

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

**FACULTAD DE ODONTOLOGÍA  
DEPARTAMENTO DE ESTOMATOLOGÍA III (MEDICINA Y  
CIRUGÍA BUCOFACIAL)**



**TESIS DOCTORAL**

**EFFECTO DE DIFERENTES TRATAMIENTOS  
ANTIOSTEOPORÓTICOS SOBRE LA  
OSTEOINTEGRACIÓN  
DE IMPLANTES DENTALES EN UN MODELO  
EXPERIMENTAL EN CONEJOS**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

**María Isabel Almagro Fernández**

Directores:

**Gabriel Herrero-Beaumont Cuenca  
Raúl Antonio Cortez Castillo  
Germán Carlos Esparza Gómez**

**Madrid, 2010**

ISBN: 978-84-693-7741-3

© María Isabel Almagro Fernández, 2010



**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID  
FACULTAD DE ODONTOLOGÍA  
DEPARTAMENTO DE MEDICINA Y CIRUGÍA BUCOFACIAL**

**TESIS DOCTORAL**

**EFECTO DE DIFERENTES TRATAMIENTOS  
ANTIOSTEOPORÓTICOS SOBRE LA OSTEOINTEGRACIÓN  
DE IMPLANTES DENTALES EN UN MODELO  
EXPERIMENTAL EN CONEJOS**

**DIRECTORES:  
GABRIEL HERRERO-BEAUMONT CUENCA  
RAÚL ANTONIO CORTEZ CASTILLO  
GERMÁN CARLOS ESPARZA GOMEZ**

**LABORATORIO DE PATOLOGÍA OSTEOARTICULAR  
FUNDACIÓN JIMENEZ DÍAZ**

**María Isabel Almagro Fernández  
Madrid, 2010**

## Agradecimientos

Es difícil resumir en pocas palabras todo lo que he tenido la suerte de vivir en estos años de trabajo científico. Ahora ha llegado el momento de dar las gracias, de nuevo, a todas las personas que me han ayudado durante este tiempo.

En primer lugar, a mis directores de tesis los Dres. Gabriel Herrero, Raúl Cortez y Germán Esparza por la confianza que han depositado en mí y por todo lo que he aprendido de ellos este tiempo. El Dr. G Herrero-Beaumont, ejemplo de constancia y capacidad de trabajo, es el verdadero ingeniero del proyecto. Gracias a su continuo estímulo en la consecución de este estudio hoy estoy aquí. El Dr. R. Cortez, brillante cirujano, es una parte esencial e imprescindible del trabajo, no sólo por su ayuda y soporte técnico, sin el que la investigación hubiera resultado imposible, sino también por sus ideas siempre concretas y constructivas. El Dr. G. Esparza, estomatólogo de mentalidad científica, gran docente y mejor persona, ha sido siempre un apoyo incondicional.

Quiero agradecer de forma muy especial a Nobel Biocare® por su apoyo, sin el cual este estudio no hubiese sido posible. En particular al Dr. Franco Biondi, responsable de investigación clínica para Nobel, por la confianza depositada en nuestro equipo. También agradecer al Dr. Peter Schüpbach y a su equipo por su impecable trabajo en el análisis de nuestras muestras. Gracias a ellos cuento con imágenes únicas.

Combinar el trabajo asistencial y docente con el trabajo en el laboratorio fue un gran reto, sobre todo en la fase de experimentación animal en la que mis conejos absorbían el tiempo que tenía y el que no tenía también. Hoy me alegro de haber vivido esta experiencia que me ha permitido conocer a otros profesionales ajenos a mi ámbito de trabajo.

En particular, quiero expresar mi agradecimiento más sincero a Miriam Bellido, compañera y amiga. Con ella he compartido momentos de alegrías y de desánimo.

Al Dr. Santos Castañeda por sus comentarios, por su ayuda e interés desde el primer momento. Para mí ha sido siempre ejemplo de mentalidad científica, disciplina y perfeccionismo.

A la Dra. Raquel Largo, responsable del laboratorio de reumatología, que desde el principio me ha guiado y enseñado con su ejemplo el día a día del trabajo científico.

A todos mis compañeros del laboratorio por todos los buenos momentos que hemos compartido. Siempre me han ayudado y me han hecho el trabajo más fácil.

A Dra. Olga Sanchez por su valiosa ayuda en el envío de las muestras animales, por su generosidad y por sus ánimos en momentos bajos.

Al Dr. Carlos Castilla, responsable del animalario, y a su equipo (Pilar, Juani y Carlos) que siempre han estado dispuestos a ayudarme en cualquier momento y situación.

A Miguel Torralbo por ayudarme con el manejo del densitómetro y por compartir su lugar de trabajo.

Finalmente, quiero agradecer a mis compañeros de la Universidad Europea de Madrid y a mi amiga la Dra. Yolanda Martínez que me hayan permitido cierta flexibilidad en el trabajo para poder llevar a cabo este estudio.

A todos, gracias por haberme acompañado en este apasionante proyecto.

María Isabel Almagro Fernández

Diciembre 2009

---

## Índice

<b>1</b>	<b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
<b>1.1</b>	<b>Tejido óseo: tipos de hueso y remodelado óseo</b>	<b>1</b>
1.1.1	Células óseas	4
1.1.1.1	Diferenciación osteoblástica	4
1.1.1.2	El osteoblasto	5
1.1.1.3	El osteocito	6
1.1.1.4	El osteoclasto	6
1.1.2	Matriz orgánica	8
1.1.2.1	El colágeno	8
1.1.2.2	Proteínas no colágenas	9
1.1.3	Fase mineral	10
1.1.4	Regeneración ósea	11
1.1.5	Remodelado óseo	11
1.1.5.1	Fases del remodelado	12
1.1.5.2	Factores reguladores del remodelado	14
<b>1.2</b>	<b>Definición de Osteoporosis</b>	<b>22</b>
<b>1.3</b>	<b>Clasificación de OP</b>	<b>23</b>
1.3.1	Osteoporosis primaria o involutiva	23
1.3.2	Osteoporosis secundaria	24
<b>1.4</b>	<b>Fisiopatología de la OP</b>	<b>26</b>
<b>1.5</b>	<b>Epidemiología de la OP</b>	<b>28</b>
<b>1.6</b>	<b>OP y enfermedad periodontal</b>	<b>28</b>
<b>1.7</b>	<b>Implantes dentales y osteointegración</b>	<b>30</b>
<b>1.8</b>	<b>Modelos animales de OP para el estudio de la osteo integración de implantes dentales</b>	<b>32</b>
<b>1.9</b>	<b>Terapia farmacológica antiosteoporótica</b>	<b>34</b>
1.9.1	Tratamiento antireabsortivo	34
1.9.2	Tratamiento anabólico u osteoformador	37
1.9.3	Combinación de terapias	38
<b>2</b>	<b>JUSTIFICACIÓN, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS</b>	<b>40</b>
<b>2.1</b>	<b>Justificación</b>	<b>40</b>
<b>2.2</b>	<b>Hipótesis</b>	<b>40</b>
<b>2.3</b>	<b>Objetivos</b>	<b>40</b>

---

<b>3</b>	<b>MATERIAL Y MÉTODOS</b>	<b>41</b>
3.1	Modelo animal .....	41
3.2	Determinaciones densitométricas .....	41
3.3	Densitometrías y contenido cálcico en mandíbulas .....	45
3.4	Valoración de la precisión de las DXAs .....	46
3.5	Protocolo quirúrgico de la ovariectomía (OVX ) y administración de metilprednisolona (MPH) .....	47
3.6	Protocolo quirúrgico de colocación de implantes .....	48
3.7	Tratamiento farmacológico .....	49
3.8	Estudios de microtomografía computadorizada y análisis histomorfométrico de las muestras.....	50
3.9	Análisis estadístico.....	52
<b>4</b>	<b>RESULTADOS</b>	<b>53</b>
4.1	Validación del modelo de OP experimental .....	53
4.1.1	Estudios de densitometría ósea .....	53
4.1.2	Validación de las medidas de DXA en conejos .....	57
4.2	Estudio de la OP en hueso mandibular .....	57
4.2.1	Densidad ósea en las diferentes regiones mandibulares .....	57
4.2.2	Contenido cálcico en las cenizas mandibulares .....	58
4.2.3	Estudio de las correlaciones entre OP sistémica y OP mandibular ....	59
4.2.4	Correlaciones entre las medidas de los dos densitómetros.....	59
4.3	Comparación de los efectos de un fármaco antireabsortivo con un fármaco formador de hueso sobre la osteointegración de implantes dentales en hueso osteoporótico .....	61
4.3.1	Efecto de la PTH (1-34) sobre la DMO.....	61
4.3.2	Efecto del ALN a diferentes dosis sobre la DMO .....	61
4.3.3	Efecto de los fármacos antiosteoporóticos sobre el porcentaje de contacto hueso-implante.....	62
<b>5</b>	<b>DISCUSIÓN</b>	<b>65</b>
5.1	Justificación del modelo animal .....	65
5.2	Validación del modelo OP .....	66
5.3	Correlación OP sistémica / OP mandibular .....	66
5.4	Efectos de la OP sobre la osteointegración de implantes dentales	68
5.5	Efectos de la PTH (1-34) vs ALN sobre la osteointegración de implantes dentales.....	69
5.6	Futuras vías de investigación .....	73
<b>6</b>	<b>CONCLUSIONES</b>	<b>74</b>

---

<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>75</b>
<b>APORTACIONES CIENTÍFICAS</b>	<b>95</b>
<b>ANEXO</b>	<b>97</b>
A. Resultados detallados histomorfometría.....	98
B. Poster presentado en el congreso ASBMR en Denver (CO, USA) en Septiembre 2009 .....	100

---

**Índice de figuras**

Figura 1:	Esquema morfológico de una sección de hueso mandibular	2
Figura 2:	Esquema morfológico de la estructura ósea: hueso cortical y hueso trabecular	3
Figura 3:	Esquema de la regulación de la osteoclastogénesis	8
Figura 4:	Esquema de las fases del remodelado óseo	13
Figura 5:	Representación esquemática de la biología de la osteointegración	32
Figura 6:	Esquema de trabajo, tiempos de tratamiento, cirugías y exploraciones densitométricas (DXA)	41
Figura 7:	Densitómetro Hologic® QDR-1000 utilizado en el estudio	42
Figura 8:	Posicionamiento de los animales para la DXA de columna lumbar	43
Figura 9:	Soporte de metacrilato específicamente utilizado para la obtención de las DXA de rodilla y posicionamiento de los animales	43
Figura 10:	DXA de columna y rodilla. Izq: DXA de columna lumbar, proyección pósterio-anterior. Dcha: DXA de rodilla izquierda (RG, HS y AI)	44
Figura 11:	Regiones de interés analizadas en la densitometría mandibular ROI 1 (región alveolar y perialveolar), ROI 2 (ramus), ROI 3 (gonion)	45
Figura 12:	Esquema de un espectrofotómetro de absorción atómica	46
Figura 13:	Coefficiente de variación in vitro de la DMO durante el estudio	47
Figura 14:	Ovariectomía	48
Figura 15:	Cirugía de implantación	49
Figura 16:	Distribución normal de la DMO en las diferentes regiones analizadas	54
Figura 17:	Correlación de las medidas de DMO en las diferentes regiones	55
Figura 18:	Valores de DMO en las diferentes regiones analizadas a diferentes tiempos durante el estudio	56
Figura 19:	Densidad mineral ósea de las diferentes regiones mandibulares	58
Figura 20:	Valores del contenido cálcico de las cenizas mandibulares de la ROI 1 de conejos sanos versus conejos OP	58

---

Figura 21:	Correlación entre las medidas del densitómetro convencional (Hologic® QDR-1000/W™) y el densitómetro específico de animales pequeños (PIXImus™)	60
Figura 22:	Valores de la DMO de las diferentes regiones analizadas a diferentes tiempos del modelo animal	61
Figura 23:	Porcentaje de contacto entre hueso e implante en cada uno de los diferentes grupos	62
Figura 24:	Imágenes de microscopio electrónico de barrido mostrando el contacto entre el implante y el hueso en cada uno de los grupos en estudio	63

---

## Índice de tablas

Tabla 1:	Posibles causas de osteoporosis secundaria.....	25
Tabla 2:	Distribución de las muestras para el análisis histomorfométrico.....	50
Tabla 3:	Resultados de la densidad mineral ósea basal en diferentes localizaciones .....	53
Tabla 4:	Valores de CV y LSC de la DMO en las diferentes regiones analizadas. ....	57
Tabla 5:	Correlación entre la DMO mandibular y la DMO de otras regiones analizadas .....	59
Tabla 6:	Porcentaje del área ósea entre las espiras del implante y fuera de ellas en los diferentes grupos de tratamiento.....	64

---

**Abreviaturas**

AI	Área de implante	IM	Intramuscular
ALN	Alendronato	LSC	Menor cambio significativo
ATP	Adenosín trifosfato	M-CSF	Macrophage-Colony Stimulating Factor
BMP	Proteínas morfogenéticas	MMPs	metaloproteasas de la matriz
BSP	Sialoproteína ósea	MPH	Metilprednisolona
Cbfa1	Factor de unión $\alpha$ 1	OCN	Osteocalcina
CL	Columna lumbar	OMS	Organización Mundial de la Salud
CMO	Contenido Mineral Óseo	OP	Osteoporosis
CV	Coeficiente de variación	OPG	Osteoprotegenina
DMO	Densidad Mineral Osea	OPN	Osteopontina
DXA	Densitometría	OVX	Ovariectomía
EGF	Epidermal Growth Factor	PDGF	Platelet-Derived Growth Factor
FA	Fosfatasa alcalina	PG	Prostaglandinas
FATR	Fosfatasa ácido tartrato resistente	PTH	Paratohormona
FGF	Fibroblastic Growth Factor	RG	Rodilla Global
GM-CSF	Granulocyte/Macrophage-Colony Stimulating Factor	RGD	Arg-Gly-Asp
HS	Hueso subcondral	Shh	Sonic Hedgehod
IGF-I y II	Factores análogos a la insulina I y II	SIBLINGS	Small Integrin-Binding Ligand, N-linked Glycoprotein
Ihh	Indian Hedgehod	TGF- $\beta$	Transforming Growth Factor- $\beta$
IL-1	Interleuquina 1	TNF	Tumor Necrosis Factor
IL-6	Interleuquina 6	UFC-GM	Unidades formadoras de colonias de granulocitos y macroófagos
IL-11	Interleuquina 11	VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor

# 1 Introducción

## 1.1 Tejido óseo: tipos de hueso y remodelado óseo

El tejido óseo es un tejido conectivo especializado y mineralizado que junto con el cartílago forma el sistema esquelético. Tiene tres funciones fundamentales: a) mecánica, como soporte para la inserción muscular, b) protectora de los órganos y la médula ósea y c) metabólica, como reserva de calcio y fósforo, necesario para mantener la homeostasis esencial del organismo (Baron 2003).

Durante el desarrollo embrionario, la formación de hueso ocurre de dos formas diferentes: por osificación intramembranosa y por osificación endocondral. La principal diferencia entre el desarrollo intramembranoso y endocondral es la presencia de cartílago.

Desde un punto de vista anatómico, en el esqueleto se encuentran dos tipos diferentes de huesos: huesos planos derivados de la osificación intramembranosa como la escápula, la mandíbula y los huesos del cráneo y huesos largos formados por osificación endocondral como la tibia, el fémur y húmero.

A nivel macroscópico, el hueso largo está formado por tres partes diferenciadas: tiene dos extremidades (epífisis), la parte central (diáfisis) y una zona de transición entre ambas que se encuentra en continuo desarrollo (metáfisis). La epífisis y la metáfisis se originan a partir de dos centros de osificación independientes, y durante el crecimiento están separadas por una capa de cartílago llamada cartílago epifisario o plataforma de crecimiento.

La proliferación y expansión del cartílago epifisario es la responsable del crecimiento longitudinal de los huesos. Se mineraliza progresivamente y será reemplazada por tejido óseo al final del periodo de crecimiento.

La parte externa de los huesos está formada por una gruesa y densa capa de tejido calcificado, la cortical (hueso compacto), la cual en la diáfisis encierra la cavidad medular donde están alojadas las células hematopoyéticas de la médula ósea. Hacia la metáfisis y la epífisis, la cortical va siendo cada vez más delgada y el espacio interno se rellena con una fina red de trabéculas calcificadas formando el hueso trabecular. Los espacios incluidos en esta trabeculación también están rellenos de médula ósea y están en comunicación con la médula ósea de la diáfisis.

El área cortical de la epífisis se cubre con cartílago, un tejido no calcificado.

El hueso cortical y el trabecular están formados por las mismas células y la misma matriz pero existen diferencias estructurales y funcionales entre ambos. La primera diferencia estructural es cuantitativa: entre el 80%-90% del volumen en el hueso cortical está mineralizado mientras que en el trabecular solo el 15-25% está calcificado. Esto nos lleva a una diferencia funcional: el hueso cortical lleva a cabo funciones mecánicas y de protección, mientras que el hueso trabecular participa fundamentalmente en las funciones metabólicas. En el análisis histológico del esqueleto del individuo adulto se observa que el 80% del volumen total del hueso está formado por hueso cortical o compacto que, es el principal responsable de la integridad mecánica. El 20% restante del volumen es hueso trabecular o esponjoso que es fundamental para las demandas metabólicas (Fig.1).

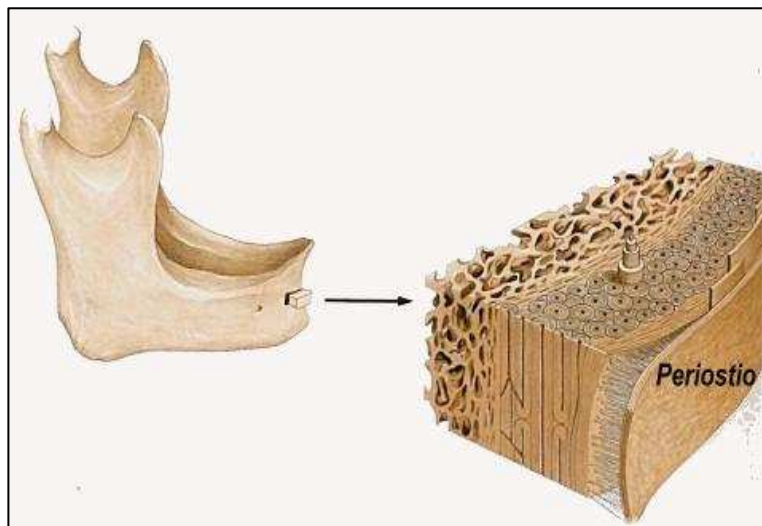


Figura 1: Esquema morfológico de una sección de hueso mandibular ([http://farm3.static.flickr.com/2215/2266831563\\_9b268117d5.jpg?v=0](http://farm3.static.flickr.com/2215/2266831563_9b268117d5.jpg?v=0))

El hueso cortical tiene una estructura de láminas o anillos concéntricos alrededor de canales centrales llamados canales de Havers, que se extienden longitudinalmente. Los canales de Havers están conectados entre sí por otros canales llamados canales de Volkmann que perforan del periostio. Ambos canales son utilizados por los vasos sanguíneos, linfáticos y nervios para extenderse a lo largo del hueso. Entre las láminas concéntricas de matriz mineralizada existen pequeños orificios ó lagunas donde se encuentran los osteocitos. Estas células intercambian nutrientes con el líquido instercial a

través de una serie de canalículos por donde se extienden prolongaciones celulares citoplasmáticas. Los canalículos están conectados entre sí y, eventualmente a los canales de Havers. El conjunto formado por el canal de Havers, las láminas concéntricas que lo rodean, las lagunas, los canalículos y los osteocitos recibe el nombre de osteona ó sistema de Havers. Las restantes láminas entre osteonas se llaman láminas intersticiales.

A diferencia del hueso compacto, el hueso trabecular o esponjoso no contiene osteonas, sino que las láminas intersticiales están dispuestas de forma irregular formando unos tabiques o placas llamadas trabéculas. Estos tabiques forman una estructura esponjosa dejando huecos que están llenos de médula ósea. Dentro de las trabéculas están los osteocitos que yacen en sus lagunas con canalículos que irradian desde las mismas. En este caso, los vasos penetran directamente en el hueso esponjoso y permiten el intercambio de nutrientes con los osteocitos. El hueso esponjoso es el principal constituyente de las epífisis de los huesos largos y del interior de la mayoría de los huesos planos. Tanto el hueso cortical como el esponjoso contienen células especializadas, matriz orgánica y fase mineral (Baron 2003).

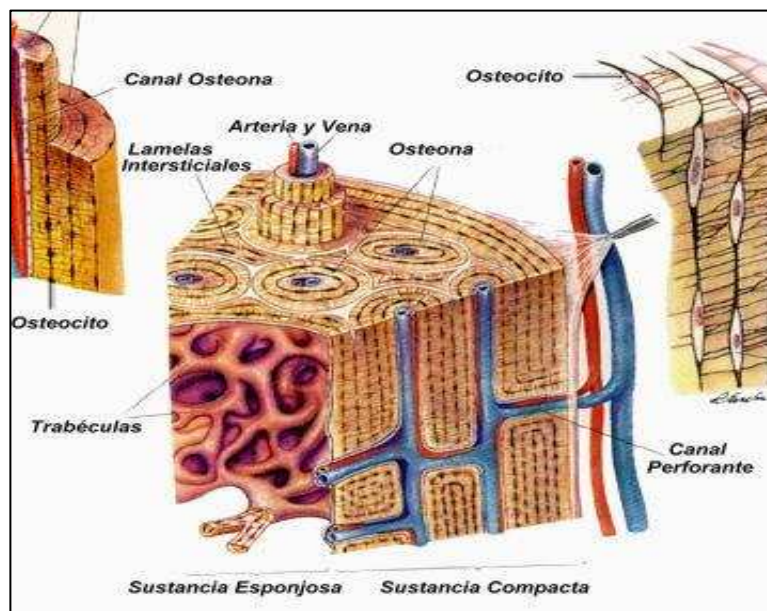


Figura 2: Esquema morfológico de la estructura ósea: hueso cortical y hueso trabecular ([www.anatomiahumana.ucv.cl/morfo1/foto1/9.jpg](http://www.anatomiahumana.ucv.cl/morfo1/foto1/9.jpg))

### 1.1.1 Células óseas

En el hueso coexisten varios tipos de células: los osteoblastos son células encargadas de la formación del tejido óseo; los osteocitos son osteoblastos maduros rodeados de matriz mineralizada y los osteoclastos son células encargadas de reabsorber hueso.

#### 1.1.1.1 Diferenciación osteoblástica

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

Actualmente se sabe que la diferenciación hacia la estirpe osteoblástica está controlada por genes pertenecientes a la familia Hedgehog, de los cuales los más conocidos son: *Ihh* (Indian hedgehog) y *Shh* (Sonic hedgehog) (Yamaguchi y cols. 2000; Aubin y Liu. 2000). Asimismo, es esencial el factor de transcripción *Cbfa1* (core-binding factor  $\alpha$ -1, también llamado *Runx2*) (Komori y cols. 1997; Heersche 2002; Ducy y cols. 1997; Hoshi y cols. 1999) y las proteínas morfogenéticas óseas (BMPs), que constituyen los reguladores más potentes de la diferenciación osteoblástica desde las células mesenquimales pluripotenciales (Yamaguchi y cols. 2000).

A medida que las células precursoras se van diferenciando expresan en la membrana celular proteínas específicas de su función o marcadores. La expresión de *Cbfa1* es la primera evidencia de la diferenciación osteogénica (Yamaguchi y cols. 2000), cuyo máximo nivel se alcanza en los pre-osteoblastos. El colágeno I y la osteopontina (OPN), se expresan de forma temprana en células osteoprogenitoras. Igualmente, la fosfatasa alcalina (FA) es una proteína de superficie que podría participar en la regulación de la proliferación, migración y diferenciación de las células osteoblásticas. La sialoproteína ósea (BSP) y la osteocalcina (OCN), son marcadores de diferenciación del pre-osteoblasto al osteoblasto y aparecen cuando se inicia la mineralización. La expresión de estas proteínas resulta especialmente útil

como marcadores osteogénicos en los estadios finales de la diferenciación osteoblástica (Fernández-Tresguerres-Hernández-Gil y cols. 2006).

### 1.1.1.2 El osteoblasto

Los osteoblastos son células grandes (20-30  $\mu\text{m}$ ), de forma poliédrica, con citoplasma basófilo y con un aparato de Golgi y un retículo endoplásmico rugoso de tamaño importante. Proceden de las células mesenquimales pluripotenciales de la médula ósea (Canfield y cols. 2000; Masi y Brandi 2001). Emiten prolongaciones citoplasmáticas hacia la matriz, que comunican con la red de osteocitos y con osteoblastos vecinos. Los osteoblastos y osteocitos se comunican entre sí por proteínas transmembrana o integrinas, que actúan de enlace entre células o entre una célula y la matriz extracelular, permitiendo el paso de mensajeros como el calcio, citoquinas o prostaglandinas (Civitelli y cols. 1993).

Los osteoblastos sintetizan la matriz orgánica o sustancia osteoide a un ritmo de 2 a 3  $\mu\text{m}$  por día y expresan una enzima característica, la FA, que permite la mineralización a un ritmo de 1-2  $\mu\text{m}$  por día. Actualmente, se sabe que los osteoblastos: 1) sintetizan las proteínas colágenas y no colágenas de la matriz orgánica del hueso; 2) dirigen la disposición de las fibrillas de la matriz extracelular; 3) contribuyen a la mineralización de la sustancia osteoide, gracias a la FA; 4) median en la reabsorción llevada a cabo por los osteoclastos a través de la síntesis de citoquinas específicas; 5) sintetizan factores de crecimiento (Simonet y cols. 1997).

La vida media de los osteoblastos humanos es de 1 a 10 semanas, al término de las cuales pueden desaparecer por mecanismos de apoptosis, transformarse en células limitantes o de revestimiento ó en osteocitos (15 %) (Aubin y Liu 1996).

Las células limitantes son células elongadas y planas, con un núcleo en forma de huso, sin apenas organelas. Pueden expresar los marcadores osteoblásticos anteriormente citados, como BSP, osteonectina y FA así como el receptor de paratohormona (PTH). Permanecen a lo largo de la superficie endóstica, constituyendo con el endostio una capa protectora de la superficie ósea, que juega un papel importante en la activación del remodelado óseo (Fernández-Tresguerres-Hernández-Gil y cols. 2006).

