



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO



FACULTAD DE ODONTOLÓGIA

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN

**“ ANÁLISIS COMPARATIVO ENTRE HUESO SANO Y HUESO NECRÓTICO
INDUCIDO POR BIFOSFONATOS MEDIANTE MICROSCOPIA
ELECTRÓNICA DE BARRIDO, RAYOS X Y ESPECTROSCOPIA
INFRARROJA ”**

Tesis para obtener el grado de
Maestra en Odontología

Presenta:

Esp. en Ortodoncia Patricia Dettmer Mendoza

Director de tesis: Dr. José Reyes Gasga

México D.F., mayo de 2012



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Índice General

| | |
|---|----|
| Resumen..... | 1 |
| Introducción..... | 2 |
| 1. Planteamiento del problema..... | 4 |
| 2. Justificación..... | 5 |
| 3. Hipótesis..... | 5 |
| 4. Objetivos..... | 6 |
| I. Bifosfonatos..... | 7 |
| 1.1 Historia de los bifosfonatos..... | 7 |
| 1.2 Clasificación..... | 10 |
| 1.3 Mecanismos de acción y farmacocinética..... | 14 |
| 1.4 <i>Reacciones adversas</i> | 16 |
| 1.5 Osteonecrosis de los maxilares..... | 17 |
| II Hueso e Hidroxiapatita..... | 23 |
| II.2.1 Histología del hueso..... | 23 |
| II.2.2 Estructura de la hidroxiapatita | 32 |
| III Técnicas instrumentales de caracterización..... | 34 |
| III.3.1 Microscopía óptica (MO)..... | 34 |
| III.3.2 Microscopía electrónica de barrido (SEM)..... | 35 |

| | |
|--|----|
| III.3.3 Analisis de difracción de Rayos X (DRX)..... | 37 |
| III.3.4 Espectrometría de Rayos infrarrojos (FTIR)..... | 39 |
| IV. Materiales y métodos..... | 40 |
| IV 4.1. Obtención de las muestras | 40 |
| IV.4.2. Preparación en bloque..... | 41 |
| IV.4.3 Preparación en polvo..... | 43 |
| IV.5 Preparación de muestra para las técnicas de caracterización | |
| V Resultados..... | 46 |
| V.51 Microscopía óptica (MO)..... | 46 |
| V.5.2 Microscopia electrónica de barrido (SEM) | 48 |
| V5.3 Análisis químico por EDS..... | 50 |
| V.5.4 Análisis mapeo químico..... | 55 |
| V.5.5 Difracción de rayos X (DRX)..... | 61 |
| V.5.6 Espectrometría de Rayos infrarrojos (FTIR..... | 64 |
| VI Discusión de resultados..... | 67 |
| VI .6.1 Discusión..... | 68 |
| VI.2 Conclusiones..... | 69 |
| Referencias bibliográficas | 70 |

Resumen.

Los bifosfonatos son fármacos de primera elección en el tratamiento de la osteoporosis, debido a su eficacia también se han combinado con otros fármacos para el tratamiento de otras patologías como las metástasis óseas, osteopenia, y trastornos como la enfermedad de Paget, la artritis reumatoide. La forma de unión de los bifosfonatos a la hidroxiapatita es la base para la absorción de este tipo de compuesto en el hueso; los cuales debido a su composición química, tienen una alta afinidad de unión al calcio. Después de su administración, los bifosfonatos son absorbidos y desaparecen rápidamente de la circulación mediante la unión con el hueso. Sin embargo, a pesar de su eficacia, en los últimos años se han reportado efectos secundarios y complicaciones asociadas con su uso lo cual puede producir un impacto muy significativo sobre la salud de los pacientes destacando, entre las complicaciones más importantes la osteonecrosis del maxilar superior e inferior.

En esta investigación se analizaron dos muestras de hueso de la mandíbula, una muestra de hueso sano y la otra a hueso necrótico inducido por bifosfonatos. Ambas muestras fueron sometidas a un estudio comparativo de la estructura y composición química con el fin de encontrar diferencias significativas atribuibles a la acción de los bifosfonatos administrados.

Para llevar a cabo este análisis se usaron técnicas de microscopía óptica (MO) y microscopía electrónica de barrido (SEM), las características químicas se determinaron por espectroscopía de energía dispersiva de rayos x (EDS), difracción de rayos x (DRX) y espectroscopía infrarroja (FTIR). Las muestras se analizaron tal y como se recibió la muestra, en bloque pulido y en polvo.

Por lo tanto, los resultados obtenidos en este trabajo de tesis indican que las diferencias entre el hueso necrótico y el hueso sano se presentan mas a nivel de superficie que a nivel volumétrico (aquí por efectos a nivel superficial queremos indicar la superficie de contacto entre los bifosfonatos y el hueso; así, por ejemplo, en un material poroso toda la pared del poro presentara los efectos producidos por los bifosfonatos, no así el material inter-poro o volumétrico) tal como lo indican los análisis de EDS, los análisis de difracción de rayos X y los resultados de FTIR realizados en las muestras en polvo: todos presentan el mismo comportamiento.

Introducción

La osteoporosis fue definida en 1991 como "una enfermedad esquelética sistémica, caracterizada por baja masa ósea y deterioro en la microarquitectura del tejido óseo que origina su fragilidad, aumentando el riesgo de fractura". Esta definición implica un concepto cualitativo de alteración de la arquitectura ósea y uno cuantitativo relacionado con la densidad ósea.¹

A esta enfermedad se le consideraba propia de la tercera edad. En la antigüedad fue conocida por Hipócrates; sin embargo, en los últimos cincuenta años se le ha conferido mayor importancia debido a la elevada magnitud del problema. A nivel poblacional, se le considera una enfermedad crónica, especialmente en mujeres mayores de 65 años. Conforme avanza la edad, todo individuo pierde masa corporal, y en mujeres posmenopáusicas el riesgo de presentar osteoporosis oscila entre 40 y 50%. Según datos reportados, en México el 17% de las mujeres y el 9% de los hombres mayores de 50 años presentan osteoporosis, por esta razón se requiere el uso de medicamentos efectivos para controlar este padecimiento, entre los cuales se encuentran los bifosfonatos.²

Los bifosfonatos inhiben el crecimiento, agregación y disolución de los cristales de calcio; presentan gran afinidad por el hueso, además de servir como base para usarse como marcadores esqueléticos en la medicina nuclear; son inhibidores de la calcificación ósea ectópica; su eficacia terapéutica guarda relación con su actividad antirresortiva, por lo que son utilizados principalmente en padecimientos con alto remodelamiento óseo tal como sucede en la enfermedad ósea de Paget, la osteoporosis y la enfermedad metastásica ósea.

Debido a estas características, la administración de bifosfonatos ha constituido un gran aporte para el control y tratamiento de estas enfermedades, y han sido utilizados con frecuencia, como de primera elección. Sin embargo, pese a su efectividad, desde el año 2002 se han reportado complicaciones asociadas a los bifosfonatos, con repercusiones de gran relevancia en la salud de los pacientes, destacando entre éstas las necrosis óseas en los maxilares.

En 2002 fue descrita por primera vez, por el Dr. Marx Ster, quien observó la aparición de una osteonecrosis del maxilar, manifestándose como hueso expuesto que no sanaba. Cuando se realizó el desbridamiento de rutina, la condición empeoró y condujo a incremento de las cantidades de hueso expuesto.

En general, los bifosfonatos poseen dos átomos de fósforo unidos a uno de carbono. Esto le confiere resistencia a la hidrólisis enzimática, permitiéndole unirse a la hidroxiapatita (HAP) e inhiben el crecimiento y la disolución de cristales. La capacidad de los bifosfonatos para inhibir la resorción del hueso, se atribuyó inicialmente a estos efectos inhibidores directos sobre la disolución de mineral. No obstante, con el desarrollo y estudios de bifosfonato cada vez más completos, quedó claro que estos efectos fisicoquímicos sobre el mineral del hueso, no explicaban completamente la inhibición de la resorción ósea. Ahora ya se sabe que los bifosfonatos también actúan directamente sobre los osteoclastos e interfieren con procesos bioquímicos para inhibir la actividad celular.

La unión del bifosfonato a la hidroxiapatita es la base para la captura selectiva de estos compuestos por el hueso. La acumulación de estos fármacos en el hueso también puede influir sobre el comportamiento cristalino de una manera que contribuya a sus acciones farmacológicas⁴.

En esta investigación, se estudiaron dos muestras de hueso maxilar de la zona retromolar, ambas donadas por diferentes pacientes, una de hueso necrótico inducido por bisfosfonatos y la otra correspondiente a hueso sano, Dichas muestras fueron sometidas a un estudio comparativo de estructura y composición química, con el objetivo de encontrar diferencias entre ambos tipos de hueso.

Para llevar a cabo estos estudios se recurrió a la microscopia óptica (MO), a la microscopia electrónica de barrido (SEM), las características químicas se obtuvieron mediante análisis químico por Espectroscopía por Dispersión de Energía de rayos X características (EDS), análisis de difracción de rayos X (DRX), espectroscopia infrarroja (FTIR).

Planteamiento del problema

Los bifosfonatos son medicamentos de primera elección para el tratamiento de la osteoporosis. Debido a su efectividad terapéutica se han combinado con otros fármacos para el tratamiento de metástasis ósea, desórdenes osteopénicos como la artritis reumatoide y la enfermedad ósea de Paget.

Los bifosfonatos son potentes inhibidores de la actividad osteoclástica, que al actuar sobre estas células van a causar una disminución en la resorción ósea.

Por su composición química, los bifosfonatos presentan una alta afinidad de unión con el calcio y se unen al hueso; esta característica condiciona el depósito del fármaco en la matriz mineralizada. En 2002 se dio alerta de un efecto secundario a la terapia con dichos medicamentos utilizados en algunos pacientes, debido a que se estima que la osteonecrosis suele presentarse en pacientes que han tomado bifosfonatos orales durante más de tres años, con un tiempo medio de consumo entre cinco y seis años, mientras que el tiempo de utilización de los pacientes con osteonecrosis, en relación con los bifosfonatos intravenosos, puede ser inferior a un año.⁵

La osteonecrosis inducida por bifosfonatos se puede presentar posterior a la realización de algún procedimiento odontológico, como puede ser después de una exodoncia, cirugía endodóntica o periodontal, e incluso por pequeñas lesiones de la mucosa gingival. No existe consenso actualmente acerca de la definición de esta entidad patológica, pero entre las varias definiciones que se manejan actualmente, se coincide en que se trata de la exposición de hueso dentro de la cavidad oral, que no se resuelve dentro de las 6-8 semanas de terapia conservadora.

El incremento del uso de los bifosfonatos ha causado aumento de los casos de necrosis ósea mandibular, y en menor medida del maxilar, los cuales son de difícil solución y con una importante afectación de la calidad de vida de los pacientes, que son o fueron tratados con estos fármacos. Fuentes médicas señalan que entre el grupo de mujeres postmenopáusicas, en los últimos años han aumentado los problemas bucodentales causado por el uso indiscriminado de bifosfonatos.⁶

El diagnóstico de un número significativo de necrosis de maxilares en pacientes tratados con bifosfonatos, es un tema que desde hace tiempo se aborda en congresos y reuniones científicas de los profesionales en la salud bucal, sin embargo, los bifosfonatos por sus propiedades curativas, los hacen ser medicamentos de primera línea, avalados por autoridades internacionales (Consenso SAO-AAOMN de 2004),⁷ debido a esto lo que se requiere realizar un mayor número de investigaciones, actualizando e informando sobre el mecanismo de acción, debido a su gran afinidad de adhesión a la fase mineral del hueso maduro y los efectos colaterales indeseables.

Es necesario determinar la capacidad de los bifosfonatos para inhibir el crecimiento mineral, su afinidades de unión a la hidroxiapatita y su efectos sobre las propiedades de la superficie ósea, por lo es necesario ser objeto de una mayor investigación, para establecer su relación y comportamiento, en cuanto a las diferencias estructurales y químicas, entre hueso sano y necrótico inducido por bisfosfonatos.

Justificación

En 2003³ se reportaron los primeros casos de osteonecrosis de maxilar y mandíbula, asociado al uso de bifosfonatos; actualmente es una condición patológica de mal pronóstico y una incidencia cada vez más alta en el ámbito odontológico. Se puede llegar a la conclusión de que es necesario someter a diversos análisis las muestras del hueso sano y hueso necrótico inducido por bifosfonatos, con la finalidad de conocer el comportamiento cristalográfico, químico y estructural, derivando la afinidad de la hidroxiapatita con dichos bifosfonatos.

La información generada contribuirá a futuras investigaciones en el área biomédica, cristalográfica, química, prescindibles o indispensables para establecer la causa, y minimizar la incidencia de dicha alteración que se puede presentar resultando como efecto secundario a la administración de tan eficaz medicamento.

Hipótesis

Las características químicas y estructurales del hueso necrótico inducido por bifosfonatos son diferentes a las del hueso sano.

Objetivos:

General

- Establecer la existencia o no de las diferencias estructurales y químicas entre el hueso maxilar necrótico inducido por bifosfonatos y el hueso maxilar sano.

Específicos

- Establecer el análisis estructural comparativo entre hueso necrótico inducido por bifosfonatos y hueso sano.
- Identificación de diferentes elementos presentes en hueso sano y en hueso necrótico.
- Determinar las diferencias en el comportamiento térmico de la hidroxiapatita de hueso necrótico con el hueso sano.
- Relacionar los datos estructurales y químicos obtenidos de ambas muestras.

I. Bifosfonatos

Historia de los bifosfonatos

Los bifosfonatos son conocidos desde mediados del siglo XIX con el nombre de difosfonatos, utilizándose por primera vez en 1865 para el tratamiento de una enfermedad ocupacional industrial denominada *Phossy jaw*⁸. Las primeras síntesis de difosfonatos fueron en 1897 y se utilizaron con propósitos industriales para evitar la corrosión, de los fertilizantes y oleazas en la industria textil⁸.

Apropiadamente denominados bifosfonatos en la literatura actual, todos estos compuestos contienen dos grupos de ácido fosfórico en el mismo carbono. Las características comunes de los bifosfonatos es que son análogos del pirofosfato, en los cuales el oxígeno de la unión P-O-P resultan en una unión P-C-P haciéndolos resistentes a la hidrólisis química y enzimática.⁹

Su reutilización comienza a principios de la década de 1960 en la división de detergentes de Procter & Gamble (P&G), en donde la compañía estaba buscando mejores aditivos para usar en regiones con aguas duras. Los bifosfonatos se mostraron muy promisorios debido a su alta afinidad por Ca^{2+} y Mg^{2+} , los principales iones causantes de problemas en el agua dura.¹ Sin embargo, muy pronto los beneficios médicos potenciales eclipsaron el valor del etidronato (EHDP por sus siglas en inglés) en los detergentes, y el escenario cambió a la vecina división de productos dentales de P&G. Desde mediados de la década de 1950, la compañía había comercializado pastas dentales con fluoruro (por ejemplo, Crest) que forman una película protectora de CaF_2 y $\text{Sn}_3(\text{PO}_4)_2$ sobre el esmalte de los dientes. Para la década de 1960, los trabajos se habían dirigido a la remoción de la acumulación de sarro (cálculo) sin dañar el esmalte dental. Los investigadores sabían que se enfrentaban a un reto difícil, porque el sarro y el esmalte son principalmente hidroxiapatita $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$, abreviado (HA); probaron el etidronato (EHDP), pero descubrieron que el compuesto no disuelve los depósitos de sarro.

El EHDP y sus familiares no fueron relegados únicamente al control de residuos de jabón, ya que se observó que no disuelve el sarro existente, pero puede impedir que ocurra la acumulación de sarro. Las investigaciones demostraron que EHDP forma una película superficial delgada de hidroxiapatita, la cual bloquea el crecimiento adicional de cristales e impide que el cálculo se deposite sobre los dientes. Este hallazgo inspiró la investigación del ácido-base fundamental y los equilibrios de solubilidad de EHDP.

De particular importancia resultaron los estudios con EHDP, marcado con ^{14}C , demostrando que el compuesto experimenta una fuerte quimisorción en la HA sólida, apareciendo una explicación de los efectos aparentemente opuestos del EHDP sobre la solubilidad de la hidroxiapatita, ya que en la fase de nucleación, la quimisorción incrementa la solubilidad de la HA, impidiendo el crecimiento adicional de cristales (es decir, impide la acumulación de sarro); pero la quimisorción sobre la HA existente, disminuye la solubilidad de la HA y esto hace que el EHDP sea inefectivo para la remoción del sarro (figural.1).

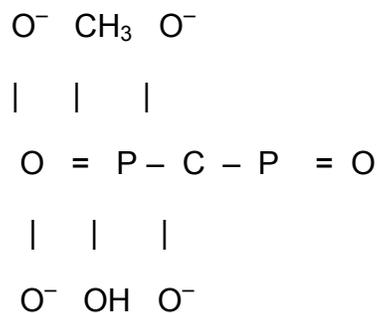


Figura I.1. Anión llamado etano-1-hidroxil-1,1-difosfonato o EHDP por Francis y Centner; hoy se conoce por su nombre comercial, Etidronato ¹⁰.

En 1966, Herbert Fleisch investigó la deposición no deseada de fosfato de calcio (calcificación) en la orina y en el tejido blando, su mismo grupo de investigación en el Instituto Suizo habían descubierto que los polifosfatos inyectados intravenosamente, podían bloquear la calcificación no deseada con un uso terapéutico limitado, debido al enlace P—O—P está sujeto a hidrólisis, especialmente “in vivo” en la presencia de enzimas fosfatasas. Obteniendo mejores resultados con el enlace P—C—P de los bifosfonatos, el cual es hidrolíticamente estable tanto “in vitro” como “in vivo” ¹⁰.

Estudios realizados en animales demostraron que los bifosfonatos podían impedir la calcificación no deseada del tejido blando, una consecuencia del incremento de la solubilidad de HA en la fase de nucleación.³

A principios de la década de 1970, pruebas clínicas mostraron que el EHDP era efectivo en el tratamiento de la enfermedad de Paget, un trastorno de los huesos caracterizado por pérdida rápida de hueso y aposición ósea anormal. Estudios

toxicológicos concurrentes demostraron que el EHDP tiene una toxicidad muy baja a niveles terapéuticos, y que no es teratogénico, mutagénico ni carcinogénico.¹¹

A mediados de la década de 1970 surgió otra aplicación de los bifosfonatos. En la presencia de estaño (II): el complejo de EHDP con tecnecio 99 se acumula en tumores óseos, lo cual es de utilidad como herramienta de diagnóstico.¹²

En los últimos años han sido sintetizados numerosos bifosfonatos, mediante variaciones de los sustituyentes en los carbonos, los cuales se han clasificado como de primera generación (etidronato), segunda generación (tiludronato, clodronato, pamidronato) y de tercera generación (alendronato, risedronato) (figura.1.2). El etidronato inhibe tanto la resorción ósea como la mineralización; no obstante, los bisfosfonatos de tercera generación son hasta 500 veces más potentes y selectivos que el etidronato.

Berenson (1998) observó que el uso de pamidronato mejoraba la supervivencia y disminuía las complicaciones óseas. Este y otros estudios llevaron a difundir el uso de estas drogas de forma indefinida¹³. Estos compuestos poseen especificidad para el hueso, gracias a su elevada afinidad de unión por los fosfatos de calcio, la unión de los bisfosfonatos a los fosfatos de calcio en el hueso, inhibe la formación y agregación de cristales de hidroxiapatita y disminuye la disolución de estos cristales¹⁴.

