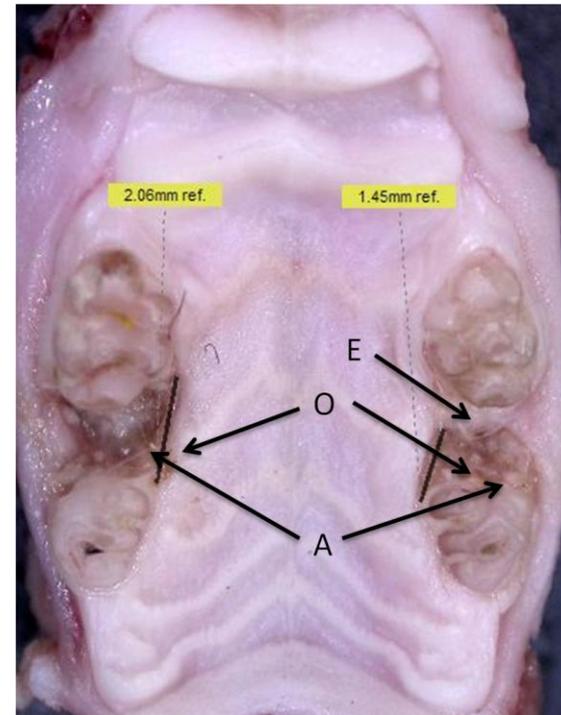
Semana 4

Grupo Testigo



En este espécimen se realizó la extracción del segundo molar maxilar izquierdo. En la zona de la extracción se observó un alvéolo con presencia de alimento (**A**) y formación de epitelio (**E**), el cual cubre totalmente la zona de extracción.

Grupo Experimental



En este espécimen se realizó la extracción bilateral de los segundos molares maxilares. En la zona de la extracción del lado derecho, se observó un alvéolo, con exposición ósea (**O**) de 2.06mm de extensión, adyacente a zona con presencia restos alimenticios (**A**); en la zona de la extracción del lado izquierdo, se observó exposición ósea (**O**) de 1.45 mm. De extensión, con presencia parcial de epitelio en la zona mesial del alvéolo y se observaron restos alimenticios (**A**).

ANÁLISIS MACROSCÓPICO

Tabla 17.1. Análisis macroscópico de Grupo Testigo

Alvéolo cerrado	Alvéolo abierto	Exposición de hueso	Fractura de hueso	Pérdida de dientes adyacentes
xxxx				

x= individuos que presentaron la característica

Tabla 17.2. Análisis macroscópico de Grupo Experimental

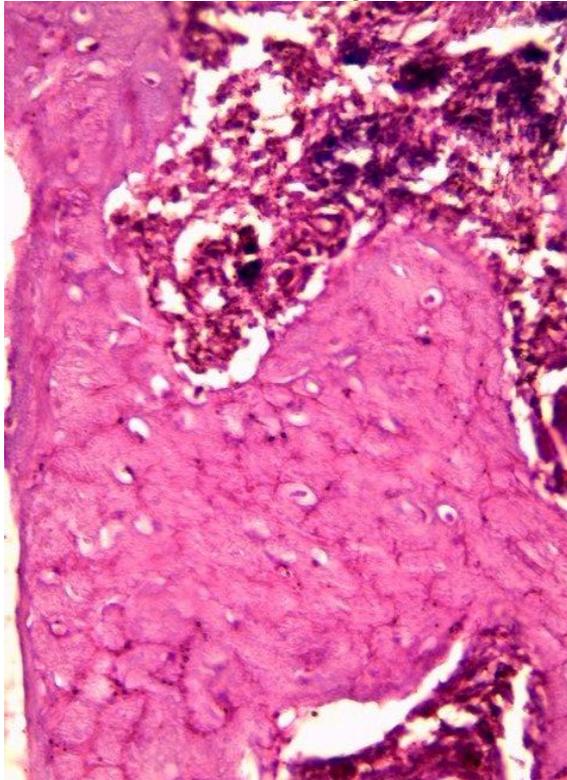
Alvéolo cerrado	Alvéolo abierto	Exposición de hueso	Fractura de hueso	Pérdida de dientes adyacentes
	xxxx	xxxx	xx	x