### 1.1.1.3 El osteocito

Una vez mineralizada la matriz, algunos osteoblastos quedan atrapados dentro, transformándose en osteocitos. Los osteoblastos, osteoclastos y células limitantes se hallan en la superficie ósea, mientras que los osteocitos están en el interior. Los osteocitos son las células más abundantes del hueso (10 veces más que los osteoblastos). Poseen forma estrellada y su cuerpo se sitúa en el interior de lagunas. Los procesos citoplasmáticos se comunican entre sí a través de los conductos calcóforos que están llenos de fluido óseo extracelular. De esta forma, los osteocitos se organizan formando un conjunto de células interconectadas que representa una única estructura, con la ventaja de que existe una gran superficie de contacto en el interior y hacia la superficie ósea, para asegurarse oxígeno y nutrientes. Cuando se produce un trauma en el hueso, el cese de la circulación sanguínea origina hipoxia y necrosis de los osteocitos que están a más de 0,1mm de un capilar intacto (Ham 1952). Los osteocitos también participan en la síntesis y mineralización de la matriz osteoide, pero se cree que su función principal es la de controlar el remodelado óseo, detectando las variaciones mecánicas de las cargas, fenómeno denominado mecanotransducción (Lanyon 1993). Los osteocitos constituyen el estadio final desde la línea osteoblástica y son incapaces de renovarse. Poseen los mismos marcadores que los osteoblastos, pero tienen como marcador específico el CD44, receptor de membrana que se expresa fuertemente en ellos y es negativo en osteoblastos y células limitantes de revestimiento.

### 1.1.1.4 El osteoclasto

Los osteoclastos proceden de células madre hematopoyéticas medulares denominadas "Unidades Formadoras de Colonias de Granulocitos y Macrófagos" (CFU-GM), precursoras de macrófagos y monocitos (Mundy 1993).

Se trata de células grandes (100  $\mu\text{m}$ ), multinucleadas, ricas en mitocondrias y vacuolas. Los osteoclastos contienen fosfatasa ácida tartrato resistente (FATR), que permite la desfosforilación de las proteínas, cuya actividad es aprovechada para su identificación, tanto in vivo como in vitro. Además tienen receptores para calcitonina.

Los osteoclastos tienen dos especializaciones en la membrana: un borde en cepillo, que es donde tiene lugar la reabsorción, y una zona clara, rica en microfilamentos, con integrinas, que sirven de anclaje a la matriz. Para ello, los osteoclastos se movilizan hacia la zona a reabsorber y, seguidamente, se adhieren a la superficie ósea mineralizada por el ribete en cepillo sellando los bordes del área mediante las integrinas. La integrina del osteoclasto, particularmente  $\alpha\text{v}\beta3$ , reconoce la secuencia Arg-Gly-Asp (RGD) existente en el colágeno y en otras proteínas de la matriz osteoide. A este nivel el pH es ácido, ya que secretan hidrogeniones generados por la anhidrasa carbónica II y enzimas proteolíticas como colagenasas, metaloproteasas, catepsina K, glucuronidasa (Mundy 1993), que van a originar la reabsorción del hueso mediante la solubilización de la matriz orgánica primero y de la mineral después.

Respecto a la osteoclastogénesis actualmente se sabe que los osteoblastos son fundamentales para la formación de osteoclastos. Así, el factor estimulante de las colonias de macrófagos (M-CSF) producido por los osteoblastos es requerido en las primeras fases de la osteoclastogénesis para la formación de células gigantes multinucleadas. Los conocimientos actuales acerca de la regulación de la osteoclastogénesis se basan en la existencia de tres moléculas clave:

- Osteoprotegerina (OPG), proteína sintetizada por osteoblastos y pre-osteoblastos.
- RANKL, ligando situado en la superficie de osteoblastos y pre-osteoblastos; es una citoquina transmembrana perteneciente a la familia del factor de necrosis tumoral (TNF) (Lacey 1998).
- RANK, receptor del anterior situado en la membrana de los osteoclastos y pre-osteoclastos.

La interacción entre el RANKL y su receptor RANK produce una activación de la diferenciación y de la actividad osteoclástica, aumentando la reabsorción ósea (Fig. 3). Asimismo, los efectos del RANKL tanto *in vivo*, como *in vitro* son inhibidos a modo de señuelo por la OPG, proteína circulante producida por los osteoblastos y pre-osteoblastos perteneciente a la superfamilia de los receptores de TNF (Simonet y cols. 1997; Aubin y Liu

1996; Ham 1952; Lanyon 1993; Mundy 1993; Burgués y cols. 1999; Hsu y cols. 1999; Bekker y cols. 2001; Boyle y cols. 2003).

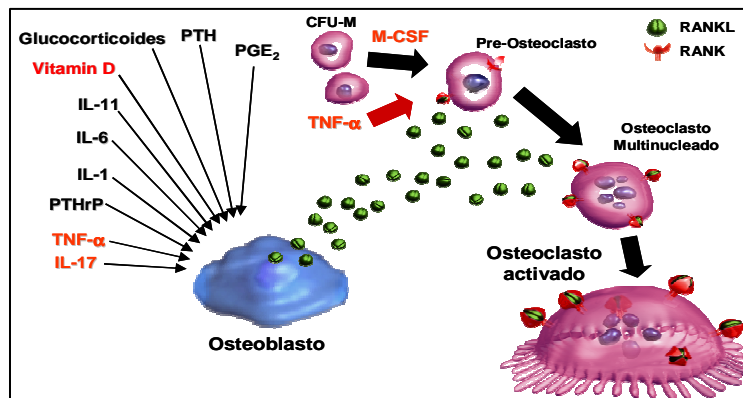


Figura 3: Esquema de la regulación de la osteoclastogénesis ([www.boneacademy.com/pdfs/RANKL\\_slides.pdf](http://www.boneacademy.com/pdfs/RANKL_slides.pdf))

### 1.1.2 Matriz orgánica

La matriz orgánica o sustancia osteoide representa un tercio del peso óseo. Está formada fundamentalmente por proteínas, entre las que destaca el colágeno. La matriz juega un papel importante en el conjunto del sistema óseo. Actualmente debe considerarse a la matriz mineralizada extracelular como algo más que un reservorio de calcio y fósforo, ya que constituye una reserva de proteínas que participan en la regulación de la diferenciación celular y en la integridad y función del tejido óseo (Young 2003).

#### 1.1.2.1 El colágeno

El 90% de la matriz extracelular está constituida por colágeno, sobre todo de tipo I (>95%) y tipo V (<5%). También se ha comprobado la presencia en pequeñas proporciones de colágeno tipo III, relacionado con las fibras de Sharpey y tipo XII, formado bajo estrés mecánico. En la molécula de colágeno se halla la secuencia RGD, que es reconocida por las integrinas de superficie de las células óseas (Gehron y cols. 1993). Contiene característicamente, los aminoácidos hidroxilisina e hidroxiprolina, siendo este último, un marcador específico de todos los fenotipos de colágeno y estando sus valores de excreción urinaria en relación directa con la tasa de reabsorción ósea (Schonau y Rauch 1997). Las fibras de colágeno se estabilizan mediante puentes de hidrógeno entre aminoácidos y a través de

la formación de puentes de piridinolina, entre las hidroxilisinas y lisinas. Sin embargo, el colágeno no tiene gran afinidad por el calcio, por lo que son otras las proteínas implicadas en el depósito mineral.

### 1.1.2.2 Proteínas no colágenas

Entre ellas hay que destacar:

#### **A. Proteoglicanos:**

Constituyen el 10% de las proteínas no colágenas. Son moléculas de gran tamaño. En la matriz osteoide hay cuatro tipos de proteoglicanos: el hialuronano y condroitín-sulfato de molécula grande que intervienen en las etapas iniciales de la morfogénesis ósea y el biglicano y la decorina de molécula más pequeña, que aparecen en las fases siguientes de la formación ósea (Fernández-Tresguerres-Hernández-Gil y cols. 2006).

#### **B. Proteínas con ácido $\gamma$ -carboxi-glutámico:**

Son la OCN y la proteína de la matriz con ácido  $\gamma$ -carboxiglutámico. Este ácido es un aminoácido que liga calcio y necesita vitamina K para su síntesis. La OCN es una pequeña proteína de la matriz sintetizada por los osteoblastos y plaquetas, dependiente de las vitaminas D y K. Representa el 15% de las proteínas no colágenas de la matriz y contiene tres restos de ácido  $\gamma$ -carboxiglutámico. Sus niveles plasmáticos se han considerado como uno de los marcadores bioquímicos de la osteogénesis, relacionándose con el número y actividad de los osteoblastos.

#### **C. Glicoproteínas:**

Son la osteonectina, la FA y las proteínas con el tripéptido RGD.

La osteonectina es una glicoproteína con gran afinidad por el colágeno tipo I, por el calcio y por la hidroxapatita. Representa el 25% de las proteínas no colágenas. Se cree que interviene en la regulación de la adhesión celular entre la matriz y las células. En el hueso es necesaria para la mineralización normal.

La FA es una enzima que libera fosfato inorgánico, necesario para la mineralización, a partir de ésteres fosfóricos. Existen varias isoenzimas y,

entre ellas la isoenzima ósea, se ha considerado un buen marcador de la actividad osteoblástica.

Proteínas con el tripéptido RGD, también llamadas SIBLINGS (Small Integrin-Binding Ligand, N-linked Glycoprotein) son fundamentalmente cinco: OPN, sialoproteínas óseas, fibronectina, trombospondina y vitronectina. Son glicoproteínas fundamentales en los procesos de remodelado y regeneración óseos, con una secuencia Arg-Gly-Asp (RGD) que es reconocida por las integrinas de los osteoblastos ( $\alpha v\beta 3$ , entre otras). También actúan como receptores de superficie de las células óseas permitiendo la adhesión de las células a la matriz extracelular y activando señales (Fernández-Tresguerres-Hernández-Gil y cols. 2006).

#### **D. Proteínas procedentes del plasma:**

Se encuentran en la matriz orgánica ósea en mayor proporción que en el plasma. Son la albúmina y la  $\alpha 2$ -SH-glicoproteína, probablemente relacionadas con la incorporación del calcio a la matriz osteoide.

#### **E. Factores de crecimiento:**

Son polipéptidos sintetizados en el propio hueso o procedentes de otros lugares como el hígado y las plaquetas, que intervienen en la diferenciación, crecimiento y proliferación de las células de forma autocrina o paracrina (Canalis y cols. 2003).

### **1.1.3 Fase mineral**

Finalmente, el componente mineral del hueso representa el 65% del peso óseo. Está formado por calcio, fosfato y carbonato (en proporciones de 10:6:1) en forma de pequeños cristales de hidroxiapatita  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ . En menor proporción hay magnesio, sodio, potasio, manganeso y flúor. El plasma se encuentra sobresaturado de calcio y fósforo respecto a la hidroxiapatita, por lo que debe haber sustancias que inhiban la mineralización. Las proteínas con capacidad adhesiva favorecen la mineralización, mientras que los proteoglicanos, magnesio, adenosín trifosfato (ATP) y pirofosfato la inhiben.

### 1.1.4 Regeneración ósea

La regeneración tisular es la respuesta que consigue la *restitutio ad integrum* del tejido tras un trauma, a diferencia de la reparación, donde el tejido que se forma es un tejido cicatricial, con características diferentes al original. En este sentido, el hueso es el único tejido del organismo, a excepción del tejido embrionario, que se restituye totalmente tras una lesión (Davies y Hosseini 2000).

La regeneración ósea origina una respuesta en la que están involucrados los vasos sanguíneos, las células y la matriz extracelular. Desde los estudios de Trueta en 1963 se sabe de la importancia de los vasos sanguíneos en la osteogénesis. Tras un trauma, se produce una respuesta inflamatoria y un hematoma inicial, con hematíes, plaquetas y fibrina (Trueta 1963). Las células del coágulo liberan interleuquinas y factores de crecimiento, originando la migración de linfocitos, macrófagos, precursores de osteoclastos y células mesenquimales pluripotenciales. Estas señales moleculares promueven la diferenciación hacia células endoteliales, fibroblastos, condroblastos y osteoblastos, dando origen a un nuevo tejido fibrovascular que reemplaza al coágulo inicial. Todo ello está regido por una serie de complejas interacciones entre factores de crecimiento, hormonas y citoquinas. En este proceso es fundamental el aporte vascular, la síntesis proteica y la mineralización (Fernández-Tresguerres-Hernández-Gil y cols. 2006).

Cuando el hueso se forma de forma rápida durante la cicatrización de una fractura no existe organización de las fibras colágenas por lo que no existe un fuerte entramado y encontramos un tejido orientado al azar. Este hueso está caracterizado por sus irregulares formaciones de fibras de colágeno, osteocitos numerosos y una calcificación retrasada y desordenada; es progresivamente sustituido por hueso estructurado durante los procesos de remodelado.

### 1.1.5 Remodelado óseo

El hueso es un tejido dinámico en constante formación y reabsorción, que permite el mantenimiento del volumen óseo, la reparación del daño tisular y la homeostasis del metabolismo fosfo-cálcico. Este fenómeno equilibrado denominado proceso de remodelado óseo, permite la renovación de un 5% del

hueso cortical y un 20 % del trabecular cada año. El remodelado óseo existe toda la vida, pero sólo hasta la tercera década el balance es positivo (Serrano y Mariñoso 1990).

Es precisamente en la treintena cuando existe la máxima masa ósea, que se mantiene con pequeñas variaciones hasta los 50 años. A partir de aquí, existe un predominio de la reabsorción y la masa ósea empieza a disminuir.

A nivel microscópico el remodelado óseo se produce en pequeñas áreas de la cortical o de la superficie trabecular, llamadas unidades básicas multicelulares. La reabsorción siempre precede a la formación y en el esqueleto joven las cantidades de hueso reabsorbidas son similares a las neoformadas. Por esto se dice que es un proceso balanceado, acoplado, en condiciones normales, tanto en el espacio como en el tiempo. La vida media de cada unidad de remodelado en humanos es de 2 a 8 meses y la mayor parte de este período está ocupado por la formación ósea. Existen en el esqueleto humano 35 millones de unidades básicas multicelulares y cada año se activan 3-4 millones, por lo que el esqueleto se renueva totalmente cada 10 años (Davies y Hosseini 2000).

#### **1.1.5.1 Fases del remodelado**

El remodelado óseo puede ser dividido en las siguientes fases:

##### **A. Fase quiescente:**

El hueso está en condiciones de reposo.

##### **B. Fase de activación:**

El primer fenómeno que tiene lugar es la activación de la superficie ósea previa a la reabsorción, mediante la retracción de las células limitantes (osteoblastos maduros elongados existentes en la superficie endóstica) y la digestión de la membrana endóstica por la acción de las colagenasas. Al quedar expuesta la superficie mineralizada se produce la atracción de osteoclastos circulantes procedentes de los vasos sanguíneos próximos.

##### **C. Fase de reabsorción:**

Seguidamente, los osteoclastos comienzan a disolver la matriz mineral y a descomponer la matriz osteoide. Los macrófagos concluyen este proceso

que permite la liberación de los factores de crecimiento contenidos en la matriz, fundamentalmente TGF- $\beta$  (factor transformante del crecimiento  $\beta$ ), PDGF (factor de crecimiento derivado de las plaquetas), IGF-I y II (factores análogos a la insulina I y II).

#### **D. Fase de formación:**

Simultáneamente, en las zonas reabsorbidas se produce el fenómeno de agrupamiento de preosteoblastos, atraídos por los factores de crecimiento que se liberaron de la matriz y que actúan como quimiotácticos y además estimulan su proliferación (Agerbaek y cols. 1991; Lind y cols. 1995). Los preosteoblastos sintetizan una sustancia cementante sobre la que se va a adherir el nuevo tejido y expresan BMPs, responsables de la diferenciación. A los pocos días, los osteoblastos ya diferenciados van a sintetizar la sustancia osteoide que rellenará las zonas horadadas.

#### **E. Fase de mineralización:**

A los 30 días del depósito de osteoide comienza la mineralización, que finalizará a los 130 días en el hueso cortical y a 90 días en el trabecular.

A continuación empieza otra fase quiescente o de descanso (Fernández-Tresguerres-Hernández-Gil y cols. 2006) (Fig 4).

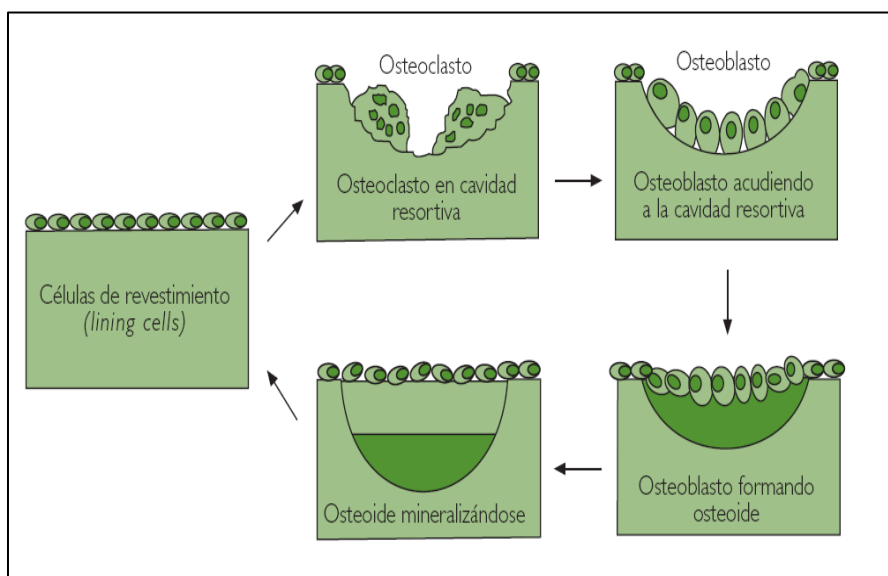


Figura 4: Esquema de las fases del remodelado óseo (Fernández-Tresguerres-Hernández-Gil I, 2006).

### 1.1.5.2 Factores reguladores del remodelado

El balance entre la reabsorción y la formación ósea está influido por una serie de factores, interrelacionados entre sí, como son factores genéticos, mecánicos, vasculares, nutricionales, hormonales y locales.

#### **A. Factores genéticos:**

Los factores genéticos son determinantes en el pico de masa ósea (valor máximo de masa ósea de cada individuo a lo largo de su vida), ya que entre el 60 y el 80% de ésta se encuentra determinada genéticamente. Así los sujetos de raza negra poseen una masa ósea mayor que los de raza blanca y éstos mayor que los orientales. La masa ósea se transmite de padres a hijos, por ello la predisposición a padecer osteoporosis es mayor en hijas de madres que la padecen (Pocock y cols. 1987).

#### **B. Factores mecánicos:**

La actividad física es imprescindible para el correcto desarrollo del hueso. Se cree que la acción muscular transmite al hueso una tensión que es detectada por la red de osteocitos incluida en el interior del fluido óseo. Estos osteocitos producen mediadores como prostaglandinas, óxido nítrico e IGF-I, que estimulan tanto su actividad como la de los osteoblastos y originan una mayor formación ósea. Por el contrario, la falta de actividad muscular, el reposo o la ingravidez tienen un efecto deletéreo sobre el hueso, acelerando la reabsorción (Morey 1978).

#### **C. Factores vasculonerviosos:**

Se sabe desde los trabajos de Trueta en 1963 que la vascularización es fundamental para el normal desarrollo óseo, permitiendo el aporte de células sanguíneas, oxígeno, minerales, iones, glucosa, hormonas y factores de crecimiento. La vascularización constituye el primer paso para la osificación: los vasos sanguíneos invaden el cartílago y posteriormente se produce la reabsorción ósea por los osteoclastos, procedentes de los vasos próximos. Igualmente, la neoformación vascular es el primer hecho en el fenómeno de la reparación de fracturas o de la regeneración ósea, ya que la existencia de oxígeno es fundamental para que se produzca la *restitutio ad integrum* y no tejido fibroso. Ham constató este fenómeno en 1952 al observar que los

osteocitos se necrosan cuando están lejos de un capilar (la distancia máxima es de 0,1 mm) (Trueta 1963; Ham 1952).

La inervación es necesaria para el normal fisiologismo óseo. El hueso es inervado por el sistema nervioso autónomo y por fibras nerviosas sensoriales. Se han encontrado fibras autónomas en periostio, endostio, hueso cortical y asociadas a los vasos sanguíneos de los conductos de Volkmann, así como neuropéptidos y sus receptores en el hueso. Ejemplos de la importancia de la inervación en la fisiología ósea son la osteopenia y la fragilidad ósea presentes en pacientes con desórdenes neurológicos, así como la menor densidad mineral ósea existente en mandíbulas denervadas (Fernández-Tresguerres-Hernández-Gil y cols. 2006).

#### **D. Factores nutricionales:**

Se necesita un mínimo de calcio para permitir la mineralización que la mayoría de los autores cifran en torno a 1.200 mg. diarios hasta los 25 años; después y hasta los 45 años no debe ser inferior a un gramo y tras la menopausia debe ser por lo menos 1.500 mg al día. Asimismo, se conoce que hábitos tóxicos como el tabaco, consumo excesivo de cafeína, alcohol y de sal constituyen importantes factores de riesgo para la aparición de osteopenia (Fernández-Tresguerres-Hernández-Gil y cols. 2006).

#### **E. Factores hormonales:**

El desarrollo normal del esqueleto está condicionado por el correcto funcionamiento del sistema endocrino, fundamentalmente de la hormona somatotropa (GH, hormona del crecimiento) secretada por la hipófisis y controlada por el hipotálamo, cuyo exceso produce gigantismo y su defecto enanismo y las hormonas calcitrópicas (PTH, calcitonina y metabolitos de la vitamina D). Las hormonas son mensajeros sistémicos que actúan a distancia de su lugar de producción (efecto endocrino), pero también regulan la síntesis y la acción de los factores locales que intervienen directamente en el metabolismo celular (efectos autocrino y paracrino). Las hormonas más importantes que intervienen en la fisiología ósea son:

**E.1. Hormonas tiroideas:** Poseen dos acciones contrapuestas sobre el hueso. En primer lugar, estimulan la síntesis de la matriz osteoide por los osteoblastos y su mineralización, favoreciendo la síntesis de IGF-I. Por esto, en el hipotiroidismo congénito (cretinismo) se produce talla baja por

alteración de la formación ósea. En segundo lugar, se produce un efecto contrario, estimulando la reabsorción al aumentar el número y función de los osteoclastos. La manifestación clínica de este efecto es la aparición de pérdida de masa ósea en el hipertiroidismo (Jódar Gimeno y cols. 1997).

**E.2. PTH (paratohormona):** Es la hormona que controla la homeostasis del calcio a través de la acción directa sobre el hueso y el riñón e indirecta en el intestino. Producida en las glándulas paratiroideas que responden al descenso de la calcemia, es la hormona hipercalcemiante por excelencia, al favorecer la reabsorción ósea. No obstante, se ha descubierto un papel estimulador en la formación ósea, a través de la síntesis de IGF-I y TGF- $\beta$  (Canalis y cols. 1989).

Este doble efecto de reabsorción y formación explicaría porque la PTH en administración continua estimularía la reabsorción ósea a través de la síntesis de RANKL; un factor favorecedor de la osteoclastogénesis, por parte de las células osteoblásticas. A dosis intermitentes estimularía la formación de hueso, asociado a un incremento de los factores de crecimiento y a una disminución de la apoptosis de los osteoblastos (Fernández-Tresguerres-Hernández-Gil y cols. 2006).

**E.3. Calcitonina:** Producida en las células C o parafoliculares del tiroides, es inhibidora de la reabsorción ósea, al reducir el número y la actividad de los osteoclastos. Sin embargo, esta acción es transitoria, ya que los osteoclastos parecen volverse “impermeables” a la calcitonina en pocos días (Prieto 1999).

**E.4. 1,25(OH) $_2$  vitamina D3 o calcitriol:** Hormona esteroidea que favorece la absorción intestinal de calcio y fosfato y, por tanto, la mineralización ósea. Es necesaria para el crecimiento normal del esqueleto. Algunos autores piensan que puede ser producida por células linfocíticas o monocíticas del hueso, ejerciendo un papel importante como regulador local de la diferenciación de los osteoclastos (Raisz 1993).

**E.5. Andrógenos:** Tienen un efecto anabolizante sobre el hueso, a través del estímulo de los receptores de los osteoblastos. Asimismo, actúan de mediadores en el pico de GH existente en la pubertad. Mientras que la deficiencia androgénica se asocia a una menor densidad ósea, la administración de testosterona en jóvenes antes del cierre epifisario

incrementa la masa ósea. Igualmente, las mujeres con exceso de andrógenos presentan densidades óseas más elevadas (Fernández-Tresguerres-Hernández-Gil y cols. 2006).

**E.6. Estrógenos:** Son esenciales para el cierre de los cartílagos de conjunción y se ha descubierto que juegan un papel importante en el desarrollo esquelético tanto femenino como masculino durante la adolescencia. Los estrógenos tienen un doble efecto sobre el metabolismo óseo: por un lado favorecen la formación ósea al aumentar el número y función de los osteoblastos y por otro lado, disminuyen la reabsorción. Se han descrito receptores de estrógenos en osteoblastos, osteocitos y osteoclastos humanos. Recientes investigaciones han comprobado que los estrógenos pueden aumentar los niveles de OPG, proteína producida por los osteoblastos que inhibe la reabsorción, por lo que podrían jugar un papel importante en la regulación de la osteoclastogénesis (Hofbauer y cols. 1999). Es por esto que la deficiencia de estrógenos durante la menopausia constituye el factor patogénico más importante de la pérdida ósea asociada a la osteoporosis postmenopáusica (Fernández-Tresguerres-Hernández-Gil y cols. 2006).

**E.7. Progesterona:** Es igualmente anabolizante sobre el hueso, bien directamente, a través de los osteoblastos, que poseen receptores para esta hormona, o bien de forma indirecta, mediante la competición por los receptores osteoblásticos de los glucocorticoides.

**E.8. Insulina:** Estimula la síntesis de la matriz directa e indirectamente, a través del aumento de la síntesis hepática de IGF-I.

**E.9. Glucocorticoides:** A dosis altas tienen efectos catabólicos sobre el hueso, ya que inhiben la síntesis de IGF-I por los osteoblastos, y suprimen directamente la BMP-2 y el Cbfa1, factores críticos para la osteoblastogénesis (Manolagas 2000). Sin embargo, estudios recientes han demostrado que a dosis fisiológicas tienen capacidad osteogénica favoreciendo la diferenciación osteoblástica (Lukert y Kream 1996; Fernández-Tresguerres-Hernández-Gil y cols. 2006).

**E.10 Hormona de crecimiento (GH):** Tiene dos acciones sobre el hueso, directa e indirecta. La GH actúa directamente sobre los osteoblastos, con receptores para la hormona, estimulando su actividad, lo que produce un

aumento en la síntesis de colágeno, OCN y FA. La acción indirecta se produce a través del aumento de la síntesis de IGF-I y II por los osteoblastos. Estos factores favorecen la proliferación y diferenciación de los osteoblastos, aumentando su número y función.

Desde hace unos años se viene considerando a la GH como un factor de crecimiento local, ya que no sólo se sintetiza en la adenohipófisis, sino en casi todas las células del organismo, incluidos los osteoblastos teniendo un efecto autocrino y paracrino, además del endocrino ya mencionado (Harvey y Hull 1998; Fernández-Tresguerres-Hernández-Gil y cols. 2006).