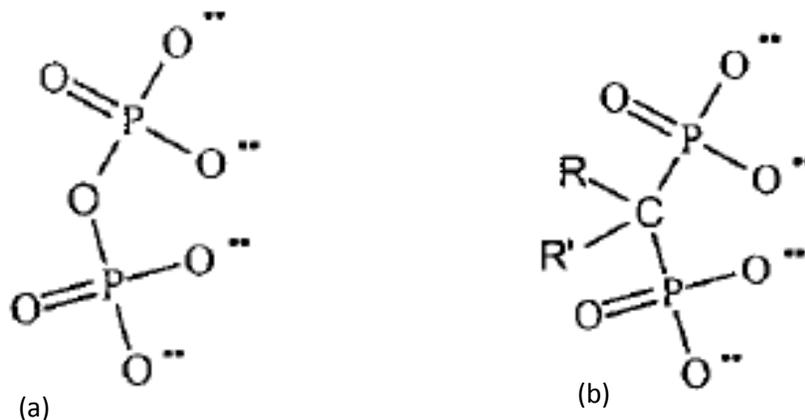


Figura 1.2. Estructura de la molécula de pirofosfato (a) y de los bisfosfonatos (b)

Clasificación de los bifosfonatos

Se han propuesto dos mecanismos moleculares básicos, responsables de los efectos de los bifosfonatos sobre la función osteoclástica, que permiten su clasificación:¹⁵

A. No nitrogenados: Con residuos más cortos en posición R1 y R2, estructuralmente son más semejantes al pirofosfato (ej.: clodronato, etidronato); pueden formar análogos inactivos de ATP. Esta vía es catalizada por una aminoacyl-tRNA sintetasa de ubicación citoplasmática; por lo tanto, para su acción los bifosfonatos deben ser internalizados a la célula, donde al acumularse inhiben ciertas enzimas intracelulares, con efectos en la función y supervivencia del osteoclasto.

B. Nitrogenados: Con residuo amino (ej.: pamidronato, alendronato, ibandronato, zolendronato, etc.) no son metabolizados, sino que ejercen su acción impidiendo la biosíntesis de compuestos isoprenoides, esenciales en la regulación de procesos celulares influyentes en la función y supervivencia del osteoclasto.

Ambos grupos con llevan a la muerte celular programada del osteoclasto (apoptosis). Los bifosfonatos que no contienen nitrógeno, considerados de primera generación, se unen a moléculas de ATP que, incorporada en osteoclastos, llegan a ser citotóxicas para estas células, alterando la función celular y produciendo su apoptosis.

1. Etidronato

Clodronato

Tiludronato

Los bifosfonatos nitrogenados, llamados de segunda y tercera generación, son más potentes que los anteriores e inhiben a la farnesil pirofosfatasa sintasa.¹⁵

2. Alkyl-amino bisfosfonatos

Pamidronato

Alendronato

Ibandronato

3. Heterocíclicos

Risedronato

Zolendronato

Etinodrato

Es un análogo sintético del pirofosfato, que se utiliza en el tratamiento de la enfermedad de Paget moderada o severa, en la osificación heterotópica y en la hipercalcemia asociada a neoplasias malignas. En la enfermedad de Paget, el etidronato se reserva para los pacientes con dolor moderado a severo.

El etinodrato es un bifosfonato no aminado que se administra por vía oral en ciclos quincenales cada tres meses; su efecto es menor que el de otros bifosfonato; en los pacientes con hipercalcemia asociada a cáncer, se le aplica por vía intravenosa.¹⁶

Tiludronato

El tiludronato también se usa para tratar la enfermedad ósea de Paget. Actúa previniendo la degradación de los huesos y aumentando su densidad, se administran por vía oral, por lo general; se toma con el estómago vacío una vez al día, durante tres meses.

Clodronato

Es un análogo del pirofosfato natural; se administra como infusión intravenosa: la solución preparada debe infundirse durante un periodo mínimo de dos horas en días sucesivos hasta conseguir la normocalcemia, lo cual suele ocurrir en un plazo de cinco días. Normalmente no se debe prolongar este tratamiento más de siete días. Se utiliza en el tratamiento de la hipercalcemia secundaria a neoplasias malignas. Su administración es por vía oral. Una vez penetrado en hueso, el alendronato queda fijado en este tejido por un periodo de más de 10 años.

Pamidronato

Se utiliza para el tratamiento de la hipercalcemia, de las lesiones osteolíticas asociadas con el cáncer y para la enfermedad de Paget sintomática de grado moderado a severo, donde reduce el dolor de origen óseo y mejora los parámetros bioquímicos; ha demostrado ser efectivo para prevenir la pérdida ósea trabecular y cortical en pacientes con osteoporosis inducida por corticoides, la dosis y la vía de administración están relacionadas con la condición metabólica del paciente. En osteoporosis se recomienda dos capsulas por día en forma continua; los mejores resultados se obtiene en periodos largos de 3 o 4 de referencia; en la mayoría de los casos es suficiente un período de tratamiento de 6 meses; el tratamiento de las recaídas puede requerir dosis mayores a las halladas efectivas en el primer ciclo o puede ser necesario optar por la vía intravenosa de administración; en osteolisis malignas, hipercalcemia severa se recomienda comenzar con la vía intravenosa.

Alendronato

Además de prevenir la pérdida ósea, origina su endurecimiento; a diferencia del etidronato no inhibe la mineralización ósea; una dosis oral de 10 mg es tan eficaz como la dosis de 1500 mg de etidronato. Está indicada en el tratamiento de osteoporosis, hipercalcemia asociada como la osificación maligna y heterotópica o en la enfermedad de Paget, en osteoporosis inducido por corticoides, el fármaco no se metaboliza, sino que es rápidamente aclarado del plasma, disminuyendo las concentraciones del plasma en un 95% en un plazo de 6 horas. Una vez fijado al hueso, queda fijado en este tejido por un periodo de 10 años .

Ibandronato

Sus beneficios son sobre el riesgo de fractura vertebral en las mujeres postmenopáusicas, en la osteoporosis glucocorticoidea, en el tratamiento de la hipercalcemia asociada con el cáncer. La aplicación por vía intravenosa en solución inyectable se debe de administrar en una vena una vez cada 3 meses, la dosis oral recomendada es de un comprimido de 150 mg una vez al mes, preferentemente el mismo día de cada mes.

Risedronato

Se emplea en el tratamiento y prevención de la osteoporosis posmenopáusica, asociada con el uso de glucocorticoides y de la enfermedad de Paget. En las mujeres postmenopáusicas y en mujeres mayores de 60 años; demostró reducción en el riesgo de fracturas vertebrales y no vertebrales. El risedronato se toma con el estómago vacío una vez al día por la mañana, una vez a la semana por la mañana, una vez al mes por la mañana o una vez al mes por 2 mañanas consecutivas, según la afección que tenga y la dosis que su médico le recete. Se toma el mismo día de cada semana o mes, o los mismos dos días consecutivos de cada mes.

Zoledronato

Está indicado en el tratamiento de la hipercalcemia asociada al cáncer y en prevención de efectos adversos óseos producidos por neoplasias que afecten los huesos; sin embargo, el zoledronato no está aprobado para el tratamiento de osteoporosis.

La dosis recomendada en procesos malignos avanzados 4 mg vía intravenosa diluido en 100 ml de cloruro de sodio durante 15 minutos¹⁷; los bifosfonatos se diferencian de los pirofosfatos en que la molécula de oxígeno se ha sustituido por una de carbono (estructura P-C-P), lo que los hace difícilmente degradables y, por otro lado, les confiere una alta afinidad por los cristales de hidroxiapatita. Al carbono central también

se le unen dos cadenas laterales que son diferentes para cada tipo de bifosfonato y que determinan su potencia, duración de acción, efectos secundarios y otros parámetros clínicos u óseos. Los bifosfonatos más potentes poseen un grupo hidroxilo en una de sus cadenas laterales que aumenta su capacidad para unirse al calcio (tabla I.1).

| |
|----------------------------|
| Etidronato: 1 |
| Clodronato: 10 |
| Tildronato: 10 |
| Pamidronato: 100 |
| Alendronato: 1000 |
| Risedronato: 5000 |
| Ibandronato: 10000 |
| Zolendronato: 20000 |

Tabla I.1. Potencia de los principales bifosfonatos en sangre ¹¹.

Aunque existen más similitudes que diferencias entre los diferentes bisfosfonatos, algunos son más utilizados para ciertas patologías. Por ejemplo, en oncología es más utilizado el pamidronato parenteral y el zolendronato, mientras que en osteoporosis los más ampliamente utilizados son el alendronato y el Risedronato ¹⁶.

La utilización clínica de los bifosfonatos continúa ampliándose desde su inicio en que fueron usados como agentes de "barrido óseo", para la detección de metástasis y otras lesiones óseas; posteriormente, su capacidad de inhibir la calcificación llevó a la aplicación del etidronato en la miositis osificante y para la prevención de osificaciones heterotópicas, su aplicación más difundida ha sido como inhibidores de la resorción ósea, en enfermedades donde la actividad osteoclástica está exacerbada como, en la enfermedad de Paget ,en metástasis de cáncer de mama, mieloma múltiple e hipercalcemia. Actualmente, diversos bifosfonatos han quedado establecidos como tratamiento efectivo para la osteoporosis posmenopáusica ¹⁴.

Mecanismos de acción y farmacocinética

El mecanismo de acción de los bifosfonatos ocurre en tres niveles íntimamente ligados entre sí:

- 1) A nivel tisular, donde el efecto principal es disminuir el recambio óseo, afectando el número y actividad de las unidades multicelulares básicas.
- 2) A nivel celular, alterando el reclutamiento, adhesión, apoptosis y actividad de los osteoclastos.
- 3) A nivel molecular, conduciendo a los efectos celulares¹⁸.

Debido a que los bifosfonatos presentan una afinidad por los sitios de recambio óseo activo, es evidente su mayor captación en placas de crecimiento, sitios tumorales, injertos óseos y gammagrafías de maxilares y mandíbulas normales; así mismo, poseen especificidad por el hueso, haciendo que la disolución de los cristales de hidroxiapatita sea más lenta. Son derivados del pirofosfato; el átomo del oxígeno se sustituyó por el de carbono y dos valencias libres del carbono R y R¹, donde R es generalmente un hidroxilo y el R es una cadena hidrocarbonada. Debido a su carbono, en sustitución del oxígeno en la cadena principal de la molécula, los bifosfonatos son completamente resistentes a la descomposición hidrolítica, de ahí su acumulación en la matriz ósea y su vida media extremadamente larga. Cabe señalar que la sustitución de cadenas laterales que contienen nitrógeno en el carbono de la cadena principal de los bifosfonatos, incrementa la potencia y tal vez la toxicidad¹⁶.

La unión a la hidroxiapatita puede realizarse de dos formas: bidentada (un átomo de oxígeno de cada grupo fosfato se une al calcio de la hidroxiapatita; por ejemplo, clodronato; o bien, tridentada, además de las dos uniones se une por el grupo hidroxilo radical R del carbono central. Esta unión es más fuerte y sus efectos fisicoquímicos explican el mecanismo por el cual los bifosfonatos inhiben la mineralización ósea, ya que el radical R es el que determina básicamente la potencia antirresortiva del fármaco, la cual aumenta con la longitud de la cadena hidrocarbonada. La existencia de una amina primaria (pamidronato y alendronato) aumenta la potencia y la metilación del grupo amino o la inclusión de un heterociclo; (ibandronato, zolendronato) la aumenta todavía más.

El radical R¹ es el que determina la potencia antirresortiva, la cual aumenta con la cadena hidrocarbonada (figura I. 3).

Hasta hoy se sabe que solo los bifosfonatos que contienen nitrógeno producen osteonecrosis de los maxilares.¹⁹

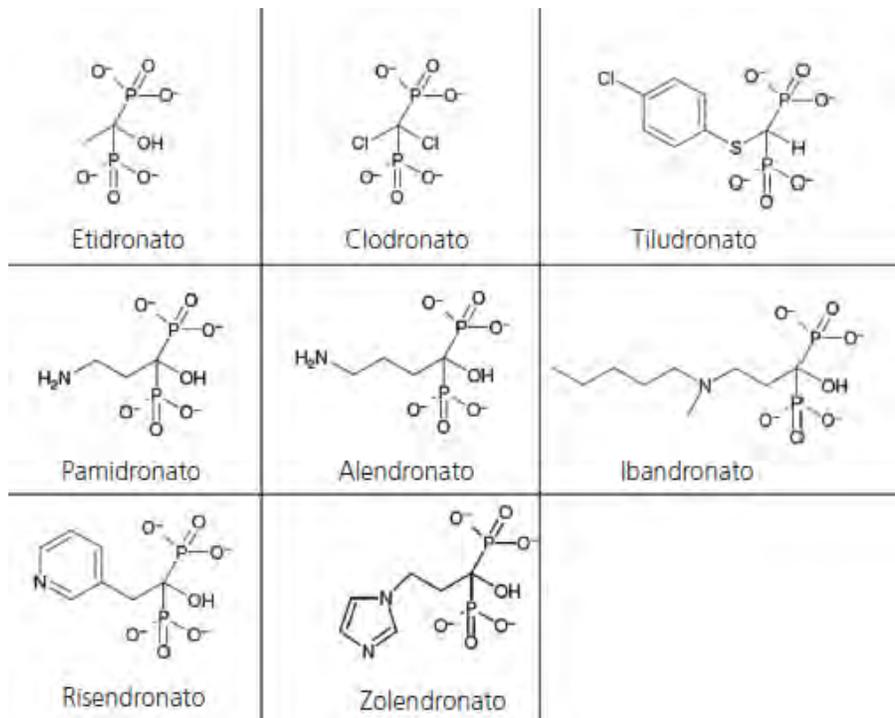


Figura I.3. Estructura química de los diferentes bisfosfonatos ¹⁵ .

Osteonecrosis de los maxilares

Los primeros informes de osteonecrosis de los maxilares inducida por bisfosfonatos, fue descrita por Marx Stern en 2002, quien observó unas lesiones con hueso expuesto que no sanaban, cuando se realizó el desbridamiento, la condición empeoró y condujo a incremento de mas área de hueso expuesto, todos los pacientes descritos en ese informe estaban recibiendo pamidronato (Aredia, Novartis) para el control de depósitos de tumor maligno en hueso. Se reportó acerca de esa complicación del fármaco en una alerta médica publicada en 2003 en el Journal of oral and Maxillofacial Surgery (JOMS)³.

La historia de la enfermedad (aunque existen casos espontáneos), inicia con una alveolitis postexodoncia, que no responde a tratamientos indicados y progresa hacia una osteomielitis, con secuestros óseos, exposición ósea, inflamación y supuración que persiste durante más de 8 semanas en un paciente que ha tomado o que actualmente toma un bifosfonato y que no tiene una historia de terapia por radiación de los maxilares. Con frecuencia en estos casos se realizan biopsias para descartar metástasis óseas o tumores maxilares óseos primarios, pero al intentar cubrir esas áreas se fracasa, aunque se haya llevado a cabo una meticulosa regularización o resección ósea y cierre con colgajos mucosos locales; clínica y radiológicamente, las lesiones recuerdan a las de la osteoradionecrosis, con secuestros (formados espontáneamente o después de procedimientos invasivos) que pueden complicarse con infecciones secundarias. Sin embargo, aunque el hueso expuesto en efecto está muerto (osteonecrosis), la muerte del hueso realmente es un resultado secundario de la toxicidad ósea por bifosfonatos.

Su patogenia radica en la interrupción de la actividad remodeladora osteoclástica y del recambio celular óseo, que es agravada por una insuficiencia vascular localizada como consecuencia de cambios isquémicos, la inhibición es parcial en el caso de bifosfonatos orales, produciéndose osteonecrosis raramente y sólo en casos de altas dosis acumuladas tras largos periodos. Si se administran vía intravenosa, la inhibición osteoclástica es irreversible, produciéndose su apoptosis, esta entidad es característica de los huesos maxilares, debido a que estos fármacos tienen afinidad por estos huesos, debido a su aporte vascular y gran actividad de remodelación ósea alrededor del ligamento periodontal.

Otros factores incluyen el escaso espesor de la mucosa maxilar y la frecuente “agresión” a la que se ve sometido el hueso en forma de procedimientos quirúrgicos u odontológicos invasivos, así como distintos factores traumáticos (por ejemplo: prótesis

desajustadas), provocando lesiones ulcerativas y estableciendo una vía de comunicación entre el medio bucal y el hueso, hacen que predomine en maxilar superior, pero también se presenta en maxilar inferior.²¹

Así como también se debe considerar la anatomía de los maxilares ya que se encuentran relacionados a través del ligamento periodontal con los dientes; de la cual están separados por no más de 0,5 mm de tejido conectivo denso, esto hace posible que los mecanismos y vías de propagación de las infecciones de origen dental y periodontal marginal sigan en muchos casos la vía ósea, de tal manera que los huesos maxilares están directamente expuestos a procesos infecciosos relacionados a los dientes (necrosis pulpar séptica y procesos periapicales, agudos o crónicos) y de sus tejidos blandos de sostén (enfermedad periodontal), siendo esta condición de “exclusividad” en relación con los otros huesos, que obviamente no poseen dientes. Otro factor anatómico, que podría explicar la especial predilección por la maxilar; sería la irrigación vascular de tipo terminal.²¹

La función osteoclástica es parte fundamental de este ciclo, ya que al reabsorberse matriz ósea mineralizada, se liberan citoquinas tales como proteínas morfogenéticas y factores de crecimiento, los cuales inducen a células totipotenciales mesenquimáticas y osteoblastos premitóticos a diferenciarse en osteoblastos y formar tejido óseo nuevo.

La interrupción de este ciclo homeostático por la interrupción de la reabsorción ósea, resulta en la acumulación de osteocitos no vitales y en microfracturas de la matriz ósea mineralizada.

En casos de altas dosis acumuladas tras largos periodos, si se administran vía intravenosa, la inhibición osteoclástica es irreversible, produciéndose su apoptosis.²³

De vez en cuando se han observado signos radiográficos tempranos, incluyendo esclerosis de la lámina dura, pérdida de la lámina dura y/o ensanchamiento del espacio del ligamento periodontal, particularmente en asociación con dientes molares²⁴.

En cuanto a la rapidez del remodelado de los huesos maxilares, se ha observado que la cresta alveolar se remodela con una rapidez que es 10 veces la de la tibia, 5 veces la del maxilar inferior al nivel del su conducto y 3.5 veces a la del borde inferior, el hueso alveolar depende más de la resorción-remodelación y renovación ósea osteoclástica que cualquier otro hueso en el esqueleto adulto, además de poseer características únicas, ya que está revestido por mucoperiostio; adicionalmente aloja a los dientes que transmiten toda la carga que reciben de la función y parafunción, ya que están unidos al ligamento periodontal, que a su vez constituye una vía de comunicación entre el hueso alveolar y la cavidad oral, además de poseer gran variedad de flora bacteriana;

estas son condiciones que ayudan a que los bifosfonatos se concentren en mayor cantidad en estos huesos.²⁵

Antes de la publicación de esta alerta médica (Marx Stern en 2002)³, representantes de Novartis^R el cual produce los dos bifosfonatos intravenosos (pamidronato y zoledronato), que causan esta forma de osteonecrosis, fueron invitados a examinar a dos de los pacientes y a discutir los otros 34 casos existentes. Si bien expresaron inquietud acerca de la situación de estos pacientes, los representantes de Novartis^R negaron la posibilidad de que la osteonecrosis estuviera conectada de alguna forma con sus fármacos, debido a que en sus estudios preclínicos en animales, ni en los más de tres mil seiscientos pacientes enrolados en sus estudios clínicos humanos se encontró ninguna evidencia de necrosis ósea. Atribuyeron las exposiciones óseas a la quimioterapia que habían recibido estos pacientes y posiblemente a la dexametasona que se había administrado a aproximadamente el 55% de los pacientes.