x= individuos que presentaron la característica

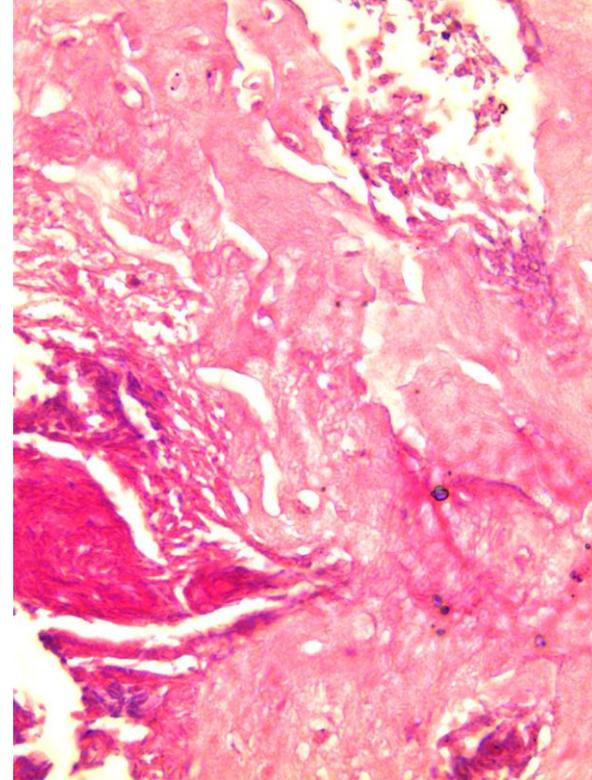
COMPARACIÓN Y DESCRIPCIÓN MICROSCÓPICA ENTRE GRUPO TESTIGO Y EXPERIMENTAL

Semana 1

Grupo Testigo



Grupo Experimental

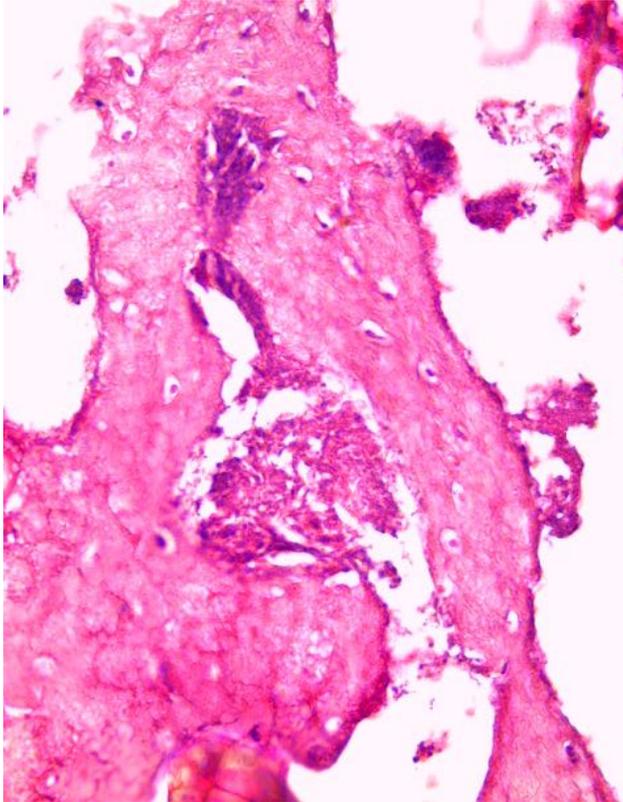


Se observó una gran cantidad de tejido inflamatorio, se observaron osteocitos en las lagunas osteocitarias, la matriz ósea se observó altamente eosinofila, pero aún organizada.

Se observó poca cantidad de células inflamatorias, en el hueso se observaron pocos osteocitos y algunas lagunas osteocitarias vacías. La matriz ósea se ve dispersa, y poco organizada.

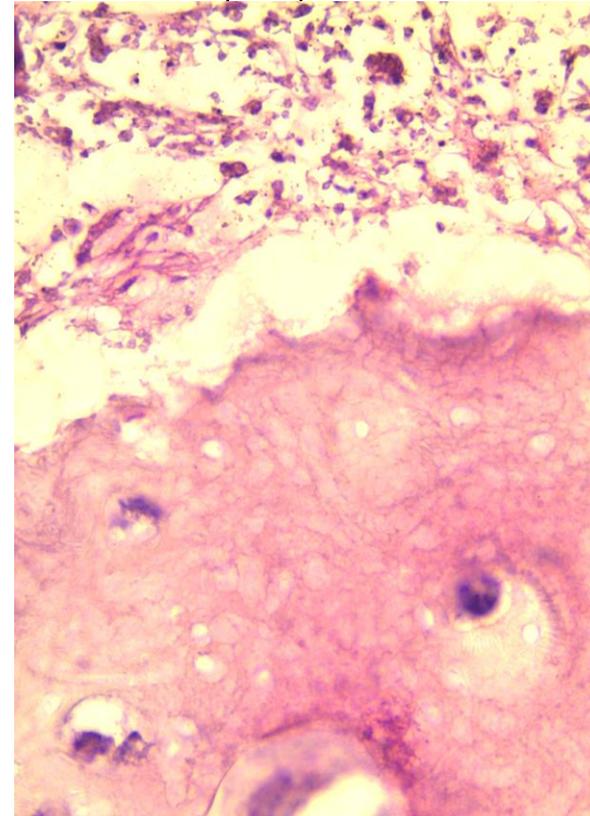
Semana 2

Grupo Testigo



Se observaron zonas de la matriz ósea con lagunas osteocitarias vacías, pero en las áreas cercanas al tejido inflamatorio se observaron osteocitos dentro de la matriz, que presenta algunas células en su periferia, lo que nos sugiere encontrarse en remodelación activa.

Grupo Experimental



Se observó tejido inflamatorio poco organizado, con la presencia de algunas células de tipo linfoide. En la matriz ósea remanente se observaron algunas células de gran tamaño, posiblemente macrófagos y en general se presentó acelular con gran número de lagunas vacías.

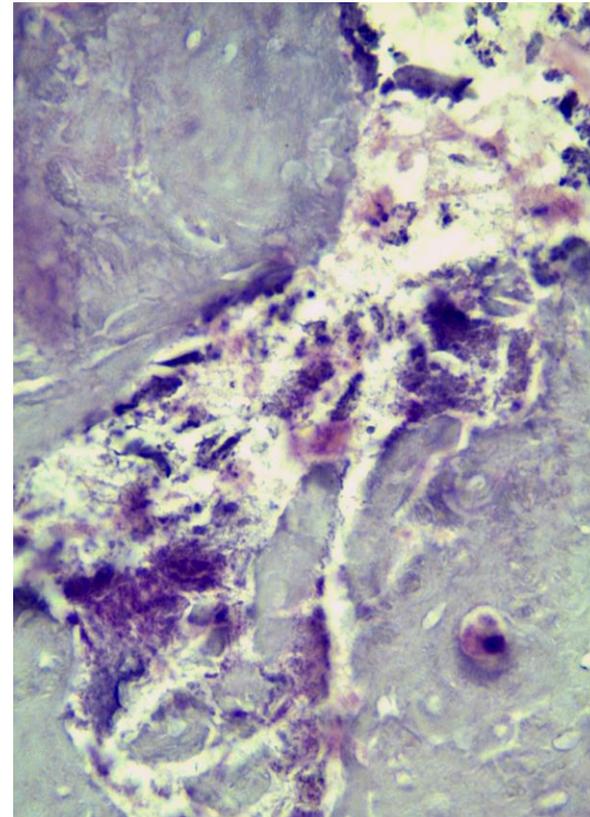
Semana 3

Grupo Testigo



Se observó el área del centro del alvéolo con presencia de tejido conectivo fibroso y algunas células de origen inflamatorio, en la matriz ósea se observan osteocitos y en la periferia actividad osteoclástica, por lo que nos encontramos en presencia de un tejido altamente reactivo y en remodelación.

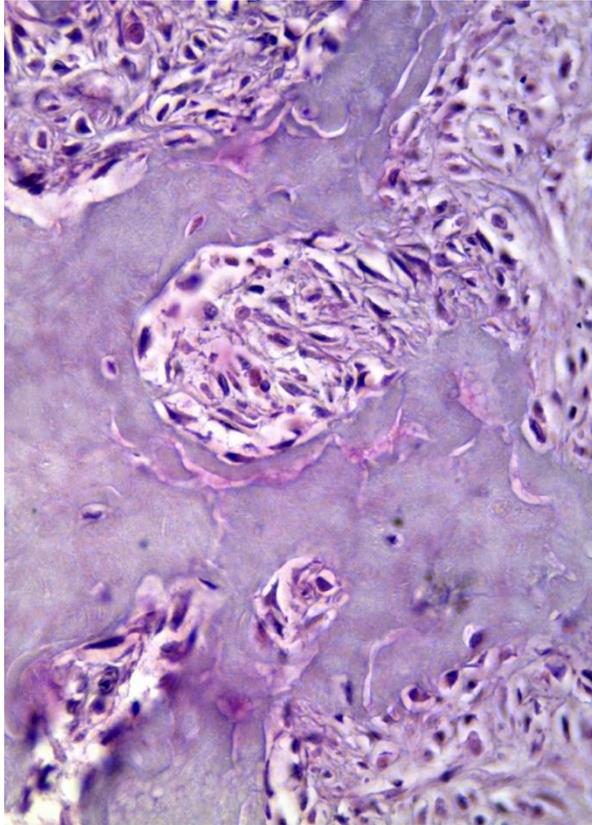
Grupo Experimental



Se observó el tejido contaminado, la matriz ósea se observa desorganizada y con gran número de lagunas osteocitarias vacías, en la periferia de esta matriz se observan algunas células de origen inflamatorio y el tejido en general, se observó estático y sin remodelación aparente.