### **F. Factores locales:**

El remodelado óseo también está regulado por una serie de factores locales, entre los que destacan los factores de crecimiento y las citoquinas. Recientemente se han implicado las proteínas de la matriz ósea como moduladoras de la acción de otros factores locales.

Las células del hueso también juegan un papel importante por la producción de prostaglandinas y óxido nítrico, así como de citoquinas y factores de crecimiento.

**F.1. Factores de crecimiento:** Son polipéptidos producidos por las propias células óseas o en tejidos extra-óseos, que actúan como moduladores de las funciones celulares, fundamentalmente sobre el crecimiento, diferenciación y proliferación celular.

- **IGF-I y II:** Los factores de crecimiento análogos a la insulina son polipéptidos similares a esta hormona sintetizados por el hígado y los osteoblastos. Se hallan en gran concentración en la matriz osteoide (Cohick y Clemmons 1993). Incrementan el número y función de los osteoblastos, favoreciendo la síntesis de colágeno. Circulan unidos a proteínas de unión (IGFBP de IGF- binding proteins) que a su vez pueden ejercer efectos estimulatorios o inhibitorios sobre el hueso. Los IGFs están regulados por hormonas y factores de crecimiento locales. Así, la GH, los estrógenos y la progesterona aumentan su producción, mientras que los glucocorticoides la inhiben. Asimismo, median en la interacción osteoblasto-osteoclasto e intervienen de forma activa en el remodelado óseo (Hill y cols. 1995). El IGF-II es el factor de crecimiento más

abundante de la matriz ósea. Es importante durante la embriogénesis (Mohan y Baylink 1991).

- TGF- $\beta$  (Transforming Growth Factor- $\beta$ ): Los factores de crecimiento transformantes  $\beta$  son una superfamilia de proteínas muy abundantes en el tejido óseo (los segundos, tras los IGF). Están presentes en la matriz en forma latente y se activan durante la reabsorción osteoclástica.

TGF- $\beta$  es un potente estimulador de la formación ósea, potenciando la diferenciación osteoblástica y la síntesis de la matriz osteoide e inhibiendo la síntesis de proteasas entre las que destacan la metaloproteasas de la matriz (MMPs), enzimas que degradan la misma. Asimismo, inhibe la reabsorción al reducir la formación y diferenciación de los osteoclastos, así como la actividad de los osteoclastos maduros y estimular su apoptosis. Además de estas funciones, se ha descubierto que inhibe la proliferación epitelial y media en el efecto anabolizante de los andrógenos (Baylink y cols. 1993).

- BMPs (Bone Morphogenetic Proteins): Las proteínas morfogenéticas óseas están incluidas dentro de la familia de los TGF- $\beta$ . Constituyen un grupo de 15 proteínas capaces de conseguir la transformación de tejido conjuntivo en tejido óseo, por lo que se consideran osteoinductivas. Asimismo, son capaces de estimular la diferenciación de células pluripotenciales hacia diferentes líneas celulares (tejido adiposo, cartílago y hueso). Son muy abundantes en el tejido óseo y durante la embriogénesis participan en la formación del hueso y cartílago.

Actualmente se las considera como los factores más potentes de la diferenciación osteoblástica y se cree que además de estimular la osteogénesis inhiben la osteoclastogénesis (Yamaguchi y cols. 2000; Canalis y cols. 2003).

- PDGF (Platelet-Derived Growth Factor): El factor de crecimiento derivado de las plaquetas por un lado estimula la síntesis proteica llevada a cabo por los osteoblastos, y por otro lado, favorece la reabsorción ósea. Otros efectos son la proliferación de fibroblastos, así como de células musculares lisas, la neovascularización y la síntesis de colágeno, por lo que favorece la cicatrización (Nash y cols. 1994).

- FGF (Fibroblastic Growth Factor): El factor de crecimiento fibroblástico es un anabolizante óseo, ya que es mitógeno de los osteoblastos y de las células endoteliales vasculares, así como de los fibroblastos. Como ejemplo práctico del efecto del FGF se sabe que las mutaciones en sus receptores producen alteraciones del esqueleto craneofacial, como la acondroplasia, el síndrome de Apert y el síndrome de Crouzon, entre otras (Marie 2003).
- EGF (Epidermal Growth Factor): El factor de crecimiento epidérmico es un potente mitógeno de las células de origen mesodérmico y ectodérmico. Se sintetiza en múltiples tejidos del organismo, por lo que podría estar involucrado en diversas funciones biológicas, aún no bien esclarecidas. Respecto al hueso podría tener una doble acción formadora y destructora, si bien ésta última es la mejor conocida (Fernández-Tresguerres-Hernández-Gil y cols 2006).
- VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor): El factor de crecimiento vascular endotelial induce la angiogénesis y la proliferación endotelial vascular. Produce vasodilatación y un incremento de la permeabilidad vascular. Se produce en situaciones de hipoxia y actualmente se está considerando como uno de los factores claves en el desarrollo de las primeras fases del proceso de reparación de fracturas y regeneración ósea, así como en el desarrollo tumoral (Fernández-Tresguerres-Hernández-Gil y cols. 2006).
- GM-CSF (Granulocyte/Macrophage-Colony Stimulating Factor): El factor estimulador de colonias de granulocitos y macrófagos es importante para la osteoclastogénesis y puede intervenir en la patogenia de la osteopetrosis (Fernández-Tresguerres-Hernández-Gil y cols. 2006).
- M-CSF (Macrophage-Colony Stimulating Factor): El factor estimulador de colonias de macrófagos es producido por los osteoblastos y células del estroma medular y es requerido como factor esencial en las primeras fases de la osteoclastogénesis para la formación de células gigantes multinucleadas, pero no tiene efecto sobre la actividad osteoclástica (Fernández-Tresguerres-Hernández-Gil y cols. 2006).
- TNF (Tumor Necrosis Factor): El factor de necrosis tumoral *in vitro* estimula la reabsorción y se le ha relacionado con la pérdida ósea de la

artritis y de la enfermedad periodontal (Fernández-Tresguerres-Hernández-Gil y cols. 2006).

**F.2. Proteínas de la matriz:** En los últimos años se ha descubierto que las proteínas de la matriz actúan como moduladores de los factores de crecimiento (Young 2003).

Hay que tener en cuenta que las proteínas de la matriz se hallan a una concentración mil veces mayor que los factores de crecimiento, por lo que podrían jugar un papel más importante en la regulación de las diferentes funciones celulares (Horowitz 2003).

Por otro lado, las proteínas de la matriz también participan en la regulación de la diferenciación de las células contenidas en la matriz. Por ejemplo, el colágeno tipo I es uno de los marcadores más tempranos que regulan las células osteoprogenitoras y la FA es una proteína de superficie que podría participar en la regulación de la proliferación, migración y diferenciación de las células osteoblásticas.

**F.3. Citoquinas:** Son polipéptidos sintetizados en células linfocíticas y monocíticas que juegan un papel importante en múltiples funciones celulares, como en la respuesta inmunológica, la inflamación y la hematopoyesis, con un efecto autocrino y paracrino. En el hueso son importantes las siguientes:

- Interleuquina 1 (IL-1): Estimula directamente la reabsorción osteoclástica, incrementando la proliferación y diferenciación de los pre-osteoclastos así como la actividad osteoclástica e inhibiendo la apoptosis de los osteoclastos.

En realidad son 3 moléculas diferentes relacionadas: IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$  y el antagonista del receptor de IL-1, siendo esta última inhibidora del efecto de las dos primeras. Su acción sobre la reabsorción es directa e indirecta, a través de la síntesis de prostaglandinas (Compston 2001).

- Interleuquina 6 (IL-6): Estimula la reabsorción ósea y parece implicada en la patogenia de la enfermedad de Paget. Se cree que juega un papel importante en las etapas iniciales de la osteoclastogénesis. Se produce en respuesta a PTH, IL-1 y 1, 25(OH) $_2$  D3 (Roodman y cols. 1992).

- Interleuquina 11 (IL-11): De reciente descubrimiento, se produce en la médula ósea y favorece la osteoclastogénesis.
- Prostaglandinas (PG): In vitro favorecen la reabsorción ósea, fundamentalmente la PGE2, pero también la PGE1, PGG2, PGI2 y PGH2 (Kamaguchi y cols. 1995). Estudios *in vivo*, midiendo los niveles de prostaglandinas en el líquido crevicular, han demostrado su participación en la destrucción ósea que acontece en la enfermedad periodontal (Offenbacher y cols. 1993; Knothe Tate y cols. 2004)

## 1.2 Definición de Osteoporosis

En la actualidad la osteoporosis (OP) se considera “un trastorno generalizado del esqueleto caracterizado por una alteración de la resistencia ósea que predispone a la persona a un mayor riesgo de fractura” (NIH 2001). El remodelado normal del hueso depende del equilibrio entre la formación y la resorción. La osteoporosis es el resultado de un balance negativo, debido a un desequilibrio entre estas dos actividades. En esta definición, la resistencia del hueso implica la integración de la cantidad y la calidad del mismo.

La cantidad de hueso contenida en un segmento óseo o en la totalidad del organismo, incluyendo todos los componentes del hueso, se conoce como masa ósea y se expresa en gramos. La masa ósea de una persona va aumentando paulatinamente desde el nacimiento, a medida que va creciendo el esqueleto, hasta alcanzar un valor máximo (pico de masa ósea) alrededor de los 30-35 años, en el momento de la madurez esquelética (ver capítulo 1.1.5). El peso de la parte mineral ósea contenida en un fragmento óseo determinado, es el Contenido Mineral Óseo (CMO). El peso del contenido mineral de un fragmento óseo determinado, referida a un área concreta, es la Densidad Mineral Ósea (DMO) y se expresa en gramos de hidroxapatita/cm<sup>2</sup>. Es el dato habitual utilizado para estimar la masa ósea de un individuo.

En realidad, el auténtico valor de la densidad mineral (g/cm<sup>2</sup>) no puede determinarse por los métodos densitométricos habituales ya que delimitan un área bidimensional y no tridimensional como lo haría la tomografía axial computadorizada (TAC), único método que mide realmente valores de densidad volumétrica. No obstante, en la actualidad, el valor absorciométrico es aceptado de forma consensuada, como valor de DMO.

En 1994, con el objetivo de crear una definición de OP que incorporase masa ósea y fractura, la Organización Mundial de la Salud (OMS) estableció una clasificación de gran valor práctico, comparando la masa ósea (medida por densitometría) de una persona determinada con la media del “pico de masa ósea” que se alcanza al final de la juventud. De esta forma estableció las siguientes definiciones:

1. **Normal:** una DMO hasta una desviación estándar (DE) por debajo del pico de masa ósea.
2. **Osteopenia:** masa ósea entre  $-1$  y  $-2,5$  DE del pico de masa ósea .
3. **Osteoporosis:** DMO menor de 2,5 DE por debajo del pico de masa ósea.
4. **Osteoporosis severa (o establecida):** cuando, además, se añade la existencia de una o más fracturas por traumatismos de bajo impacto.

En cuanto a la calidad del hueso intervienen distintas características macroscópicas y geométricas del hueso, tales como el tamaño de la vértebra o la longitud del cuello del fémur, y otras microscópicas, como la actividad de remodelado, la mineralización secundaria, el estado de los enlaces de colágeno, la porosidad cortical, la pérdida de conectividad trabecular y la acumulación de microlesiones que se van produciendo con la edad (Smolen 1996).

## 1.3 Clasificación de OP

Atendiendo a la etiopatogenia de la OP, podemos considerar dos grupos bien diferenciados:

1. **Osteoporosis primaria o involutiva**
2. **Osteoporosis secundaria**

### 1.3.1 Osteoporosis primaria o involutiva

Es el grupo de OP más frecuente y al que siempre nos referimos cuando no especificamos. Como su nombre indica, se produce con el transcurso de los años, especialmente en la mujer después de la menopausia entre los 50 y 75 años (OP posmenopáusica o tipo I) y tanto en la mujer como en el varón

en edades más avanzadas, por encima de los 70 - 75 años (OP senil o tipo II):

- **OP postmenopáusica o tipo I:** se produce en la mujer como consecuencia del cese de la función ovárica. La pérdida ósea se acelera y afecta especialmente al hueso trabecular, siendo características las fracturas vertebrales por aplastamiento y las de la extremidad distal del antebrazo (fractura de Colles).
- **OP senil o tipo II:** se produce en ambos sexos, a edades más avanzadas. Es consecuencia de la pérdida de cantidad y alteración de la calidad ósea que progresivamente tiene lugar con el transcurso de los años. Esta pérdida no es tan acelerada como en el tipo I y afecta tanto al hueso trabecular como al cortical, siendo características la fractura de cadera, además de las de pelvis, húmero proximal y vértebras (acuñamientos múltiples).

Es necesario recalcar que esta división en tipos I y II de la osteoporosis involutiva, aunque útil en la práctica clínica, es un tanto artificial y no se corresponde con dos procesos completamente independientes, sino que muestra momentos diferentes de un mismo proceso que evoluciona a lo largo de años. Si la mujer no tuviese una pérdida acelerada de masa ósea después de la menopausia, no padecería tan frecuentemente una OP senil 15 ó 20 años más tarde. Hoy sabemos que el déficit estrogénico juega un papel importante no solamente en la pérdida rápida de masa ósea que sigue a la menopausia sino también en la fase lenta de pérdida que sufren la mujer y el varón en edades más avanzadas (Black y cols. 2001).

### 1.3.2 Osteoporosis secundaria

Se utiliza esta denominación cuando existe una causa capaz de producir el trastorno independientemente de la menopausia y la edad. Las posibles etiologías son muy numerosas, resaltando diferentes enfermedades endocrinas, gastrointestinales, hematológicas o del tejido conectivo, así como la inmovilización prolongada o el uso de distintos fármacos.

A continuación se exponen las causas mejor conocidas de osteoporosis secundaria:

<b>Posibles etiologías</b>	
<b>Endocrinopatías</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• hiperparatiroidismo</li> <li>• hipertiroidismo</li> <li>• hipercortisolismo</li> <li>• déficit de GH</li> <li>• diabetes mellitus tipo I</li> <li>• hipogonadismo femenino (hiperprolactinemia, amenorrea hipotalámica, anorexia nerviosa, menopausia precoz)</li> <li>• hipogonadismo masculino (fallo gonadal primario o secundario)</li> </ul>
<b>Enfermedades digestivas</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• síndromes de malabsorción</li> <li>• gastrectomía subtotal</li> <li>• cirrosis hepática</li> <li>• cirrosis biliar primaria</li> <li>• ictericia obstructiva crónica y alactasia</li> </ul>
<b>Desórdenes hematológicos</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• mieloma múltiple</li> <li>• leucemias</li> <li>• linfomas</li> <li>• anemias hemolíticas</li> <li>• mastocitosis sistémica</li> </ul>
<b>Conectivopatías</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• artritis reumatoide</li> <li>• osteogénesis imperfecta</li> <li>• síndrome de Marfan</li> <li>• síndrome de Ehlers-Danlos</li> <li>• homocistinuria</li> </ul>
<b>Fármacos</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• heparina</li> <li>• glucocorticoides</li> <li>• anticomiciales</li> <li>• ciclosporina</li> <li>• tiroxina</li> <li>• análogos de GnRH</li> <li>• quimioterápicos</li> <li>• litio</li> <li>• diuréticos de asa</li> </ul>
<b>Alteraciones de la nutrición</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• déficit de calcio y vitamina D</li> <li>• dietas hiperproteicas</li> <li>• cafeína</li> <li>• alcohol</li> <li>• anorexia nerviosa</li> </ul>
<b>Otros</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• inmovilización prolongada</li> <li>• hipercalciuria</li> <li>• situación postrasplante</li> </ul>

Tabla 1: Posibles causas de osteoporosis secundaria (Walsh y cols.1996)

El conocimiento de la osteoporosis secundaria debida al uso de glucocorticoides es muy importante por su elevada frecuencia y gravedad. Los glucocorticoides producen disminución de la absorción intestinal de calcio y vitamina D e hiperparatiroidismo secundario, junto con una

disminución de la actividad osteoblástica y exceso de acción osteoclástica, con el consiguiente efecto pernicioso para el hueso.

Se estima que hasta un 0,5% de la población toma glucocorticoides durante largos períodos, cifra que se eleva a más del 1,5% en mujeres mayores de 55 años. Sin embargo, muy pocos pacientes son alertados del riesgo de padecer OP y casi ninguno recibe tratamiento profiláctico adecuado.

La pérdida ósea secundaria al uso de glucocorticoides se produce de forma rápida durante los primeros 3-6 meses, enlenteciéndose posteriormente. El uso de 7,5 mg/día de prednisona o una dosis superior, así como dosis equivalentes de otros glucocorticoides, durante 6 meses o más se considera nocivo para el hueso, aumentando extraordinariamente el riesgo de OP y fracturas por fragilidad, especialmente en vértebras y costillas.

Por todo ello, es obligatorio utilizar siempre la dosis de glucocorticoides más baja posible durante el mínimo tiempo necesario y, cuando se prevea una dosis elevada y/o un tratamiento prolongado, se debe realizar una valoración del riesgo y un tratamiento preventivo. Los corticoides inhalados, aunque son mucho menos deletéreos, no están totalmente exentos de riesgo osteopenizante (Walsh y cols. 1996).

#### **1.4 Fisiopatología de la OP**

En condiciones normales, la fase de reabsorción ósea del remodelado dura unas 2 semanas y la de formación unos 3 meses. En el adulto joven, la masa ósea se mantiene estable porque existe un equilibrio entre la actividad de osteoclastos y osteoblastos. La cantidad de hueso formado y destruido es similar. En estas condiciones de normalidad se calcula que al cabo de un año se renueva el 4 - 5% del hueso cortical y el 25% del hueso trabecular. Cuando este equilibrio se rompe, como ocurre en la osteoporosis por un aumento de actividad osteoclástica con creación de cavidades de resorción más profundas y/o por fallo de los osteoblastos para rellenar esas cavidades, se produce una pérdida ósea difícilmente recuperable.

Con la menopausia se produce una situación de alto remodelado óseo. Aumenta el número de unidades de remodelado activas y existe un desequilibrio osteoclasto-osteoblasto, lo que da lugar a una pérdida acelerada de masa ósea que afecta fundamentalmente al hueso trabecular. En conjunto, se atribuye a la menopausia la responsabilidad directa de casi el 50% de la

pérdida de masa ósea en la mujer a lo largo de la vida, lo que la hace mucho más propensa que el varón a padecer osteoporosis. Todo ello se debe al déficit de la función ovárica. En efecto, se sabe que los estrógenos disminuyen la actividad osteoclástica inhibiendo la producción de M-CSF, RANKL, IL-1, IL-6 y TNF- $\alpha$ , al tiempo que estimulan la producción de OPG y TGF- $\beta$ , por lo que su déficit tras la menopausia invierte todas estas acciones y condiciona la pérdida acelerada de masa ósea. Como consecuencia de la reabsorción ósea exagerada, el calcio que se extrae del hueso, tiende a elevar los niveles de calcemia, lo que conlleva a una disminución de la secreción de PTH y de la producción de 1,25 (OH) $_2$  D3. Disminuye la absorción intestinal de calcio y aumenta la eliminación urinaria del mismo, cerrándose el círculo de las alteraciones fisiopatológicas subyacentes.

Independientemente de la pérdida acelerada de la masa ósea que se produce en la mujer durante los primeros años tras la menopausia, existe además una pérdida continua a ritmo más lento tanto en ella como en el varón que llega hasta edades muy avanzadas y que es uno de los principales mecanismos implicados en la osteoporosis senil. Existe una evidencia creciente de que los niveles de testosterona y estrógenos influyen en la masa ósea del varón y la disminución de los niveles de estrógenos se correlacionan con la disminución de la masa ósea tanto en la mujer como en el varón. Con la edad, la producción de OPG en médula ósea está disminuida al tiempo que aumenta la producción de RANKL, lo que puede jugar un papel patogénico importante (Khosla 2001; Troen 2003).

A esta pérdida contribuye, además, la disminución de la función renal que se produce con la edad. Esto da lugar al déficit de 1,25 (OH) $_2$  D3 y la disminución de la absorción intestinal de calcio, con aumento secundario de secreción de PTH. Los distintos factores que regulan la cantidad de masa ósea también intervienen en la calidad del hueso, siendo importante la genética, la menopausia y la edad. El aumento del remodelado disminuye el grosor de las trabéculas y produce pérdida de conectividad entre las mismas. Ello, junto con la edad, altera los enlaces de colágeno y aumenta las microlesiones por fatiga, disminuyendo la resistencia ósea. Se añaden, además, los distintos factores de riesgo de OP que a lo largo de la vida de la persona se van sumando para contribuir a una menor cantidad y calidad del hueso.

## 1.5 Epidemiología de la OP

La osteoporosis es una de las enfermedades más prevalentes en nuestra sociedad. Constituye un importante problema sanitario, particularmente porque los ancianos son los más propensos a padecerla y el promedio de edad de la población está aumentando. Las fracturas óseas que son su principal expresión clínica suponen un enorme sufrimiento humano, así como un elevado coste económico para la sociedad (Elders 2000).

La OP afecta a un 35% de las mujeres españolas mayores de 70 años, siendo la enfermedad metabólica ósea de mayor prevalencia. Una de cada 5 mujeres de más de 50 años tiene al menos una fractura vertebral debida a la OP, que se asocia a un deterioro de la calidad de vida y a un riesgo aumentado de padecer otras fracturas. La incidencia anual de fractura de fémur en mujeres de edad superior a 50 años es del 3% mientras que la incidencia de fractura de antebrazo distal es de casi el doble. En la actualidad, el riesgo de padecer una fractura de fémur en lo que resta de la vida, para una mujer española de 50 años, oscila entre un 12% y un 16%. La presencia de fracturas, especialmente de fémur, conlleva un aumento de la mortalidad con relación a las pacientes sin fracturas. Si se compara con las cifras presentadas por el mismo grupo en varones, mayores de 70 años se puede observar cómo la prevalencia es del 11,3% (Díaz- Curiel y cols. 1997).

Se trata de una enfermedad frecuente, sobre todo en mujeres, crónica, progresiva, con una importante morbimortalidad asociada, que origina discapacidades, invalideces y económicamente costosa. Estas características propias de la enfermedad son las que pueden explicar la importante repercusión socio-sanitaria de la OP.

## 1.6 OP y enfermedad periodontal

La osteoporosis y la periodontitis son enfermedades frecuentes en la sociedad occidental. Por esta razón las encontramos con frecuencia asociadas en el mismo paciente.

La estructura ósea que encontramos en las mandíbulas dentadas de individuos con OP mayores de 70 años se caracteriza por tener una cortical fina y porosa, al igual que ocurre en otras localizaciones del esqueleto. Esta característica es más marcada en mujeres que en hombres (Wowern 2001).

Aunque la OP mandibular no está muy estudiada, existen trabajos que muestran que pacientes con osteoporosis tienen una mayor incidencia de complicaciones dentales (Kaye 2007; Sidiropoulou-Chatzigiannis y cols. 2007).

Apoyando estos estudios existen modelos animales en los que se ha demostrado que la OP afecta al hueso mandibular (Mori y cols. 1997; Tanaka y cols. 2002). Sin embargo, no está bien definido si la OP mandibular refleja la OP sistémica, ni cómo la OP afecta a las distintas regiones mandibulares, región perialveolar, gonion y ramus, con distinto porcentaje de hueso cortical y trabecular (Mulder y cols. 2006).

Varios estudios demuestran que la DMO y el CMO en mandíbulas de pacientes con OP son más bajos que en pacientes sanos y relacionan esta disminución con una aceleración en la reabsorción de cresta alveolar. La pérdida ósea a nivel de la cresta alveolar nos lleva por consiguiente a una pérdida de inserción dentaria, que se manifiesta con movilidad de los dientes y en definitiva, con la pérdida progresiva de estos (Wowern 2001; Ozawa y cols. 2002; Tezal y cols. 2005; Wactawski-Wende y cols. 2005; Lopes y cols. 2008; Swoboda y cols. 2008, Nicopoulou-Karayianni y cols. 2009). Es la misma secuencia de acontecimientos y el mismo desenlace que vemos en pacientes con enfermedad periodontal.

Estudios recientes afirman que cada milímetro de pérdida ósea alveolar hace aumentar por tres el riesgo de pérdida de piezas dentales (Tezal y cols. 2005). La pérdida de dientes disminuye la calidad de vida del individuo causando pérdida de funcionalidad masticatoria, dificultad en el habla, compromiso estético e incluso, en ocasiones, afecta a la autoestima de los pacientes. Por este motivo, el tratamiento con implantes dentales se ha convertido en un tratamiento rutinario para la rehabilitación de los pacientes edéntulos con alta predictibilidad. Un porcentaje alto de pacientes que necesita tratamiento con implantes es mayor de 65 años. En este grupo de pacientes la osteoporosis es muy frecuente (Misch 2007).

La pérdida de masa ósea y el deterioro de la microarquitectura que caracteriza a la osteoporosis se considera un factor que afecta de forma negativa a la osteointegración de implantes dentales, tanto en estudios en modelos animales como en los ensayos clínicos.

La OP sistémica puede inducir alteraciones en el hueso alrededor del implante, afectando a las zonas de osteointegración del implante y reduciendo la capacidad de soporte óseo necesario para estabilizarlo (Pan y cols. 2000; Lugo GG de Falco Caparbo y cols. 2000; Keller y cols. 2004; Tsoiaki y cols. 2009). Se ha demostrado que los pacientes con OP desarrollan más complicaciones dentales que la población general, tales como la pérdida dental o el fracaso de la osteointegración de los implantes dentales (Kaye 2007; Sidiropoulou- Chatziannnis y cols. 2007).

El desarrollo de varios modelos experimentales ha sido fundamental para aumentar el conocimiento sobre el impacto que tiene la OP en la salud oral en un tema de especial relevancia como es la osteointegración de los implantes en los pacientes con OP (Turner 2001).

## 1.7 Implantes dentales y osteointegración

La osteointegración se define como la conexión directa, estructural y funcional entre el hueso vivo, ordenado, y la superficie de un implante sometido a carga funcional (Branemark y cols. 1999).

El éxito del tratamiento con implantes se debe al logro de la osteointegración, la cual es, clínicamente manifiesta con la ausencia de movilidad en el implante. La estabilidad inicial alcanzada en su colocación es el resultado de la conexión mecánica entre el implante y el hueso.

Los implantes dentales son el método de elección para restaurar la función masticatoria de los pacientes edéntulos parciales o totales. El éxito del tratamiento con implantes proporciona el mejor tratamiento restaurativo sin las desventajas de otros métodos. Este tratamiento ha ido aumentando hasta convertirse en la principal opción terapéutica en la actualidad (Misch 2007).

A principios de los años 60, un equipo de investigadores suecos iniciaron estudios microscópicos *in vivo* para seguir la evolución del hueso y la médula ósea durante un largo periodo de tiempo utilizando una cámara óptica de titanio implantada en la localización de interés. El titanio parecía tener mejores características mecánicas y de superficie para su implantación en un medio biológico comparado con el tantalio, utilizado anteriormente para el mismo fin. Estos estudios indicaron la posibilidad de establecer una verdadera osteointegración en el tejido óseo, puesto que las cámaras ópticas no podían ser retiradas del hueso una vez que habían cicatrizado. La estructura del titanio

se había incorporado completamente en el hueso, y el tejido mineralizado era totalmente congruente con las microirregularidades de la superficie del titanio.