Irónicamente, la evidencia más fuerte hasta la fecha de una relación causa y efecto entre los bifosfonatos y la osteonecrosis de los maxilares, la proporcionan los resultados de un estudio de Novartis^R, realizado para obtener la aprobación para la comercialización por la Administración de Alimentos y Drogas (FDA). En este estudio, pacientes con metástasis ósea recibieron su quimioterapia normal solamente o quimioterapia más un régimen de esteroides y un bifosfonato intravenoso (aredia o zometa). Pacientes con las mismas malignidades sin metástasis ósea también recibieron su quimioterapia normal y un régimen de esteroides idéntico, pero no recibieron bifosfonatos intravenosos. Resultó interesante descubrir que sólo los pacientes que recibieron un bifosfonato intravenoso desarrollaron alguna vez hueso expuesto. Este fue uno de los estudios mejor aleatorizados, controlados y realmente en doble ciego en la historia de la medicina o la odontología.²⁶

Aunque el texto de Marx y Stern tiene el crédito de haber identificado por primera vez la osteonecrosis de los maxilares inducida por bifosfonatos, existen indicios que la misma enfermedad pudo haber sido reconocida hace más de 100 años como una enfermedad ocupacional industrial denominada *Phossy jaw*. Según se informó, mineros de fosfatos y obreros de fábricas de cerillos en los Estados Unidos y Gran Bretaña desarrollaron exposiciones óseas que no sanaban sólo en la boca, relacionadas con el tiempo que trabajaron en la mina (figura I.4). Es probable que esta exposición diaria crónica a los fosfatos en el medio ambiente, causara una acumulación de compuestos de bifosfonato en el hueso, produciendo finalmente la misma



enfermedad clínica que ahora se relaciona con terapias médicas con bifosfonatos⁸.

Figura I.4. Imagen Phossy jaw, enfermedad común en trabajadores de la industria del fósforo en los años 1840-1919. Referencia ²⁷.

Recientemente, se han descrito casos de osteonecrosis mandibular y maxilar en pacientes sometidos a tratamiento crónico con bifosfonatos. Hasta el momento tres han sido los fármacos implicados: pamidronato de disodio, ácido zoledrónico y alendronato de sodio. Se trata de un efecto secundario muy poco frecuente, no detectado en ensayos clínicos precomercialización, que repercute de forma significativa en la calidad de vida de estos pacientes. La mayoría de los casos se dan en pacientes oncológicos que reciben tratamiento antineoplásico concomitante a largo plazo y muchos de ellos estaban sometidos a tratamiento intermitente con esteroides a corto plazo, junto a los bifosfonatos vía endovenosa, para el tratamiento del cáncer y de los síntomas ^{21,22}.

Los bifosfonatos están adquiriendo una relevancia terapéutica cada vez mayor, dada su utilidad en el manejo de diversas patologías²⁷. Con el incremento de su uso, se están

documentando casos de necrosis maxilar ósea de difícil solución y con una importante afectación de la calidad de vida de los pacientes en tratamiento con estos fármacos. El factor que con mayor frecuencia desencadena el proceso es la actuación de los profesionales: odontólogos, estomatólogos y cirujanos maxilofaciales, en tratamientos traumáticos. La previsión e intervención conservadora, parecen ser los medios más adecuados para minimizar la incidencia o resolver las complicaciones ²⁸.

Las pruebas diagnósticas que ayudan a detectar la necrosis mandibular, además de la historia clínica son:

1. Estudio histopatológico del hueso expuesto.
2. Cultivo antibiograma.
3. Estudios radiográficos: ortopantomografía y tomografía computarizada

Los pacientes con esta afección requieren de prolongados tratamientos con antibiótico, siendo de gran utilidad determinar el espectro bacteriano determinando la sensibilidad a los diferentes antibióticos de los microorganismos presentes. Los estudios radiográficos ayudaran a valorar la extensión de la zona osteolítica, así como márgenes clínicos mal definidos de la lesión (fig 1.5).

Ruggiero y colaboradores en el año de 2007, proponen tres estadios clínicos de la osteonecrosis, los cuales se pueden clasificar de acuerdo con las características clínicas presentes(tabla I. 2) ²¹.

| | |
|------------------|---|
| <i>Estadio 1</i> | <i>Exposición ósea. Hueso necrótico. Asintomático. No hay evidencias clínicas de infección.</i> |
| <i>Estadio 2</i> | <i>Exposición ósea. Hueso necrótico. Dolor e infección de los tejidos blandos/hueso</i> |
| <i>Estadio 3</i> | <i>Exposición ósea. Hueso necrótico. Dolor, infección y uno o más de estos signos: fractura patológica, fístula extraoral u osteolisis que se extiende al borde inferior.</i> |

Tabla I.2. Estadios clínicos propuestos por Ruggiero et al ²¹.



Figura I .5. A. Radiografía panorámica, donde se observa la destrucción ósea. B) Presencia clínica exposición ósea. C) Obtención quirúrgicas de la muestra. D) Hueso necrótico inducido por bisfosfonatos.

II Hueso e hidroxapatita

Histología del hueso

El tejido óseo es una variedad de tejido conjuntivo, que se caracteriza por su rigidez y su gran resistencia tanto a la tracción como a la compresión, conformada por una porción mineral y otra orgánica.

Su composición química es de un 25% de agua, 45% de minerales como fosfato y carbonato de calcio 30%, de materia orgánica, principalmente colágeno y otras proteínas.

El componente orgánico está formado de un 85 a 90% de colágeno tipo I y un 10 a 15% de otras proteínas como proteoglicanos, proteínas implicadas en la adhesión celular osteonectina, glicoproteínas ósea osteocalcina y factores de crecimiento.

El componente mineral se conoce como matriz ósea; está formada por fibrillas, las cuales forman laminillas óseas de aspecto estriado o punteado. Presenta lagunas óseas que son cavidades existentes donde se alojan las células óseas, denominadas osteocitos que se comunican entre sí, a través de canales finos de la cavidad de la matriz ósea. Las láminas del hueso compacto se disponen de forma concéntrica alrededor de unos conductos paralelos al eje longitudinal del hueso, llamados conductos de Havers los cuales contienen fibras nerviosas y vasos sanguíneos que proporcionan nutrientes orgánicos a los huesos. Los conductos de Havers están conectados entre sí, con las cavidades medulares y con el exterior por los denominados canales de Volkman. El hueso esponjoso no contiene canales de Havers, consiste en un entramado de trabéculas o laminillas óseas que se disponen de forma tridimensional, creando cavidades comunicadas, ocupadas por una red de tejido conjuntivo que recibe el nombre de tejido medular.

La matriz ósea es la responsable de las extraordinarias propiedades biomecánicas del hueso; las fibras colágenas le proporcionan flexibilidad y resistencia a la tensión, mientras que las sales minerales le confieren dureza, rigidez y resistencia a la compresión.²⁹

Tipos de tejido óseo

El tejido óseo se organiza de dos formas diferente: Tejido óseo esponjoso y tejido óseo compacto (figura II. 1)

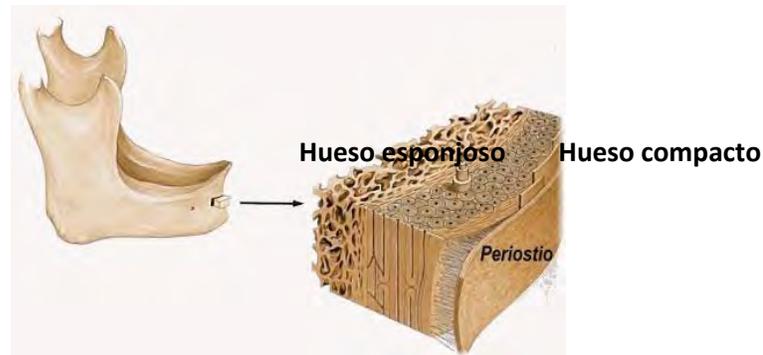


Figura II .1.Conformación de tejido óseo

Hueso esponjoso.

Está formado por delgadas trabéculas que, en los huesos ya formados, corresponden al tejido óseo laminar rodeadas por células de revestimiento óseo. Este se localiza en el interior de los huesos del cráneo, vértebras, esternón y pelvis y también al final de los huesos largos.

Su estructura está dispuesta en forma de redes similares a una esponja caracterizada por trabéculas, en donde se ubican los osteocitos, y su función es actuar como andamio que provee rigidez y soporte en la mayoría del hueso compacto. El hueso esponjoso no contiene osteonas, sino que las láminas intersticiales están de forma irregular, formando unas placas llamadas trabéculas. Estas placas forman una estructura esponjosa, dejando huecos llenos de la médula ósea roja. Dentro de las trabéculas están los osteocitos; los vasos sanguíneos penetran directamente en el hueso esponjoso y permiten el intercambio de nutrientes con los osteocitos^{29 30}.

Hueso compacto o denso

Este se localiza en porciones externas de todos los huesos y ramificaciones de los huesos largos; poseen una estructura dura y predomina matriz ósea. Aquí se localizan los osteocitos dentro de las lagunas alrededor de los conductos de Havers u osteón.

Este hueso provee rigidez y soporte, y forma una capa exterior sólida sobre los huesos, lo cual evita que sean fácilmente fracturados.

Su matriz ósea mineralizada está depositada en laminillas: entre estas se ubican las lagunas con los osteocitos (cada laguna con el osteocito es llamada osteoblasto); desde cada una se irradian canalículos, ramificados que las comunican y permiten la nutrición de los osteocitos (recordemos que esto es importante ya, que los osteocitos se encuentran rodeados de matriz mineralizada que no permite la difusión de nutrientes al osteocito). Las laminillas se disponen de 3 formas:

1) Concéntricamente alrededor de un canal longitudinal vascular (llamado conducto de Havers), que contiene capilares, vénulas y a veces arteriolas, formando estructuras cilíndricas llamadas osteonas o sistemas haversianos visibles al microscopio óptico. Los canales haversianos comunican entre sí con la superficie o la cavidad medular por canales transversales u oblicuos llamados canales perforantes o de Volkman, que poseen vasos que vienen del periostio y del endostio más grande que los de las osteonas que comunican entre ellas.

2) Entre las osteonas se disponen de forma angular, formando los sistemas intersticiales separados de las osteonas por las llamadas líneas de cemento (capas de matriz ósea pobres en fibras colágeno que no son atravesados por estos canalículos, o sea que no poseen elementos vasculares, todo esto es observable al microscopio óptico).

3). Por debajo del periostio, y del endostio se ubican alrededor de la circunferencia del tallo de forma extendida las laminillas circunferenciales externas e internas (paralelas a la superficie).

Los minerales de los huesos no son componentes inertes ni permanecen fijos, sino que son constantemente intercambiados y reemplazados junto con los componentes orgánicos, en un proceso que se conoce como remodelación ósea. Su formación y mantenimiento está regulada por hormonas y alimentos ingeridos, que aportan vitaminas de vital importancia para su correcto funcionamiento²⁹.

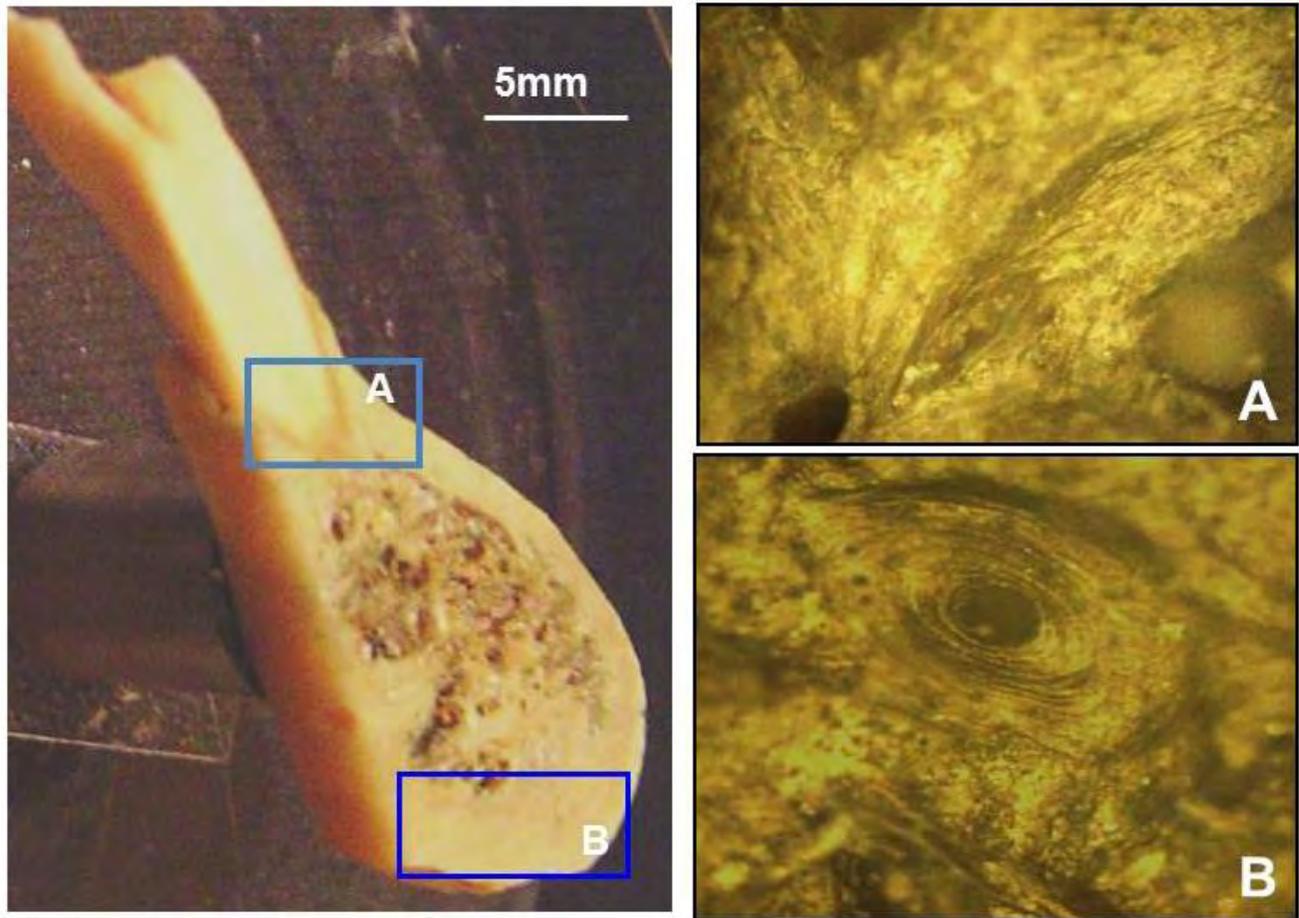


Figura II.2. Se muestra corte de sinfisis mandibular. A) Imagen de microscopía de luz donde se observa conducto haverisano .B) Sistema haverisano, conductos Volkmann,laminillas óseas y canaliculos ³⁵ .

Células del tejido óseo

Célula osteoprogenitora

Las células osteoprogenitoras o células madre ósea son células indiferenciadas que preceden de las células mesenquimatosas. Durante la formación de los huesos, estas células sufren división y diferenciación a células formadoras de hueso (osteoblastos) y secretan matriz ósea. Se localizan en el periostio endostio y en los canales perforantes y de Havers, mientras que los preosteoclastos darán origen a los osteoclastos. Esta es una célula en reposo capaz de transformarse en un osteoblasto y secretar matriz ósea. Estas células se encuentran en las superficies externas e internas de los huesos (células periósticas y células endósticas). Son capaces de dividirse y proliferar y tienen la capacidad de diferenciarse a tres tipos celulares, además de los osteoblastos; estas son: adipositos, condroblastos y fibroblastos (se desconoce el origen exacto de estas células).

Osteoblastos

Surgen como diferenciación de las células osteoprogenitoras, bajo la influencia de la familia de la proteína morfogénica ósea (BMP), que posee la capacidad de inducir la formación de hueso nuevo, cartílago y tejido conjuntivo: son células mononucleares de forma cúbica, citoplasma basófilo y ricas en una isoenzima específica de la fosfatasa alcalina; dentro de sus funciones destacan: a) sintetizar el componente orgánico de la matriz ósea, b) intervenir en el proceso de mineralización, c) controlan el depósito de las sales minerales, sintetizan el colágeno y secretan la parte orgánica de la matriz ósea, ya que producen vesículas de matriz. Se ubican siempre en la superficie del tejido óseo ya que este solo puede crecer por aposición, además liberan algunos factores que son probablemente mediadores de la resorción ósea. El desarrollo de los osteoblastos se ve influenciado por distintos factores que estimulan su formación como la hormona paratiroidea y la vitamina D.

Producen el receptor RANKL (molécula importante para el metabolismo óseo), ya que es receptor para la activación del factor nuclear K-B, cuya principal función es la activación de los osteoclastos. La superproducción de RANKL está implicada en gran variedad de enfermedades degenerativas del tejido óseo, segregan también la glicoproteína osteonectina (para la mineralización ósea), osteopontina (para sellar la zona donde actúa el osteoclasto), osteocalcina (mineralización ósea), sialoproteína ósea (une osteoblastos y osteocitos a la matriz extracelular) y M-CSF (factor estimulante de colonias de macrófagos, poseen receptores de hormonas, vitaminas y citocinas, como la hormona paratiroidea que induce al osteoblasto a secretar OPGL

(ligando de osteoprotegerina) y factor estimulante de osteoclastos; estos actúan en la diferenciación de preosteoclastos a osteoclastos y en su activación, participan en la resorción ósea secretando sustancias que eliminan la osteoide (fina capa de matriz no mineralizada), exponiendo la matriz ósea para el ataque de los osteoclastos.

Los osteoblastos tienen dos destinos posibles: pueden ser rodeados por la matriz ósea que producen y pasan a ser osteocitos, o permanecen en la superficie del tejido óseo recién formado, aplanándose y constituyendo las células de revestimiento óseo. Cuando los osteoblastos entran en un estado de inactividad se les llama células de recubrimiento óseo y pueden revertirlo para secretar citocinas o matriz ósea; cuando quedan envueltas por la matriz ósea es cuando se transforman en un estadio no activo.

Osteocito:

Se localizan en el hueso formado, ya que residen en lagunas en el interior de la matriz ósea mineralizada, su forma se adapta al de la laguna y emiten prolongaciones largas que se extienden por los canalículos de la matriz ósea y esto los pone en contacto con otros osteocitos. En esas zonas de contacto las membranas forman unnexo que permite el intercambio de iones. Son similares a los osteoblastos, pero menos activos y, por lo tanto, su retículo endoplasmático y aparato de Golgi está menos desarrollado; su función es seguir sintetizando los componentes necesarios para el mantenimiento de la matriz que los rodea. Están ampliamente relacionados con la mecanotransducción (proceso de señales celulares en respuesta a los estímulos mecánicos). De esta manera reaccionan a la tensión ejercida liberando CAMP (monofosfato de adenosina cíclico, es un segundo mensajero empleado en las rutas de transducción de la señal en las células como respuesta a un estímulo externo o interno y osteocalcina y somatomedinas, lo que induce a la adición de osteoblastos para la remodelación hueso. Poseen la capacidad de sintetizar y resorber la matriz ósea, al menos en forma limitada; estas actividades contribuyen a la homeostasis de la calcemia.

El osteocito es capaz de modificar la matriz ósea circundante por su actividad sintética y resortiva; morfológicamente tiene tres estados funcionales.

- A) Osteocitos latentes poseen matriz calcificada madura.
- B) Osteocitos formativos exhiben indicios de formación de matriz.
- C) Osteocitos resortivos eliminan matriz mecanismo llamado osteolisis osteocítica.

Osteoclasto

Esta es una célula multinucleada de gran tamaño, acidófila, cuya función es de resorción ósea. Cuando el osteoclasto está en actividad, descansa directamente sobre la superficie ósea donde se producirá la resorción, como consecuencia de su actividad, inmediatamente por debajo del osteoclasto se forma una excavación poco profunda llamada laguna de resorción o laguna de Howship. Los osteoclastos reabsorben las trabéculas, van formando tejido óseo a manera de laminillas y se dispone la médula ósea definitiva, dada la menor o mayor cantidad de laminillas.