Semana 4

Grupo Testigo



Se observó el tejido en organización y remodelación con gran cantidad de células de apariencia osteoblastoide, comienza la formación de una matriz trabeculada y en ella hay presencia de osteocitos.

Grupo Experimental



Se observó una matriz ósea desorganizada y con posibles desmineralizaciones por sus características de tinción. Se observó gran cantidad de lagunas vacías y en general el tejido se encontró acelular y se observó poco reactivó.

ANÁLISIS MICROSCÓPICO

Tabla 18.1. Análisis microscópico de Grupo Testigo			
Lagunas Osteocitarias		Matriz Ósea	
Osteocitos	Acelular	Organizada	Dispersa
xxxx		xxxx	

x= individuos que presentaron la característica

Tabla 18.2. Análisis microscópico de Grupo Experimental			
Lagunas Osteocitarias		Matriz Ósea	
Osteocitos	Acelular	Organizada	Dispersa
	xxxx		xxxx

x= individuos que presentaron la característica

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Tabla 19

Tabla de contingencia alvéolo * Tratamiento

Recuento		Tratamiento		Total
		Testigo	Bifosfonato	
alvéolo	Alvéolo abierto	1	10	11
	Alvéolo cerrado	11	0	11
Total		12	10	22

Tabla 20

Pruebas de chi-cuadrado

	Valor	gl	Sig. asintótica (bilateral)	Sig. exacta (bilateral)	Sig. exacta (unilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	18,333 ^b	1	,000		
Corrección por continuidad	14,850	1	,000		
Razón de verosimilitudes	23,614	1	,000		
Estadístico exacto de Fisher				,000	,000
Asociación lineal por lineal	17,500	1	,000		
N de casos válidos	22				

a. Calculado sólo para una tabla de 2x2.

b. 0 casillas (,0%) tienen una frecuencia esperada inferior a 5. La frecuencia mínima esperada es 5,00.

DISCUSIÓN

Los bifosfonatos son potentes inhibidores de los osteoclastos, con una vida media de hasta 10 años en el organismo, (Toranzo, 2009), estos fármacos son usados principalmente para el tratamiento de las metástasis óseas de tumores sólidos, así como para el mieloma múltiple y el cáncer de mama, estas drogas reducen la incidencia de los eventos óseos metastásicos de forma significativa. (Berenson, 1996).

Aun no se ha establecido una relación entre el uso de estos medicamentos sobre la ONM, sin embargo, la incidencia en tiempos anteriores en relación al uso de bifosfonatos era muy baja (Vitte, 1996), siendo que hoy en día esta incidencia, alcanza 10% o más entre los pacientes tratados con zoledronato y algo menos con otros BF. (Durie, 2005)

La ONMAB puede aparecer espontáneamente pero es más frecuente encontrarla como consecuencia de un tratamiento dental invasivo, en el cual la cicatrización se ve comprometida por razones aún no muy claras, que propician la exposición de tejido óseo en la mandíbula o en el maxilar presentando además, en algunos casos el desarrollo de infecciones que complican la condición inicial, empeorando los síntomas del paciente y aumentando el área expuesta en la región afectada. (Odvina, 2005)

Marx en el 2003 fueron los primeros en relacionar la Osteonecrosis maxilar con el uso de BF, al documentar en un estudio con 119 pacientes, la osteonecrosis de la mandíbula (ONM). La mayoría de los pacientes fueron sometidos a tratamiento a base de BF, para mieloma múltiple (52,1%) y cáncer de mama metastásico (42%). La mandíbula resultó ser el sitio más común de exposición ósea (68,1%) y de enfermedad periodontal en curso, la cual estuvo presente en un número significativo de pacientes (84%). (Marx R. , 2003)

Ruggiero y cols. en el 2004 informó sobre 63 casos de ONMAB. Veintiocho de los 63 pacientes tenían mieloma múltiple, 20 pacientes tenían cáncer de mama, 3 pacientes tenían cáncer de pulmón, y 1 paciente tenía plasmocitoma y leucemia. Cincuenta y cuatro de 63 pacientes informaron de una extracción reciente en el sitio necrótico, mientras que los restantes nueve pacientes tuvieron exposición ósea aparentemente espontánea. Resultados de cultivos bacterianos fueron reportados como flora oral normal en todos los casos. La duración de la terapia con BF varió de 6 a 48 meses, aunque el tiempo de tratamiento para cada paciente individual no fue especificado. El tratamiento de las lesiones necróticas mandibulares fueron desde el tratamiento conservador hasta la resección quirúrgica de la zona afectada. (Ruggiero S. L., 2009)

Ciertas hipótesis intentan explicar la especificidad de la ONMAB, estas mencionan la remodelación ósea alterada ante constantes microtraumas, inhibición de la angiogénesis, e infección bacteriana. (Landesberg, y otros, 2011)

Una teoría más, propone que los BF acumulados en el tejido óseo de la región maxilofacial, resultan tóxicos para los epitelios adyacentes, afectando cualquier proceso de cicatrización que se desencadene en estos tejidos, como consecuencia de múltiples factores etiológicos tales como: un procedimiento dental invasivo, una prótesis dental mal ajustada o cualquier otro trauma. Los BF almacenados biológicamente, son determinantes en los cambios que sufre el epitelio oral, se manifiestan reacciones de toxicidad, y al estar alterado el proceso de cicatrización del mismo, habrá exposición de hueso prolongada y a su vez propiciará la acumulación y desarrollo de una biopelícula bacteriana, dando oportunidad al desarrollo de una infección que dispare una osteomielitis (Landesberg R. , 2008), esta característica se observó en nuestro modelo de estudio in vivo, ya que los grupos experimentales mostraron una clara exposición ósea y retraso en la formación de epitelio de la herida. Esta epitelización parcial fue evidente hasta los 28 días.

Otra teoría se basa en la evidencia de estudios que muestran que los BF administrados por vía intravenosa son importantes inhibidores de la neoangiogénesis capilar, ya que inhiben el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF).

De esta manera, crece la inquietud de crear un modelo animal translacional al ser humano, ya que es esencial para ayudar a determinar la fisiopatología de ONMAB y establecer estrategias de prevención y de gestión, para ser probados clínicamente.