Se llevaron a cabo estudios sobre la cicatrización y la estabilidad mecánica de elementos protésicos anclados en el hueso, utilizando elementos de anclaje de titanio puro de diferentes tamaños y diseños. Se averiguó que un implante insertado en el espacio medular y dejado cicatrizar inmovilizado sin exponerlo a ninguna carga durante un periodo de tiempo, acaba rodado por un recubrimiento de hueso compacto. Un fenómeno constante fue la condensación del tejido óseo hacia la superficie del titanio en la cavidad medular además de la integración en el hueso cortical.

Después de 30 años de desarrollo experimental y más de 20 años de desarrollo clínico, se eligió un diseño de fijación con forma de tornillo de titanio puro, con diámetro exterior que varía de entre 3,3 y 5 mm y con longitudes que van desde los 10 a los 15 mm (Branemark y cols. 1999).

Hoy en día, el problema más estudiado es la modificación del diseño y de la superficie del implante con el fin de mejorar y agilizar su osteointegración (Xiropaidis y cols. 2005; Coelho y cols. 2009). La oxidación natural de la capa superficial del implante (óxido de titanio), hace posible la aparición de procesos electroquímicos que dan lugar a un biomaterial, el cual tiene una superficie porosa. Esta superficie presenta una topografía microestructurada sin rasgos agudos y caracterizada por la presencia de poros abiertos, uniformemente distribuidos bajo gama de micrómetro (Hall y Lausmaa 2000). Las propiedades de esta superficie estimulan el crecimiento óseo directamente en ella. El resultado es una fuerte y rápida osteointegración del implante. A partir del hueso preexistente se forma nuevo hueso por osteoconducción en la superficie del titanio siguiendo el contorno de las espiras lo que proporciona una fuerte unión (Schüpbach y cols 2005; Huang y cols. 2005).

En este nuevo hueso, que se forma rápidamente en la superficie del titanio durante la cicatrización de la fractura que provocamos en el hueso que recibe el implante, no existe una organización de las fibras colágenas por lo que no encontramos un fuerte entramado sino algo orientado al azar. Este hueso se caracteriza por sus formaciones irregulares de fibras colágenas, osteocitos numerosos, alargados y una calcificación retrasada y desordenada. Es progresivamente sustituido por hueso estructurado durante los procesos de

remodelado que siguen normalmente a la cicatrización de la herida. Es el llamado hueso fibroso o callo óseo (Branemark y cols. 1999).

El objetivo de realizar un alveolo estriado en el hueso es el de conseguir una inmovilización inmediata después de la colocación y durante el periodo cicatricial. En esta primera fase, el hueso no puede hacerse totalmente congruente al implante y aparecen cavidades cerradas de hematoma (Fig 5.a). Durante el periodo cicatricial sin carga (de 2 a 3 meses), el hematoma se transforma en un hueso nuevo por la formación de un callo óseo (Fig 5.b). El hueso dañado también cicatriza, sufre una revascularización, desmineralización y remineralización. Después de este periodo de cicatrización el tejido vital óseo se encuentra en estrecho contacto con la superficie de la fijación (Fig 5.c) (Branemark y cols. 1999).

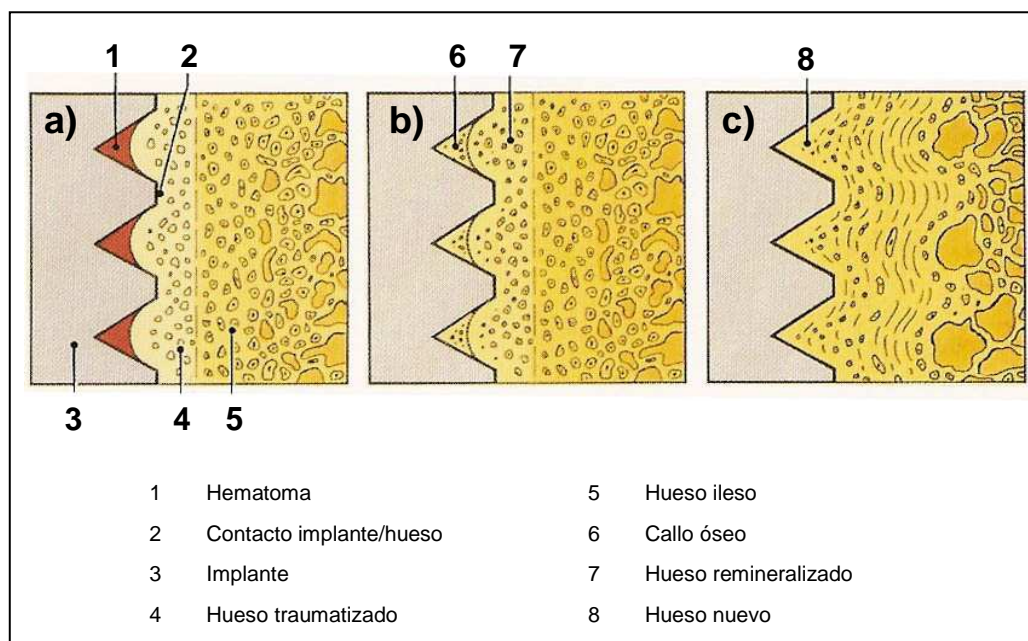


Figura 5: Representación esquemática de la biología de la osteointegración (Branemark y cols. 1999)

## 1.8 Modelos animales de OP para el estudio de la osteointegración de implantes dentales

Los modelos animales han contribuido de manera esencial a mejorar nuestro conocimiento sobre la etiología, los mecanismos fisiopatológicos y el tratamiento de un gran número de enfermedades. Asimismo, han desarrollado un papel primordial en la evaluación de la eficacia y seguridad de nuevos

agentes terapéuticos. Los modelos experimentales resultan imprescindibles en el estudio y desarrollo de nuevos fármacos.

En la actualidad existen modelos bastante homologados y estandarizados para el estudio de la osteoporosis. Los requisitos necesarios para un modelo animal de OP se pueden resumir en :

1. **Crecimiento y madurez esquelética (cierre de la placa epifisaria):** La importancia de estas dos fases radica en que los procesos de modelado y remodelado óseo son radicalmente diferentes, predominando el modelado durante el crecimiento y el remodelado en la madurez. Un modelo óptimo de OP debería presentar ambas fases con una duración bien establecida.
2. **Periodicidad estral:** La especie humana es la única con menarquia y ciclos ovulatorios frecuentes y regulares que experimenta una disminución de masa ósea tras el cese espontáneo de la función ovárica. Sólo algunos mamíferos con ovulaciones cíclicas y frecuentes e importantes oscilaciones en los niveles de estradiol pueden tener algún grado de pérdida ósea por depleción estrogénica de manera espontánea.
3. **Menopausia natural:** La mayoría de modelos de depleción estrogénica son por ovariectomía médica ó quirúrgica. Sólo los primates presentan un proceso biológico similar al climaterio y menopausia natural humana por lo que, en teoría, constituyen el modelo óptimo para remedar una situación semejante a la OP postmenopáusica.
4. **Fracturas:** En su definición más estricta, la OP viene marcada por la aparición de fracturas tras traumatismos de bajo impacto. A pesar de disponer hoy en día de buenos modelos de animales con OP postmenopáusica, son escasos los que presentan fracturas espontáneas.
5. **Remodelado óseo:** Un adecuado modelo animal debe presentar un remodelado cortical o harversiano desarrollado. La rata ovariectomizada es un buen modelo para el estudio del hueso trabecular, pero carece de remodelado cortical, por lo que la FDA ("Food and Drug Administration") recomienda el empleo al menos de otra especie con remodelado cortical.
6. **Conveniencia:** La conveniencia de un modelo viene definida por factores como el coste de compra y mantenimiento, disponibilidad de animales y espacio físico disponible, dificultades de manejo o aspectos emocionales en

el caso de animales de compañía como perros y gatos. Es más difícil obtener muestras periódicas de sangre y/o biopsias óseas seriadas en animales pequeños que en medianos y grandes. Igual ocurre si se trata de valorar la fijación de un implante o una prótesis. (Turner y cols. 2001).

Los conejos son animales idóneos por tamaño, disponibilidad, temperamento, bajo coste y por disponer de razas genéticamente homogéneas. Por estos motivos, los conejos son utilizados en numerosos estudios que evalúan la osteointegración de implantes dentales. La localización elegida con mayor frecuencia para la inserción del implante es la tibia del animal. Desde el punto de vista óseo, alcanza verdadera madurez esquelética a los 8-10 meses de edad, siendo la especie más pequeña de las habitualmente utilizadas con verdadero remodelado óseo animal (Mori y cols. 1997; Lugero GG de Falco Caparbo y cols. 2000; Keller y cols. 2004).

En resumen, podemos concluir que los modelos animales de OP representan una vía esencial para continuar avanzando en el conocimiento de la etiología, genética y fisiopatología de la OP humana y constituyen una herramienta fundamental para el desarrollo de nuevos agentes terapéuticos, especialmente para investigar fármacos con propiedades anabólicas o formadoras de hueso. En este sentido, el conejo ofrece la ventaja de presentar un remodelado óseo rápido en comparación con otras especies animales. La OP puede ser inducida en el conejo por combinación de ovariectomía y tratamiento con corticoides de manera predecible. La pérdida de hueso trabecular y cortical es significativa y se obtiene en cortos periodos de tiempo (Castañeda y cols. 2006).

## 1.9 Terapia farmacológica antiosteoporótica

Actualmente existe un amplio abanico de opciones farmacológicas para el tratamiento de la OP. Las terapias más utilizadas en la actualidad son los **tratamientos antireabsortivos** y las **terapias anabólicas u osteoformadoras**.

### 1.9.1 Tratamiento antireabsortivo

Los fármacos antireabsortivos utilizados para el tratamiento de la OP disminuyen el remodelado óseo. Consiguen incrementar la resistencia del hueso, preservan su microarquitectura e inducen un balance positivo en la unidad de remodelado. Se consideran fármacos antireabsortivos:

bisfosfonatos, calcitonina, estrógenos, SERMs (moduladores selectivos de los receptores de estrógenos), el calcio y la vitamina D.

Las opciones terapéuticas para la OP son variadas. Sin embargo, los bisfosfonatos son los fármacos que se han revelado en amplios ensayos clínicos como los más eficaces a la hora de reducir el riesgo de fractura de cadera (Otomo – Corgel 2007).

**Los bisfosfonatos (BFF)** son fármacos análogos de los pirofosfatos endógenos no metabolizados. Son capaces de fijarse al hueso e inhibir la función de los osteoclastos reduciendo el recambio óseo y disminuyendo el remodelado activo en los lugares donde existe reabsorción ósea excesiva. De esta forma, inhiben la reabsorción ósea.

Los BFF actúan fijándose a la hidroxiapatita del hueso e inhibiendo la reabsorción ósea al disminuir la actividad de los osteoclastos, promover su apoptosis y evitar su síntesis a partir de precursores hematopoyéticos o bien afectando a los osteoblastos al disminuir su apoptosis y estimular la secreción de inhibidores del reclutamiento de osteoclastos. También se ha descrito cierta actividad antiangiogénica responsable de alguno de sus efectos.

Los ensayos clínicos demuestran que los bisfosfonatos aumentan significativamente la DMO en la columna y la cadera en mujeres posmenopáusicas.

La estructura de los BFF muestra dos grupos fosfato unidos a un átomo de carbono y dos radicales, R1 y R2, que también se unen a un carbono central. El radical R1 determina la afinidad de la unión a la hidroxiapatita explicando sus efectos sobre el hueso mientras que R2 determina la potencia y eficacia del fármaco.

Los BFF también pueden clasificarse según su composición química en dos subgrupos: los que contienen nitrógeno y los que no. Los BFF que contienen nitrógeno dentro de su estructura química, BFF nitrogenados, tienen mayor potencia y mayor efecto antitumoral. Son potentes inhibidores de los osteoclastos por lo que son utilizados para el tratamiento de la OP a largo plazo. Estos medicamentos son absorbidos rápidamente y se fijan a la matriz ósea quedando retenidos en esta durante años. Su vida media plasmática es muy corta (entre 20 minutos y 2 - 3 horas) y su vida en el

hueso muy larga (desde meses hasta años). Sobre el 50% de lo absorbido es fijado al hueso, teniendo mayor afinidad por las zonas de mayor remodelación ósea. Los BFF se liberan cuando el hueso donde están depositados es reabsorbido, lo que explica su larga vida media (Russell y cols. 2007).

Los BFF se dividen en dos grandes grupos según su vía de administración:

- **Vía intravenosa:** pamidronato y ácido zoledrónico o zoledronato. El ácido zoledrónico es 100 veces más potente que el pamidronato. Ambos fármacos se utilizan en el tratamiento de: metástasis en los procesos cancerosos, sobre todo de mama, en el mieloma múltiple, hipercalcemia por malignidad y enfermedad de Paget.
- **Vía oral:** Alendronato y el risendronato son los más utilizados para el tratamiento de la OP postmenopausica.

El tratamiento a largo plazo de BFF para el control de la OP es seguro (Whyte y cols. 2003). No obstante, se han descrito diferentes efectos adversos y complicaciones asociadas a su uso.

Los efectos secundarios más frecuentes en el caso de los BFF orales son: erosiones orales, úlceras gástricas, esofagitis y estenosis esofágica.

Entre los efectos adversos de los BFF intravenosos se encuentran: flebitis, febrícula transitoria, escalofríos, síndrome pseudogripal en los dos primeros días e insuficiencia renal. Especial relevancia ha adquirido durante los últimos años la aparición de numerosos casos de osteonecrosis de los maxilares (ONM) en pacientes con tratamiento con BFF tanto intravenoso como oral (Ponte Fernandez y cols. 2006). La ONM inducida por BFF es una forma de osteomielitis crónica de lenta evolución. Se caracteriza por la aparición de hueso expuesto en la mandíbula o maxilar, con un tiempo de evolución superior a 6 semanas en pacientes que recibieron o están recibiendo tratamiento con BFF y no han sido sometidos a tratamiento con radioterapia en el área maxilofacial, ni tienen evidencia de metástasis (Marx y cols. 2005).

Los BFF se concentrarían en los huesos de los maxilares, ya que tienen un mayor aporte sanguíneo que otros huesos y un intercambio óseo más rápido, relacionados con su gran actividad y con la presencia de los dientes.

La prevalencia de ONM es de un caso por cada 10.000 a 100.000 pacientes. Aunque no se han establecido claramente los factores que están relacionados con el desarrollo de una ONM, se consideran factores de riesgo el tabaquismo, la corticoterapia, la anemia, la hipoxemia, la diabetes mellitus, las infecciones y los estados de inmunodepresión. Además se han señalado la exodoncia, la dosis y la potencia de los BFF administrados como factores de riesgo (Assael 2009).

Se han descrito casos de ONM asociados a BFF tanto en pacientes que tomaban la medicación durante años como durante pocas semanas (Ponte Fernández y cols. 2006).

La utilización de dosis altas de BFF endovenosos ha sido señalada como factor de riesgo muy elevado de ONM. No sucede lo mismo con los BFF orales utilizados a dosis bajas para el tratamiento de la OP y otras enfermedades. Actualmente, el número de casos de ONM relacionados con alendronato, el BFF oral más prescrito, es de aproximadamente 170. Esto supone una incidencia de ONM de 0,7 casos por 100.000 pacientes /año. (Grewal y Fayans 2008).

**El alendronato (ALN)** es un bisfosfonato de segunda generación. Es el primer fármaco que demostró que no sólo previene la pérdida ósea sino que incrementa la resistencia del hueso a la fractura. Se trata de un potente inhibidor de la reabsorción ósea y no interfiere en la mineralización ósea. El alendronato está aprobado para la prevención y el tratamiento de la osteoporosis posmenopáusica.

### 1.9.2 Tratamiento anabólico u osteoformador

Los fármacos anabólicos u osteoformadores son fármacos de reciente aprobación nacional e internacional, que actúan en la progenie osteoblástica y en los osteoblastos maduros, promoviendo la formación de hueso nuevo. Incrementan la resistencia ósea al aumentar la masa ósea y se consideran como tales la teriparatida (PTH 1-34), la PTH completa ó la 1-84 y el ranelato de estroicio (Dempster y cols. 2001; Nerr 2001; Meunier y cols. 2004).

**La hormona paratiroidea (PTH)** es la hormona que controla la homeostasis del calcio a través de una acción directa sobre el hueso y el riñon e indirecta en el intestino. Producida en las glándulas paratiroideas que responden al

descenso de la calcemia, es la hormona hipercalcemiente por excelencia y favorece la reabsorción ósea. No obstante, en los últimos años se ha descubierto su papel estimulador de la formación ósea, a través de la síntesis de IGF-I y TGF- $\beta$  (Canalis y cols. 1989).

La terapia ósea anabólica, en particular la administración intermitente de PTH, se considera una alternativa a los tratamientos antirresortivos. Los efectos beneficiosos de la administración intermitente de PTH se han demostrado en modelos animales y en grupos de pacientes con OP (Jilka y cols. 1999; Mashiba y cols. 2001; Hodsman y cols. 2005; Lindsay y cols. 2006). La administración intermitente de PTH desencadena una respuesta celular diferente a la que se produce con la pauta continua y constituye el fundamento por el que su utilización prolongada genera un efecto anabólico óseo (Ishizuya y cols. 1997; Locklin y cols. 2003).

Administrada de forma intermitente la PTH estimula la proliferación de pre-osteoblastos, incrementa la diferenciación de la línea pre-osteoblástica a osteoblastos (OB) maduros y además inhibe la apoptosis de los OB (Jilka y cols. 1999).

**La teriparatida** (fracción 1-34 de PTH recombinante humana), comercializada en España como Forsteo<sup>®</sup>, está aprobada tanto por la administración nacional de medicamentos (ANMAT), como por la FDA (Food and Drug Administration, de EE.UU) para el tratamiento de la OP postmenopáusica, la OP idiopática del varón y la OP inducida por glucocorticoides.

Se reserva para tratar mujeres con alto riesgo de fractura, incluidas las que tienen DMO muy baja (valores inferiores a - 3) con una fractura vertebral previa. La PTH mejora la DMO y reduce el riesgo de nuevas fracturas vertebrales y periféricas.

### 1.9.3 Combinación de terapias

En la OP postmenopáusica existen niveles de osteoclastos y niveles de reabsorción ósea muy elevados. Se produce formación ósea pero no llega a niveles similares a los de la reabsorción, como ocurre en los sujetos sanos. Con determinados tratamientos antiosteoporóticos en los que se atenúa la reabsorción disminuyendo el número de osteoclastos (ALN) se observa que también disminuye la escasa formación ósea que se produce. Estos datos

---

nos hacen pensar en la posibilidad de que los osteoclastos no solamente tienen una actividad reabsortiva sino que también juegan un papel muy importante secretando factores anabólicos.

Es interesante conocer que el efecto anabólico de los osteoclastos depende del número de ellos que exista presente.

Lo ideal sería conseguir un fármaco que sostenga el número de osteoclastos y que sólo atenúe su actividad antireabsortiva. Estos datos que arrojan recientes estudios pueden explicar porque cuando se susministra PTH y alendronato a un mismo paciente no se consigue sinergia terapéutica. La presencia de los osteoclastos es necesaria para que la administración intermitente de PTH produzca el efecto anabólico deseado (Karsdal MA, 2007).

---

## 2 Justificación, hipótesis y objetivos

### 2.1 Justificación

Los ensayos clínicos sugieren que la pérdida de masa ósea con el deterioro de la microarquitectura que caracteriza a la osteoporosis se considera un factor de riesgo para la osteointegración de los implantes dentales. Sin embargo, existen pocos estudios comparativos que proporcionen información sobre los efectos que el tratamiento antiosteoporótico provoca en la osteointegración de implantes dentales en estos pacientes.

### 2.2 Hipótesis

El tratamiento antiosteoporótico puede influir en la osteointegración de los implantes dentales en pacientes osteoporóticos.

### 2.3 Objetivos

1. Validar un modelo de osteoporosis experimental en conejos.
2. Correlacionar la osteoporosis sistémica y la osteoporosis en hueso mandibular.
3. Estudiar la influencia de la osteoporosis como factor de riesgo en la osteointegración de implantes dentales.
4. Comparar los efectos del tratamiento con alendronato *versus* PTH sobre la osteointegración de implantes dentales en un modelo experimental de osteoporosis en conejos.

### 3 Material y métodos

#### 3.1 Modelo animal

El modelo animal utilizado en este estudio fue desarrollado por Castañeda (Castañeda y cols. 2006).

Se utilizaron 55 conejos albinos de raza Nueva Zelanda, hembras esqueléticamente maduras (3,7- 6,3 kg de peso) suministradas por Granja Universal (Pamplona). Antes de iniciar los diferentes experimentos, se aclimató a los animales durante dos semanas mediante su manejo en jaulas individuales de 50 x 40 x 40 cm. Las condiciones ambientales se mantuvieron de forma constante a lo largo de todo el estudio, consistiendo en ciclos de 12 horas de luz y 12 de oscuridad a temperatura ambiente, con acceso ad libitum al agua y comida comercial estándar para conejos (Panlab®, Barcelona).

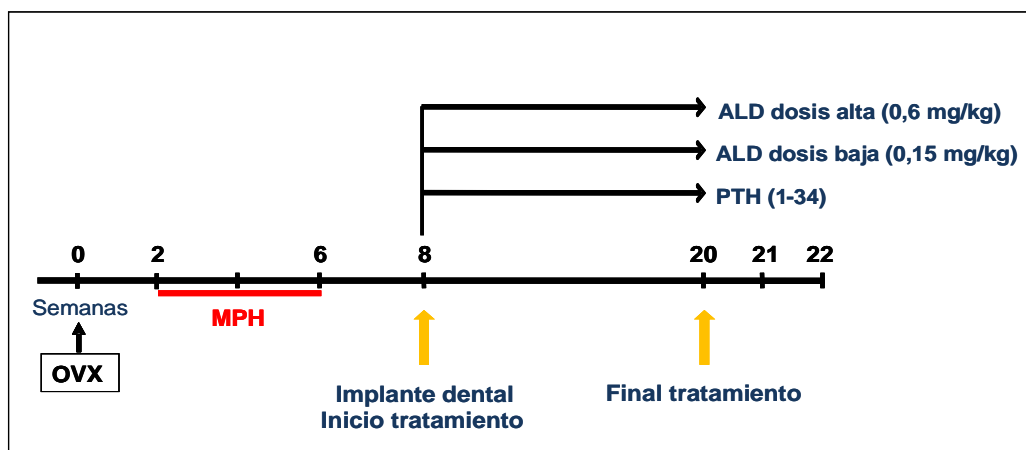


Figura 6: Esquema de trabajo, tiempos de tratamiento, cirugías y exploraciones densitométricas (DXA)

#### 3.2 Determinaciones densitométricas

A los 55 animales se les realizaron diferentes determinaciones basales de la masa ósea mediante absorciometría dual de Rx (DXA) tanto en columna lumbar como en rodilla, con objeto de determinar los valores de normalidad de nuestra población. Todas las exploraciones densitométricas se realizaron previa anestesia general mediante inyección intramuscular (IM) de una combinación de 2 ml/ kg de xylacina (Rompun®, Bayer, Madrid) e hidrocloreuro

de ketamina (Ketolar<sup>®</sup>, Parque-Davis, Barcelona) en proporción 3:1 (Bellino 2000).

Los análisis densitométricos se realizaron mediante un densitómetro de primera generación con fuente de Rx de doble energía "Hologic QDR-1000/W<sup>™</sup>", basado en la tecnología pencil-beam (Hologic Inc., Waltham, MA, USA), añadiendo un colimador de 1 mm de diámetro en la salida del tubo de rayos Rx (Fig.7). El densitómetro se calibraba diariamente con el objeto de mantener unas óptimas condiciones de reproducibilidad y calidad en la medida, siempre dentro del rango de los valores recomendados por el fabricante. Se utilizó un software específico para el análisis de animales pequeños, que incrementa considerablemente la resolución espacial (espacio interlineado de 0,0254 cm y resolución por punto de 0,0127 cm; versión 6.2). En todos los casos se midieron el área ósea proyectada (AO), el contenido mineral óseo (CMO) y la densidad mineral ósea (DMO) en columna lumbar (CL) y en rodilla izquierda (global, hueso subcondral y área de implantación).

Las mediciones se realizaron in vivo con los animales colocados en decúbito supino bajo anestesia general según la técnica descrita previamente. De las 7 vértebras que componen la CL del conejo, se eligieron aleatoriamente dos vértebras centrales, L3 y L4, que era lo máximo que permitía la ventana de exploración. Para el centrado del densitómetro a nivel L3 y L4, y después de varias pruebas con radiología digital convencional, se tomó como referencia un punto situado 3 cm por debajo del ombligo del animal (Fig 8).



Figura 7: Densitómetro Hologic<sup>®</sup> QDR-1000 utilizado en el estudio

Para el estudio de la rodilla, los conejos eran colocados sobre un molde de metacrilato específicamente diseñado para el estudio, con 30 grados de angulación lateral con objeto de obtener una visión postero-anterior lo más anatómica posible de la articulación (Fig. 9).



Figura 8: Posicionamiento de los animales para la DXA de columna lumbar



Figura 9: Soporte de metacrilato específicamente utilizado para la obtención de las DXA de rodilla y posicionamiento de los animales

El tiempo medio de las dos exploraciones, con el correspondiente reposicionamiento del animal, fue de 40 minutos por conejo.

Una vez definidas las localizaciones de interés, se procedió al análisis densitométrico de la CL y de las diferentes subregiones seleccionadas de la rodilla con distinto contenido de hueso trabecular y cortical.

Para la CL, se calculó la media de los valores densitométricos de la tercera y cuarta vertebra lumbares. Respecto a la rodilla, se seleccionaron 3 áreas anatómicas con diferente proporción de hueso trabecular y cortical (Fig. 10):

- a) Rodilla global (RG), con una ventana o región de interés (ROI) de 266 líneas y una anchura de 22 líneas simétricas por encima y debajo de la interlínea articular. Esta zona fue considerada representativa de hueso trabecular y cortical.
- b) Cuatro subregiones dentro de las epífisis, correspondientes a los dos cóndilos femorales y a ambas mesetas tibiales (17 x 11 píxeles con 0,06 cm<sup>2</sup> cada una), localizadas respectivamente 1 mm por encima y por debajo de la interlínea articular en la zona de máximo contacto entre los cóndilos femorales y ambos platillos tibiales. Los valores medios representativos de CMO y de la DMO de estas zonas fueron considerados representativos de hueso subcondral (HS).
- c) Se analizó una área de 69 x 13 píxeles (0,29 cm<sup>2</sup>) a nivel del cortex de la metáfisis proximal de la tibia, inmediatamente distal a la articulación tibio-peronea superior, como teórico paradigma de hueso correspondiente al área de implantación (IA). Los valores medios representativos de CMO y de la DMO de esta zona fueron considerados representativos de hueso cortical y trabecular.