Por su origen hematopoyético, son entendidos como "macrófagos del hueso". Hasta hace poco, se creía que surgían de la fusión de varios monocitos, pero, de acuerdo con las nuevas investigaciones, se ha descubierto que tienen su origen en el sistema de fagocitos mononucleares y surgen de la diferenciación (mediada por citocinas provenientes del osteoblasto) de macrófagos, ubicados en las lagunas de Howship. Se encuentran con los núcleos cerca de su superficie lisa, mientras que la superficie adyacente al hueso presenta prolongaciones muy apretadas como una hoja delimitada por profundos pliegues (se le llama borde en cepillo o borde plegado), abundantes mitocondrias en el borde plegado: también en esta región hay lisosomas y vacuolas; rodeada de un citoplasma libre de orgánulos llamada "zona clara", con la que se adhiere a la superficie del hueso mediante integrinas, unos receptores especializados del hueso alrededor del borde plegado la membrana se une al hueso por filamentos de actina (zona de sellado donde el osteoclasto lleva a cabo su función de reabsorción). En este sitio de sellado el osteoclasto bombea protones que baja el pH (acidifica el medio): para disolver el material óseo, el interior ácido del compartimiento favorece la liberación de hidrolasas ácidas lisosomales y proteasas, como gelatinasa y colagenasa (por el aparato de Golgi, retículo endoplasmático y vesículas del borde), que eliminan las sales de calcio y degradan el colágeno y componentes orgánicos de la matriz ósea. La nutrición de los osteocitos depende de canalículos que penetran la matriz ósea y conectan a los osteocitos vecinos entre sí y con canales vasculares que penetran al hueso o que se ubican en las membranas conjuntivas que revisten las superficies del hueso (periostio y endostio) ³¹.

Osificación

Es el proceso de crear nuevo material óseo por las células llamadas osteoblastos.

Mecanismos de osificación

Existen dos procesos para formar tejido óseo normal:

1) La osificación intramembranosa

Es la formación directa de hueso en el se limita a los huesos que no tienen función de sostén estructural; por ejemplo, los huesos planos del cráneo. El hueso se forma por diferenciación de células mesenquimáticas en osteoclastos; en la osificación el mesénquima se condensa en tejido conjuntivo vascularizado en el cual las células están unidas por prolongaciones y en los espacios intercelulares depositan haces de colágena orientados al azar quedando incluidos en la matriz. La primera señal de formación ósea es la aparición de bandas de matriz eosinófila más densa que se deposita en los vasos sanguíneos que forman la red. Las células se agrandan y se reúnen sobre las trabéculas permanecen unidas por medio de prolongaciones se hacen más basófilas transformándose en osteoblasto que depositan matriz osteoide no calcificada, dando origen a nuevas laminillas de oseína (sustancia cementante amorfa, de por sí bastante rígida, secretada por osteoblastos) y a la vez se van cargando de sales de calcio. El tejido conjuntivo continúa la multiplicación de los fibroblastos y sigue formando oseína, y el pseudoepitelio continúa retrocediendo. Así, capa a capa, va formándose el tejido óseo. Las laminillas se forman a partir de un tejido que posee sustancia fundamental, fibrillas, células conjuntivas. Durante esta formación surgen dos etapas que son la aparición de sustancia cementante (oseína) y la impregnación con sales cálcica se depositan sobre la matriz extracelular. Luego se genera la primera laminilla de hueso sin calcificar, posteriormente se forma la segunda laminilla y se calcifica la primera, y así sucesivamente. A partir de la glucosa-6-fostato, llega a la zona de osificación y se desdobra por la fosfatasa alcalina (forfolilasa) en ion fosfato y glucosa. El ión fosfato, que es el de interés en el proceso, se une al ión calcio que proviene de la sangre y forma una sal: fosfato de calcio (83-88%). Una vez llega a su formación óptima, precipita en forma de cristales (hidroxiapatita). Debido al engrosamiento trabecular los osteoblastos quedan atrapados en lagunas y se convierten en osteocitos que se conectan con los osteoblastos de la superficie por medio de canalículos. El número de osteoblastos se mantiene por la diferencia de células primitivas del tejido conjuntivo laxo. Las aéreas esponjosas se convierte en hueso compacto, las trabéculas siguen engrosando hasta que desaparecen los espacios que rodean los vasos sanguíneos, las fibras de colágeno se vuelven mas ordenadas; donde persiste el hueso esponjoso termina el engrosamiento trabecular y el tejido vascular interpuesto se transforma en tejido hematopoyético, el tejido conjuntivo se transforma en periostio, los osteoblastos superficiales se trasforman en células de aspecto fibroblástico, pudiéndose transformar de nuevo en osteoblasto si son provocados. El periostio no solo genera hueso, sino también lo reabsorbe permitiendo su remodelación.

2) La osificación endocondral

Inicia con la proliferación y agrupación de células mesenquimáticas en el sitio donde se desarrollará el futuro hueso; no obstante, las células mesenquimáticas se diferencian en condroblastos que a su vez producen matriz cartilaginosa característica de esta osificación que se lleva a partir de cartílago. Los huesos, durante el desarrollo embrionario, son un molde de cartílago hialino que va siendo progresivamente reemplazado por tejido óseo.

Este tipo de osificación se puede estudiar de la siguiente manera:

1. Desarrollo del modelo cartilaginoso: En el sitio donde se formará el hueso, las células mesenquimáticas se diferencian en condroblastos, que producen una matriz cartilaginosa, de tal forma que el modelo se compone de cartílago hialino. Además, se desarrolla una membrana llamada pericondrio, alrededor del modelo cartilaginoso.
2. Crecimiento del modelo cartilaginoso: Cuando los condroblastos quedan ubicados en las capas profundas de la matriz cartilaginosa, se les llama condrocitos. El modelo cartilaginoso crece en sentido longitudinal por división celular continua de los condrocitos, acompañada de secreción adicional de matriz cartilaginosa. Este proceso genera un aumento de longitud que se llama crecimiento intersticial. En contraste, el incremento en el grosor del cartílago se debe principalmente a la adición de matriz en la periferia del modelo por nuevos condroblastos, los cuales evolucionan a partir del pericondrio. A este tipo de desarrollo por depósito de matriz sobre la superficie cartilaginosa se le llama desarrollo por aposición.

Al continuar el crecimiento del modelo cartilaginoso, se hipertrofian los condrocitos de su región central, acumulan glucógeno para la producción de ATP, sintetizan enzimas que catalizarán las reacciones químicas. Algunas de las células hipertróficas explotan y liberan su contenido, lo que modifica el pH de la matriz, este cambio activa la calcificación. Otros condrocitos del cartílago en calcificación mueren porque la matriz ya no difunde los nutrientes con rapidez suficiente. Al ocurrir esto, se forman lagunas que tarde o temprano se fusionan para formar cavidades pequeñas.

3. Desarrollo del centro de osificación primario: Una arteria nutricia penetra en el pericondrio y en el cartílago en calcificación, estimulando a las células osteógenas del pericondrio que se diferencian en osteoblastos. Estas células secretan, bajo el pericondrio, una lámina delgada de hueso compacto, llamada collar de matriz ósea; cuando el pericondrio empieza a formar tejido óseo, se le conoce como periostio. El conjunto de estos vasos y sus correspondientes osteoblastos, osteoclastos y

células de la médula ósea roja, recibe el nombre de brote perióstico. Al crecer en el modelo cartilaginoso, los capilares inducen el crecimiento de un centro de osificación primario, región en que el tejido óseo sustituye la mayor parte del cartílago. Luego los osteoblastos comienzan a depositar matriz ósea sobre los residuos del cartílago calcificado, con lo que se forman las trabéculas del hueso esponjoso. La osificación primaria principia en la superficie exterior del hueso y avanza hacia el interior.

4. Desarrollo de los centros de osificación secundarios: La diáfisis, que al principio era una masa sólida de cartílago hialino, es reemplazada por hueso compacto. La formación de hueso es similar a la que tiene lugar en los centros de osificación primarios; sin embargo, la osificación secundaria se inicia en el centro de la epífisis y prosigue hacia él, en dirección a la superficie externa del hueso.

El crecimiento de los hueso es un largo proceso que dependen de varios factores como algunos genéticos, hormonales, nutricionales, por lo que está expuesto a numerosos y variados trastornos obligando a utilizar fármacos que restablezcan la fisiología adecuada o prevengan el deterioro de este tan importante tejido.

Es de importancia conocer la fisiología y necesidades metabólicas del tejido óseo, para comprender la interacción de fármacos administrados cotidianamente como los bifosfonatos quienes por su comportamiento y gran afinidad son utilizados cada día más³¹.

Estructura de la hidroxiapatita

La hidroxiapatita ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) es un sólido transparente-translúcido y poco soluble en agua. Las apatitas son el componente principal de las rocas alcalinas y el mayor constituyente de los huesos y dientes.

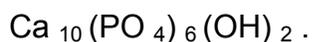
Es un compuesto cristalino integrado por cinco átomos de calcio, tres moléculas de fosfato y de un ión de hidroxilo; El hueso contiene aproximadamente 14% proteína de colágeno, 4% de otras proteínas y aminoácidos (hidroxiprolina, glicina y ácido glutámico). El calcio abarca entre el 24-30% de la matriz de la hidroxiapatita junto con otros minerales (zinc, potasio, silicio, magnesio y hierro), forma un conjunto biodisponible activo de calcio³².

Como sabemos, el hueso está constituido por hidroxiapatita la que difiere en contenido en agua, cantidad y contenido de componentes orgánicos; el calcio es un elemento con gran relevancia para la estructura y el funcionamiento posterior de los tejidos mineralizados; es un elemento esencial para que los individuos vivan y tengan excitabilidad nerviosa; aumenta en las contracciones musculares, paso de sustancias a través de sus membranas y actividad hormonal. En los humanos el calcio ocupa el quinto lugar en importancia de los elementos que lo componen, atrás del sodio y del potasio, y es el tercer catión más importante en el espacio extracelular: el 99% del calcio en humanos se halla en huesos y dientes como parte de la HAP y el 1% se encuentra en el líquido extracelular³⁴.

Sin embargo, la hidroxiapatita natural contiene porcentajes mínimos de sodio, cloro, carbonatos y magnesio, los cuales juegan un papel preponderante en la función remodeladora del hueso. Por esta razón, no se le considera una apatita pura.

Fórmula de la hidroxiapatita

La distribución cristalográfica es característica del grupo apatita del acomodo hexagonal, el cual es una de las redes de Bravais; su fórmula está constituida por



Posee un grupo espacial $P6_3/m$. En estado natural no es completamente pura, ya que permite el acomodo de impurezas en su celda unitaria. En el modelo de la figura II. 1 podemos observar la red cristalina de la hidroxiapatita en el plano cristalográfico (001).

A partir de la fórmula de la hidroxiapatita, se estima que el número de átomos de Ca en la celda unitaria es de 10 ,hay 6 átomos de P,26 átomos de O y 2 de H. La relación del número de átomos de Ca con respecto al número de P es un parámetro importante en los fosfatos cálcicos .En el caso de la hidroxiapatita sintética esta relación Ca/P es de 1.67.También podemos tomar las relaciones entre otros átomos, como por ejemplo:

$$O/Ca = 2.6$$

$$O/P = 4.3$$

La relación de Ca/P en el esmalte dental humano tiene un valor de alrededor de 2, nunca se obtiene el valor de 1.67 (34,35).

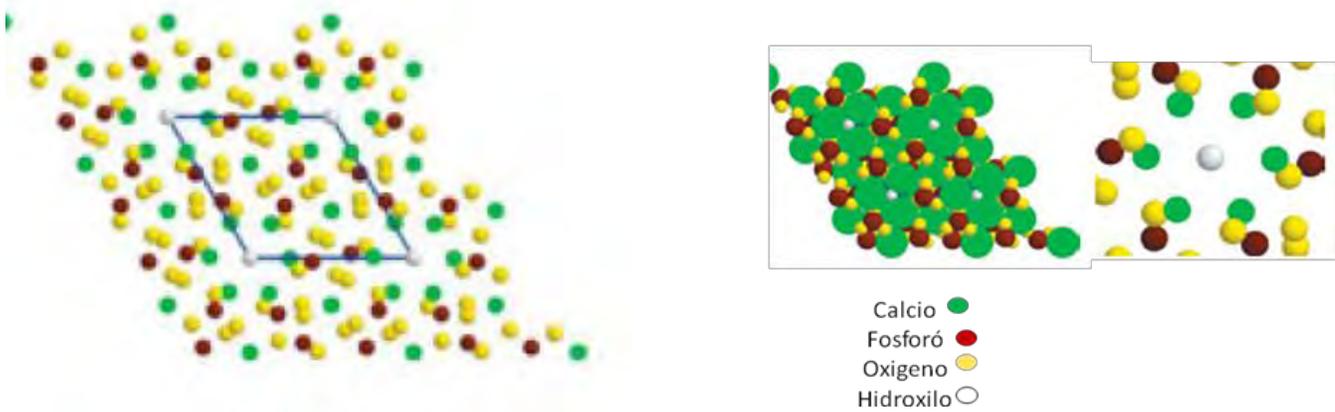


Figura II.1 Modelo hexagonal de la HAP ³².

III. Técnicas instrumentales de caracterización

Microscopio estereoscópico de luz

Ofrece una imagen estereoscópica (3D) de la muestra, mediante un doble ocular y un doble objetivo, la cual permite percibir la imagen en profundidad. Generalmente utiliza iluminación por reflexión.

Presenta una distancia de trabajo de entre 32 y 270mm, apta para manipular el material en estudio. Se usa para observar objetos opacos relativamente grandes.³⁶

El microscopio estereoscópico Zeiss Stemi 200c, utilizado en este estudio, permite maniobrar la muestra en la platina sin dificultad; posee magnificaciones que va desde .65X a 5.0X tiene adaptador para una cámara digital, la cual almacena la imagen en la computadora.



Figura III.1. Microscopio de luz de la marca Zeiss.

Microscopio electrónico de barrido

A diferencia de los microscopios de luz visible, este microscopio funciona a base de electrones.

Este microscopio permite imágenes con aspectos tridimensionales que registran información sobre la morfología la muestra, la composición química y la estructura. Funciona con un haz de electrones generados por un cañón electrónico, acelerados por un alto voltaje y focalizados por medio de lentes magnéticas (ello al alto vacío). Los electrones barren la muestra con el haz electrónico de sección transversal pequeña. Los electrones emitidos en un punto son recolectados por medio de detectores utilizados para modular la polarización de la rejilla de un tubo de rayos catódicos; así, la cantidad de electrones detectada y la intensidad del punto correspondiente en la pantalla del tubo de rayos catódicos darán las características topográficas de la superficie de la muestra.

El SEM está compuesto por tres detectores que permiten obtener imágenes de electrones secundarios, imágenes de electrones de retrodispersión y espectros de rayos X EDS.

El SEM que se utilizó este trabajo fue el. JEOL – 5600-LV, el cual cuenta con un EDS de la marca NORAN.

Microanálisis de rayos X por dispersión de energía (EDS)

Identifica la distribución cuantitativa y cualitativa de elementos químicos que se encuentran en la muestra, proporcionando gráficas e imágenes relacionadas con esa distribución. El EDS identifica y evalúa el contenido de elementos químicos desde el carbono al uranio en superficies planas o secciones finas de las muestras en todo tipo de material (biológico e inerte).

Una vez obtenido el espectro, se identifican los elementos de acuerdo a su intensidad y número atómico

Los mapas de RX que sirven para ver gráficamente la distribución de los elementos en la zona seleccionada, mediante una imagen de la zona analizada se asigna un color diferente a cada uno dependiendo de la distribución de los elementos químicos presentes en la muestra.



Figura III.2. Microscopio electrónico de barrido.

Análisis por difracción de rayos X

La difracción de rayos X es una técnica que consiste en hacer pasar un haz de rayos X de una determinada longitud de onda a través del material sujeto a estudio. Por difracción, da lugar a un patrón de intensidades de acuerdo a la ley de Bragg, que predice la dirección en la que se da la interferencia constructiva entre haces de rayos X dispersados coherentemente por un cristal.

Debido a su precisión, es una de las técnicas utilizadas frecuentemente en el estudio de materiales. Es posible trabajar con monocristales o con polvo microcristalino.

El difractómetro utilizado en este trabajo fue de la marca BRUKER, modelo D8-ADVANCE; el cual utiliza una radiación monocromática producida por blanco de Cu (ka) con $\lambda=0.154\text{nm}$.



Figura III 3. Difractómetro BRUKER, modelo D8-ADVANCE.

Espectroscopía infrarroja

La espectrometría de rayos infrarrojos es un tipo de espectrometría de absorción que utiliza la región infrarroja del espectro electromagnético. Como las demás técnicas espectroscópicas, puede ser utilizada para identificar un compuesto e investigar la composición de una muestra

La espectrometría infrarroja se basa en el hecho de que los enlaces químicos de las sustancias tienen frecuencias de vibración específicas, que corresponden a los niveles de energía de la molécula. Estas frecuencias dependen de la forma de la superficie de energía potencial de la molécula, la geometría molecular, las masas atómicas y, posiblemente, el acoplamiento vibracional.

Con el fin de hacer medidas en una muestra, se transmite un rayo multicromático de luz infrarroja a través de la muestra, y se registra la cantidad de energía absorbida, repitiendo esta operación en un rango de longitudes de onda de interés (por lo general, 4000-400 cm^{-1}) se puede construir un gráfico. Al examinar el gráfico de una sustancia, un usuario experimentado puede obtener información sobre los modos de vibración de las moléculas presentes en la muestra.

. Espectrometría de infrarrojos por transformada de Fourier

La espectrometría infrarroja con transformado de Fourier (FTIR) es una técnica de análisis para obtener el espectro infrarrojo con mayor rapidez. En lugar de registrar los datos variando la frecuencia de luz infrarroja monocromática, se guía la luz IR (con todas las longitudes de onda de pista utilizada) a través de un interferómetro. Después de pasar por la muestra, la señal medida da el interferograma. La realización de una transformada de Fourier de la señal produce un espectro idéntico al de la espectrometría infrarroja convencional (dispersiva).

Para realizar el estudio se utilizó el equipo de radiación Nicolet NEUX 470; la técnica utilizada por espectrómetro es de reflectancia difusa.



Figura III.4. Espectrómetro Nicolet NEUX 470.

IV. Materiales y Métodos

Obtención de las muestras

Las muestras a estudiar corresponden a dos tramos de hueso de la zona retromolar izquierda del maxilar superior (ambas muestras se obtuvieron por donación).

Las muestras de hueso necrótico relacionado con aplicación de bifosfonatos (zolendronato) donada por una paciente femenina de 56 años con antecedentes patológicos carcinoma de mama (figura IV.1).

La segunda muestra es una porción de hueso sano sin presencia de necrosis avascular, donada por una paciente femenina de 50 años de edad atropellada, que presentó fractura del maxilar (figura IV.2).

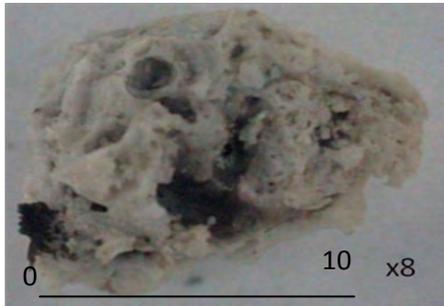


Figura IV.1. Muestra de hueso necrótico



Figura IV.2. Muestra de hueso sano.

Preparación de las muestras

Ambas muestras fueron preparadas para ser estudiadas con microscopía óptica y Electrónica de Barrido SEM, rayos X, rayos Infrarrojos IR.

Las muestras se midieron y pesaron, individualmente se separó el material muestra para la elaboración y preparación de un bloque y polvo de cada una para realizar su respectivo análisis.

1. Los bloques se observaron en el microscopio óptico, en el microscopio electrónico de barrido y se analizaron por EDS.
2. El polvo se observó en microscopio electrónico de barrido, y se analizó por espectroscopia infrarroja mediante difracción de rayos X.

Preparación de las muestras en bloque

Se preparó un molde rectangular, con cera de uso dental, dejando la parte de la muestra que se quería observar cercana a la superficie. (Figuras IV. 5-6.).

Polimerizado el material, se realizó el procedimiento de el pulido a espejo para obtener una superficie lisa y plana, eliminando rugosidades, utilizando lijas de carburo de silicio de número 100, 400, 1200 y 4000, en ese orden. Esto se realizó en una superficie lisa y con movimientos circulares.

Posteriormente se pulió sobre un paño de pelo mediano y alumina (Al_2O_3) de 1 micra (figura IV.7) y se lavaron con agua bidestilada (figura IV. 9), hasta la obtención de bloques con terminación de "pulido en espejo".