Bi y cols. (2010) desarrollaron un modelo de osteonecrosis maxilar en ratones, a los que previamente a la extracción del primer molar les administraron por vía intraperitoneal dexametasona (5 mg/kg de peso, semanalmente), AZ (125 g/kg de peso; dos veces por semana) o docetaxel (25 mg/kg de peso, semanalmente) o sus combinaciones. Después de la extracción, los diferentes fármacos o su combinación se siguieron inyectando durante 3 a 12 semanas. Los especímenes a los que se les inyectó AZ no mostraron lesiones en tejidos blandos (hueso expuesto), en tanto que los que recibieron dexametasona con AZ sólo el 27 % mostraron estas lesiones, y los que recibieron la combinación de los tres fármacos (AZ, dexametasona y docetaxel) el 100% mostraron desarrollo de la ONMAB. (Bi Y., 2010). Así, ellos concluyeron que: i) la lesión mecánica condujo a una fase temprana de necrosis ósea, que requiere de un mínimo de 3 semanas para reparar de forma natural en la ausencia BF; ii) la administración de BF suprime la angiogénesis y la remodelación ósea en el hueso alveolar, lo que conduce a la acumulación de hueso necrótico en el sitio de la lesión, y iii) la administración de medicamentos de quimioterapia, exagera aún más la ONMAB como enfermedad en los ratones tratados con BF, resultando en una variedad de defectos de tejidos blandos, que persistieron más allá de 12 semanas después de la lesión.

Bi y col. extendieron sus estudio después de las ocho semanas que señala la Organización Americana de Maxilofaciales como tiempo establecido para el diagnóstico de la ONMAB; encontrando que la Osteonecrosis ósea estuvo presente en los ratones inyectados con zoledronato y Dexametasona, en cambio

nosotros observamos que si la patología es evidente a las 4 semanas, entonces no es necesario extender los tiempos de estudio para obtener resultados satisfactorios y traslacionales al ser humano.

Pautke y cols. utilizaron minicerdos en su estudio de 2012, a los cuales administraron por vía endovenosa 0.05 mg/kg de AZ de manera semanal y durante seis semanas antes de la extracción mandibular, después siguieron aplicando el BF durante diez semanas más, todos los animales presentaron hueso expuesto o mejor escribir necrosis ósea (Pautke, 2012).

Para mostrar la exposición de hueso en pruebas de fluorescencia ellos medicaron cuatro días antes del sacrificio a los cerdos con 100mg de doxiciclina, creemos que esta medicación puede alterar los resultados obtenidos.

Aún realizando análisis en los parámetros de urea y creatinina en sangre, estos estudios no resultaron significativos. Pero en general, el modelo en animales grandes como, en este caso el minipig, son muy válidos ya que, cuenta con la estructura ósea y los parámetros de recambio comparables a los seres humanos

En nuestro modelo, los especímenes fueron tratados con dosis altas de Ácido Zoledrónico para simular la dosis administrada mensualmente de 4-mg/60-kg a pacientes con cáncer para el control de enfermedades de los huesos. (Aghaloo T. e., Periodontal disease and bisphosphonates induce osteonecrosis of the jaws in the rat. , 2011)Esta dosificación se asocia con un mayor riesgo en el desarrollo de la ONMAB a diferencia de los pacientes con osteoporosis. Aunque también existe un número significativo de pacientes con tratamiento de BF que padecen osteoporosis, sólo una fracción muy pequeña de estos pacientes desarrollan ONMAB

A este respecto, es importante mencionar que nosotros usamos estas altas dosis de BF, pero de forma fraccionada a los -14 y -7 días a diferencia de los otros autores que emplearon altas dosis pero en un periodo más prolongado de tiempo (Pautke, 2012), (Aghaloo T. e., Periodontal disease and bisphosphonates induce osteonecrosis of the jaws in the rat. , 2011).

Los estudios de la ONMAB se han basado en algunas revisiones de casos y en estudios realizados en animales. Antes de 2009, no se había reportado ningún modelo experimental en animales, por lo que un grupo de trabajo de la American Society for Bone and Mineral Research recomendó: “es necesario y esencial, desarrollar un modelo animal apropiado para determinar el mejor manejo terapéutico de los pacientes con osteonecrosis de los maxilares”. (Koshla, 2007). Entonces, Sonis y colaboradores en el 2009, realizaron el primer modelo en ratas intentando simular la ONMAB. Con su modelo demostraron retraso en la curación de heridas con ulceración de la mucosa y secuestros óseos después de la extracción de dientes maxilares, en ratas que recibieron Ácido Zoledrónico y dexametasona en terapia de combinación. A un grupo de ratas se les aplicó por vía subcutánea dexametasona en dosis de 1 mg/kg durante 7, 14 o 21 días antes de la extracción de los tres molares maxilares, los animales también de manera previa recibieron por vía subcutánea dosis semanales de ácido zoledrónico (AZ)

en los días -14,-7 y -1. Los animales que recibieron los dos medicamentos desarrollaron lesiones expuestas de hueso necrótico en porcentajes que variaron del 60 al 100%, esto dependiendo de la localización y el esquema específico de dosificación. También hicieron un grupo al que solo aplicaron AZ los días 7 y uno antes de la extracción y en el que el porcentaje de la lesión solo apareció en el 60%. (Sonis S. W., 2009) Así, ellos concluyeron que incluso una breve exposición a ZA era suficiente para provocar cambios en la curación del sitio de la extracción en comparación con los controles.

En su modelo Sonis y cols. realizaron extracciones de los tres molares izquierdo ya sean, maxilares o mandibulares, haciendo un trauma quirúrgico mayor, que conllevaba a la pérdida de los parámetros para medir el tamaño de la lesión causada por la medicación. Nosotros decidimos realizar un trauma quirúrgico menor y con ello más controlado, por ello, realizamos solo la extracción del segundo molar maxilar, teniendo así como parámetros los molares adyacentes con el objetivo de poder conservarlos como referencias sanas alrededor de la lesión.

En 2011 López-Jornet y cols., evaluaron el efecto profiláctico de la penicilina en dosis de 0.1 ml/kg de peso en la aparición de lesiones óseas expuestas asociadas a la aplicación de dexametasona (1 mg/kg) y pamidronato (3mg/kg tres veces por semana) y a la extracción de molares maxilares o mandibulares. En el grupo testigo (sin antibiótico) el porcentaje de lesiones con hueso necrótico expuesto fue de 34.6%, mientras que en el grupo que recibió la terapia antibiótica tres días antes de las extracciones y después durante 4 días, solo el 9.61% desarrolló la osteonecrosis sin presencia de cicatrización en la mucosa (López-Jornet, 2011) Estos autores, al igual que Sonis realizaron la extracción de los tres molares maxilares y mandibulares creando con ello un gran trauma quirúrgico y perdiendo las zonas de referencia para evaluar la lesión y su magnitud. Aún con la terapia profiláctica existieron casos de ONMAB, por lo que sería recomendable establecer cuidadosamente un modelo de estudio y después de ello, proponer una terapia antibiótica basada en el conocimiento claro de los microorganismos involucrados en el desarrollo de la ONMAB.