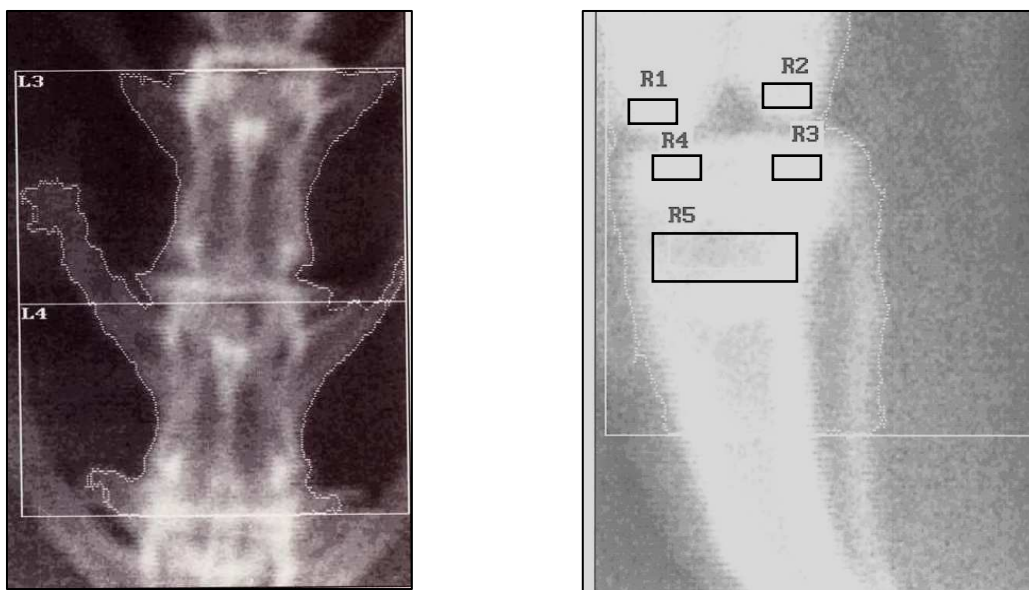


Figura 10: DXA de columna y rodilla. Izq: DXA de columna lumbar, proyección pósterio-anterior. Dcha: DXA de rodilla izquierda (RG, HS y AI)

Para ver la correlación de los cambios de masa ósea en la mandíbula de los conejos con otras zonas esqueléticas estudiadas se realizaron densitometrías de las mandíbulas de los conejos.

### 3.3 Densitometrías y contenido cálcico en mandíbulas

Para el estudio de la DMO de las mandíbulas se utilizaron las hemimandíbulas de 8 conejos sanos y 12 conejos OP. Las mandíbulas disecadas en el sacrificio se separaron por la sínfisis. Ambas hemimandíbulas fueron congeladas a -20 °C. Tanto para los estudios densitométricos como de contenido cálcico se utilizaron las hemimandíbulas izquierdas.

Estas hemimandíbulas se analizaron utilizando el mismo densitómetro que se usó para las medidas de la columna y de la rodilla (Hologic® QDR-1000/W™). Además, se analizaron con un densitómetro específico para estudio de animales y muestras pequeñas (PIXImus™ (software version 1.4 X; GE Lunar, Madison, WI, USA). En todas las mediciones se posicionaron de manera estándar todas las hemimandíbulas. Para el análisis de las densitometrías se dividió la hemimandíbula en cuatro zonas de interés: región alveolar y perialveolar (ROI 1), ramus (ROI 2), gonion (ROI 3) y región global (ROI 4). Cada zona presenta una composición distinta de hueso cortical y trabecular. El tamaño de estas regiones se delimitó en función del tamaño de cada hemimandíbula (Mulder y cols. 2006) (Fig.11).

Se asumió que la cantidad de calcio en los tres molares y en el incisivo era similar en todos los animales.

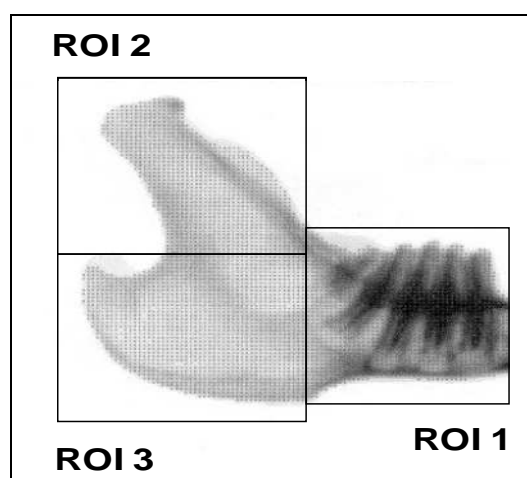


Figura 11: Regiones de interés analizadas en la densitometría mandibular ROI 1 (región alveolar y perialveolar), ROI 2 (ramus), ROI 3 (gonion)

El estudio del contenido cálcico se realizó mediante espectrometría de absorción atómica de llama, técnica que se basa en la medida de la radiación absorbida por un vapor atómico (Fig. 12). El vapor atómico se genera mediante una llama en la que se aspira la muestra líquida. Los átomos en fase de vapor absorben aquellas radiaciones cuyas energías coinciden exactamente con las de sus transiciones electrónicas, que son características de cada elemento. Para este estudio las hemimandíbulas fueron previamente pesadas y sometidas a una mineralización seca a 450 °C en un horno incinerador durante 168 horas. Las cenizas blancas resultantes fueron disueltas en 3 ml de HNO<sub>3</sub> 1N y diluidas hasta 100 ml con agua ultrapura. Para evitar las interferencias de la matriz se utilizó una solución de LaCl<sub>3</sub> (Moreno-Torres R, 2000). Las determinaciones de Ca fueron realizadas mediante la aspiración de la muestra líquida en la llama de un espectrofotómetro de absorción atómica Perkin-Elmer 1100B, con una lámpara de Ca de cátodo hueco de Ca-Mg como fuente primaria de radiación luminosa, siguiendo las recomendaciones del fabricante. La precisión y la validez de este método se verificó comparando con un material de referencia (CRM, leche en polvo desnatada).

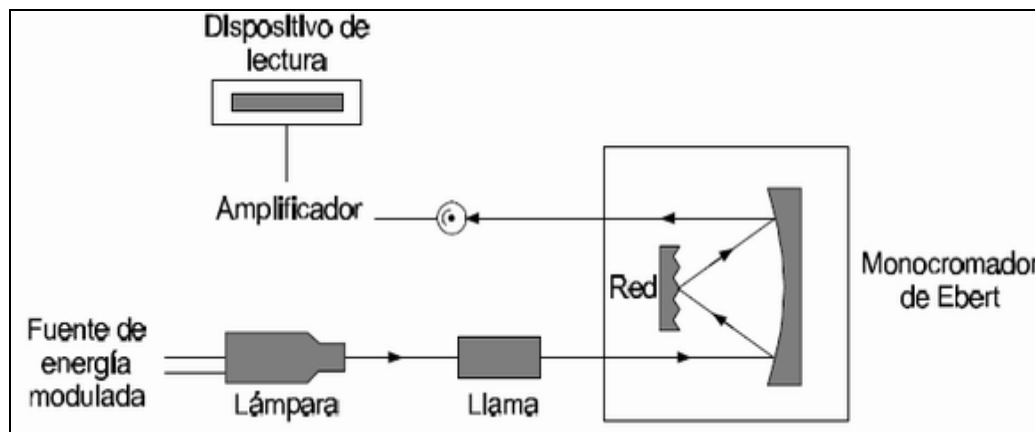


Figura 12: Esquema de un espectrofotómetro de absorción atómica

### 3.4 Valoración de la precisión de las DXAs

Para evaluar el efecto del reposicionamiento de las DXAs, se repitieron tres densitometrías de CL y otras tres de rodilla en 10 animales sanos consecutivos durante la misma semana, antes del inicio de los diferentes experimentos. Se calculó de esta manera el error de precisión, expresado en tanto por ciento como coeficiente de variación (CV). Este CV nos permitirá calcular el llamado menor cambio significativo ("least significant change", LSC) de acuerdo con la

formula de Glueer y cols, que valora los cambios de CMO y la DMO que sobrepasan  $2\sqrt{2}$  veces el error de precisión de la técnica utilizada (Gluer y cols. 1995).

La reproducibilidad de la mediciones in vitro fue testada mediante un fantoma antropomórfico de composición mineral conocida (s/n Q-239, Hologic®), siguiendo las recomendaciones del fabricante. El CV in vitro durante el periodo de estudio fue de 0,64% para la DMO y 0,58% para el CMO.

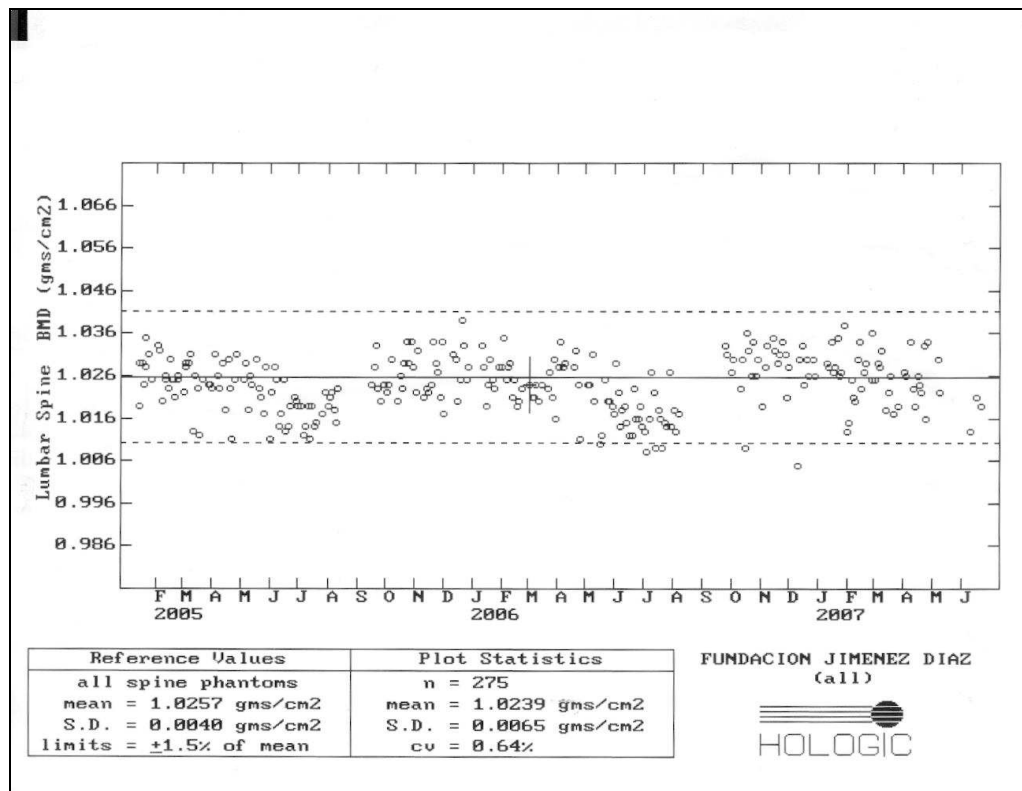


Figura 13: Coeficiente de variación in vitro de la DMO durante el estudio

### 3.5 Protocolo quirúrgico de la ovariectomía (OVX ) y administración de metilprednisolona (MPH)

Tras el periodo de aclimatación y una vez realizadas todas las determinaciones de densitometría basal, 45 de los 55 animales se reservaron para la inducción de un modelo de OP mediante ooforectomía bilateral (OVX)(Fig.14) y administración intramuscular (IM) de metilprednisolona (Urbason®, Hoechst M Roussel, Madrid) (MHP) durante 4 semanas a dosis de 1 mg / kg / día. Se utilizaron 10 conejos como controles. Las inyecciones de MHP se iniciaron 2 semanas tras las OVX para evitar posibles complicaciones de la cirugía.

La OVX bilateral se realizó bajo anestesia general según la técnica estándar y en condiciones de asepsia (Kaplan y Timmons 1979). Se realizó profilaxis antibiótica con cefonicid IM (100 mg / kg) (Monocid<sup>®</sup>, KleineSmith and Beecham, Madrid) antes de la cirugía y los 3 días posteriores.

Se realizaron DXA secuenciales con objeto de determinar la variación de la masa ósea después de 4 semanas de administración de los corticoides y su evolución en un período de tiempo más prolongado. La variación de la masa ósea se calculó midiendo la diferencia entre los valores de DMO iniciales y finales.

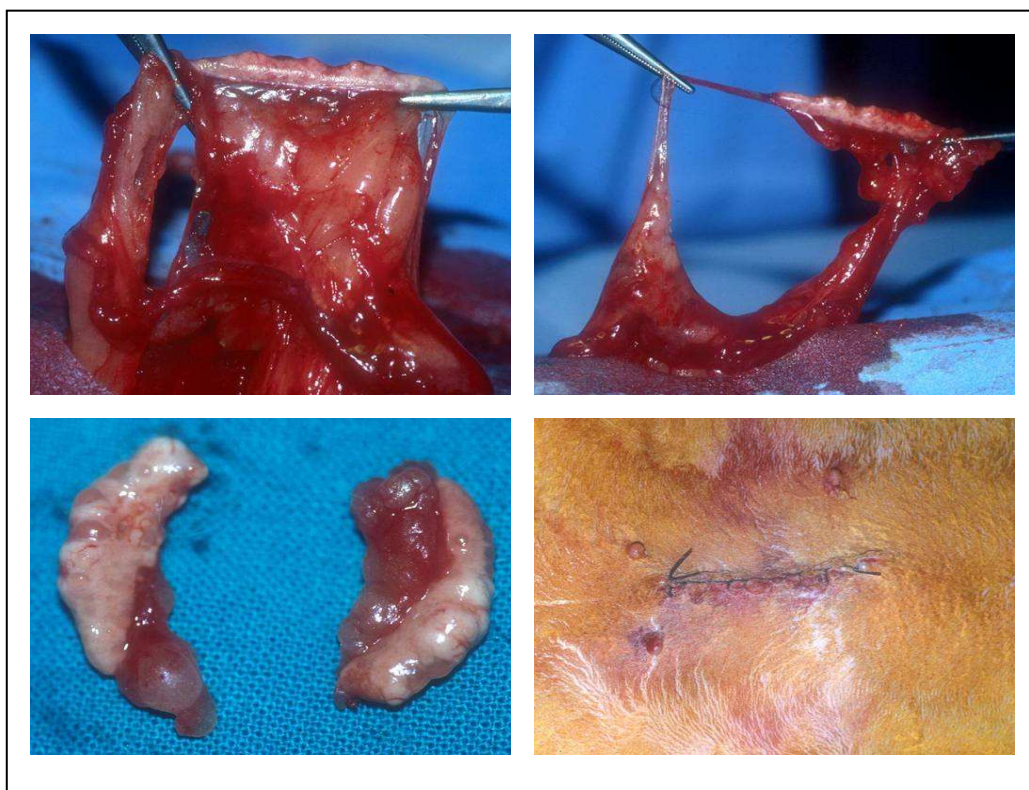


Figura 14: Ovariectomía

### 3.6 Protocolo quirúrgico de colocación de implantes

Ocho semanas después de la OVX, mediante anestesia general con la misma técnica y profilaxis antibiótica anteriormente descrita, se colocaron un total de 55 implantes Brånemark System<sup>®</sup> con superficie TiUnite<sup>™</sup> (Nobel Biocare AB, Göteborg, Sweden). A cada uno de los conejos se le colocó un implante en la metáfisis proximal de la tibia izquierda. La piel de la región tibial fue rasurada, lavada y desinfectada con Betadine<sup>®</sup>. La superficie ósea de la tibia se expuso mediante una incisión de espesor total de aproximadamente 3 cm de longitud.

Bajo copiosa irrigación, el lecho del implante se creó con fresas e instrumentos rotatorios que no exceden de 800 rpm y el implante se insertó en el lecho creado. Los implantes empleados fueron estériles y tenían unas dimensiones de 2,5 mm de diámetro y 7 mm de longitud. El tejido blando fue reposicionado y se aproximaron los bordes con sutura de ácido poliglicólico (Polysorb® 3/0, Syneture, USA). Se administró antibiótico durante los 3 días siguientes a la cirugía.

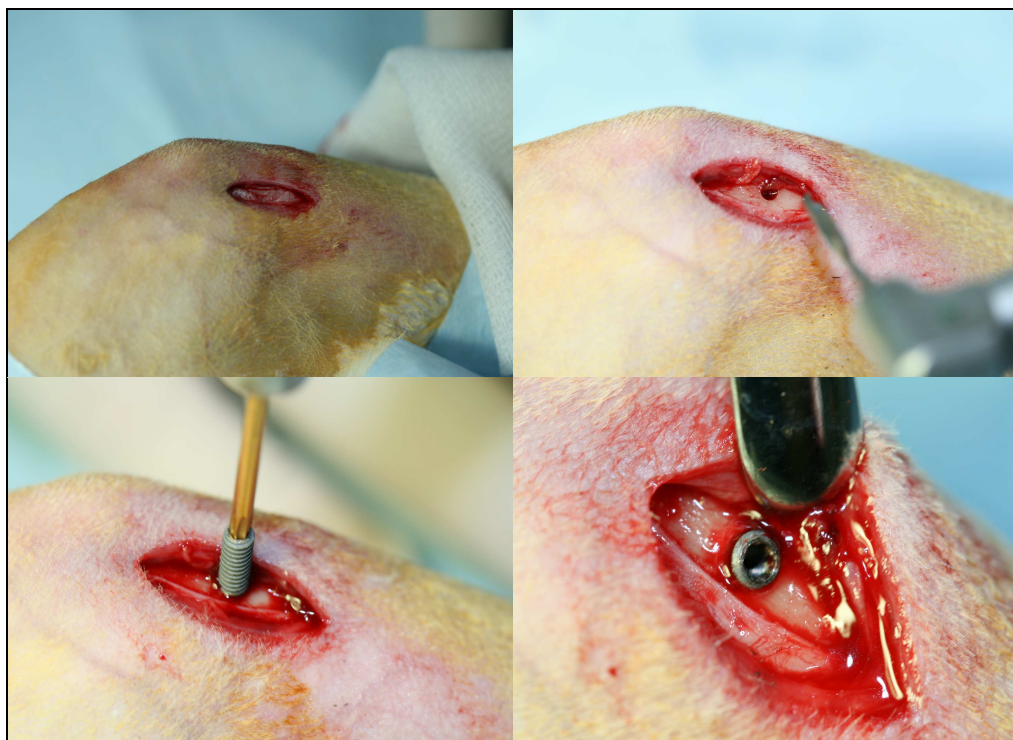


Figura 15: Cirugía de implantación

### 3.7 Tratamiento farmacológico

Tras la cirugía de la implantación los conejos controles se devolvieron a sus jaulas individuales y los conejos OP fueron divididos de forma aleatoria en 4 grupos. Cada uno de estos 4 grupos recibió un tratamiento farmacológico diferente:

- OP sin tratamiento farmacológico (placebo).
- OP con alendronato (ALN) Merck Sharp & Dohme (MSD) a 0,15 mg / kg de alendronato sodico inyectado subcutaneo semanalmente (ALN -).
- OP con alendronato (ALN) MSD a 0,6 mg / kg de alendronato sodico inyectado subcutaneo semanalmente (ALN +).

- OP con PTH (1-34) (Lilly®) disuelta en 50mM suero salino más 2% de suero de conejo, ajustada a un ph de 4.5 con ácido acético. Se administraron 40 microgramos / conejo / día subcutaneo en la región dorsal 5 días a la semana (de lunes a viernes).

Los implantes permanecieron en el hueso durante 12 semanas. Después de 12 semanas de la implantación se analizaron el CMO y DMO.

A las 22 semanas, los animales fueron sacrificados mediante la administración intracardiaca de pentobarbital sódico (50 mg / kg) (Pentotal, Abbott®, Madrid) previa anestésia general.

Todos los experimentos fueron aprobados por el comité ético y en todos los procedimientos se respetó la normativa de la UE (BOE 223/1988 y 265/1990) para la manipulación de animales de experimentación.

### 3.8 Estudios de microtomografía computadorizada y análisis histomorfométrico de las muestras

El hueso tibial y los tejidos circundantes fueron removidos y fijados en formalina al 10%. Posteriormente, las muestras fueron enviadas al laboratorio de investigación de implantes y biomateriales dirigido por el Dr. Peter Schüpbach en Zurich (Suiza) para su análisis histomorfométrico. Las muestras enviadas se detallan en la siguiente tabla:

GRUPO	NUMERO DE ANIMALES
SANOS	10
OP + PLACEBO	10
OP + PTH	10
OP + ALN +	5
OP + ALN -	5

Tabla 2: Distribución de las muestras para el análisis histomorfométrico

En el laboratorio se realizaron los siguientes análisis:

### **A. Micro-tomografías computadorizadas ( $\mu$ TC)**

La  $\mu$ TC es una técnica de imágenes en 3D de alta resolución que permite la evaluación eficiente y cuantitativa de la arquitectura trabecular del hueso, un detallado análisis tridimensional de la arquitectura ósea y de su relación con la resistencia del hueso. Con la  $\mu$ TC se pueden realizar reconstrucciones bidimensionales a partir de las lecturas obtenidas con los detectores. Estas proyecciones axiales nos permiten construir la imagen tridimensional y nos proporcionan la posibilidad de evaluar los efectos de la OP en la arquitectura ósea pudiéndose observar los efectos de los fármacos a nivel arquitectural.

Los parámetros obtenidos con la exploración tridimensional de  $\mu$ TC incluyen la densidad volumétrica ósea, el número de trabéculas, grosor, separación y conexiones trabeculares (Capiglioni 2006).

### **B. Histomorfometría**

Para el estudio histomorfométrico las muestras fueron incluidas en metacrilato. Se realizaron cortes a lo largo del eje longitudinal del implante, consiguiendo secciones de tibia de 50 $\mu$ m de espesor usando un sistema de cortes sin decalcificación de las muestras.

Cada sección fue nuevamente cortada a un espesor de 15  $\mu$ m y fueron teñidas con azul de toluidina para su observación al microscopio óptico. Mediante este análisis se pudo examinar la calidad del nuevo hueso formado alrededor del implante.

Para evaluar el porcentaje de contacto directo entre el hueso y el implante se utilizó el microscopio electrónico de barrido (SEM). El microscopio electrónico de barrido es una técnica no destructiva que permite el estudio de superficies a alta resolución mediante imágenes.

### 3.9 Análisis estadístico

La hipótesis de normalidad de la distribución de datos de DXA en la población inicial fue definida mediante el test de Kolmogorov-Smirnov. La reproducibilidad de las medidas in vivo se evaluó en 10 conejos consecutivos calculando el CV de cuatro medidas repetidas de columna, rodilla global, subregiones de la rodilla y área de implante, realizadas a lo largo de una misma semana, como se ha explicado anteriormente. Se calculó de esta manera el error de precisión, expresado en tanto por ciento como coeficiente de variación (CV), definido como  $DE/mediana \times 100$ . Este CV nos permitirá calcular el llamado menor cambio significativo ("least significant change", LSC) de acuerdo con la fórmula de Gluer y cols., que valora los cambios de CMO y la DMO que sobrepasan  $2\sqrt{2}$  veces el error de precisión de la técnica utilizada.

Las correlaciones se calcularon mediante el coeficiente de correlación de Spearman ( $r$  = correlación parcial). Los datos se expresaron como media estadística  $\pm$  error estándar de la media (EEM). Los datos entre los diferentes grupos se compararon usando el análisis no paramétrico Mann-Whitney. Se consideró siempre significativo un valor de  $p < 0,05$ . Todos los cálculos estadísticos se realizaron con el programa informático SPSS v. 11.0 para Windows (SPSS, Chicago, ILL, USA).

## 4 Resultados

### 4.1 Validación del modelo de OP experimental

Para desarrollar el primer objetivo, la validación del modelo OP experimental, se realizaron estudios densitométricos a distintos tiempos que permitieron caracterizar el remodelado óseo.

#### 4.1.1 Estudios de densitometría ósea

Para determinar los valores basales en la población se llevaron a cabo densitometrías en la semana anterior a la OVX. La tabla 3 muestra los resultados de DMO en las diferentes localizaciones anatómicas evaluadas. Se observan variaciones en la DMO en las diferentes áreas estudiadas. Estas variaciones reflejan la diferente proporción de hueso trabecular y cortical de las áreas analizadas.

	COLUMNA LUMBAR	RODILLA GLOBAL	HUESO SUBCONDRA	AREA IMPLANTE
DMO (g/cm <sup>2</sup> )	0,28 ± 0,003	0,41 ± 0,004	0,64 ± 0,006	0,41 ± 0,017
CV-DMO (%)	10,30	9,65	9,51	16,59

Tabla 3: Resultados de la densidad mineral ósea basal interindividual en diferentes localizaciones

Se evaluó la distribución estadística de los datos mediante el test de Kolmogorov-Smirnov, y se comprobó que las DMO seguían una distribución normal (Fig.16). Los cambios de estos parámetros tenían un comportamiento paralelo en las cuatro regiones anatómicas valoradas.