Se realizó un ataque químico con ácido fosfórico al 86% en una cara y un borde del bloque (figura IV.8).Posteriormente se lavó con agua bidestilada (figura IV.9).Ambos bloques se analizaron en el microscopio óptico y microscopio electrónico de barrido.

Cabe mencionar que si este proceso de pulido a espejo puede ser fuente de contaminación de la muestra por silicio y aluminio. El ataque con ácido tiene como objetivo eliminar residuos de estos materiales y revelar la estructura de las muestras bajo estudio.

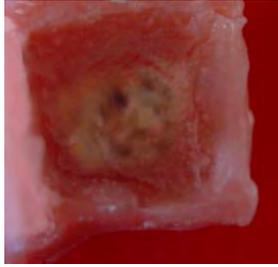


Figura. IV.5-6. Hueso sumergido en metacrilato de uso dental.



Figura IV.7 Pulido de la muestra para obtener superficie en espejo.



Figura IV .8. Colocación de ácido fosfórico.



Figura IV. 9. Lavado de las muestras con agua bidestilada.



Figura IV.10. Bloque de hueso con estructuras reveladas para ser observadas

Preparación de las muestras en polvo

Ambas muestras se molieron individualmente para obtener polvos finos.

Muestra de hueso necrótico

Se molió en un mortero de ágata de alta pureza (figura IV.12), hasta obtener un polvo fino; posteriormente se pasó por el tamiz de acero inoxidable con apertura de 120 y 325 micras.

Muestra de hueso sano

Debido a que esta muestra se mostró más duro que la muestra de hueso necrótico, se molió en el molino de bolas a una velocidad de 568 rpm. El polvo fue extraído del molino de bolas CARL Zeiss (figura IV 13). Con la pipeta metálica se recolectó para ser molido en el mortero de ágata, logrando un grano más fino y tamizarlo a 120 y 325 micras (figura IV.14).

Para ser analizada por EDS se esparció polvo en un portamuestras y se fabricó una pastilla, utilizando un pastillero de acero templado (figura IV.15 a-b) y una prensa de palanca marca Gimbel a una presión de media tonelada (figura IV 15 d).

El polvo para ser analizado por DRX y por espectroscopia infrarroja no necesita preparación adicional



Figura IV. 12. Mortero de ág



Figura IV .13. Molino de bolas.



Figura IV. 14. Hueso en polvo.



B



A



E



C



D

Figura IV.15 (a) (b). Colocación de polvo de hueso en el pastillero. (c) Prensa manual. (d) Presión a media tonelada. E) Prensa manual



a



b



c

Figura IV 16. a) Pastilla de hueso en polvo.

b) Se eliminaron restos de polvo.

c) Pastilla en portamuestra.

Técnicas de caracterización

Las muestras elaboradas fueron sometidas a diversas técnicas de caracterización, como se observa en la tabla siguiente (tabla IV.1).

| | MO | SEM | EDS | Mapeo | RX | IR |
|-----------------------------|----|-----|-----|-------|----|----|
| Hueso necrótico | ★ | | | | | |
| Hueso sano | ★ | | | | | |
| Bloque de hueso necrótico | ★ | ★ | ★ | ★ | | |
| Bloque de hueso sano | ★ | ★ | ★ | ★ | | |
| Pastilla de hueso necrótico | ★ | ★ | ★ | | | |
| Pastilla de hueso sano | ★ | ★ | ★ | | | |
| Polvo de hueso necrótico | | | ★ | | ★ | ★ |
| Polvo de hueso Sano | | | ★ | | ★ | ★ |

Tabla IV.1. Lista de análisis realizados a cada una de las muestras.

V. Resultados

Los resultados se presentarán de acuerdo con los análisis realizados secuencialmente en cada una de las técnicas.

V.1 Hueso necrótico

Microscopio óptico

En la figura V.1 se observa la muestra de hueso necrótico tal y como fue obtenido y la preparación requerida de la muestra para ser analizada en SEM. También se presenta en esta figura la muestra de hueso sano y su preparación.

Fue posible comparar las muestras en color, ya que el hueso necrótico presenta un color amarillo en toda su superficie con cambio de tonalidades, que son más oscuras. Algunas partes son de color negro, características de la necrosis. El trabeculado óseo se observa de mayor tamaño y zonas con gran reabsorción sin regeneración, el hueso sano es de color más claro y su superficie es más compacta.

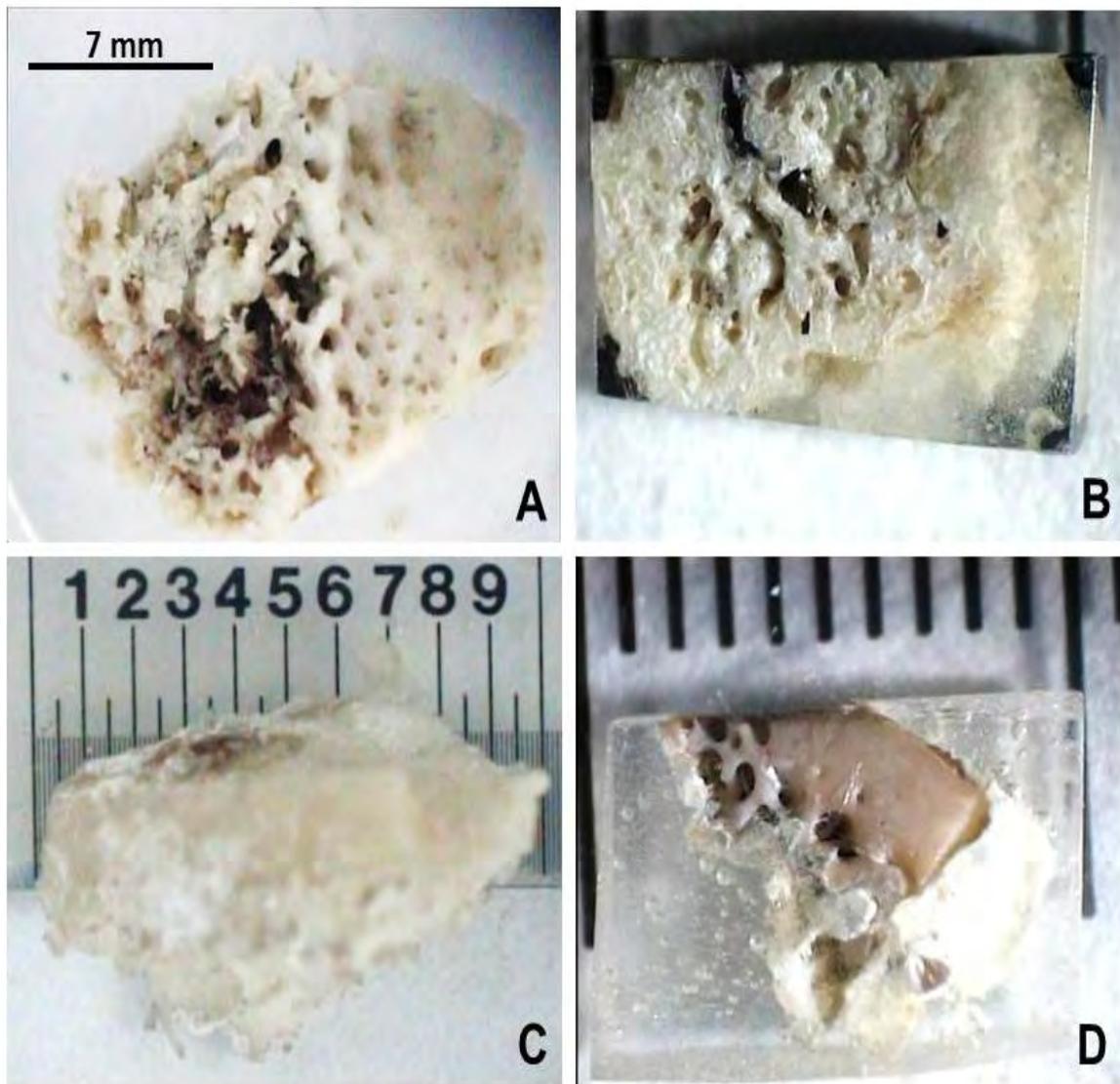


Figura V.1 A). Muestra de hueso necrótico en microscopio óptico(MO).

Figura V.1 C). Muestra de hueso sano en microscopio óptico (MO).

Figura V.1 B y D) Muestras de hueso necrótico y hueso sano preparados en bloque

Microscopía Electrónica de Barrido

En la figura V.2 se presenta una imagen de SEM del hueso sano, con los elementos que lo constituyen un osteoma o sistema de Havers rellenos de material orgánico (como un residuo de algún vaso sus típicas laminillas concéntricas, canalículos Volkmann). La arquitectura normal del tejido óseo no se encuentra alterada²⁹.

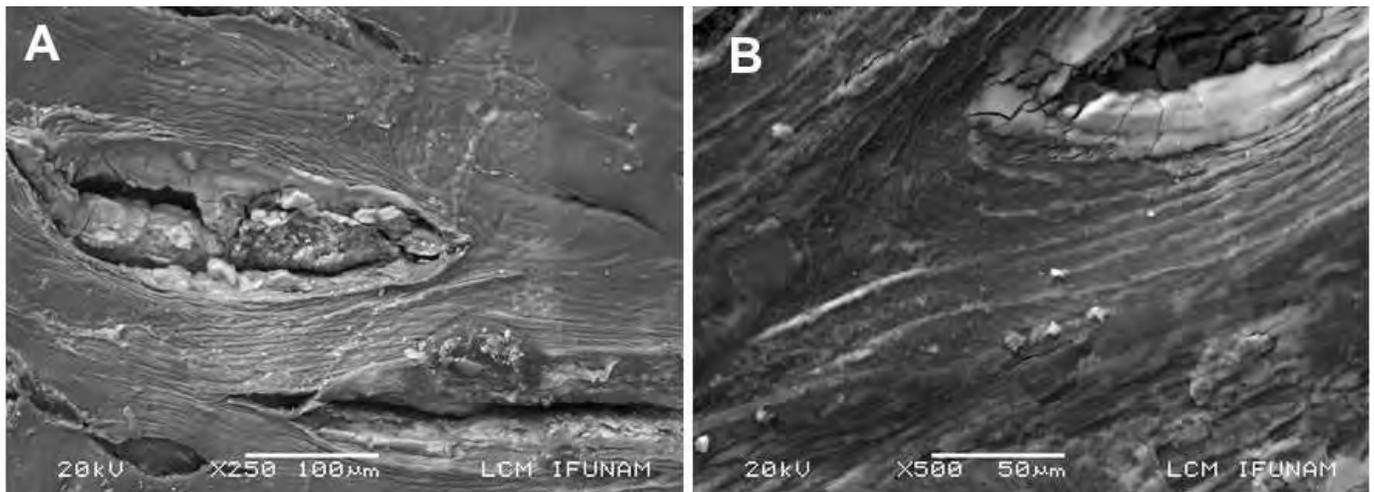


Figura V.2 Muestra de hueso sano.

- A) Se observa hueso compacto, conducto de Havers, láminas concéntricas.
- B) Se observa conducto de Havers, láminas concéntricas, láminas intersticiales.

En la figura V.3 se observa una imagen SEM de hueso necrótico, que presenta cristalización en la mayor parte del área. Estos cristales se presentan en diferentes zonas de la muestra más no en toda la superficie.

Estos cristales, cuando reciben el haz electrónico son muy sensibles y tienden a destruirse, tal y como se muestra el orificio en la figura V.3 (d).

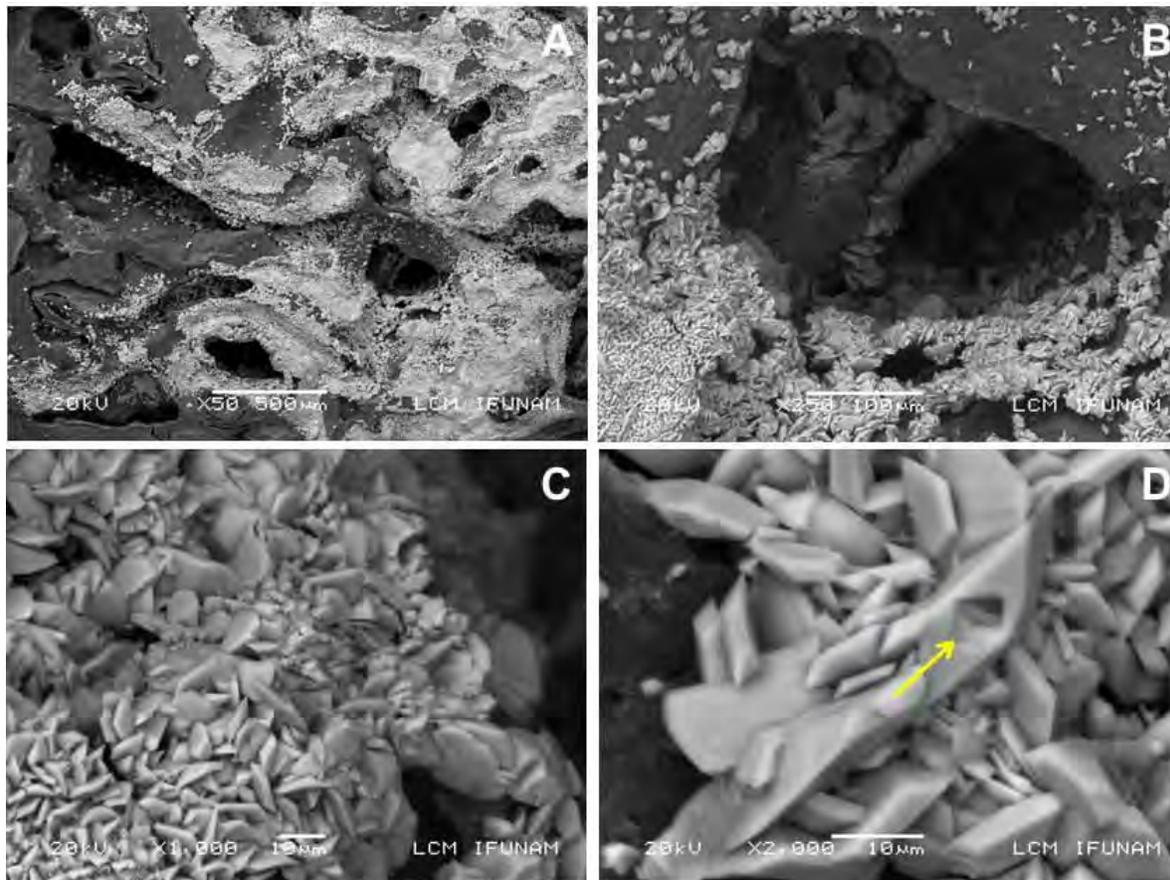


Figura V.3. Imagen de SEM del hueso necrótico.

A): Hueso necrótico. Se observa sistema haversianos con presencia de calcificaciones alrededor del hueso

B): Amplificación. Se observa presencia de cristales rodeando conductos haversianos.

C): Amplificación de los cristales. Se observa la distribución que presentan.

D): Los cristales son muy frágiles, ya que se destruyen durante la observación (indicado por la flecha).

Análisis químico por dispersión de energía EDS.

En análisis químico realizado a la muestra del hueso necrótico se observaron los cristales que se presentan en la figura V. 4. Se encontraron también los diferentes elementos que componen este material, destacando que además del fósforo (P), el calcio (Ca), el oxígeno (O), que son elementos principales de la hidroxiapatita y que conforma el hueso se presentan carbono (C), que proviene del material orgánico del hueso, aluminio (Al) y silicio(Si). El silicio y el aluminio bien pueden ser residuos del proceso de preparación, ya que también se observaron en los resultados del EDS del hueso sano.

Cabe destacar la presencia del titanio (Ti), siendo la concentración de 0.48 en porcentaje atómico o 1.44 en porcentaje de peso. También los espectros de EDS mostraron la presencia de Ti en el hueso sano, dentro del mismo porcentaje

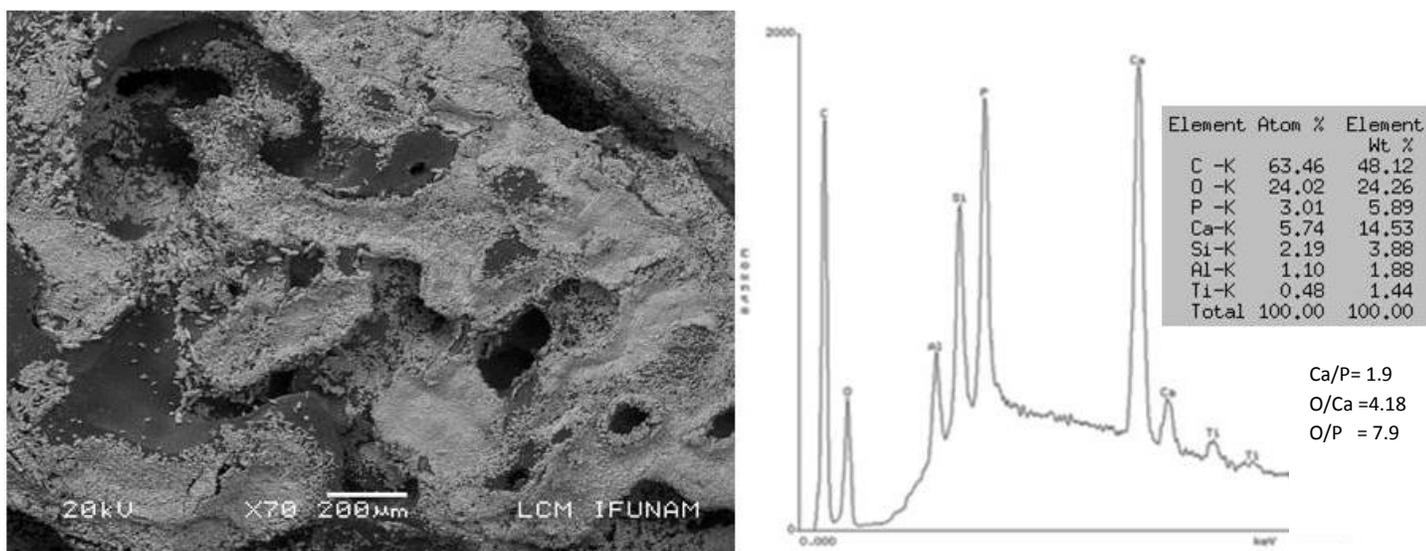


Figura V .4 Espectro de EDS de hueso necrótico con la presencia de calcio (Ca), fósforo (P), oxígeno(O), titanio (Ti) y carbono(C), que pertenece al material orgánico del hueso.