El complejo orofacial es un sistema complicado compuesto de dientes, mucosa oral, tejidos periodontales, músculos, lengua, glándulas salivales, y el hueso alveolar. Estos tejidos interactúan para realizar funciones únicas que van desde la masticación, habla, la deglución y el gusto.

El maxilar es un hueso cubierto por mucosa en estrecha proximidad con el ambiente externo (Landesberg, y otros, 2011) sin embargo, los parámetros específicos que contribuyen a la sensibilidad de la mandíbula por padecer ONMAB permanecen sin identificar. (Jaimes M, 2008)

Uno parámetro, podría ser que el tratamiento con BF puede perjudicar la resistencia ósea, autores como Weinstein remarcan que la supresión excesiva del recambio óseo dada por los BF, puede afectar a la competencia biomecánica del hueso (Weinstein, 2000).

A pesar de que Landerberg R (Landesberg, y otros, 2011), sugiere que las diferencias inherentes entre las células formadoras de hueso de la mandíbula y otras partes del esqueleto potencialmente pueden influir en el desarrollo de la ONMAB, nosotros en el modelo que hemos empleado, elegimos como área de estudio la maxila que proviene de la diferenciación osteoblástica intramembranosa, y aún así, desarrolla la ONMAB con las mismas características con que se produce en la mandíbula, por lo que creemos que el origen embrionario del hueso no es un factor relevante en el desarrollo de la ONMAB.

En nuestros resultados observamos que en nuestro grupo experimental se presentó un retraso en la reepitelización en donde en los grupos de 3 semanas en promedio había 4mm de exposición ósea, sin formación de epitelio; esto coincide con los resultados de Landerberg R (Landesberg, y otros, 2011) donde, demuestran que el pamidronato inhibe la proliferación celular a una concentración de 0,1 mM en su estudio *in vitro* de células epiteliales de la mucosa bucal de ratones, por lo que concluyen que los efectos adversos de la BF en el epitelio oral, pueden jugar un papel crítico en la iniciación de ONMAB.

En las observaciones histológicas, coincidimos con el estudio de Odvina en 2005, (Odvina, 2005) quienes reportaron en un estudio realizado en 9 pacientes medicados con BF por osteoporosis/osteopenia, los cuales presentaron fractura no vertebral espontánea o traumática (s), con retraso o que no sanan, las fracturas eran expuestas en seis pacientes durante el tratamiento con BF y en cuatro pacientes después de suspender el tratamiento con BF; encontraron un hueso acelular y adinámico -con este término se refieren a disminución de superficies óseas osteoblásticas y osteoclasticas, la tasa de formación ósea se redujo y la matriz ósea se vio gravemente afectada-, estos resultados son similares a lo que encontramos en nuestro análisis histológico en el grupo experimental y se hacen evidentes a partir de la tercera semana de estudio.

Respecto a los resultados radiográficos, pocos estudios evalúan de manera cuantitativa la densidad ósea de la zona de la extracción, varios estudios utilizan micro CT como Pautke y Bi, pero su estudio es únicamente descriptivo (Bi Y., 2010) (Pautke, 2012)

Con respecto a esto, Sonis y cols. realizaron un estudio radiográfico igual que el nuestro a 28 días (Sonis S. W., 2009). A diferencia de nosotros, ellos realizaron una toma radiográfica sagital de la mandíbula, en la que no se observan cambios significativos debido a la superposición de estructuras. Nosotros por esta razón, decidimos realizar la toma radiográfica coronal, para poder observar las estructuras desde una vista oclusal y con ello evitar, la superposición.

Podemos observar en los resultados de diversos modelos de ONMAB reportados en la literatura, que existe una gran variedad en diseños que incluyen numerosas diferencias en cuanto a: administraciones agregadas con antineoplásicos, tiempos de medicación previa a la extracción, medicación postextracción, el tipo de animales (rata, ratón, minipig), así como en los parámetros tisulares observados,

los cambios histológicos y las mediciones de la presencia de osteoclastos, viabilidad de osteocitos, presencia de lagunas osteocitarias vacías y estudios radiográficos.

Con nuestro modelo experimental observamos que la exposición de hueso durante la extracción del diente, actúa como un disparador para abrir la puerta a la invasión bacteriana y agravar la situación de ONMAB.

Por lo observado en nuestros resultados, creemos que con nuestro modelo se podrán proponer tratamientos farmacológicos preventivos para minimizar la aparición de esta complicación que presentan las terapias que acompañan el manejo de cierto tipo de cánceres.

Este modelo, pretende ser translacional, mimetizando los cambios histopatológicos, así como los fisiopatológicos de este padecimiento en el ser humano, ello nos permitirá estudiar estos mecanismos. El modelo pretende entender los cambios que ocurren en los tejidos afectados para responder así, interrogantes acerca de los cambios sucedidos en esta patología.

Por lo tanto, la disponibilidad de este modelo de estudio en rata nos brinda la oportunidad de realizar estudios prospectivos y controlados para evaluar los diferentes factores de riesgo en la etiología, prevención y tratamiento de la ONMAB, que puede ser además una herramienta útil, práctica y económica para desarrollar nuevas estrategias terapéuticas para prevenir y curar esta enfermedad en pacientes humanos.

CONCLUSIONES

1. Las ratas que fueron tratadas con Ácido Zoledrónico desarrollaron osteonecrosis en el maxilar después de realizar la extracción dental, como sucede en el ser humano.
2. El modelo propuesto de extracción del segundo molar maxilar en ratas tratadas con Ácido Zoledrónico en dosis total de 104.16µg, sí permite obtener lesiones de Osteonecrosis en el 100% de los casos.
3. El modelo permite hacer un análisis de los cambios que ocurren alrededor de los tejidos involucrados en la extracción del segundo molar en 4 semanas, sin necesidad de extender los tiempos de estudio.
4. El Fijador de Zinc no es un buen fijador para muestras de tejido óseo.