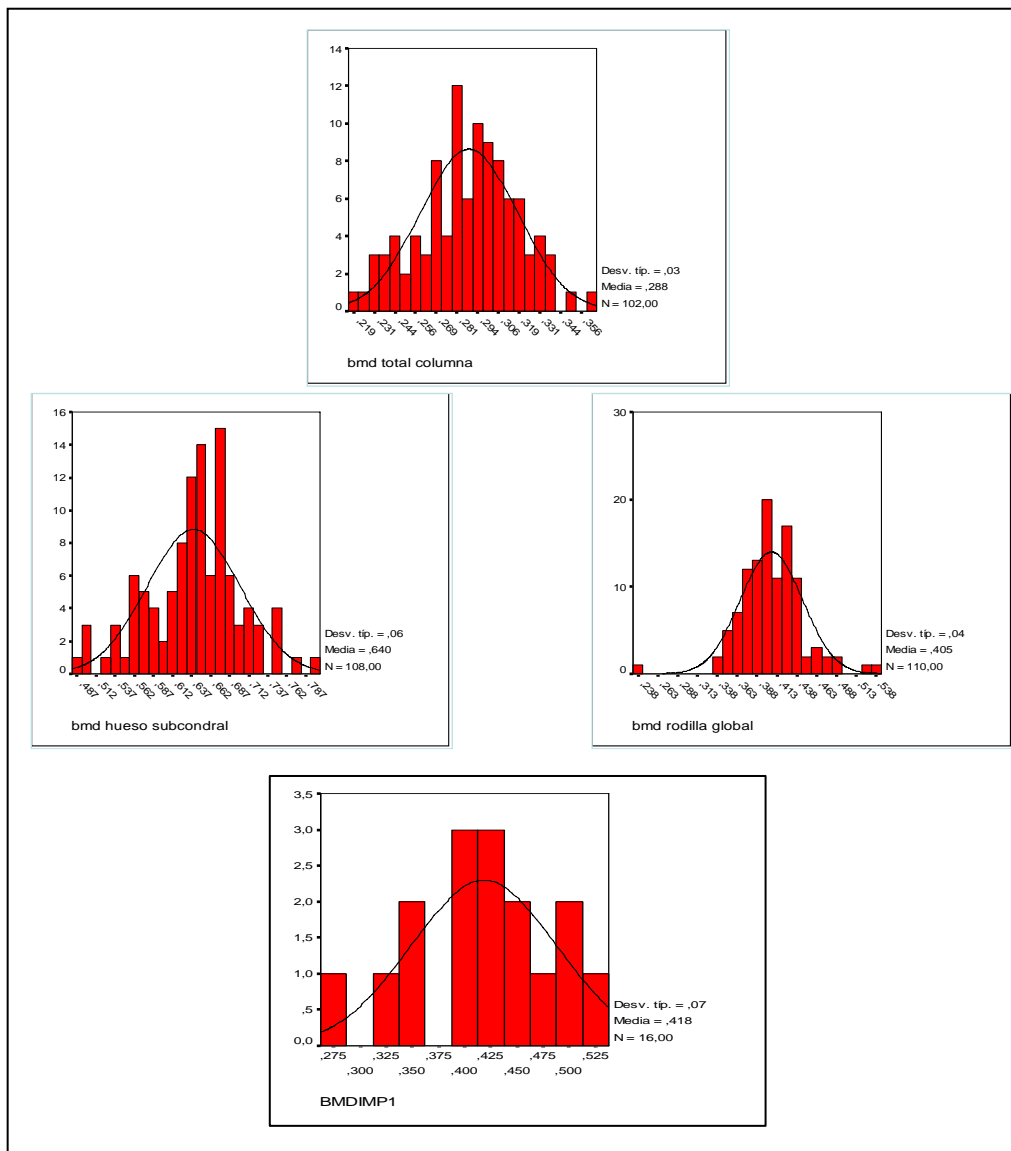


Figura 16: Distribución normal de la DMO en las diferentes regiones analizadas

Las medidas de DMO de las distintas regiones mostraron una correlación significativa entre los valores en CL, RG y HS (Fig.17).

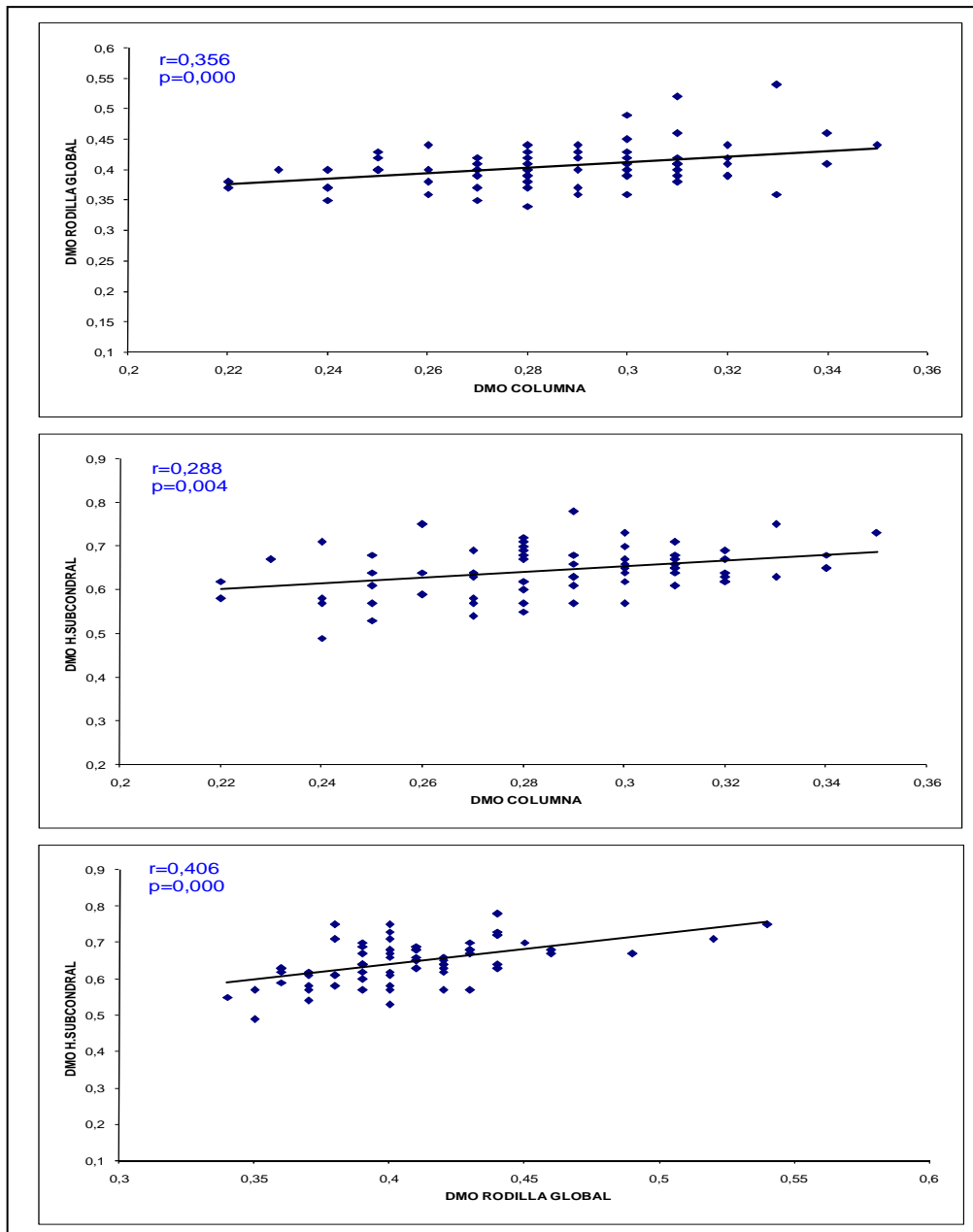


Figura 17: Correlación de las medidas de DMO en las diferentes regiones

Una vez caracterizadas las medidas de DXA basales y comprobado que en nuestra población los datos DMO se ajustaban a una distribución normal en todas las regiones analizadas, se calculó la DMO en estas zonas a diferentes tiempos durante el modelo. Se realizaron las medidas en los animales sanos y en los sometidos a OVX junto con la administración sistémica de MPH, para analizar si estas intervenciones afectaban a la densidad ósea en nuestra población (Fig.18).

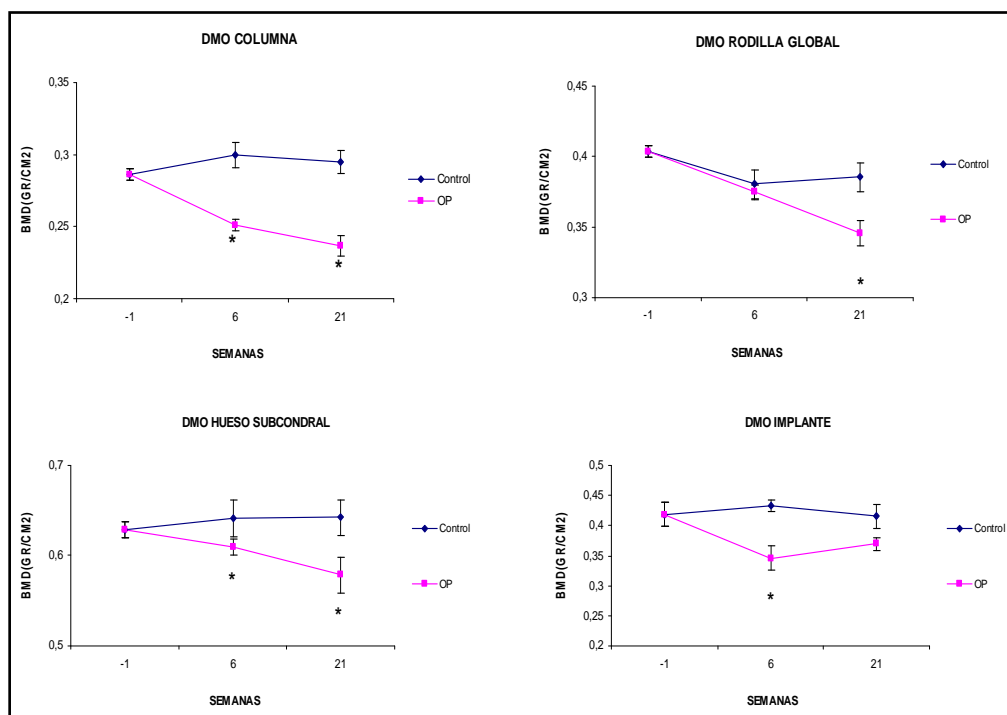


Figura 18: Valores de DMO en las diferentes regiones analizadas a diferentes tiempos durante el estudio

En la figura 18 se observa como los valores de DMO de los conejos sanos no variaron de forma significativa durante el estudio en ninguna de las zonas analizadas: CL, RG, HS y AI (área de implantación).

Después de 6 semanas los animales OP presentaban una densidad ósea significativamente menor comparado con los sanos. Esto resulta apreciable tanto en la CL (con un mayor porcentaje de hueso trabecular) como en el hueso subcondral (hueso cortical y trabecular) de los conejos OP. La disminución de la DMO también es significativa en la metáfisis tibial izquierda, (área de implantación). En rodilla global (mayor porcentaje de hueso cortical), se aprecia la misma tendencia pero no se consigue la significación (Fig 18).

22 semanas después de la OVX, se comprobó que la reducción en la DMO se mantenía de manera constante en CL, RG HS y AI en los conejos OP. Se verificó que la pérdida ósea no revirtió tras la supresión de los corticoides. En el AI se observa una pequeña recuperación de DMO, lo que hace que se pierda la significación aunque los valores de los conejos OP siguen siendo bastante menores que los que se obtienen en los controles.

Todos los grupos estudiados fueron homogéneos respecto al peso corporal, que osciló entre  $4,0 \pm 0,5$  kg y  $5,0 \pm 0,4$  kg al inicio, y permaneció estable a lo largo del seguimiento.

#### 4.1.2 Validación de las medidas de DXA en conejos

Se analizaron las medidas de DXA que se habían realizado. Para determinar la variabilidad intra-individuo se realizaron tres determinaciones diferentes de cada región anatómica en cada conejo dentro de la misma semana. Para comprobar la reproducibilidad y la precisión de estas medidas en los conejos se calculó el CV in vitro y el CV in vivo de las DXA. Después de un triple reposicionamiento de los animales el CV osciló entre 2,6% y 3,8% según la región estudiada y el menor cambio significativo (LSC) de la DMO osciló entre 7,3% y 10,7% según la región considerada (Tabla 4).

	COLUMNA LUMBAR	RODILLA GLOBAL	HUESO SUBCONDAL	AREA IMPLANTE
CV (%)	3,8± 2,6	2,6± 1,6	3,6± 3,6	3,1± 2,2
LSC (%)	10,7	7,3	10,2	8,7

Tabla 4: Valores de CV y LSC de la DMO en las diferentes regiones analizadas

La reproducibilidad de las mediciones in vitro se testó siendo el CV durante el periodo de estudio de 0,64 % para la DMO.

Con estos coeficientes de correlación se puede considerar que las medidas de DXA son válidas.

## 4.2 Estudio de la OP en hueso mandibular

Con el objetivo de estudiar las correlaciones entre la OP sistémica y la OP en el hueso mandibular se analizó la DMO de las diferentes regiones de la mandíbula.

### 4.2.1 Densidad ósea en las diferentes regiones mandibulares

Tras 22 semanas de la OVX, los conejos OP mostraron una disminución de la DMO en todas las regiones de la mandíbula, presentando en la región perialveolar (ROI 1) y la mandíbula global una disminución estadísticamente significativa respecto a los animales controles (Fig 19).

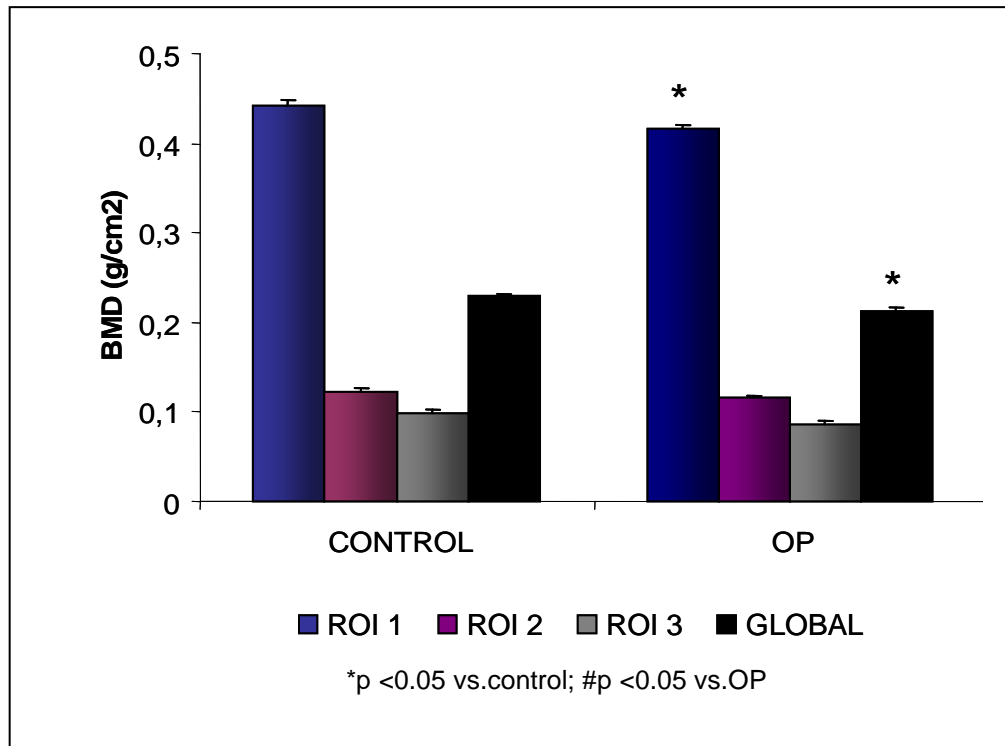


Figura 19: Densidad mineral ósea de las diferentes regiones mandibulares

#### 4.2.2 Contenido cálcico en las cenizas mandibulares

El estudio del contenido mineral cálcico del hueso mandibular de conejos sanos versus conejos OP confirma que la DMO mandibular se ve afectada ante la OP.

Los resultados del contenido cálcico de las cenizas mandibulares de la ROI 1 muestran que se produjo una disminución significativa en los conejos OP respecto a los animales sanos. Además estas medidas se correlacionaron significativamente con los valores de DMO en esta misma región (Fig.20).

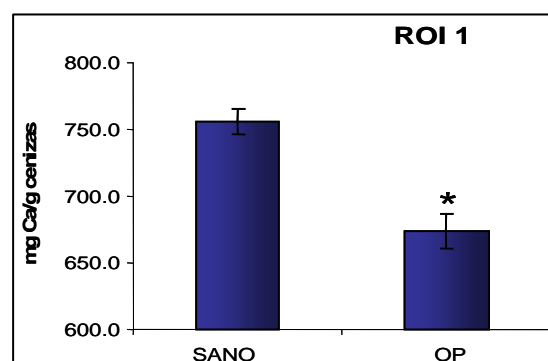


Figura 20: Valores del contenido cálcico de las cenizas mandibulares de la ROI 1 de conejos sanos versus conejos OP

#### 4.2.3 Estudio de las correlaciones entre OP sistémica y OP mandibular

Se estudiaron las correlaciones entre los cambios en la DMO mandibular y los cambios observados en las otras regiones analizadas. Los resultados mostraron que la DMO de la ROI 2 y de la mandíbula global presentaban una correlación positiva lineal con la DMO de la rodilla global. Las DMO de las ROI 1 y 3 mostraron la misma tendencia a correlacionarse positivamente con las demás zonas analizadas aunque no se consiguió significación estadística. También se observaron correlaciones significativas entre la densidad ósea de la ROI 2 y la mandíbula global con la DMO en el hueso subcondral de la rodilla. En la ROI 1 existía una tendencia a la correlación positiva pero no significativa.

Ninguna de las medidas de DMO en las diferentes regiones mandibulares se correlacionaron con las DMO de la columna lumbar (Tabla 5).

	R1	R2	R3	GLOBAL	
r	0,32	0,24	0,34	0,32	LUMBAR SPINE
<i>p</i> (Spearman)	0,16	0,30	0,13	0,16	
r	0,40	<b>0,46 *</b>	0,40	<b>0,46 *</b>	GLOBAL KNEE
<i>p</i> (Spearman)	0,07	0,04	0,07	0,03	
r	0,42	<b>0,49 *</b>	0,35	<b>0,48 *</b>	SUBCHONDRAL BONE
<i>p</i> (Spearman)	0,06	0,02	0,12	0,03	
* $p < 0.05$					

Tabla 5: Correlación entre la DMO mandibular y la DMO de otras regiones analizadas

#### 4.2.4 Correlaciones entre las medidas de los dos densitómetros

Para validar las densitometrías hechas con el densitómetro convencional (Hologic<sup>®</sup> QDR-1000/W<sup>™</sup>) se realizaron las mismas determinaciones en un densitómetro específico de animales pequeños (PIXImus<sup>™</sup>) observando una correlación positiva entre ambas medidas (Fig.21).

Asimismo para comprobar la reproducibilidad de estas medidas, se calculó el coeficiente de variación (CV); siendo de 1,11% en el Hologic<sup>®</sup> y de 0,30% en el PIXImus<sup>™</sup>.

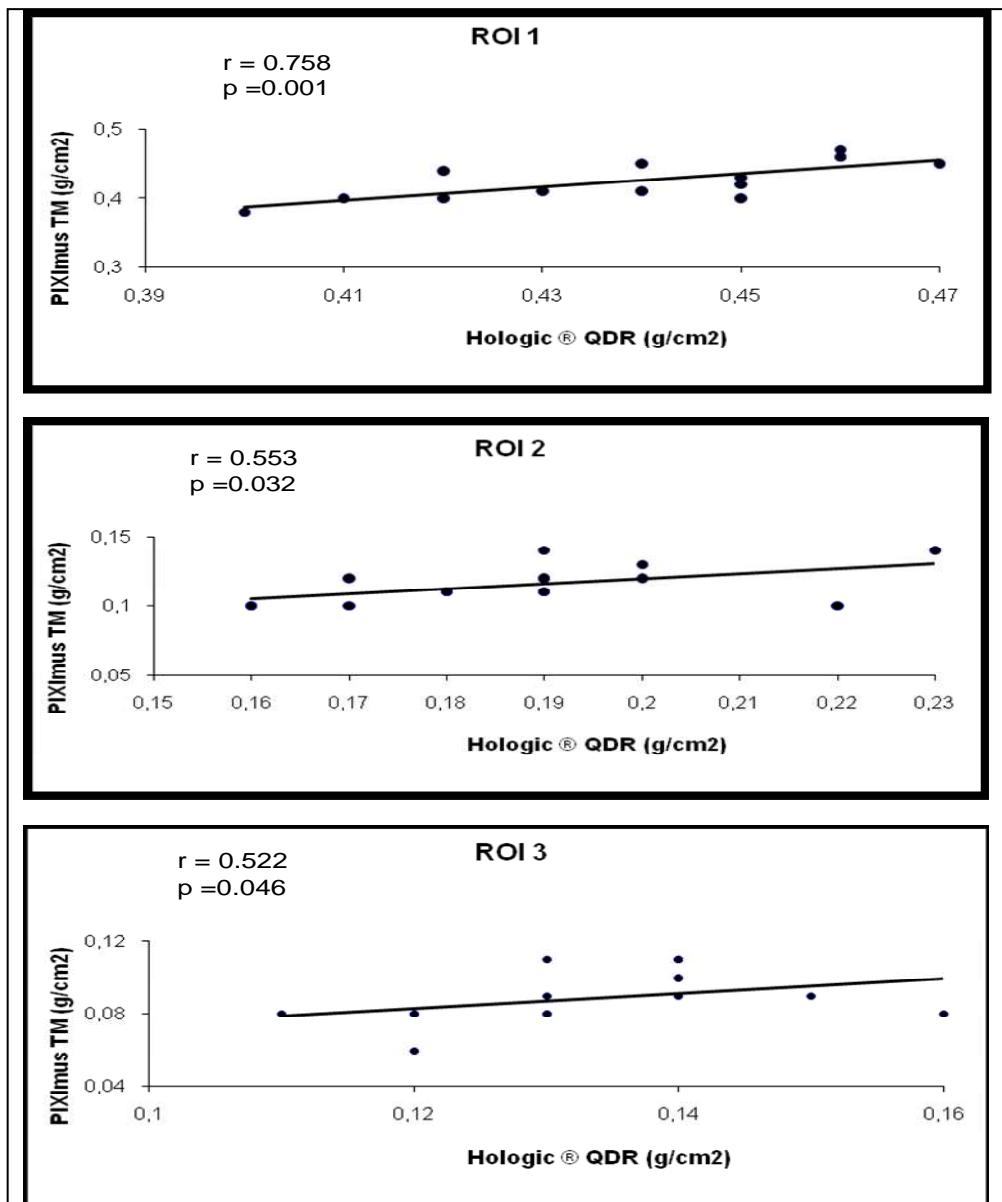


Figura 21: Correlación entre las medidas del densitómetro convencional (Hologic<sup>®</sup> QDR-1000/W<sup>TM</sup>) y el densitómetro específico de animales pequeños (PIXImus<sup>TM</sup>)

### 4.3 Comparación de los efectos de un fármaco antireabsortivo con un fármaco formador de hueso sobre la osteointegración de implantes dentales en hueso osteoporótico

#### 4.3.1 Efecto de la PTH (1-34) sobre la DMO

El tratamiento con PTH (1-34) comenzó 8 semanas después de la OVX. Tras 12 semanas de tratamiento intermitente, los conejos tratados con PTH mostraban un incremento significativo de la DMO con respecto a los conejos OP en todas las zonas estudiadas, incluyendo el AI (Fig.22).

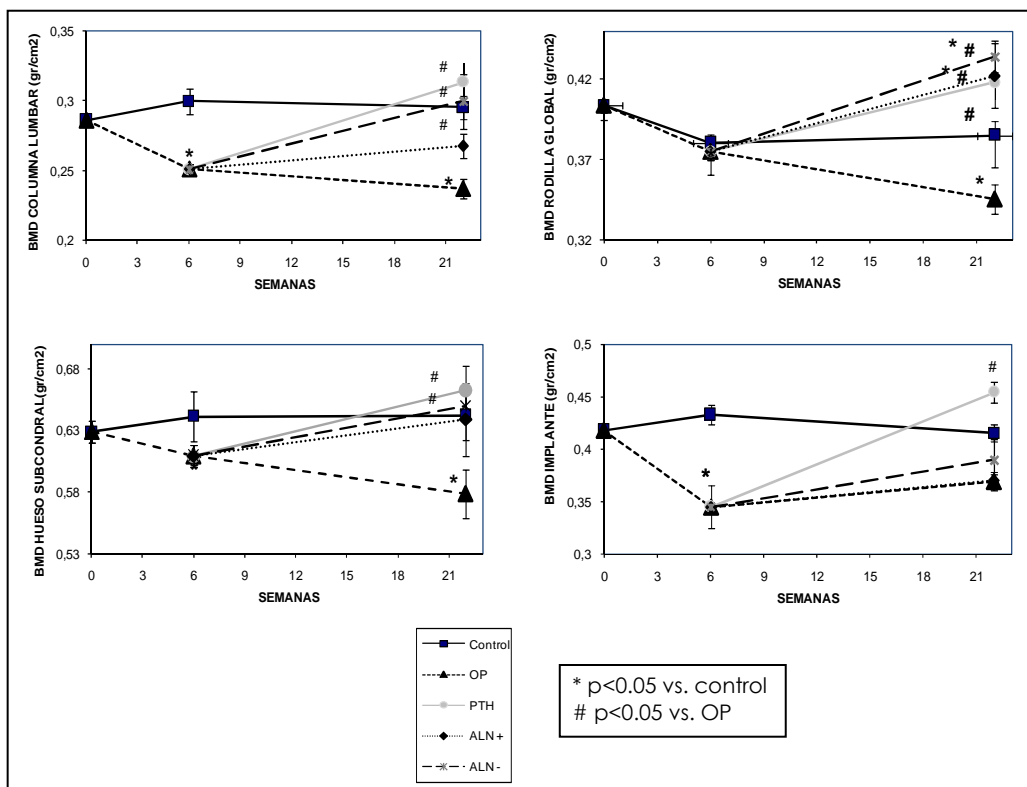


Figura 22: Valores de la DMO de las diferentes regiones analizadas a diferentes tiempos del modelo animal

#### 4.3.2 Efecto del ALN a diferentes dosis sobre la DMO

El tratamiento con ALN comenzó tras 8 semanas de la OVX. Se administró semanalmente a dos diferentes dosis durante 12 semanas.

En la semana 22 los conejos tratados con ALN a ambas dosis presentaban un incremento significativo de la DMO de la columna y de la rodilla global con respecto a los conejos OP. Esta misma tendencia se apreciaba en el hueso subcondral y en la metáfisis tibial pero no se consiguió significación.

No existían diferencias significativas en la DMO de ninguna de las regiones estudiadas al emplear diferentes dosis de ALN.

#### 4.3.3 Efecto de los fármacos antiosteoporóticos sobre el porcentaje de contacto hueso-implante

Se estudió el porcentaje de contacto entre el hueso y el implante en cada uno de los grupos. El análisis de los datos obtenidos muestra una disminución del área de contacto entre hueso e implante cuando se compara el grupo de los animales placebo con los animales controles ( $p = 0,063$ ).

El aumento del área de contacto entre el hueso y el implante es significativo cuando se compara el grupo de animales tratados con PTH (1-34) con los animales placebo y el grupo de animales control.

El grupo de animales tratados con ALN a diferentes dosis no presenta cambios significativos respecto al grupo de animales placebo. No existen diferencias significativas cuando se utiliza ALN a diferentes dosis.

Estos datos de la histomorfometria se corroboran con los obtenidos del análisis densitométrico de las DMO.