Debido a la presencia de estos cristales en la superficie del hueso necrótico, y para obtener un análisis más descriptivo topográficamente, se dividió de forma arbitraria la zona analizada de hueso necrótico en tres zonas, como se presenta en la imagen de la figura V.5

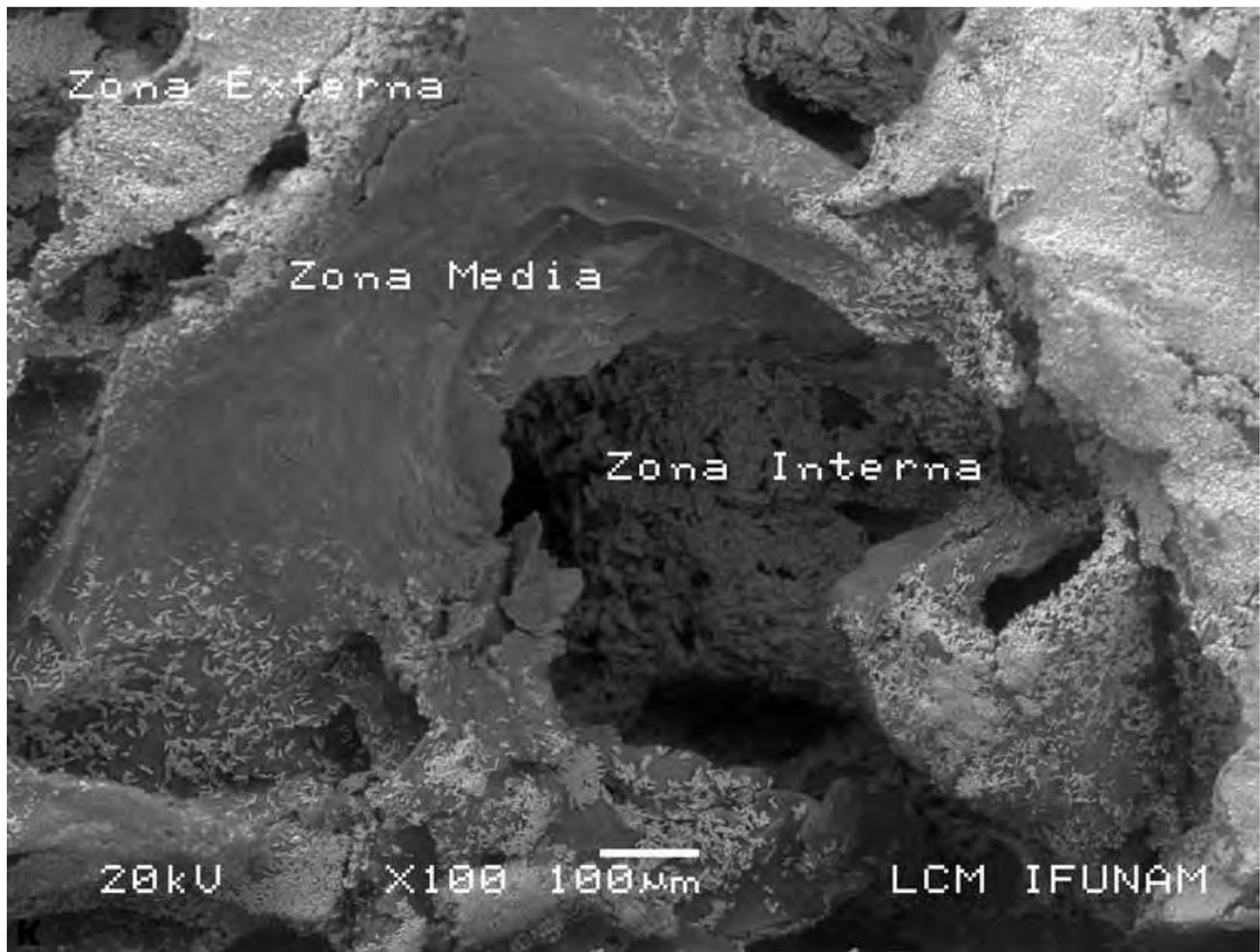


Figura V. 5. Amplificación de hueso necrótico. La imagen se clasificó en tres zonas para su estudio: zona “externa”, zona “media” y zona “interna”.

La figura V.6 nos da a conocer la topografía de la denominada zona externa formada la mayor parte por calcio (Ca) y fósforo (P). Vemos que el calcio (Ca) tiene un 47% seguido del fósforo (P) que es un 20%, mientras que el carbono (C) y el oxígeno(O) son los elementos que le siguen.

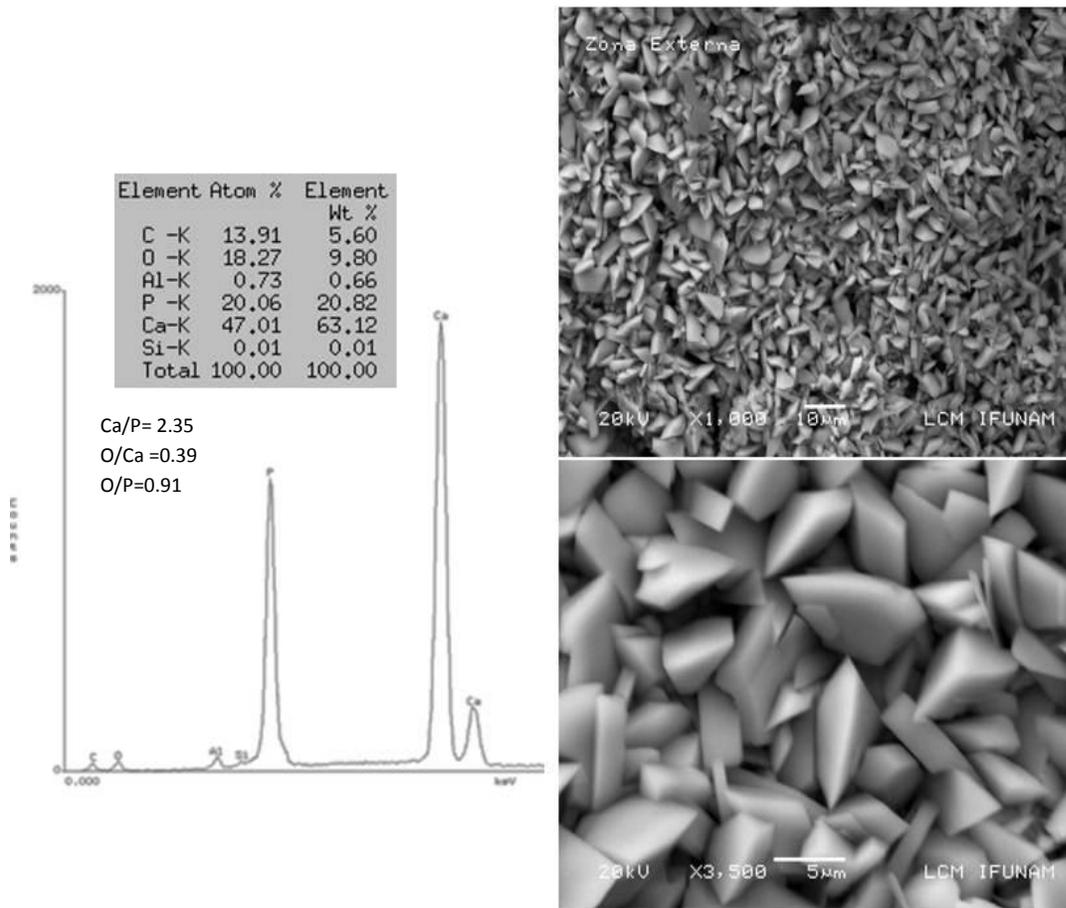


Figura V.6. Análisis químico por EDS de la zona “externa” del hueso necrótico, donde se observan cristales de fosfato de calcio, tal y como lo demuestra el espectro de EDS. También se obtiene la presencia de fósforo y carbono.

La figura V.7 pertenece a la zona “intermedia”, donde se observó que el número de elementos aumentó. Se observa el calcio (Ca), el fósforo (P), y el oxígeno (O). El aluminio (Al) aumenta considerablemente y existe un indicio de azufre (S). El aluminio (AL), pasa a ser un elemento considerable en el que tenemos 25.69% a nivel atómico y 20% a nivel peso, mientras que el magnesio es una pequeña proporción siendo de 0.83. Considerando que esta zona es un “poro”, es probable que el aluminio proviene del proceso de preparación de la muestra, donde se utilizó polvo de alúmina. El azufre es un poco mayor de 2.62 y el silicio 0.41 junto con el cloro (Cl). La imagen de SEM presenta un grano brillante seguramente de alúmina y es quien origina el incremento de aluminio en este espectro

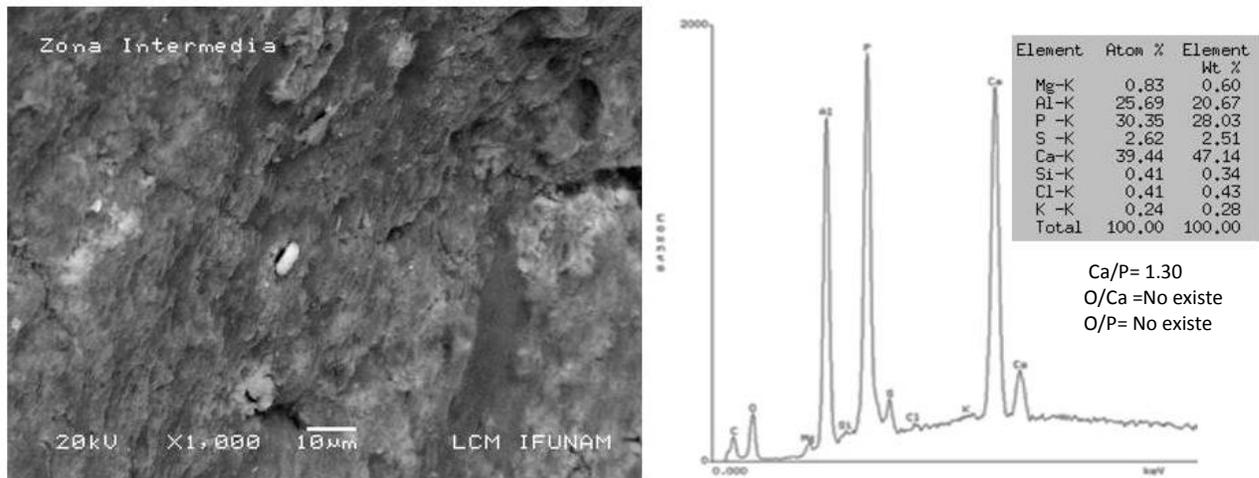


Figura V.7. Imagen de SEM del hueso necrótico en la zona “intermedia”. El análisis químico por EDS indica que el aluminio se encuentra en un porcentaje más alto que en la zona “externa”. El calcio y el fósforo disminuyeron en porcentaje con respecto a la zona “externa”. En pequeñas proporciones se observó magnesio, azufre, silicio, y cloro. Obsérvese el grano brillante en esta imagen, seguramente de alúmina.

El análisis químico por EDS de la zona “interna” se muestra en la figura V.8. El calcio (Ca), el fósforo (P) se encuentran presentes, siendo el aluminio (Al) el de mayor porcentaje. Nuevamente el aluminio puede provenir del proceso de preparación de muestra donde se utilizó polvo de alúmina.

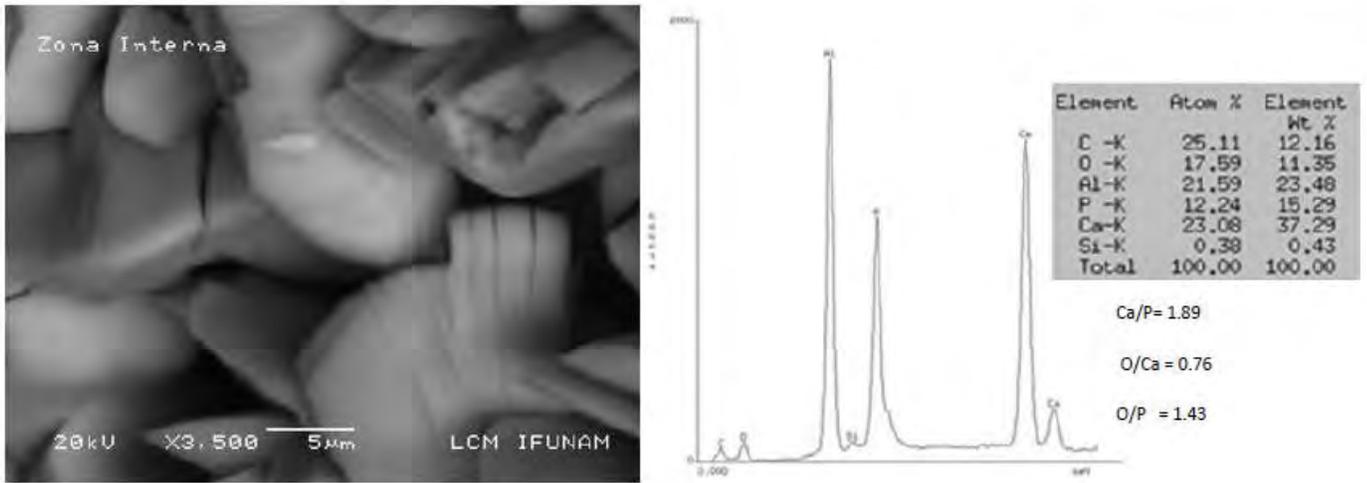


Figura V.8. Imagen de SEM de la zona " interna". El espectro de EDS indica la presencia de calcio (Ca) y fósforo (P) y que el aluminio (Al) se ha incrementado considerablemente. El carbono (C) y calcio (Ca) son mayoritarios.

La figura V.9, muestra el mapeo químico de la figura V.5, en cual vemos que el titanio (Ti) y el aluminio (Al), están presentes en la zona estudiada. Sin embargo, es de resaltar que el aluminio (Al), se encuentra en la zona interna como se puede ver en la figura V.10H. La señal más intensa proviene de la zona interna, mientras que el titanio (Ti) se encuentra distribuido en todo lo que es la zona de observación. En la zona interna también se encuentra azufre (S). Si comparamos el aluminio (Al) con oxígeno (O), vemos que hay una zona donde se encuentra tanto el aluminio (Al) como el oxígeno (O); eso podría indicar que tenemos una alúmina presente en este material. El carbono (C) proviene de material orgánico, como se puede ver en la figura V.11D mientras que el azufre se encuentra distribuido en toda la zona de observación.

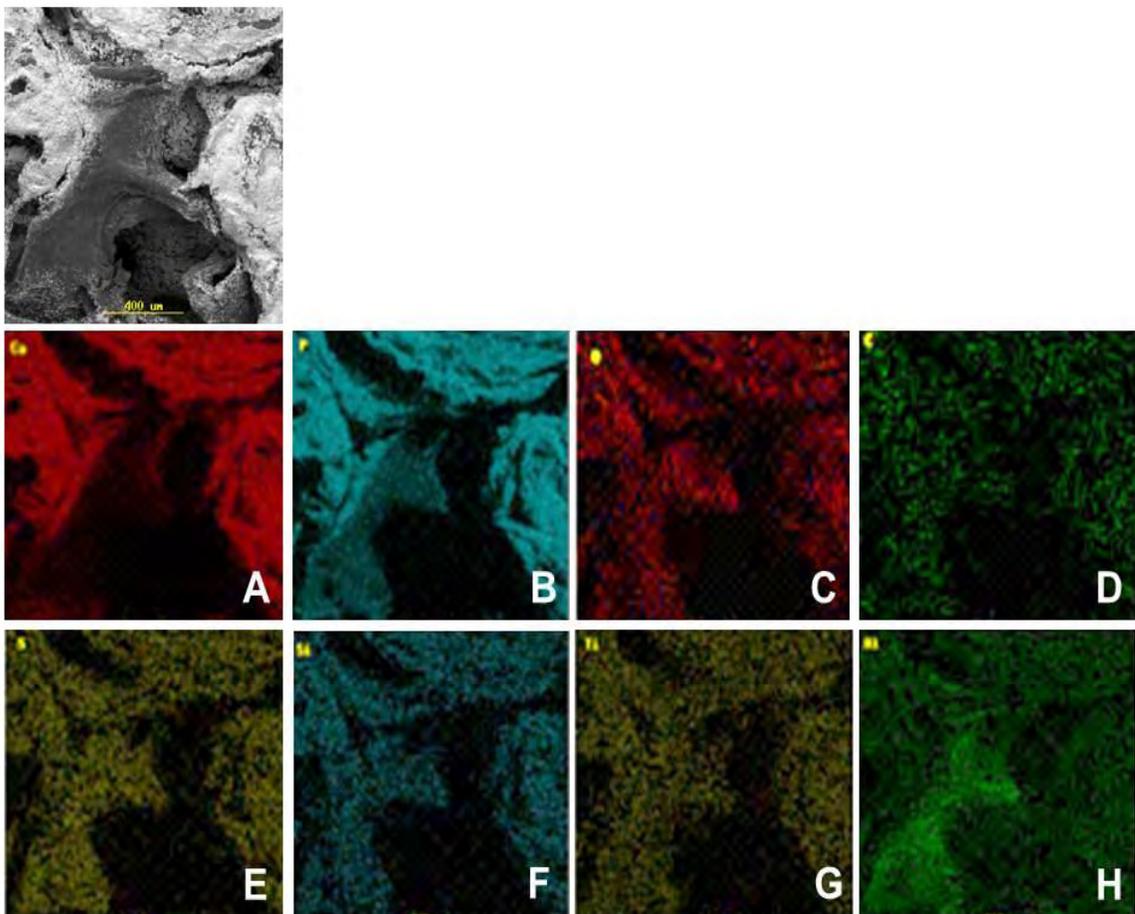


Figura V.9. Mapeo químico por EDS del hueso necrótico. Se observa la presencia y ubicación de los diferentes elementos. A) calcio (Ca), B) fósforo (P) C) oxígeno (O), D) carbono (C), E) azufre (S), F) silicio (Si), G) titanio (Ti), y H) aluminio (Al).

Con el fin de complementar los resultados del análisis químico del hueso necrótico se realizó el análisis a nivel volumétrico del material. Esto se presenta en la figura V.10 y lo único que nos indica que el calcio y el fósforo son componentes mayoritarios de este hueso: el calcio (C) que esta alrededor del 48%, seguido del oxígeno (O); que es el 20% y el fósforo (P) esta 17%, el carbono (C) está en un 13%, y el cloro 1%.

Este resultado indica que el titanio y el azufre, que son los elementos adicionales, observados en el análisis anterior se encuentran distribuidos en la muestra de hueso necrótico.

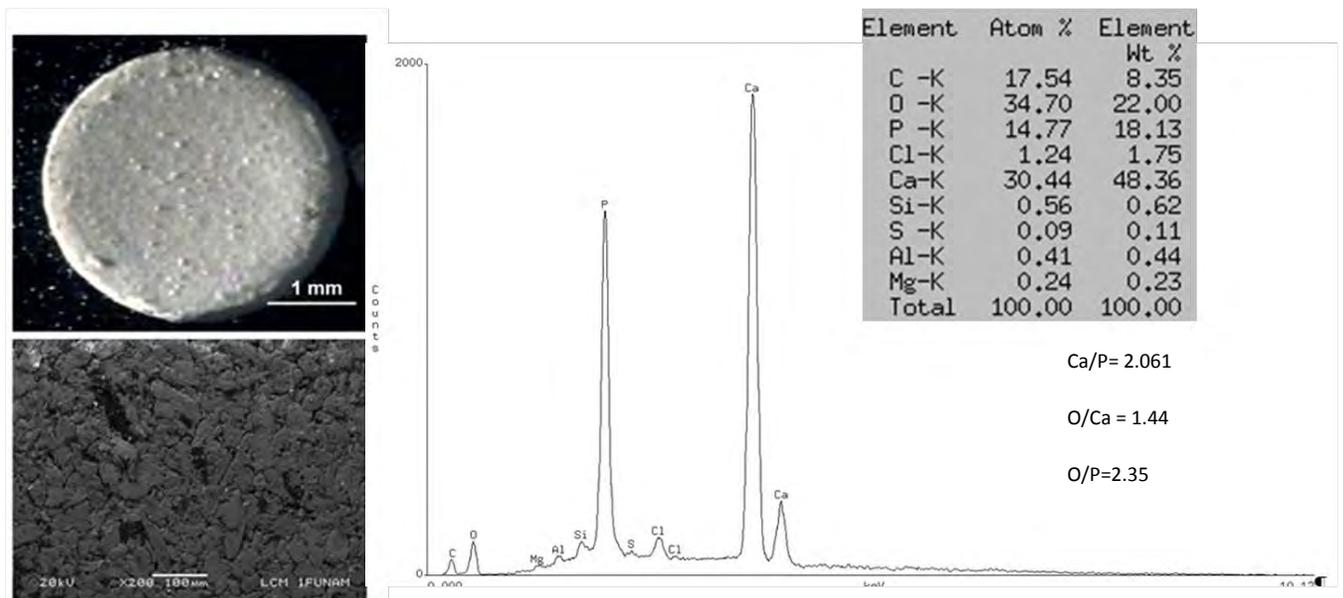


Figura V.10. Imagen de MO de la pastilla de hueso necrótico generada y su imagen por SEM. Espectro de análisis químico EDS, donde se observa la presencia de los elementos que conforman la hidroxiapatita como son calcio (Ca), fósforo (P), oxígeno (O). El titanio (Ti), no se encuentran presentes en este tipo de preparación de muestra.