BIBLIOGRAFÍA

- Aaron, R. (1998). Osteonecrosis: etiology, pathophysiology and diagnosis. In J. R. Callaghan, *The adult hip* (p. 457). Philadelphia: Lippincott-Raven.
- Aghaloo, T. e. (2011). Periodontal disease and bisphosphonates induce osteonecrosis of the jaws in the rat. *J Bone Miner Res.*, 26(8):1871-82.
- Aghaloo, T. e. (2011). Periodontal disease and bisphosphonates induce osteonecrosis of the jaws in the rat. *J Bone Miner Res.*, 26(8):1871-82.
- Aghaloo, T. L. (2011). Periodontal disease and bisphosphonates induce osteonecrosis of the jaws in the rat. *J Bone Miner Res.*, 26(8):1871-82.
- American Dental Association Council on Scientific. (2006). *Dental management of patients receiving oral bisphosphonate therapy: expert panel recommendations*. J Am Dent Assoc.
- Andersen TL, d. C. (2004). A scrutiny of matrix metalloproteinases in osteoclasts: evidence for heterogeneity in osteoclasts: evidence for heterogeneity and for the presence of MMPs synthesized by other cells. *Bone* 35, 1107–19.
- Andrew, E. y. (1995). *El sistema esquelético y los tumores de los tejidos blandos: Huesos. En Patología Estructural y Funcional*. España: Mc. Graw-Hill Interamericana.
- Arboleya, L., & Alper, M. y. (2011). Efectos adversos de los bisfosfonatos. *Reumatología clínica*.
- Aubin, J. E. (1996). *The osteoblast lineage. En Principles of Bone Biology*. USA: Editorial: Academic Press.
- Avery, J. K. (2007). *Principios de Histología y Embriología Bucal con orientación clínica*. España: ELSEVIER.
- Berenson, J. L. (1996). Efficacy of pamidronate in reducing skeletal events in patients with advanced multiple myeloma. *N Engl J Med*, 334-488.
- Bi Y., G. Y. (2010). Bisphosphonates cause osteonecrosis of the jaw-like disease in mice. *Am J Pathol.*, 177(1):280-90.
- Borromeo, G. L., Brand, C., Clement, J. G., McCullough, M., Thomson, W., & Flitzanis, E. a. (2011). Is bisphosphonate therapy for benign bone disease associated with impaired dental healing? A case-controlled study. *BMC Musculoskeletal Disorders*, 12-71.
- Cisterna, C., Yanine, N., & González, C. y. (2008). Osteonecrosis de los Maxilares Asociado a Terapia con Bifosfonatos: Situación Actual. *Clin Periodoncia Implantol Rehabil. Oral Vol. 1*, 32-37.
- Cortina, R. G. (2004). MODELOS DE EXPERIMENTACIÓN PARA EL ESTUDIO. *REB 23 (3)*, 107-116.
- Cortina, R. G., & Calderón, S. J. (2004). MODELOS DE EXPERIMENTACIÓN PARA EL ESTUDIO. *REB 23 (3)*, 107-116.
- Coxon, F. P. (2006). Recent advances in understanding the mechanism of action of bisphosphonates. *Current Opinion in Pharmacology* 6, 307–312.
- Di Fiore, M. S. (1975). *Atlas de histología normal*. Universidad de Texas: Librería El Ateneo Editorial.
- Dunn, M. J. (1983). *Anatomía Dental y de Cabeza y Cuello*. México D.F.: Interamericana.

- Durie, B. K. (2005). Osteonecrosis of the jaw and bisphosphonates. . *N Engl J Med* , 353.
- Edwards, B. G. (2008). Pharmacovigilance and reporting oversight in US FDA fast-track process: bisphosphonates and osteonecrosis of the jaw. *Lancet Oncol* , 9:1166–1172.
- Fernández, T., Hernández, G., & Alobera, G. (2011). Physiological bases of bone regeneration I. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* , 11:E47-51.
- Ferrara, S. V. (2011). Etiopathogenesis and Clinical Aspects of BIONJ. In G. Iannetti, *Bisphosphonates and Osteonecrosis of the Jaw: a Multidisciplinary Approach* (pp. 73-83). Roma, Italia: Springer.
- Fleisch, H. (2009). Bisphosphonates: Mechanisms of Action. *Endocrine Reviews* , 19(1): 80-100.
- Fleish, H. R. (1969). Prevention by diphosphonate of immobilization osteoporosis in rats. *Nature* , 223:211-2.
- Fraunfelder, F. F. (2003). Scleritis and other ocular side effects associated with pamidronate disodium. . *Am J Ophthalmol* , 135:219–222.
- French, D. M. (2008). Postmarketing surveillance of uveitis and scleritis with bisphosphonates among a national veteran cohort. . *Retina* , 28:889–893.
- Friedenstein, A. J. (1976). Precursor cells of mechanocytes. *Int Rev Cytol* , 47:.
- Genneser, F. (2000). *Histología (Sobre bases biomoleculares)*. Madrid, España.: Panamericana.
- Grier, R. L. (1998). Inhibition of tooth eruption in the Rat by a Bisphosphonate. *Journ. Dent. Res.* , Jan, 77 (1), 8-15.
- Gutta R, L. P. (2007). Bisphosphonates and osteonecrosis of the jaws: science and rationale. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 104 , 186-193.
- Guyton, A. C. (1998). *Hormona paratitoeida, calcitonina, metabolismo del calcio y del fosfato, vitamina D, huesos y dientes. En Tratado de Fisiología Médica*. México: Interamericana Mc. Graw-Hill.
- Harada S, R. G. (2003). Control of osteoblast function and regulation of bone mass. *Nature* , 423: 349-55.
- Hudler, P. (2007). The use of animals in biomedical research. *Slov Vet Res.* , 44(3):55-62.
- Hylland, S. (2012). *Osteonecrosis*. Atlanta: American College of Rheumatology Communications and Marketing Committee.
- Igarashi, K. M. (1994). Anchorage and retention effects of a Biphosphonate (AHBuBP) on tooth movements in rats. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* , 106:279-289.
- Instituto Nacional de Artritis y Enfermedades Musculoesqueléticas y de la Piel. (2009). *¿Qué es la osteonecrosis?* Bethesda, MD: Departamento de Salud y Servicios Humanos de los EE.UU.Servicio de Salud Pública.
- Jaimes M. (2008). Bifosfonatos asociado a osteonecrosis de los maxilares. Revisión de la literatura. . *AVANCES EN ODONTOESTOMATOLOGÍA* , 219, 226.
- Jaimes, M., Oliveira, G., Olate, S., & Albergaria, B. J. (2008). Bifosfonatos asociado a osteonecrosis de los maxilares. Revisión de la literatura. *AVANCES EN ODONTOESTOMATOLOGÍA* , 219, 226.
- Karsenty, G. (2003). The complexities of skeletal biology. *Nature* , 423:316-318.