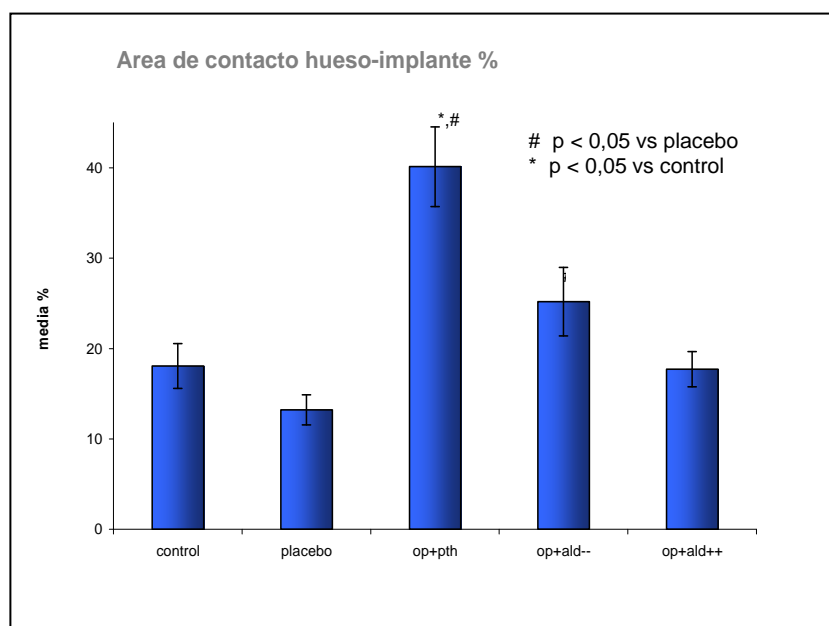


Figura 23: Porcentaje de contacto entre hueso e implante en cada uno de los diferentes grupos

Las imágenes del análisis histomorfométrico apoyan los datos representados en la figura 23. La figura 24 muestra una imagen al microscopio electrónico de barrido de cada grupo de estudio.

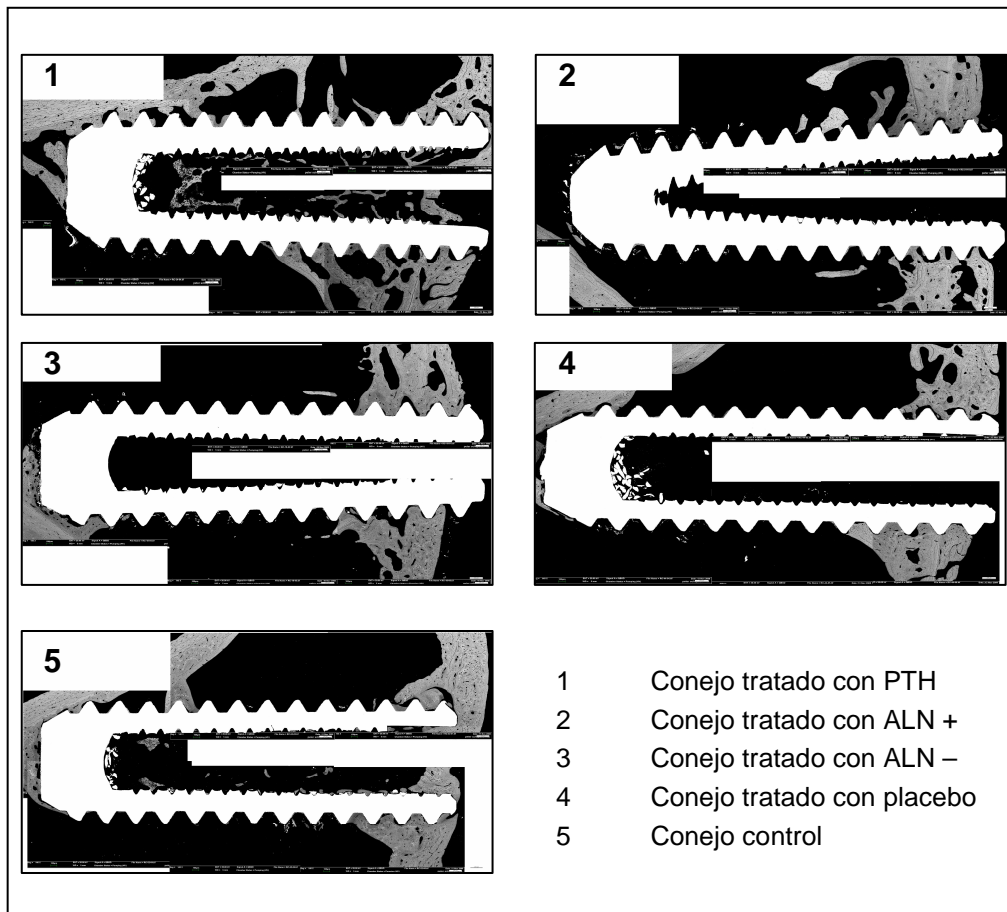


Figura 24: Imágenes de microscopio electrónico de barrido mostrando el contacto entre el implante y el hueso en cada uno de los grupos en estudio

En la tabla 6 se reflejan los datos correspondientes al estudio histomorfométrico de las muestras. Se puede observar como el grupo de animales tratados con PTH (1-34) muestra un aumento en el porcentaje del área ósea en contacto con el implante. Este aumento del contacto se produce en el hueso medular tanto entre las espiras del implante como fuera de ellas cuando son comparados con el grupo control y el grupo placebo. Esta tendencia no se observa en hueso cortical.

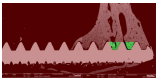
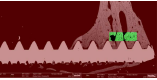
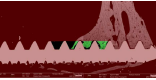
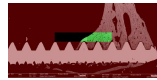
	CHI (%)	Área ósea (%)	Área ósea(%)	Área ósea(%)	Área ósea (%)
	en las primeras 4 espiras	entre las 2 primeras espiras	fuera de las 2 primeras espiras	entre las 4 espiras siguientes	fuera de las 4 espiras siguientes
	en compartimento medular	en hueso cortical	en hueso cortical	en compartimento medular	en compartimento medular
					
OP + PTH	40.3 ± 10.3	63.5 ± 11.7	72.2 ± 13.2	28.7 ± 9.0	19.0 ± 7.4
OP + ALN+	17.7 ± 4.8	67.4 ± 8.3	80.0 ± 10.9	22.6 ± 6.6	20.6 ± 7.8
OP + ALN-	21.3 ± 11.0	66.4 ± 5.7	79.1 ± 4.9	23.2 ± 14.8	23.5 ± 17.6
OP+Placebo	13.2 ± 4.3	61.8 ± 13.9	80.0 ± 8.0	21.3 ± 6.2	13.6 ± 4.7
Controles	13.6 ± 7.9	66.5 ± 6.9	77.7 ± 5.5	16.8 ± 11.1	12.1 ± 11.5

Tabla 6: Porcentaje del área ósea entre las espiras del implante y fuera de ellas en los diferentes grupos de tratamiento

## 5 Discusión

### 5.1 Justificación del modelo animal

La rata ovariectomizada es el modelo más utilizado para el estudio de la pérdida ósea por deprivación hormonal y se considera el “patrón oro” para el estudio de la pérdida ósea principalmente trabecular inducida por la deficiencia de estrógenos (Wronski y cols. 1985; Wronski y cols. 1986; Kalu 1991; Frost y Jee 1992; Barlet y cols. 1994; Dempster y cols. 1995; Turner 2001). Sin embargo, el conejo presenta algunas ventajas sobre este modelo (Newman y cols. 1995). Se eligió el conejo como modelo experimental de OP porque alcanza la “madurez esquelética” en torno a los 8-10 meses y ostenta un verdadero remodelado cortical con un “turnover óseo” más acelerado que el de otras especies. Esto lo hace un modelo apropiado para el estudio de fármacos que regulan dicho remodelado. Aún así, el conejo ha sido poco utilizado para estudiar la OP postmenopausica. A pesar de todo esto, en realidad no existe el modelo ideal para estudiar la OP postmenopausica (Bellino 2000). El modelo más idóneo lo constituyen algunas especies de primates, pero la investigación con estos modelos es costosa, laboriosa y no exenta de riesgos. Newman y cols proponen la oveja como alternativa a la rata y a otros modelos animales. Sin embargo, también señalan el interés y enfatizan las ventajas del conejo como modelo experimental de OP (Newman y cols. 1995).

Los dos principales mecanismos empleados para producir una reducción de la masa ósea en el conejo han sido la OVX y la administración de corticoides. Los resultados con ambos métodos por separado son controvertidos y discordantes (Grardel y cols. 1994; Southard y cols. 2000; Eberhardt y cols. 2001).

Los conejos se han mostrado como animales idóneos por tamaño, disponibilidad, temperamento, bajo coste y por disponer de razas genéticamente homogéneas. Por todos los motivos expuestos, los conejos se utilizan en numerosos estudios en los que evalúan la osteointegración de implantes dentales. La localización elegida con mayor frecuencia es la tibia del animal (Keller y cols. 2004; Mori y cols. 1997; Lugero GG de Falco Caparbo y cols. 2000).

## 5.2 Validación del modelo OP

Previamente se ha validado el modelo de OP en conejos mediante OVX y administración sistémica de corticoides (MHP) en distintas localizaciones esqueléticas: columna lumbar, rodilla global (de especial interés por ser la localización elegida para la colocación del implante), hueso subcondral de la rodilla y hueso mandibular y en distintos tipos de hueso (cortical, trabecular y mandibular). Se realizaron distintos análisis que permitieron caracterizar el remodelado óseo y el efecto tanto de la OVX como de diversas dosis de glucocorticoides. Primero se caracterizaron mediante DXA las medidas basales y se comprobó que en la población los datos de DMO se ajustaban a una distribución normal y se correlacionaban en todas las regiones analizadas.

En conejos, la OVX por si sola no consigue disminuir la DMO al rango osteoporótico, por lo que es preciso añadir otra intervención terapéutica tal como alimentar a los animales con una dieta baja en calcio o la administración de corticoides (Mori y cols. 1997; Turner y cols. 2001; Castañeda y cols. 2006). En el modelo experimental la combinación de la OVX y la administración sistémica de glucocorticoides produjo una pérdida significativa de DMO en la columna lumbar, en la rodilla global (incluyendo la metáfisis tibial) y el hueso subcondral ya en la semana 6 tras la OVX. Esta pérdida se mantuvo hasta 22 semanas después de la OVX. Se observa que la OVX induce un aumento de la reabsorción ósea mientras que la administración de glucocorticoides disminuye la formación ósea, datos que están en concordancia con otros estudios como los de Castañeda y Manolagas (Manolagas 2000; Castañeda y cols. 2006).

## 5.3 Correlación OP sistémica / OP mandibular

El estudio de la DMO mandibular ha mostrado un descenso en la DMO en la mandíbula global y en la región perialveolar, así como una disminución del contenido cálcico en esta última región.

Se hallan resultados similares en los estudios de OP mandibular en los que se observa que la OP sistémica afecta también a esta región esquelética (Streckfus y cols. 1997; Miller y cols. 1997; Johnson y cols. 2002; Shirota y cols. 2003; Jiang y cols. 2008; Ejiri y cols. 2008). La OP sistémica afecta de forma diferente a las distintas regiones de la mandíbula con distinto porcentaje de hueso cortical y trabecular (Mulder y cols. 2006).

Las medidas de DXA de la mandíbula global y de la región del ramus se correlacionan positivamente con las DMO del hueso subcondral y de la rodilla global. Esta correlación entre la OP sistémica y la OP mandibular ya ha sido descrita en ratas (Mavropoulos y cols. 2007).

Sin embargo, no se encuentra correlación con la DMO de la columna lumbar. Estos datos concuerdan con los que presenta Kingsmill en 1999 (Kingsmill y Boyde 1999). En contraste existen estudios que encuentran correlación entre la DMO mandibular y la DMO de columna lumbar (Horner y cols. 1996; Taguchi y cols. 1996; Jiang y cols. 2008).

A partir de nuestros datos se puede afirmar que existe correlación entre la OP sistémica y la OP mandibular. Se comprueba que la OP en rodilla global se correlaciona con la OP mandibular, argumento que nos valida colocar el implante en dicha zona.

La gran mayoría de los estudios que analizan la osteointegración de los implantes dentales utilizan el conejo como modelo experimental y su tibia como área de implantación (Keller y cols. 2004; Mori y cols. 1997; Lugero GG de Falco Caparbo y cols. 2000).

Con la colocación del implante en la metáfisis tibial se facilitó la técnica de implantación y se aumentaron las posibilidades de supervivencia del animal.

Para corroborar las medidas de DXA se utilizaron dos densitómetros diferentes: uno convencional (Hologic<sup>®</sup> QDR-1000/W<sup>TM</sup>) y otro específico de animales pequeños (Piximus<sup>TM</sup>). Las medidas en ambos se correlacionaron y los coeficientes de variación fueron similares a los encontrados en otras especies animales, variando entre 0,3 - 2,79 % en ambos densitómetros (Jayo y cols. 1991; Griffin y Hopfer 1993; Casez y cols. 1994; Rozenberg y cols. 1995; Turner y cols. 1995; Gala Paniagua y cols. 1998).

Esto permitió comprobar la precisión y la reproductibilidad de las medidas de DXA en animales pequeños. Se confirmó que la DXA es una técnica efectiva y precisa para medir la densidad mineral ósea y detectar las variaciones de la masa ósea.

Estos resultados vienen apoyados por otros en los que se demuestra que la DXA con software de ultra alta resolución es una herramienta de alta precisión, superior a otros procedimientos no invasivos basados en la atenuación de los

rayos y de los ultrasonidos (Sartoris y Resnick 1990; Lang y cols. 1991; Grier y cols. 1996; Shipp y cols. 1988; Gala Paniagua y cols. 1998).

Se concluye que este modelo de OP en conejos es reproducible y consigue reducir la masa ósea en el hueso trabecular, cortical y mandibular en un corto plazo de tiempo. Es un modelo válido para el estudio de la OP y el remodelado óseo.

Todos los grupos estudiados fueron homogéneos respecto al peso corporal, que osciló entre  $4,0 \pm 0,5$  kg y  $5,0 \pm 0,4$  kg al inicio y permaneció estable a lo largo del seguimiento, por lo que las variaciones de la DMO no tendrían relación con variaciones en el peso de los animales.

#### **5.4 Efectos de la OP sobre la osteointegración de implantes dentales**

El estudio proporciona importante información sobre los efectos que la terapia antiosteoporótica (antireabsortivos y osteoformadores) tiene sobre el hueso que se encuentra alrededor de los implantes dentales. Los resultados muestran que la administración intermitente de PTH (1-34) aumenta la DMO en el área perimplantaria y mejora la osteointegración estimulando la formación de nuevo hueso trabecular alrededor del implante.

En el modelo de OP la osteointegración del implante se ve disminuida. Este hallazgo es consistente con otros estudios que sugieren que la osteointegración de los implantes dentales puede estar comprometida en pacientes OP (Linder y cols. 1988; Baxter 1993; Hara y cols. 1999; Motohashi y cols. 1999).

Estudios más recientes consideran también la OP como posible factor de riesgo de la osteointegración, pudiendo inducir alteraciones en el hueso alrededor del implante lo que reduce la capacidad de soporte óseo necesario para su estabilidad (Tsolaki y cols. 2009; Keller y cols. 2004; Tokugawa y cols. 2003; Pan y cols. 2000; Luger GG de Falco Caparbo y cols. 2000).

En el área perimplantaria la DMO y el área contacto hueso-implante (CHI) se redujo significativamente cuando comparamos el grupo de conejos OP con el grupo de conejos control. Estos datos concuerdan con los que obtienen en conejos Mori y cols y con los de Ozawa y cols en ratas. En ambos casos se observa una alteración de la osteointegración de los implantes dentales en

modelos OP, en los que es necesario un tiempo de cicatrización más prolongado para que se produzca un desenlace correcto del proceso de osteointegración (Ozawa y cols. 2002).

En contraposición, Dao y cols no consideran la OP postmenopausica como un factor de riesgo para el fracaso de la osteointegración de implantes dentales. Su argumento se basa en que la tasa de fracaso de implantes no se correlaciona con la edad ni el sexo de los pacientes, algo que caracteriza a la OP postmenopausica. La consistencia del estudio de Dao y cols es limitada debido al diseño del estudio (de naturaleza retrospectiva, con una muestra pequeña y escasamente representativa de la población general, en la que incluso la prevalencia de la OP no está establecida). En este sentido, las conclusiones de su estudio se deben interpretar con suma precaución (Dao y cols. 1993).

### **5.5 Efectos de la PTH (1-34) vs ALN sobre la osteointegración de implantes dentales**

Nuestro modelo animal tiene un activo remodelado Haversiano. Esta característica lo hace adecuado para evaluar los efectos del remodelado óseo de fármacos anabólicos.

Los datos del análisis densitométrico demuestran que la administración intermitente de PTH (1-34) aumenta de forma significativa la DMO en el área perimplantaria y en la mandíbula del animal cuando se compara con el grupo placebo (OP). En el área perimplantaria no existen diferencias significativas en cuanto a DMO entre el grupo tratado con PTH (1-34) y el grupo control.

Nuestros datos apoyan a los publicados por Miller y cols donde se demuestra que la administración intermitente de PTH (1-34) estimula la formación ósea en la mandíbula y la cresta alveolar en ratas OP. Se ve aumentada la DMO mandibular de forma significativa en animales tratados con PTH (1-34) respecto a los no tratados (Miller y cols. 1997).

Los resultados de la histomorfometría de este estudio muestran un aumento significativo del porcentaje de CHI en el grupo tratado con PTH (1-34) respecto al grupo placebo (OP) y al grupo control. El análisis histomorfométrico detallado refleja un aumento en el porcentaje del área ósea, en compartimento medular, en el grupo de animales tratados con PTH (1-34) cuando son comparados con

el grupo control y el grupo placebo. Este incremento del porcentaje de área ósea se observa tanto entre las espiras del implante como fuera de estas. En el hueso cortical no se observan estas diferencias. Existen varios autores que obtienen datos en concordancia con los nuestros. Duarte y cols demuestran comparando ratas ovariectomizadas con ratas sanas que la osteointegración de implantes dentales en el hueso cortical de las ratas ovariectomizadas no se ve afectada cuando se compara con las sanas mientras que en el hueso trabecular se producen diferencias significativas. Recientemente, Mair y cols. también comprueban en ratas que la PTH no muestra su efecto sobre la osteointegración de implantes dentales a nivel del hueso cortical (Duarte y cols. 2005; Mair y cols. 2009).

De los resultados del estudio histomorfométrico se concluye que la administración intermitente de PTH (1-34) incrementa notablemente el CHI global mediante un aumento de nuevo hueso trabecular y mejora significativamente la osteointegración de implantes dentales respecto al grupo control y al grupo placebo.

Existen mas estudios que analizan mediante DXA los efectos sobre la osteointegración de la administración intermitente de PTH (1-34) tras la colocación de implantes de titanio en la tibia de ratas OP. Los resultados de todos ellos coinciden en que la DMO alrededor del implante en el grupo PTH (1-34) no muestra diferencias respecto al grupo control y es más alta que en el grupo placebo. Además demuestran que la administración intermitente de PTH (1-34) aumenta de forma significativa el número de nuevas trabéculas formadas alrededor del implante colocado en la metafisis tibial de ratas OP, proporcionando un aumento del CHI y por tanto mejorando la osteointegración (Skripitz y Aspenberg 2001; Shirota y cols. 2003; Seebach y cols. 2004; Skripitz y cols. 2005; Dayer y cols. 2007; Mair y cols. 2009).

Ohkawa y cols, en concordancia con nuestros datos, demuestran en ratas que la PTH (1-34) aumenta la formación ósea alrededor del implante. Observan que la DMO en el grupo tratado con PTH (1-34), medida en diferentes tiempos después de la implantación, es significativamente más alta que en el grupo placebo. En cambio, no encuentran diferencias significativas entre el grupo PTH (1-34) y el grupo control.

Remarcamos que en el estudio de Ohkawa y cols, al igual que en el nuestro, los valores densitométricos del área perimplantaria al final del tratamiento no muestran diferencias significativas entre la población sana (controles) y la población tratada durante 12 semanas con PTH (1-34). Sin embargo, en el análisis histomorfométrico el porcentaje de CHI es significativamente mayor en el grupo PTH que en el grupo placebo y en el grupo control (Ohkawa y cols. 2008).

Esta aparente contradicción podría explicarse por el hecho de que con la DMO no se puede medir la densidad ósea inmediatamente adyacente al implante. Con cada técnica se miden territorios diferentes.

Tras una revisión bibliográfica se puede comprobar que en los estudios experimentales se utilizan dosis muy distintas de ALN. Ante la dificultad de decidir cual sería la dosis de ALN subcutánea adecuada para nuestro modelo animal y equivalente a la dosis oral en humanos, se tomó la decisión de diseñar el estudio con dos grupos de animales tratados con ALN a diferentes dosis:

- 0.15 mg / kg / semana. Es la dosis que con más frecuencia aparece en la literatura (Narai y cols. 2003).
- 0.6 mg / kg /semana. Es la dosis recomendada por la farmacéutica MSD.

Cuando se compararon las DMO de los grupos tratados con ALN a distintas dosis no encontramos diferencias estadísticamente significativas entre ellas. Entre ambos grupos de ALN no existe diferencia estadísticamente significativa en el porcentaje CHI. Se consigue el mismo efecto, incluso levemente mejor, en la osteointegración utilizando una dosis más baja de ALN. Este mismo resultado lo obtienen Kurth y cols cuando estudian el efecto del ibandronato a dos diferentes dosis sobre la osteointegración de implantes en ratas OVX. Según este estudio, este “efecto meseta” podría explicarse a través de los resultados obtenidos tras la administración de altas dosis de ibandronato en animales de experimentación donde se observa que la masa ósea fue corregida de acuerdo con los requerimientos del animal y esta nunca superó los niveles correspondientes, a pesar de administrar dosis altas de fármaco (Kurth AHA y cols. 2005; Monier-Faugere y cols. 1999).

Los datos de nuestro análisis densitométrico prueban que el tratamiento con ALN no muestra ningún efecto sobre la osteointegración en la región perimplantaria. En el grupo tratado con ALN- se observa un aumento en la DMO en el área perimplantaria cuando se compara con el grupo placebo y el grupo control aunque esta diferencia no es estadísticamente significativa.

Estos resultados se confirman en el estudio histomorfométrico donde el porcentaje CHI en el grupo tratado con ALN no aumenta con respecto al grupo control ni al grupo placebo en el área periimplantaria.

Starck y cols dan un paso más y defienden que el tratamiento con BFF es un factor de riesgo para la osteointegración de implantes (Starck y Epker 1995). De acuerdo con estos datos, Kasai y cols advierten de que los pacientes en tratamiento con BFF orales tienen un riesgo mayor de fracaso de implantes (Kasai y cols. 2009).

En contraposición a nuestros datos Tokugawa y cols demuestran que el tratamiento con BFF mejora la osteointegración en ratas OVX (Tokugawa y cols. 2003). Así mismo Giro y cols. comprueban que el ALN previene la pérdida de masa ósea alrededor del implante al disminuir el remodelado óseo. Se encuentra un mayor número de trabéculas y un aumento de la DMO cuando se compara el grupo de ratas en tratamiento con ALN y el grupo de ratas OVX sin tratamiento (Giro y cols. 2008). El método utilizado para el análisis del tejido óseo en el estudio de Giro y cols fue la radiografía convencional, por lo que estos datos carecen de rigor metodológico suficiente y se deben interpretar con precaución.

El efecto positivo de los BFF sobre la osteointegración de implantes dentales también fue demostrado por otros grupos de trabajo (Da Paz y cols. 2001; Andersson y cols. 2002; Narai y Nagahata 2003; Duarte y cols. 2005; Kurth AHA y cols. 2005; Chacon y cols. 2006; Viera-Negrón y cols. 2008).

A pesar de la actual relevancia de la implantología dental como opción terapéutica restauradora de la funcionalidad masticatoria en pacientes OP desdentados total ó parcialmente, existen pocos estudios comparativos que proporcionen información sobre los efectos que el tratamiento con PTH (1-34) y el tratamiento con ALN provocan en la osteointegración de implantes dentales en estos pacientes.

Nuestro estudio aporta datos muy valiosos en cuanto a la influencia que las terapias antiosteoporóticas actuales ejercen sobre la osteointegración de implantes dentales.

Sin duda, el efecto de los fármacos formadores de hueso es sustancialmente superior al de los antireabsortivos que, de hecho, no mejoran la osteointegración.

Nuestros resultados demuestran que la administración intermitente de PTH (1-34) mejora la osteointegración de los implantes dentales debido al aumento de nuevo hueso trabecular formado alrededor del implante, lo cual no ocurre con el tratamiento con ALN.

## **5.6 Futuras vías de investigación**

Este estudio proporciona datos novedosos respecto a la osteointegración de los implantes dentales en hueso osteoporótico.

A pesar de que los fármacos antiosteoporóticos son prescritos con frecuencia en la actualidad, todavía no se conoce el impacto que estos tratamientos ejercen sobre la osteointegración de los implantes dentales.

Nuestro estudio experimental en conejos osteoporóticos puede servir para establecer futuras líneas de investigación en este campo.

Resultaría interesante realizar ensayos clínicos sobre pacientes para evaluar el efecto de los fármacos anabólicos sobre el nuevo hueso formado alrededor de los implantes dentales y sobre otras estructuras dentarias en sujetos osteoporóticos.

## **6 Conclusiones**

- 1. El modelo experimental de osteoporosis en conejos es reproducible. Consigue reducir la masa ósea tanto en hueso trabecular como cortical y mandibular en un corto periodo de tiempo. Es un modelo válido para el estudio de la osteoporosis y del remodelado óseo.**
- 2. La osteoporosis sistémica y la osteoporosis mandibular se correlacionan. La osteoporosis en rodilla global se correlaciona con la osteoporosis mandibular.**
- 3. La OP podría ser un factor de riesgo para la osteointegración de implantes dentales.**
- 4. La administración intermitente de PTH (1-34) mejora la osteointegración de los implantes dentales debido al aumento de nuevo hueso trabecular formado alrededor del implante, lo cual no ocurre con el tratamiento con alendronato.**

---

## Bibliografía

Agerbaek MO, Eriksen EF, Kragstrup J, Mosekilde L, Melsen F. A reconstruction of the remodelling cycle in normal human cortical iliac bone. *Bone Miner* 1991; 12(2): 101-12.

Andersson N, Surve VV, Lehto-Axtelius D, Ohlsson C, Hakanson R, Andersson K et al. Drug-induced prevention of gastrectomy and ovariectomy-induced osteopenia in the young female rat. *J Endocrinol* 2002; 175: 695-703.

Assael LA. Oral bisphosphonates as a cause of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws: clinical findings, assessment of the risks, and preventive strategies. *J Oral Maxillofac Surg* 2009; 67(5): 35-43.

Aubin JE, Liu F. The osteoblasts lineage. *Principles of Bone Biology*. San Diego, California, 1996 Academic Press.

Aubin JE. Osteogenic cell differentiation. En: Davies JE Ed. *Bone Engineering*. Toronto 2000: 19-30

Barlet JP, Coxam V, Davicco MJ, Gaumet N. Animal models of post-menopausal osteoporosis. *Reprod Nutr Dev* 1994; 34(3): 221-36.

Baron R. Anatomy and Biology of Bone Matrix and Cellular Elements. *General Principles of Bone Biology. Primer on the metabolic bone diseases and disorders of mineral research*. Washington, DC. USA 2003.