V. 2 Hueso sano

Microscopía Electrónica de Barrido y Análisis químico por EDS

El análisis EDS, que se muestra en la figura V. 11, pertenece a la muestra del hueso sano y se observa nuevamente que la composición de silicio (Si) es muy alta, seguido de lo que es carbono (C) y oxígeno (O). El mapeo químico muestra que el silicio (Si) se encuentra principalmente en los bordes de los conductos de Havers, indicando que el silicio proviene de las lijas que se utilizaron para la preparación de las muestras. Por otra parte, el oxígeno (O) y el aluminio (Al) se encuentran en la misma zona. Alrededor de los conductos de Havers en el hueso sano. Esto indica que el aluminio proviene de la preparación de la muestra. El carbono (C) se encuentra distribuido en toda la zona del hueso sano, como lo muestra esta figura, el fósforo (P) y el calcio (Ca) se encuentran principalmente dentro de los conductos de Havers. Este resultado indica la existencia de material orgánico (debido al carbono (C) y oxígeno (O)), en los conductos de Havers: Nótese que esta muestra de hueso sano también presenta la existencia de Ti, al igual que en la muestra de hueso necrótico.

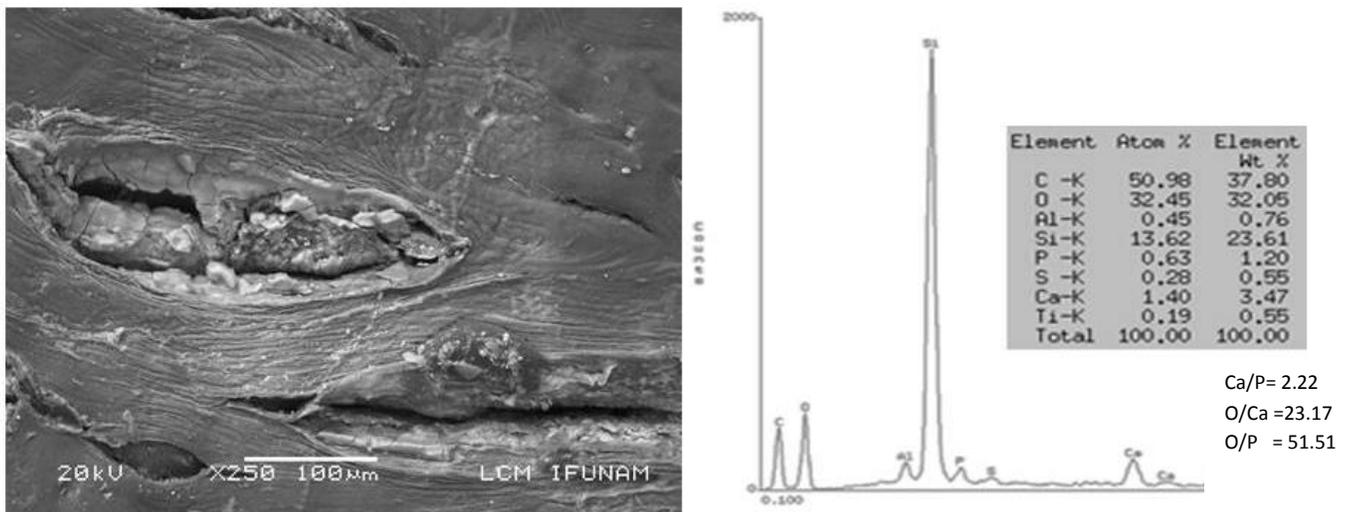


Figura V.11. Imagen de SEM de hueso sano, donde se observa el conducto de Havers. El análisis por EDS indica que el silicio es el elemento de mayor porcentaje en comparación del calcio, fósforo y oxígeno. Los elementos con mayor porcentaje son el carbono, el oxígeno y el silicio. En pequeña cantidad se presenta el azufre, aluminio y titanio.

En el mapeo que se muestra en la figura V.12 se observa la presencia del oxígeno, lo cual quiere decir que es material orgánico presente en el hueso sano. El fósforo es un 5%, mientras que el magnesio es 0.12.

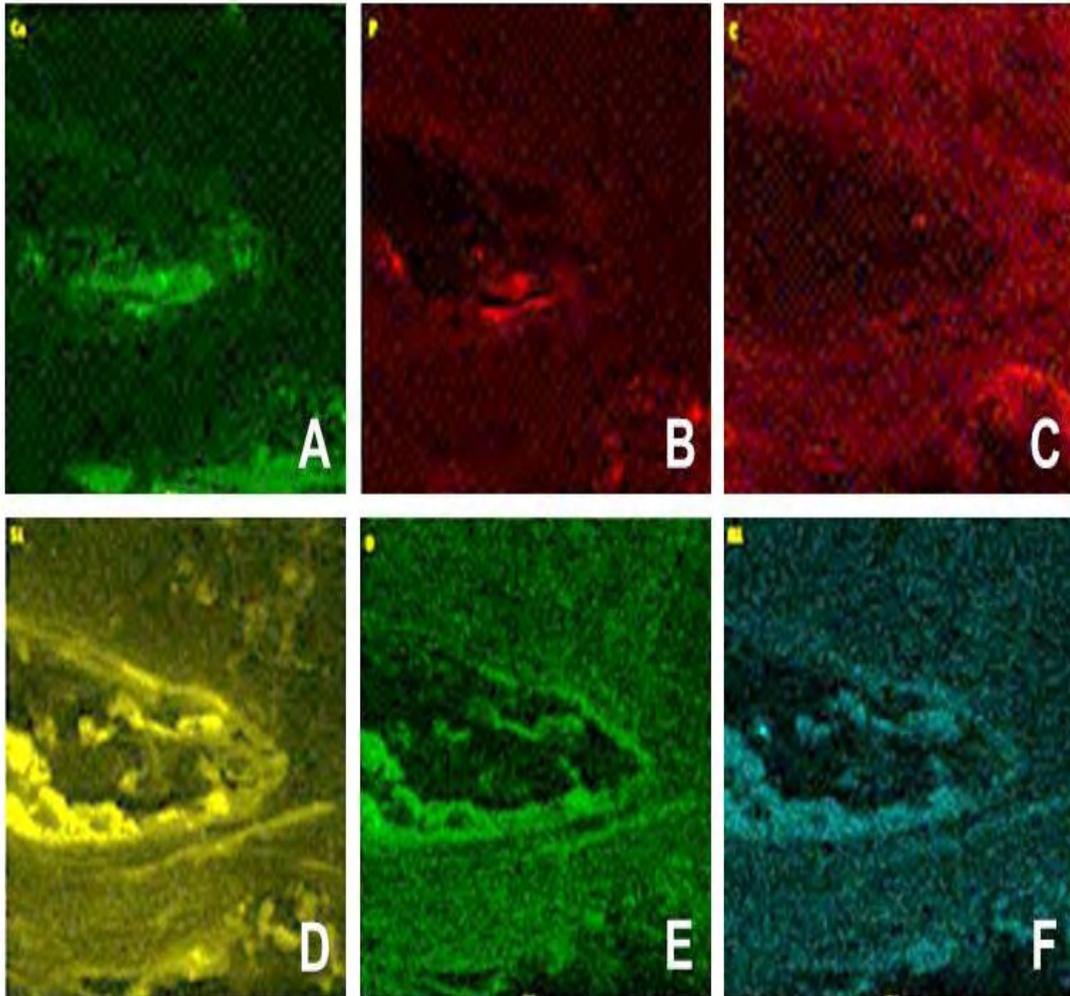


Figura V.12. Mapeo químico de EDS de hueso sano de la figura 12. A) calcio, B) fósforo, C) carbono, D) silicio, E) oxígeno, y F) aluminio. El aluminio y silicio se encuentran presentes en el conducto de Havers.

El análisis químico de la pastilla de hueso sano presenta los componentes que la conforman: en mayor porcentaje están el calcio, fósforo, oxígeno, carbono, y ya en menor proporción el magnesio, el sodio y el cloro. El recuadro nos muestra que mayor porcentaje corresponde al carbono, como se observa en la figura V.13.

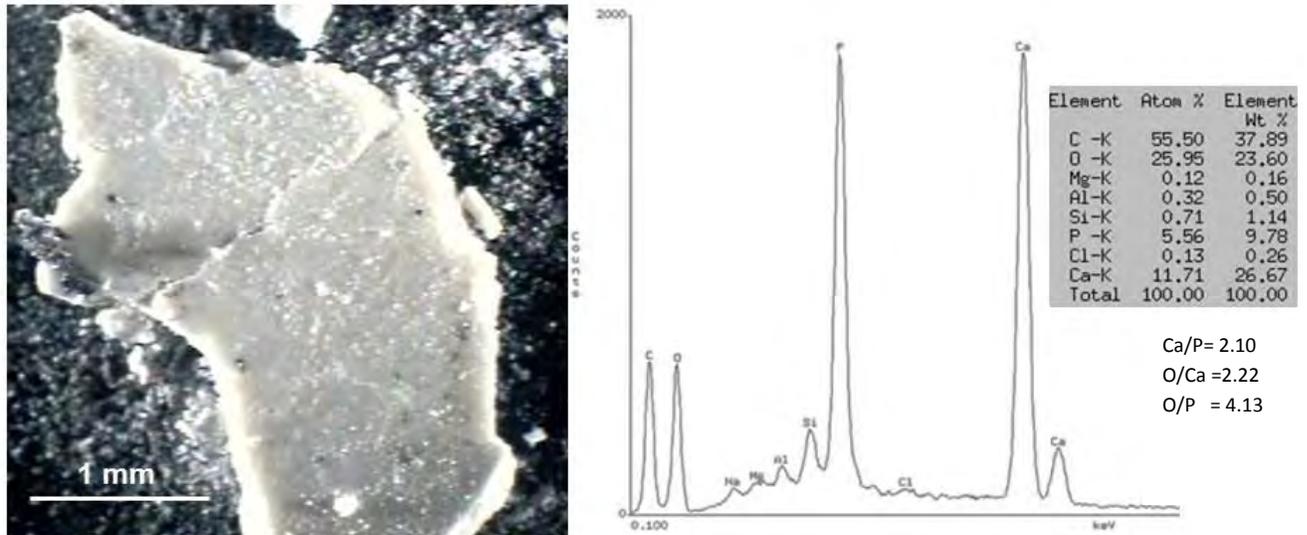


Figura V.13. Imagen de MO de la pastilla fabricada de hueso sano y su correspondiente análisis químico por EDS.

Comparando el espectro de EDS del hueso sano (figura V.13) con el correspondiente del hueso necrótico (figura V.10), se observa que son muy similares. La única diferencia se presenta en las concentraciones de carbono y el oxígeno, así como la pequeña concentración de azufre en el caso del hueso necrótico.

Lo anterior implica que la diferencia entre las muestras en polvo del hueso sano y el hueso necrótico radica principalmente en la concentración de material orgánico, representados por los picos del carbono y del oxígeno principalmente: en el hueso necrótico presenta menos concentración de material orgánico que en el hueso sano.

Difracción por rayos X.

En el difractograma de rayos X de la muestra en polvo del hueso necrótico, donde se observa que éste está constituido principalmente por hidroxiapatita, se muestra en la figura V. 14. Los picos principales de este espectro son fácilmente indexados como hidroxiapatita. También vemos que el tamaño de grano de la hidroxiapatita es muy pequeño y, por lo tanto, los picos son muy anchos.

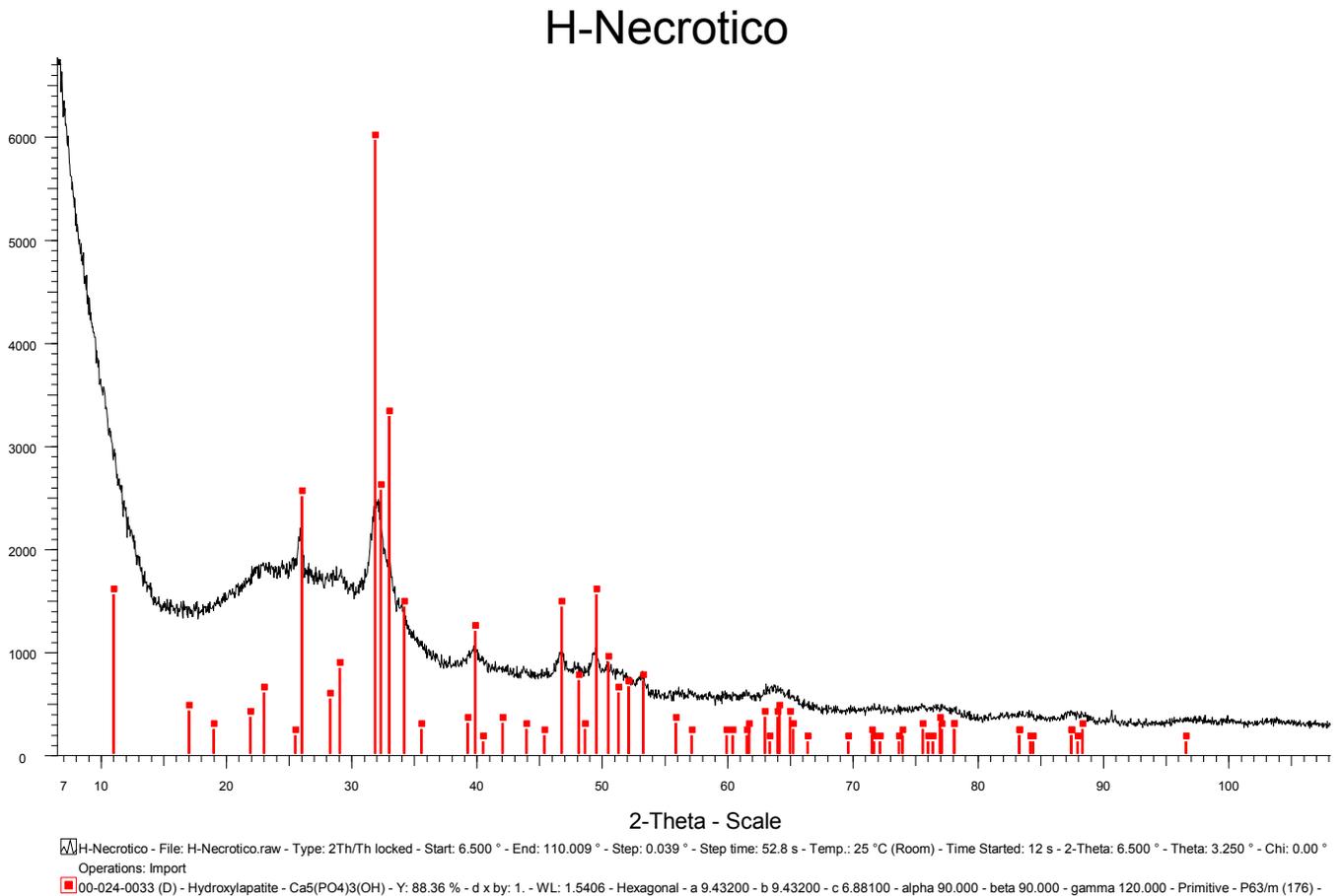


Figura V 14 .Espectro de DRX de hueso necrótico .Los cursores en rojo muestran las señales de la hidroxiapatita. En tamaño del grano de la hidroxiapatita en el hueso necrótico es pequeño, por lo que los picos son anchos.

En la figura V.15 se presenta el difractograma de rayos X de la muestra en polvo del hueso sano. También se observa que los picos del espectro pueden ser identificados como hidroxiapatita al igual que en el caso del hueso necrótico, y que el tamaño de grano es muy pequeño.

Hueso-Sano

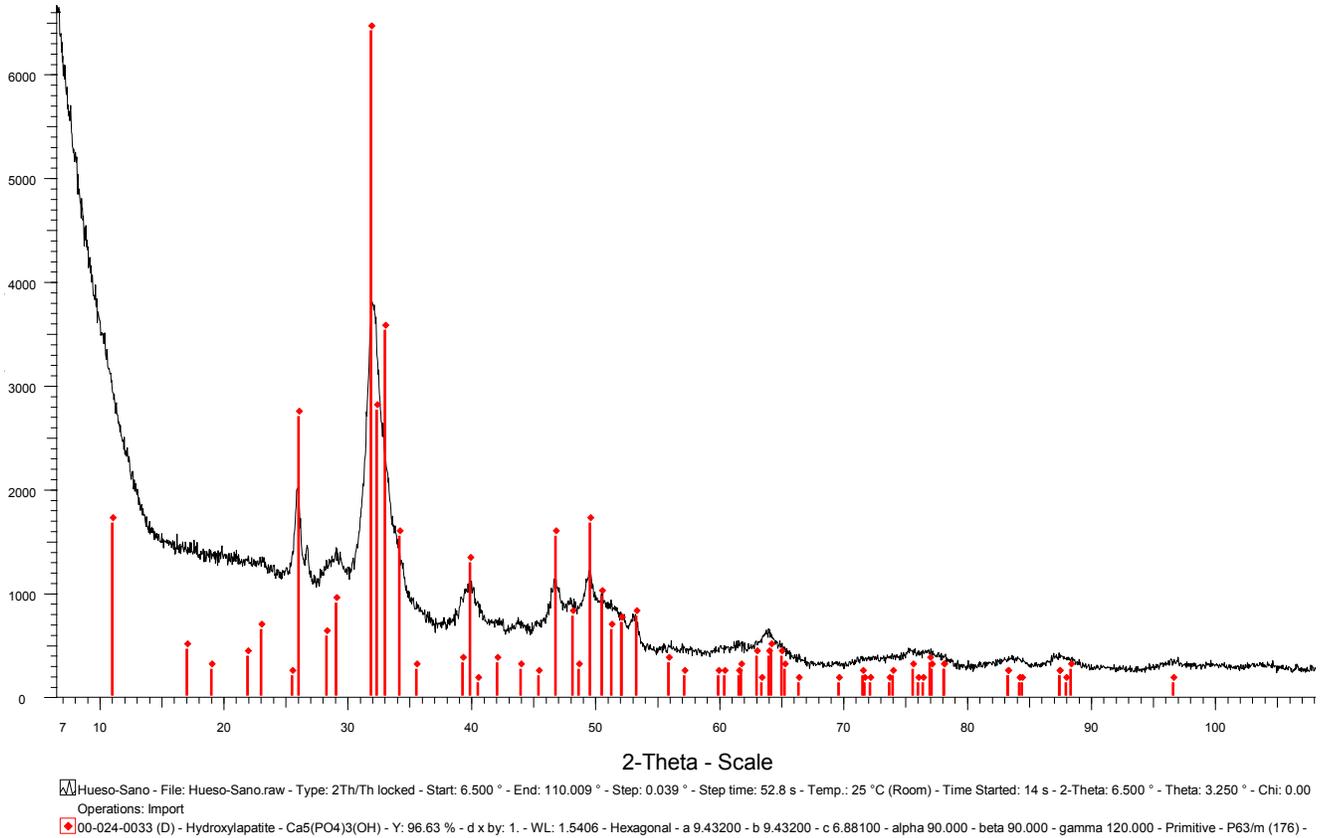


Figura V.15. Espectro de DRX del hueso sano. Los cursores en rojo corresponden a las señales de la hidroxiapatita, e indican que todos los picos corresponden a la hidroxiapatita.

En la figura V.16 se compara los resultados de las muestras de polvo del hueso necrótico y del hueso sano con un espectro de hidroxiapatita en polvo: el tamaño de grano en el caso de las muestras de hueso sano y hueso necrótico son más pequeños que en la muestra de hidroxiapatita como era de esperarse.