- Khosla, S. B. (2007). American Society for Bone and Mineral Research. Bisphosphonate-associated osteonecrosis of the jaw: report of a task force of the American Society for Bone and Mineral Research. *J Bone Miner Res.* , 22:1479–14.
- Khurana, J. S. (2009). *Bone Pathology*. E.U.A: Springer.
- King, A. U. (2008). Osteonecrosis of the jaw in patients receiving intravenous or oral bisphosphonates. . *Pharmacotherapy* , 28:667–677.
- Koshla. (2007). American Society for Bone and Mineral Research. Bisphosphonate-associated osteonecrosis of the jaw: report of a task force of the American Society for Bone and Mineral Research. *Mineral Research. J Bone Miner Res.* , 22:1479–1.
- Kühl, S., Walter, C., Acham, S., Pfeffer, R., & Lambrecht, J. T. (2012). Bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws – A review. *Oral Oncology* , 1-10.
- Lam, D. S. (2007). A review of Bisphosphonate-associated osteonecrosis of the jaws and its management. . *JCDA* , 73(5): 417-422.
- Landesberg Regina, W. V.-N. (2011). Potential pathophysiological mechanisms in osteonecrosis of the jaw. *ANNALS OF THE NEW YORK ACADEMY OF SCIENCES 1218* , 69-72.
- Landesberg, R. (2008). Inhibition of oral mucosal cell wound healing by bisphosphonates. *J Oral Maxillofac Surg.* , 66(5):839-47.
- Landesberg, R., Woo, V., Cremere, S., Cozin, M., Marolt, D., Vunjak-Novakovic, G., et al. (2011). Potential pathophysiological mechanisms in osteonecrosis of the jaw. *ANNALS OF THE NEW YORK ACADEMY OF SCIENCES 1218* , 69-72.
- Leeson, T. S. (1988). *Texto/Atlas de Histología*. México: Interamericana McGraw-Hill.
- Levine, M. G.-m.–3. (2000). Proportion of osteoporotic post-menopausal women at increased risk for upper GI adverse events associated with bisphosphonate therapy. *Pharmacoepidemiol Drug Saf* , 9:367–370.
- Lieberman, J. R. (2002). Osteonecrosis of the Hip: Management in the Twenty-first Century . *J.Bone and Joint Surg* , 84: 834-853.
- López-Jornet, P. C.-A. (2011). Perioperative antibiotic regimen in rats treated with pamidronate plus dexamethasone and subjected to dental extraction: a study of the changes in the jaws. . *J Oral Maxillofac Surg.* , 69(10):2488-93.
- Luckman, S. C. (1998). Heterocycle-containing bisphosphonates cause apoptosis and inhibit bone reorption by preventing protein prenylation: evidence from structure-activity relationships in J774 macrophages. *J Bone Miner Res* , 13: 1668-1678.
- Luckman, S. H. (1998). Nitrogen-containing bisphosphonates inhibit the Mevalonate pathway and prevent post-translational prenylation of GTP-binding proteins, including Ras. *J Bone Miner Res* , 13:581-589.
- Markin, H. J. (2008). Osteonecrosis. In V. J. Vigorita, *Orthopaedic Pathology* (pp. 546-555). Philadelphia, USA: LIPPINCOTT WILLIAMS & WILKINS.
- Martins CM, S. I. (2007). Treatment of avascular osteonecrosis of the mandible in cancer patients with a history of bisphosphonate therapy by combining bone resection and autologous platelet-rich plasma: report of 3 cases. *J Oral Maxillofac Surg* , 65: 349-355.

- Marx, R. E. (2009). L'osteonecrosi dei Mascellari da bisfosfonati. *Quintessence, Milan*, -.
- Marx, R. (2003). Pamidronate (Aredia) and Zolendronate (Zometa) induced avascular necrosis of the jaws: a growing epidemic. *J Oral Maxillofac Surg*, 61: 1115-1116.
- Marx, R. (2003). Pamidronate (Aredia) and Zolendronate (Zometa) induced avascular necrosis of the jaws: a growing epidemic. *J Oral Maxillofac Surg*, 61: 1115-1116.
- Marx, R. S. (2005). Bisphosphonate-induced exposed bone (osteonecrosis/osteopetrosis) of the jaws: risk factors, recognition, prevention and treatment. *J Oral Maxillofac Surg*, 63: 1567-1575.
- Mavrokokki, T. C. (2007). Nature and frequency of bisphosphonate associated osteonecrosis of the jaws in Australia. *J Oral Maxillofac Surg*, 65(3): 415-423.
- Mayoral, J. M. (1977). *Ortodoncia Principios fundamentales y práctica*. Barcelona, España: Labor.
- Mazziotti, S. M. (2011). Instrumental Diagnosis. In I. Giorgio, *Bisphosphonates and Osteonecrosis of the Jaw: A Multidisciplinary Approach* (pp. 85-93). Roma : Springer.
- Minutoli, A. D. (2011). Pharmacology: Mechanism of Action of Biphosphonates. In G. Iannetti, *Bisphosphonates and Osteonecrosis of the Jaw: A Multidisciplinary Approach* (p. 20). Roma, Italia: Springer.
- Mont, M. H. (1995). Non traumatic avascular necrosis of the femoral head [review]. *J BONE JOINT SURG AM.*, 77-A: 459-474.
- Navia, J. (1977.). Animal Models in Dental Research. *University*, University of Alabama.
- Odvina, C. Z. (2005). Severely Suppressed Bone Turnover: A Potential Complication of Alendronate Therapy. *J Clin Endocrinol Metab.*, 90(3):1294-301.
- Patrick., G. R. (2007). Bisphosphonates and osteonecrosis of the jaws: Science and rationale. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, 104: 186-193.
- Pautke, C. K. (2012). Bisphosphonate related osteonecrosis of the jaw: A minipig large animal model. *Bone.*, 51(3):592-9.
- Pellegrini G., S. Y. (2009). Pre-clinical Models for Oral and Periodontal Reconstructive Therapies. *J Dent Res.*, 88(12):1065-76.
- Ruggiero, S. L. (2009). American association of oral and maxillofacial surgeons position paper on bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws: update. *J Oral Maxillofac Surg*, 67(Suppl 5):2–12.
- Ruggiero, S. L., & Fantasia, J. a. (2006). Bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw: background and guidelines for diagnosis, staging and management. *Ora ISurg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 102(4), 433–41.
- Ruggiero, S. M. (2004). Osteonecrosis of the jaws associated with the use of Bisphosphonates: A review of 63 cases. *J Oral Maxillofac Surg*, 62: 527-534.
- Rusell, R., Watts, N., Ebetino, F., & Rogers, M. (2008). Mechanisms of action of bisphosphonates: similarities and differences and their potential influence on clinical efficacy. *Osteoporos*, 19:733-759.
- Sánchez, Y. T. (2010). Repercusión de los bisfosfonatos durante el tratamiento odontológico: incidencia de osteonecrosis de los maxilares, prevención y actitud terapéutica. *Cient Dent*, 7;2:89-97.