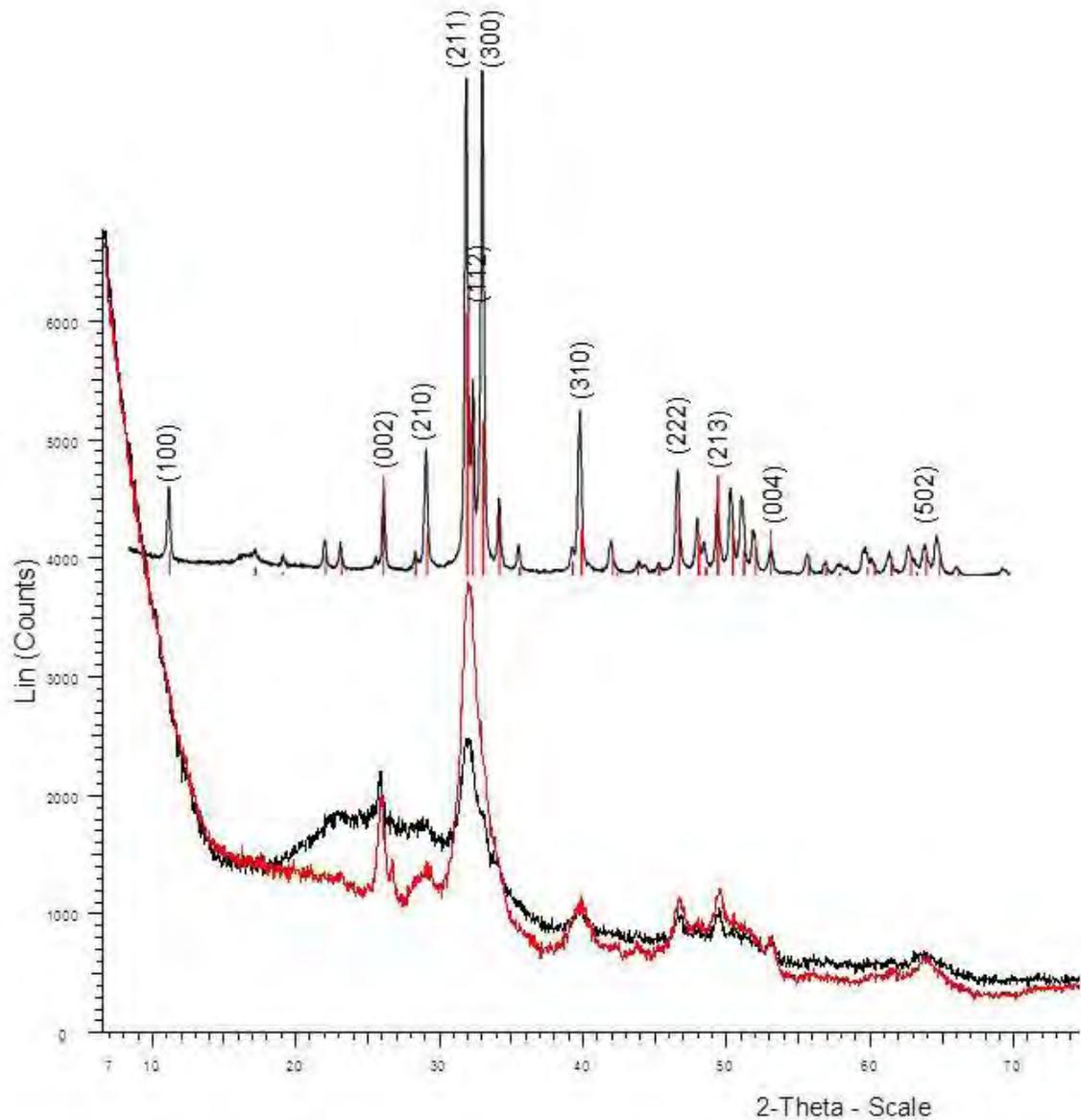


Figura V.16. Comparación de los espectros de difracción de rayos x de hidroxiapatita sintética (parte superior) y espectro de rayos X de hueso sano y hueso necrótico (en la parte inferior). Todas las muestras fueron en polvo.

V.4 Espectroscopía infrarroja FTIR

Los resultados de FTIR indican que no existe diferencia entre el polvo de hueso necrótico y del hueso sano, y su comportamiento a diferentes temperaturas es idéntico.

En el espectro de rayos infrarrojos de hueso necrótico a temperatura ambiente se observa que las señales no presentan diferencia con respecto al espectro del hueso sano. En la figura V.17 observamos a temperatura ambiente que están presentes los grupos OH^- , PO_4^{3-} , CO_3^{2-} el agua y material orgánico.

Comparando los espectros de hueso necrótico y (figura V.17) hueso sano (figura V.18) se observa que estos son iguales.

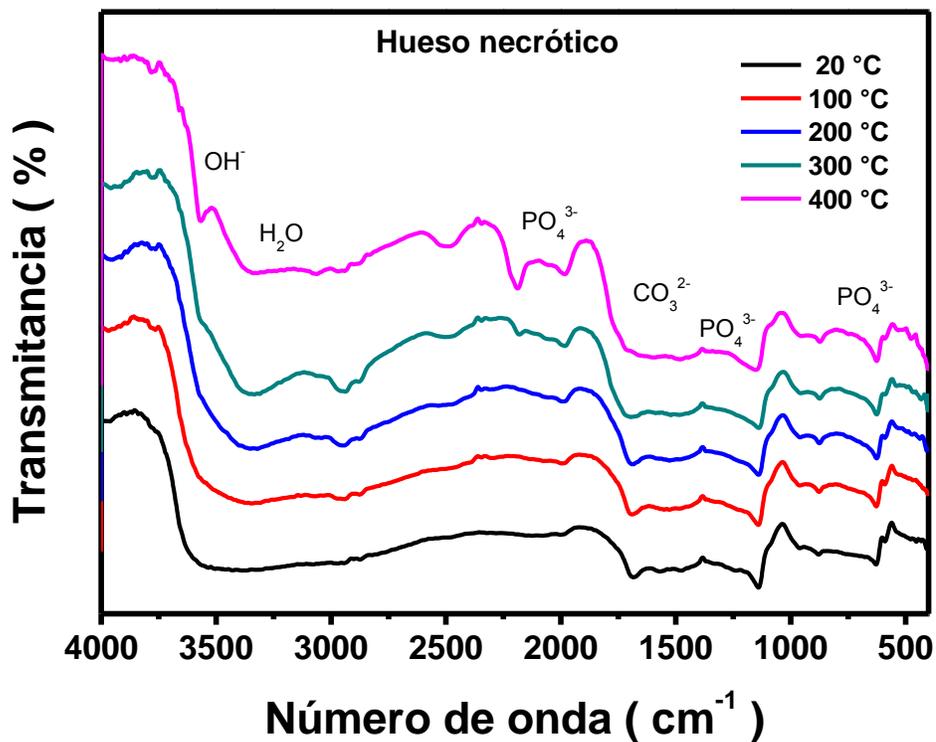


Figura V.17. Espectros infrarrojo del hueso necrótico. Temperatura ambiente y a diferentes temperaturas. Los modos vibracionales del agua, del hidróxido de carbono, carbonato y fosfato están presentes en este espectro.

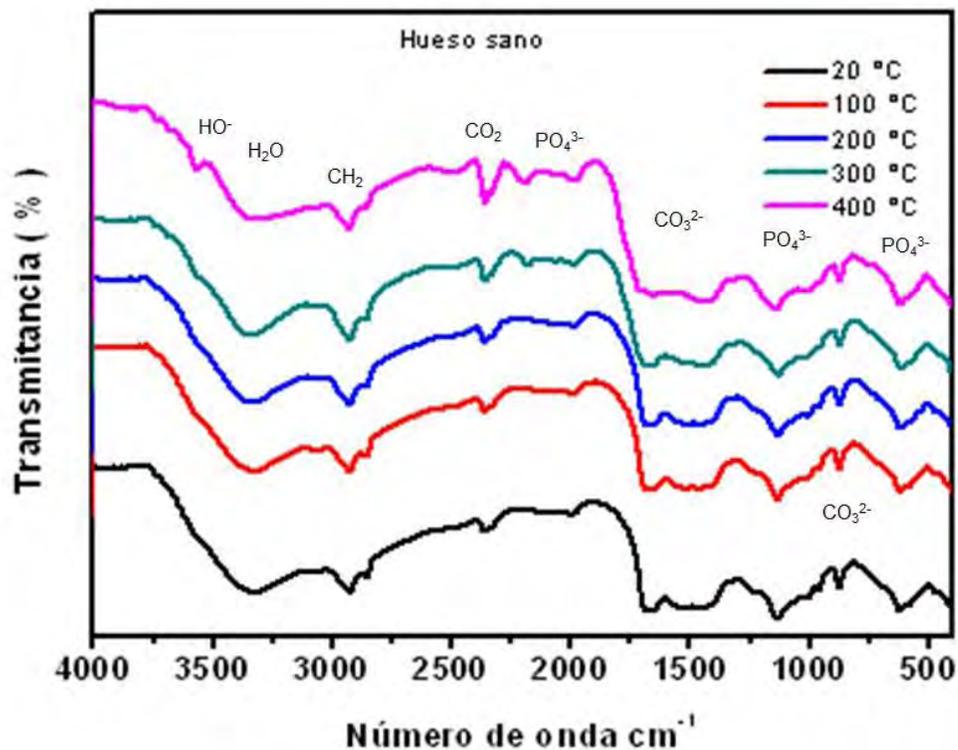


Figura V.18. Espectro de infrarrojo del hueso sano. Se observan las señales a temperatura ambiente y a diferentes temperaturas. Se observan los modos vibracionales del agua, del ion hidroxilo, del dióxido de carbono, carbonato y fosfatos. A medida que la temperatura aumenta, la señal del agua desaparece, mientras que las señales de carbonato y fosfato están presentes y las señales de OH se vuelven más definidas.

VI. Discusión de resultados.

El propósito del estudio presentado en este trabajo tesis es identificar, mediante microscopía electrónica de barrido, análisis químico por EDS, difracción de rayos X, y por espectroscopia infrarroja, las características estructurales y químicas de hueso necrótico con la del hueso sano, y, a través de la comparación de los resultados obtenidos, encontrar y comentar sus diferencias si es que existiera alguna.

La caracterización del hueso humano crea un panorama extenso, ya sea de hueso sano o con alteraciones de diferente etiología, ya sea por enfermedad fisiológica o inducida, como es el caso de necrosis maxilar, debido a que las propiedades positivas del fármaco ponen en controversia al mundo de la medicina. Por lo que es necesario entender los cambios estructurales que logra el fármaco, en este caso los bifosfonatos.

A través de la historia de la medicina, el hombre ha tratado de fabricar medicamentos capaces de controlar o combatir enfermedades que alteren su salud, procurando que sean efectivos, que actúen en el sitio indicado y con el menor daño posible incluyendo las reacciones secundarias. Sin embargo, dada la biología y fisiología de los seres vivos, la respuesta de cada fármaco es impredecible, ya que la mayoría se realizan en pequeños animales de experimentación y no siempre reaccionan de igual manera que en el ser humano; inclusive la respuesta y comportamiento de un medicamento administrado de paciente a paciente es diferente. También debemos tener presentes las variaciones genéticas que existen en los seres vivos siendo necesario no trabajar con ensayo y error.

La utilización de los bifosfonatos como medicamento de elección en el tratamiento de diversa patologías ósea, vino a cambiar su manejo, no sin antes haber sido probados en animales (no teniendo reacción secundaria alguna), motivo por el cual la primera farmacéutica que lanzó este medicamento al mercado rechazó la aparición de la osteonecrosis maxilar siendo, sin embargo, después reconocida. Estudios posteriores dieron a conocer que la fisiología del hueso era diferente entre los humanos y los animales de prueba. Estos estaban condicionados a tener más soporte de carga, dándose cuenta de que la afinidad de los bifosfonatos es sobre sitios de mayor actividad ósea, siendo en el humano los huesos maxilares.

Por lo tanto, los resultados obtenidos en este trabajo de tesis indican que las diferencias entre el hueso necrótico y el hueso sano se presentan mas a nivel de superficie que a nivel volumétrico (aquí por efectos a nivel superficial queremos indicar

la superficie de contacto entre los bifosfonatos y el hueso; así, por ejemplo, en un material poroso toda la pared del poro presentara los efectos producidos por los bifosfonatos, no así el material inter-poro o volumétrico) tal como lo indican los análisis de EDS, los análisis de difracción de rayos X y los resultados de FTIR realizados en las muestras en polvo: todos presentan el mismo comportamiento

El análisis por EDS de las muestras necrosadas indicaron la presencia de los mismos elementos observados en las muestras sanas, incluyendo la presencia de titanio y azufre. La única diferencia perceptible fue en los porcentajes del carbono y el oxígeno, siendo mayoritarios en las muestras sanas. Considerando la relación Ca/P en la muestra necrótica tiene un valor de 2.06, mientras que en la muestra sana tiene un valor de 2.10. Por otro lado, la relación O/Ca y O/P en la muestra necrótica los valores presentados fueron de 1.14 y 2.35 respectivamente, mientras que en la muestra sana fueron de 2.22 y 4.13. Por lo tanto, existe menos oxígeno en la muestra necrótica con respecto a la muestra sana. Tomando en cuenta que el carbono y el oxígeno son los principales elementos del material orgánico, este resultado indica que en el hueso necrosado se elimina en mayor porcentaje el material orgánico que el material inorgánico.

Por otro lado, el análisis de las muestras en polvo de ambos materiales realizado por EDS, difracción de rayos x y espectroscopia infrarroja, lo que indica el estudio del material volumétrico de ambos tipos de hueso, no presentó diferencia alguna.

De acuerdo con nuestros resultados, el primer material del hueso sano que resulta dañado es el material orgánico y después el material inorgánico. Así, el daño produce primeramente la eliminación de material orgánico, después la descomposición de la superficie del hueso que entra en contacto con ellos y, al avanzar, va destruyendo el resto del hueso hasta necrosarlo completamente.

Nuestra recomendación, por lo tanto, para todo estudio que pretenda realizarse con el objetivo de profundizar en las diferencias entre hueso necrótico y hueso sano es el que las técnicas de análisis deben involucrar solo técnicas de análisis de superficie, y deben incluir, además, el análisis de material orgánico, puesto que nuestros resultados indican que poco cambio sufre el material inorgánico por la disolución del mismo.

CONCLUSIONES

- El proceso de necrosis de hueso sano por el efecto de los bifosfonatos se inicia con la eliminación de su material orgánico, que es el primer material del hueso sano que entra en contacto con ellos.
- Después de la eliminación de material orgánico, se presenta la descomposición de la superficie del hueso que entra en contacto con los bifosfonatos, y al avanzar necrosa completamente el hueso sano.
- A nivel volumétrico, el hueso necrótico y el hueso sano no presentan diferencia alguna, siendo la hidroxiapatita en ambos casos su mayor componente.
- El estudio de las diferencias estructurales y químicas entre el hueso necrótico inducido por bifosfonatos y el hueso sano debe de incluir necesariamente técnicas de análisis de superficie.

Referencias Bibliográficas.

1. Sowers R, Epidemiology of bone mass in premenopausal women. Epidemiological reviews 1993; 5: 374-98.
2. Clark P, Epidemiology, cost and burden of osteoporosis in Mexico. Archives of osteoporosis 2010.
3. Max RE. Pamidronate (Aredia) and Zoledronate (Zometa) induced avascular necrosis of the jaws: a multifactorial etiology. J oral maxillofacial Surg. 2003;61:115-17.
4. Reszka AA. Bisphosphonate mechanism of action Curr Mol 2002. 2:571-7.
5. Licata AA. Discovery, clinical development and therapeutic uses of bisphosphonates. Ann Pharmacother 2005;39:668-77.
- 6 Rossi D. MD Bisphosphonate-associated osteonecrosis of the Jaws-a therapeutic dilemma 2008 .XX: 1-5.
7. Schurman L. International Society for clinical SAO Consenso de la Asociación Argentina de Osteología Metabolismo y Mineral (AAOMM). Actualizaciones en osteología 2007;3(3).117-136.
8. Hellenstein J. Bisphosphonate osteonecrosis (bis-phossy jaw): are the posty jaws of the 21 st century. J Oral Maxillofac Surg 2003;63:682-9.
9. Lourwood D. The Pharmacology and Therapeutic Utility of Bisphosphonates. Pharmacotherapy. 1998; 18: 779-783.
10. Williams K. The Bisphosphonate story: from detergents to bone disease: Journal of chemical education 2004;8(10) 1406-07.
11. Fleish HA. Bisphosphonates mechanisms of action. Endocrine reviews 1998. 19(1) 80-100.
12. Subramanian G. A new complex of ^{99m}Tc for skeletal imaging .Radiology 1971:99 - 112.
13. Berenson J: Advances in multiple myeloma: J Clin Oncol. 1998;16:3832-3842.
14. Reszka A A. bisphosphonate mechanisms of action .Contemporary Endocrinology 2010: 443-468.

15. Torregrosa J.V. Uso de bisfosfonatos en la enfermedad renal crónica. *Nefrología* 2010; 30(3):288-96.
16. Lin JH 1996. Bisphosphonates: a review of their pharmacokinetic properties. *Bone* 18:75-85.
17. Adrover Rigo: Revision Clínica de la utilización de los bifosfonatos *Farm . Hosp.* 2000:24:74-82
18. Fleisch H. Bisphosphonates: preclinical aspects. 13 th IOF Advanced Training Course on Osteoporosis. Lyon, February 2004: 127-132.
19. Rosen C.J. Comparative Clinical Pharmacology and Therapeutic use of bisphosphonates in metabolic bone disease: drug. 1996 51:5376-51.
20. Ingo J. Adverse effects bisphosphonates current issues . *J. Oncol.* 2007 (5): 483-487.
21. Ruggiero SL. Osteonecrosis of the jaws associated with the use of bisphosphonates a review of 63 cases. *J oral maxillofac Surg.* 2004 :(62):527-534.
22. Marx RE. Bisphosphonate-induced exposed bone (osteonecrosis) of the jaws: risk factors, recognition, prevention, and treatment. *J Oral Maxillofac Surg* 2005; 63:1567-75.
23. Fournier P. Bisphosphonates inhibit angiogenesis in vitro and testosterone-stimulated vascular regrowth in the ventral prostate in castrated rats. *Cancer Res* 2002; 62:6538-44.
24. Serrano S. Bases histológicas de la histomorfometría ósea. *Patología ósea metabólica.* Barcelona: Doyma, 1990; 55-70.
25. Van B. Differentiating the mechanisms of antiresorptive action of nitrogen containing bisphosphonates . *Bone:*2003(5): 805-811.
26. Dixon RB. Bone turnover in elderly canine mandibule and tibia: *J Dent Rest.* 1997:76-82.
27. Marx R .E. Oral & Intravenous Bisphosphonate – Induced Osteonecrosis the of jaws: Quintessence Publishing 2007 edition 1.
28. Bagán J. Recomendaciones para la prevención de la osteonecrosis de los maxilares (ONM) en pacientes con cáncer tratados con bisfosfonatos intravenosos. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* 2008;(13) (3):161-7.

29. Hib J..Histologia de di fiore.edit. 2001 El ateneo cap.7p.p 50.74.
 30. Gerrit B. Histology.edit. Mosby Company cap 4.
 31. Thomas S. Dynamics of connective tissue macromolecules. 1974 edit 1 cap. 4.
 32. Gomez J.Estructura cristalina de la hidroxiapatita. Ingenierías 2004(7) (24) 47-5.
 33. Garcia M. La hidroxiapatita y su importancia con los tejidos mineralizado. 2006 Rev. Esp. en Ciencias Químico-Biológicas, 9(2):90-95.
 34. Londoño M. Características cristaloquímicas de la hidroxiapatita tratadas a diferentes temperaturas .2206 Revista EIA, ISSN 1794-1237 (5). 109-118.
 35. Redonda L.Análisis químico y de dureza del alvéolo dental y base del hueso mandibular por microscopía electrónica de barrido, rayos X y durometría. Tesis para obtención del título de cirujano dentista.
 36. Yacaman M. Microscopía electrónica de barrido una visión del microcosmos. 1995. Consejo Nacional de la Ciencia y Tecnología 34-111.
 37. Vázquez G. Introducción a la Microscopía Electrónica Aplicada a las Ciencias Biologicas. Facultad de Ciencias.Fondo de Cultura Económica.
 38. Diccionario farmacéutico THOMSON PLM 2008.
-