Sanofi-Aventis. (2012). *Facultad de Medicina UNAM*. Retrieved octubre 22, 2012, from http://www.facmed.unam.mx/bmnd/dirijo.php?bib_vv=6

Siegel, M. D. (1985). A comparison of craniofacial growth in normal and cleft palate rhesus monkeys. *Cleft Palate J.* , 22(3):192-6.

Sonis, S. W. (2009). Bony changes in the jaws of rats treated with zoledronic acid and dexamethasone before dental extractions mimic bisphosphonate-related osteonecrosis in cancer patients. . *Oral Oncol.* , 45(2):164-72.

Sonis, S. W. (2009). Bony changes in the jaws of rats treated with zoledronic acid and dexamethasone before dental extractions mimic bisphosphonate-related osteonecrosis in cancer patients. *Oral Oncol.* , Feb;45(2):164-72.

Starck, W. E. (1995). Failure of osteointegrated dental implants after diphosphonate therapy for osteoporosis: a case report. . *Int J Maxillofac Implants* , 10:74-8.

Steinber, M. E. (1995). A quantitative system for staging avascular necrosis. . *J BONE JOINT SURG BR.* , 77B:34-41.

Stevens, A. L. (2006). *Histología humana*. E.U.A: Elsevier.

Subir R. Maitra, A. J. (2010). Modulation of matrix metalloproteinase-9 and tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-1 in sepsis. *Int J Clin Exp Med*3(3) , 180-185.

Toranzo, F. J. (2009). Osteonecrosis de los maxilares asociada a bifosfonatos en pacientes con cáncer. *Revista Oficial de la Asociación Dental Mexicana Vol. LXV, No. 1* , 46-49.

Urbaniak, J. J. (1997). Osteonecrosis: etiology, diagnosis and treatment. *American Academy of Orthopaedic Surgeons* , p 218.

Vescovi, P., Campisi, G., Fusco, V., Mergoni, G., Manfredi, M., Merigo, E., et al. (2011). Surgery-triggered and non surgery-triggered Bisphosphonate-related. *Oral Oncology* 47 , 191–194.

Vincent, J. V. (2008). *Orthopaedic Pathology*. Philadelphia, USA.: LIPPINCOTT WILLIAMS & WILKINS.

Vitte, C. F. (1996). Bisphosphonates induce osteoblasts to secrete an inhibitor of osteoclastic mediated resorption. . *Endocrinology* , 137: 2324-33.

Wang, H. W. (2007). Effect of long–term oral bisphosphonates on implant wound healing: literature review and a case report. . *J Periodontol* , 78: 584-594.

Wang, H. W. (2007). Effect of long–term oral bisphosphonates on implant wound healing: literature review and a case report. *J Periodontol* , 78: 584-594.

Wang, J., Goodger, N., & Progrell, M. (2003). Osteonecrosis of the jaws associated. *J Oral Maxillofac Surg* , 61: 1104-1117.

Weinstein, R. (2000). La verdadera fuerza. *J Bone Miner Res* , 15 : 621 -625.

Xiaoping Xu, Z. C. (2005). Functional basis for the overlap in ligand interactions and substrat especificities of matrix metalloproteinases-9 and -2. *Biochem. J.* 392 , 127–134.

ANEXO 1

A continuación se describirá a detalle la técnica de rutina que se utilizó para preparar las muestras y observarlas al microscopio.

FIJADOR DE ZINC

Preparar casi al momento de usar.

• Tris base 0.1M	1.21 gr	2.42 gr
• Acetato de calcio	0.05 gr	0.1gr
• Agua destilada	80 ml	160 ml

Mezclar y ajustar a pH 7.2-7.4

Aforar a 100 ml 200 ml

Adicionar:

• Acetato de Zinc	0.5 gr	1 gr
• Cloruro de Zinc	0.5 gr	1 gr

Guardar en frasco ámbar y refrigerar si se hace un día antes.

Las muestras se fijaron con un volumen de 20 veces mayor con respecto a la muestra por 24 horas, se cambió el fijador y se dejó 48 hrs. más.

LÍQUIDO RUYTER:

- Acetona 20ml
- Benzoato de Metilo 0.5ml
- Agua destilada 80ml
- Clara de Huevo
- Glicerina

1. Se preparan 2 soluciones:

A. 20ml de acetona, con 0.5 ml ó 10 gotas de benzoato de metilo.

B. 80ml de agua destilada, agregar clara de huevo: glicerina, v/v.

2. Se mezcla la solución A y B.

3. Se filtra porque puede precipitarse la albúmina

4. Se guarda en frío a 4 °C hasta su uso

Se colocó el portaobjetos sobre una platina caliente, se extendieron los cortes, se retiró de la platina, se retiró el exceso de líquido de Ruyter y se dejó secar, así los cortes quedaron adheridos al portaobjetos, se numeraron consecutivamente los portaobjetos usados para una misma muestra.

Después fueron teñidos con Hematoxilina-eosina.

ANEXO 2

TÉCNICA DE HEMATOXILINA Y EOSINA

HEMATOXILINA DE HARRIS

Hematoxilina	5 gr
Alcohol 70%	50ml
Alumbre de amonio o potasio	100gr
Oxido de mercurio rojo	2.5gr
Agua destilada	1000ml

Disolver la hematoxilina en el alcohol, y el alumbre de potasio en el agua destilada bajo calor. Cuando este disuelto mezclar ambas soluciones y poner a hervir lo más rápido posible (límite el calor a menos de 1 minuto y agite). Retirar del calor y agregar el rojo oxido muy lentamente. Recalentar a fuego lento hasta que tome color púrpura retirar del fuego y coloque el recipiente en otro con agua fría hasta que enfríe. La adición de 2-4 ml de ácido glacial por 100ml de solución incrementa la precisión de la tinción nuclear.

Filtrar y guardar en frasco ámbar. Se puede usar cuando se enfríe, dura varios meses. Cuando se observe que se requiere aumentar el tiempo de tinción agregar más ácido acético.

EOSINA ACIDIFICADA STOCK

Eosina Amarillenta	20gr	2gr
Agua destilada	500ml	50ml
Ácido clorhídrico	10ml	1ml
Alcohol 96%	1000ml	100ml

Mezclar la eosina en agua destilada, agregar el ácido lentamente por las paredes del recipiente y dejar asentar toda la noche. Decantar y lavar el precipitado bien con varios cambios de agua pasándolo por el papel filtro. Secar el papel en el horno a 60 °C durante 24 horas, para que seque bien. Después macerar el polvo filtrado e ir agregando poco a poco 1000ml de alcohol de 96%. Esta es la solución stock.

Solución de trabajo	
Solución de eosina stock	100ml
Alcohol al 70%	200ml