Baxter JC. Osteoporosis and osseointegration of implants. *J Prosthodont*. 1993; 2(2): 120-125.

Baylink DJ, Finkelman RD, Mohan S. Growth factors to stimulate bone formation. *J Bone Miner Res* 1993; 8: 565-72.

---

Bekker PJ, Holloway D, Nakanishi A, Arrighi M, Leese PT, Dunstan CR . The effect of a single dose of osteoprotegerin in postmenopausal women. *J Bone Miner Res* 2001; 16(2): 348-60.

Bellino FL. Nonprimate animal models of menopause: workshop report. *Menopause* 2000; 7(1): 14-24.

Black DM, Steinbuch M, Palermo L, Dargent-Molina P, Lindsay R, Hoseney MS et al. An assessment tool for predicting fracture risk in postmenopausal women. *Osteoporos Int* 2001; 12: 519-28.

Bone H G, Adami S, Rizzoli R, Favus M, Ross PD, Santora A, Prahhalada S, Daifotis A, Orloff J y Yates J. Weekly administration of alendronate: rationale and plan for clinical assessment. *Clin Ther* 2000; 22(1): 15-28.

Boyle WJ, Simonet WS, Lacey DL. Osteoclast differentiation and activation. *Nature* 2003; 423(6937): 337-42.

Branemark PI, Zarb GA, Albrektsson T. La osteointegración en la odontología clínica. Barcelona, 1999; Quintaessence.

Burgess TL, Quian Y, Kaufman S, Ring BD, Van G, Capparelli C et al. The ligand for osteoprotegerin (OPGL) directly activates mature osteoclasts. *J Cell Biol* 1999; 145: 527-38.

Canalis E, McCarthy TL, Centrella M. The role of growth factors in skeletal remodeling. *Endocrinol Metab Clin North Am* 1989; 18: 903-18.

Canalis E, Economides AN, Gaggero E. Bone morphogenetic proteins, their antagonists, and the skeleton. *Endocr Rev* 2003; 24: 218-35.

Canfield AE, Doherty MJ, Ashton BA. Osteogenic potential of vascular pericytes. *Bone Engineering*. Toronto 2000.

---

Capiglioni RR. Evaluación de hueso trabecular por TAC y RMN. *Actualiz Osteología* 2006; 2(1): 9-11.

Casez JP, Muehlbauer RC, Lippuner K, Kelly T, Fleisch H, Jaeger P. Dual-energy X-ray absorptiometry for measuring total bone mineral content in the rat: study of accuracy and precision. *Bone Miner* 1994; 26(1): 61-8.

Castañeda S, Largo R, Calvo E, Rodríguez F, Marcos ME, Díaz Curiel et al. Bone mineral measurements of subchondral and trabecular bone in healthy and osteoporotic rabbits. *Skeletal Radiol* 2006; 35: 34-41.

Chacon GE, Stine EA, Larsen PE, Beck FM, McGlumphy EA. Effect of alendronate on endosseous implant integration: a in vivo study in rabbits. *J Oral Maxillofac Surg* 2006; 64(7): 1005-1009.

Civitelli R, Beyer EC, Warlow PM, Robertson AJ, Geist ST, Steinberg TH. Connexin 43 mediates direct intercellular communication in human osteoblastic cells networks. *J Clin Invest* 1993; 91: 1888-96.

Coelho PG, Granjeiro JM, Romanos GE, Suzuki M, Silva NR, Cardaropoli G, Thompson VP, Lemons JE. Basic research methods and current trends of dental implant surfaces. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 2009; 88(2): 579-96.

Cohick WS, Clemmons DR. The insulin-like growth factors. *Annu Rev Physiol* 1993; 55: 131-53.

Compston JE. Sex steroids and bone. *Physiol Rev* 2001; 81: 419-47.

Da Paz LH, de Falco V, Teng NC, dos Reis LM, Pereira RM, Jorgetti V. Effect of 17 beta-estradiol or alendronate in the bone densitometry, bone histomorphometry and bone metabolism of ovariectomized rats. *Braz J Med Biol Res* 2001; 34: 1015-1022.

---

Dao TTT, Anderson JD, Zarb GA. Is osteoporosis a risk factor for Osseointegration of dental implants? *Int J Oral Maxillofac Implants* 1993; 8: 137-144.

Davies JE, Hosseini MM. *Histodynamics of endosseous wound healing*. Bone Engineering. Toronto 2000.

Dayer R, Badoud I, Rizzoli R, Ammann P. Defective Implants Osseointegration Under Protein Undernutrition: Prevention by PTH or Pamidronate. *J Bone Miner Res* 2007; 22: 1526-1533.

Dempster DW, Birchman R, Xu R, Lindsay R, Shen V. Temporal changes in cancellous bone structure of rats immediately after ovariectomy. *Bone* 1995; 16(1): 157-61.

Dempster DW, Cosman F, Kurland ES, Zhou H, Nieves J, Woelfert L, Shane E, Plavetic K, Muller R, Bilezikian J, Lindsay R. Effects of daily treatment with parathyroid hormone on bone microarchitecture and turnover in patients with osteoporosis: a paired biopsy study. *J Bone Miner Res* 2001; 16(10): 1846-53.

Díaz -Curiel M, Turbí C, Rapado A, García J. Prevalencia de osteopenia y osteoporosis densitométrica en la población masculina española. *Rev Esp Enf Metab Óseas* 1997; 6: 129-32.

Duarte PM, de Vasconcelos Gurgel BC, Sallum AW, Filho GR, Sallum EA, Nociti FH Jr. Alendronate therapy may be effective in the prevention of bone loss around titanium implants inserted in estrogen-deficient rats. *J Periodontol* 2005; 76(1): 107-14.

Ducy P, Zhang R, Geoffroy V, Ridall AL, Karsenty G. *Osf2/Cbfa1*: a transcriptional activator of osteoblasts differentiation. *Cell* 1997; 89: 747-54.

---

Eberhardt AW, Yeager-Jones A, Blair HC. Regional trabecular bone matrix degeneration and osteocyte death in femora of glucocorticoid-treated rabbits. *Endocrinology* 2001; 142(3): 1333-40.

Ejiri S, Tanaka M, Watanabe N, Anwar RB, Yamashita E, Yamada K et al. Estrogen deficiency and its effect on the jaw bones. *J Bone Miner Metab* 2008; 26: 409-415.

Elders MJ. The increasing impact of arthritis on public health. *J Rheumatol* 2000; 60: 6-8.

Fernández-Tresguerres-Hernández-Gil I, Alobera Gracia MA, del Canto Pingarrón M, Blanco Jerez L. Physiological bases of bone regeneration I. Histology and physiology of bone tissue. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 2006; 11: E47-51.

Fernández-Tresguerres-Hernández-Gil I, Alobera-Gracia MA, del Canto-Pingarrón M, Blanco-Jerez L. Physiological bases of bone regeneration II. The remodeling process. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 2006; 11: E151-7

Friedenstein AJ. Precursor cells of mechanocytes. *Int Rev Cytol* 1976; 47: 327-59.

Frost HM, Jee WS. On the rat model of human osteopenias and osteoporoses. *Bone Miner* 1992; 18(3): 227-36.

Gala Paniagua J, Díaz-Curiel M, de la Piedra Gordo C, Castilla Reparaz C, Torralbo García M. Bone mass assessment in rats by dual energy X-ray absorptiometry. *Br J Radiol* 1998; 71(847): 754 -8.

Gehron RP, Fedarko NS, Hefferan TE, Bianco P, Vetter UK, Grzesik W et al. Structure and molecular regulation of bone matrix proteins. *J Bone Miner Res* 1993; 8: 483 -7.

---

Giro G, Goncalves D, Sakamura CE, Rodrigues Pereira RM, Marcantonio E Jr, Perez Orrico SR. Influence of estrogen deficiency and its treatment with alendronate and estrogen on bone density around osseointegrated implants: radiographic study female rats. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2008; 105: 162 -167.

Glüer CC, Blake G, Lu Y, Blunt BA, Jergas M, Genant HK. Accurate assessment of precision errors: how to measure the reproducibility of bone densitometry techniques. *Osteoporos Int* 1995; 5: 262-70.

Grardel B, Sutter B, Flautre B, Viguier E, Lavaste F, Hardouin P. Effects of glucocorticoids on skeletal growth in rabbits evaluated by dual-photon absorptiometry, microscopic connectivity and vertebral compressive strength. *Osteoporos Int* 1994; 4(4): 204 -10.

Grewal VS, Fayans EP. Bisphosphonate-associated osteonecrosis: a clinician's reference to patient management. *Today's FDA* 2008; 20(8): 38-46.

Grier SJ, Turner AS, Alvis MR. The use of dual-energy x-ray absorptiometry in animals. *Invest Radiol* 1996; 31(1): 50-62.

Griffin MG, Hopfer W. Dual-energy x-ray absorptiometry of the rat: accuracy, precision, and measurement of bone loss. *J Bone Miner Res* 1993; 8(7): 795-800.

Guidelines for preclinical and clinical evaluation of agents used in the prevention or treatment of postmenopausal osteoporosis. Division of Metabolism and Endocrine Drug Products. FDA. Washington DC.1994.

Hall J, Lausmaa J. Properties of a new porous oxide surface on titanium implants. *Appl Osseointegration Res* 2000; 1: 5-8.

---

Ham AW. Some histophysiological problems peculiar to calcified tissue. *J Bone Joint Surg Am* 1952; 34: 701.

Hara T, Hayashi K, Nakashima Y, Kanemaru T, Iwamoto Y. The effect of hydroxyapatite coating on the bonding of bone to titanium implants in the femora of ovariectomised rats. *J Bone Joint Surg Br* 1999; 81: 705-9.

Harada S, Rodan GA. Control of osteoblast function and regulation of bone mass. *Nature* 2003; 423: 349-55.

Harvey S, Hull KL. Growth hormone: A paracrine growth factor?. *Endocrine* 1998; 7: 267-79.

Heersche JNM. Mesenchymal stem cells and their involvement in bone remodeling, repair, and regeneration. *Aging, Osteoporosis, and Dental Implants*. Quintessence Publishing 2002.

Hill PA, Reynolds JJ, Meikle MC. Osteoblasts mediate insulin-like growth factor-I and -II stimulation of osteoclasts formation and function. *Endocrinology* 1995; 136: 124-31.

Hodsman AB, Bauer DC, Dempster DW, Dian L, Hanley DA, Harris ST, et al. Parathyroid hormone and teriparatide for the treatment of osteoporosis: a review of the evidence and suggested guidelines for its use. *Endocr Rev* 2005; 26: 688-703.

Hofbauer LC, Khosla S, Dunstan CR, Lacey DL, Spelsberg TC, Riggs BL. Estrogen stimulates gene expression and protein production of osteoprotegerin in human osteoblastic cells. *Endocrinology* 1999; 140: 4367-70.

Horner K, Devlin H, Alsop CW, Hodgkinson IM, Adams JE. Mandibular bone mineral density as a predictor of skeletal osteoporosis. *Br J Radiol* 1996; 69: 1019-1025.

---

Horowitz M. Matrix proteins versus cytokines in the regulation of osteoblasts function and bone formation. *Calcif Tissue Int* 2003; 72: 5-7.

Hoshi K, Komori T, Ozawa H. Morphological characterization of skeletal cells in Cbfa1-deficient mice. *Bone* 1999; 25: 639-51.

Hsu H, Lacey DL, Dunstan CR, Solovyev I, Colombero A, Timms E, Tan HL, Elliott G, Kelley MJ, Sarosi I, Wang L, Xia XZ, Elliott R, Chiu L, Black T, Scully S, Capparelli C, Morony S, Shimamoto G, Bass MB, Boyle WJ. Tumor necrosis factor receptor family member RANK mediates osteoclast differentiation and activation induced by osteoprotegerin ligand. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1999; 96(7): 3540-5.

Huang YH, Xiropaidis AV, Sorensen RG, Albandar JM, Hall J, Wikesjo UM. Bone formation at titanium porous oxide (TiUnite) oral implants in type IV bone. *Clin Oral Implants Res* 2005; 16(1): 105-11.

Ishizuya T, Yokose S, Hori M, Noda T, Suda T, Yoshiki S et al. Parathyroid hormone exerts disparate effects on osteoblast differentiation depending on exposure time in rat osteoblastic cells. *J Clin Invest* 1997; 99(12): 2961-70.

Jayo MJ, Rankin SE, Weaver DS, Carlson CS, Clarkson TB. Accuracy and precision of lumbar bone mineral content by dual-energy X-ray absorptiometry in live female monkeys. *Calcif Tissue Int* 1991; 49(6): 438-40.

Jiang GZ, Matsumoto H, Hori M, Gunji A, Hakozaiki K, Akimoto Y et al. Correlation among geometric, densitometric, and mechanical properties in mandible and femur of osteoporotic rats. *J Bone Miner Metab* 2008; 26: 130 -137.

Jilka RL, Weinstein RS, Bellido T, Roberson P, Parfitt AM, Manolagas SC. Increased bone formation by prevention of osteoblast apoptosis with parathyroid hormone. *J Clin Invest* 1999; 104: 439 - 446.

---

Jódar Gimeno E, Muñoz-Torres M, Escobar-Jiménez F, Quesada Charneco M, Luna del Castillo JD, Olea N. Identification of metabolic bone disease in patients with endogenous hypertiroidism: Role of biological markers of bone turn-over. *Calcif Tissue Int* 1997; 61: 370 - 6.

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

Kalu DN. The ovariectomized rat model of postmenopausal bone loss. *Bone Miner* 1991; 15(3): 175-91.

Kaplan HM, Timmons EH. *The Rabbit. A model for the principles of mammalian physiology and surgery.* New York: Academic Press Inc 1979; 127-9.

Karsdal MA, Martin TJ, Bollerslev J, Christiansen C, Henriksen K. Are Nonresorbing Osteoclasts Sources of Bone Anabolic Activity? *J Bone Miner Res* 2007; 22(4): 487-94.

Kasai T, Pogrel MA, Hossaini M. The prognosis for dental implants placed in patients taking oral bisphosphonates. *J Calif Dent Assoc* 2009; 37(1): 39-42.

Kawaguchi H, Pilbean CC, Harrison JR, Raisz LG. The role of prostaglandins in the regulation of bone metabolism. *Clin Orthop* 1995; 313: 36-46.

Kaye EK. Bone health and oral health. *J Am Dent Assoc* 2007; 138(5): 616-9.

Keller JC, Roehm M, Schneider GB. Osteoporosis-like bone conditions affect osseointegration of implants. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2004; 19: 687-94.

Khosla S. The OPG/RANKL/RANK System. *Endocrinology* 2001; 142: 5050 -5.

---

Kingsmill VJ, Boyde A. Mineralisation density and apparent density of bone in cranial and postcranial sites in the ageing human. *Osteoporos Int* 1999; 9: 260-268.

Knothe Tate ML, Adamson JR, Tami AE, Bauer TW. The osteocyte. *Int J Biochem Cell Biol* 2004; 36(1): 1-8.

Komori T, Yagi H, Nomura S, Yamaguchi A, Sasaki K, Deguchi K et al. Targeted disruption of *Cbfa1* results in a complete lack of bone formation owing to maturational arrest of osteoblasts. *Cell* 1997; 89: 755-64.

Kurth AHA, Müller S, Steinacker M, Schwarz M, Bauss F. The bisphosphonate ibandronate improves implant integration in osteopenic ovariectomized rats. *Bone* 2005; 37: 204-210.

Lacey DL, Timms E, Tan HL, Kelley MJ, Dunstan CR, Burgess TL et al. Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclasts differentiation and activation. *Cell* 1998; 93: 165-76.

Lang P, Steiger P, Faulkner K, Glüer C, Genant HK. Osteoporosis. Current techniques and recent developments in quantitative bone densitometry. *Radiol Clin North Am* 1991; 29(1): 49-76.

Lanyon L. Osteocytes, strain detection, bone remodeling and remodeling. *Calcified Tissue Int* 1993; 53: 102-7.

Lerouxel E, Liboubanb H, Moreau MF, Basle MF, Audran M, Chappard D. Mandibular bone loss in an animal model of male osteoporosis (orchidectomized rat): a radiographic and densitometric study. *Osteoporos Int* 2004; 15: 814-819.

Lind M, Deleuran B, Thestrup-Pedersen K, Soballe K, Eriksen EF, Bunger C. Chemotaxis of human osteoblasts. Effects of osteotropic growth factors. *APMIS* 1995; 103: 140-6.

---

Linder L, Carlsson A, Marsal L, Bjursten LM, Branemark PI. Clinical aspects of osseointegration in joint replacement. A histological study of titanium implants. *J Bone Joint Surg, Br* 1988; 70: 550-5.

Lindsay R, Cosman F, Zhou H, Bostrom MP, Shen VW, Cruz JD et al. A novel tetracycline labeling schedule for longitudinal evaluation of the short-term effects of anabolic therapy with a single iliac crest bone biopsy: early actions of teriparatide. *J Bone Miner Res* 2006; 21: 366-373.

Locklin RM, Khosla S, Turner RT, Riggs BL. Mediators of the biphasic responses of bone to intermittent and continuously administered parathyroid hormone. *J Cell Biochem* 2003; 89: 180-90.

Lopes FF, Loureiro FH, Pereira Ade F, Pereira AL, Alves CM. Association between osteoporosis and periodontal disease. *Rev Bras Ginecol Obstet* 2008; 30(8): 379-83.

Lugero GG de Falco Caparbo V, Guzzo ML, Konig B Jr, Jorgetti V. Histomorfometric evaluation of titanium implants in osteoporotic rabbits. *Implant Dent* 2000; 9: 303-309.

Lukert BP, Kream BE. Clinical and basic aspects of glucocorticoid action in bone. *Principles of Bone Biology*. San Diego, California, 1996; Academic Press.

Mair B, Tangl S, Feierfeil J, Skiba D, Watzek G, Gruber R. Age-related efficacy of parathyroid hormone on osseointegration in the rats. *Clin Oral Impl Res* 2009; 20: 400-405.

Manolagas SC. Birth and death of bone cells: Basic regulatory mechanisms and implications for the pathogenesis and treatment of osteoporosis. *Endocr Rev* 2000; 21: 115-37.

---

Marie PJ. Fibroblast growth factor signaling controlling osteoblast differentiation. *Gene*. 2003; 316: 23-32.

Marx RE, Sawatari Y, Fortin M, Broumand V. Bisphosphonate-Induced Exposed Bone (Osteonecrosis/Osteopetrosis) of the Jaws: Risk Factors, Recognition, Prevention, and Treatment. *J Oral Maxillofac Surg* 2005; 63: 1567–1575.

Mashiba T, Burr DB, Turner CH, Sato M, Cain RL, Hock JM. Effects of human parathyroid hormone (1-34), LY333334, on bone mass, remodeling, and mechanical properties of cortical bone during the first remodeling cycle in rabbits. *Bone* 2001; 28: 538-547.

Masi L, Brandi ML. Physiopathological basis of bone turnover. *Q J Nucl Med* 2001; 45: 2-6.

Mavropoulos A, Rizzoli R, Ammann P. Different responsiveness of alveolar and tibial bone to bone loss stimuli. *J Bone Miner Res* 2007; 22: 403-410.

Meunier PJ, Roux C, Seeman E, Ortolani S, Badurski JE, Spector TD, Cannata J, Balogh A, Lemmel EM, Pors-Nielsen S, Rizzoli R, Genant HK, Reginster JY. The effects of strontium ranelate on the risk of vertebral fracture in women with postmenopausal osteoporosis. *N Engl J Med* 2004; 305(5): 459-68.

Miller SC, Hunziker J, Mecham M, Wronski TJ. Intermittent parathyroid hormone administration stimulates bone formation in the mandibles of age ovariectomized rats. *J Dent Res* 1997; 76(8): 1471-1476.

Mish CE. *Protesis dental sobre implantes*. Madrid, 2007; Elsevier.

Mohan S, Baylink DJ. Bone growth factors. *Clin Orthop* 1991; 263: 30-48.

---

Monier-Faugere M-C, Geng Z, Paschalis EP, Qi Q, Arnala I, Bauss F. Intermittent and continuous administration of the bisphosphonate ibandronate in ovariectomized beagle dogs: effects on bone morphometry and mineral properties. *J Bone Miner Res* 1999; 14: 1768-78.

Moreno-Torres R, Navarro M, Ruiz-Lopez MD, Artacho R, Lopez C. Comparison of wet and dry mineralisation procedures for determining calcium and phosphorus in cow's milk. *Austral J Dairy Techno* 2000; 55: 23-27.

Morey ER, Baylink JJ. Inhibition of bone formation during space flight. *Science* 1978; 19: 172-6.

Mori H, Manabe M, Kurachi Y, Nagumo M. Osseointegration of dental implants in rabbit bone with low mineral density. *J Oral Maxillofac Surg* 1997; 55(4): 351-61.

Motohashi M, Shirota T, Tokugawa Y, Ohno K, Michi K, Yamaguchi A. Bone reactions around hydroxyapatite-coated implants in ovariectomized rats. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endo* 1999; 87: 145– 52.

Mulder L, van Groningen LB, Potgieser YA, Koolstra JH, van Eijden TM. Regional differences in architecture and mineralization of developing mandibular bone. *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol* 2006; 288: 954-61.

Mundy GR. Cytokines and growth factors in the regulation of bone remodeling. *J Bone Miner Res* 1993; 8: 505-10.

Narai S, Nagahata S. Effects of alendronate on the removal torque of implants in rats with induced osteoporosis. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2003; 18: 218-223.

---

Nash TJ, Howlett CR, Martin C, Steele J, Johnson KA, Hicklin DJ. Effects of platelet-derived growth factor on tibial osteotomies in rabbits. *Bone* 1994; 15: 203-8.

Nerr RM. Effects of parathyroid hormone (1-34) on fractures and bone mineral density in postmenopausal women with osteoporosis. *N Engl J Med* 2001; 344(19): 1434 – 41.

Newman E, Turner AS, Wark JD. The potential of sheep for the study of osteopenia: current status and comparison with other animal models. *Bone* 1995; 16(4): 277S-284S.

Nicopoulou-Karayianni K, Tzoutzoukos P, Mitsea A, Karayiannis A, Tsiklakis K, Jacobs R, Lindh C, van der Stelt P, Allen P, Graham J, Horner K, Devlin H, Pavitt S, Yuan J. Tooth loss and osteoporosis: the OSTEODENT Study. *J Clin Periodontol* 2009; 36(3): 190 - 7.

NIH. Consensus development panel on osteoporosis prevention. *JAMA* 2001; 285: 785-95.

Offenbacher S, Heasman PA, Collins JG. Modulation of host PGE2 secretion as a determinant of periodontal disease expression. *J Periodontol* 1993; 64: 432-44.

Ohkawa Y, Tokunaga K, Endo N. Intermittent administration of human parathyroid hormone (1-34) increases new bone formation on the interface of hydroxyapatite-coated titanium rods implanted into ovariectomized rat femora. *J Orthop Sci* 2008; 13: 533-542.

Otomo-Corgel J. Implants and oral bisphosphonates: risk business? *J Periodontol* 2007; 78(3): 373-6.

---

Ozawa S, Owaga T, Iida K, Sukotjo C, Hasegawa H, Nishimura R.D, Nishimura I. Ovariectomy hinders the early stage of bone-implant integration: histomorphometric, biomechanical, and molecular analyses. *Bone* 2002; 30(1): 137-143.

Pan J, Shirota T, Ohno K, Michi K. Effects of Ovariectomy on Bone Remodeling Adjacent to Hydroxyapatite-Coated Implants in the Tibia Of Mature Rats. *J Oral Maxillofac Surg* 2000; 58: 877-882.

Pocock NA, Eisman JA, Hopper JL, Yeates MG, Sambrook PN, Eberly S. Genetic determinants of bone mass in adults. *J Clin Invest* 1987; 80: 706-10.

Ponte Fernandez N, Estefanía Fresco R, Aguirre-Urizar JM. Bisfosfonatos y patología Oral I. Aspectos generales y preventivos. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 2006; 11(6): 456-61.

Prieto S. Control del metabolismo del calcio, fósforo y magnesio. *Fisiología Humana*, 2ª edición. Madrid, 1999; McGraw-Hill-Interamericana.

Raisz LG. Bone cell biology: New approaches and unanswered questions. *J Bone Miner Res* 1993; 8: 457-65.

Roodman GD, Kurihara N, Ohsaki Y, Kukita A, Hosking D, Demulder A. Interleukin-6: A potential autocrine/paracrine agent in Paget's disease of bone. *J Clin Invest* 1992; 89: 46-52.

Rozenberg S, Vandromme J, Neve J, Aguilera A, Muregancuro A, Peretz A, Kinthaert J, Ham H. Precision and accuracy of in vivo bone mineral measurement in rats using dual-energy X-ray absorptiometry. *Osteoporos Int* 1995; 5(1): 47-53.

---

Russell RG, Xia Z, Dunford JE, Oppermann U, Kwaasi A, Hulley PA, Kavanagh KL, Triffitt JT, Lundy MW, Phipps RJ, Barnett BL, Coxon FP, Rogers MJ, Watts NB, Ebertino FH. Bisphosphonates: an update on mechanisms of action and how these relate to clinical efficacy. *An N Y Acad Sci* 1997; 1117: 209-57.

Sartoris DJ, Resnick D. Current and innovative methods for noninvasive bone densitometry. *Radiol Clin North Am* 1990; 28(2): 257-78.

Schonau E, Rauch F. Markers of bone and collagen metabolism. Problems and perspectives in Pediatrics. *Horm Res* 1997; 48: 50-9.

Schüpbach P, Glauser R, Rocci A, Matignoni M, Sennerby L, Lundgren AK, Gottlow J. The human bone- oxidized titanium implant interface: a microscopic, scanning electron microscopic, back-scatter scanning electron microscopic, and energy-dispersive X-ray study of clinically retrieved implants. *Clin Implant Dent Relat Res* 2005; 7: 36-43.

Seebach C, Skripitz R, Andreassen TT, Aspenberg P. Intermittent parathyroid hormone (1-34) enhances mechanical strength and density of new bone after distraction osteogenesis in rats. *J Orthop Res* 2004; 22: 472-478.

Serrano S, Mariñoso ML. Bases histológicas de la histomorfometría ósea. 1990; Barcelona.

Shipp CC, Berger PS, Deehr MS, Dawson-Hughes B. Precision of dual-photon absorptiometry. *Calcif Tissue Int* 1988; 42(5): 287-92.

Shirota T, Tashiro M, Ohno K, Yamaguchi A. Effect of intermittent parathyroid hormone(1-34) treatment on the bone response after placement of titanium implants into the tibia of ovariectomized rats. *J oral Maxillofac Surg* 2003; 61: 471-480.

Sidiropoulou-Chatzigiannis S, Kourtidou M, Tsalikis L. The effect of osteoporosis on periodontal status, alveolar bone and orthodontic tooth movement. A literature review J Int Acad Periodontol 2007; 9(3): 77-84.

Simonet WS, Lacey DL, Dunstan CR, Kelley M, Chang M-S, Luethy R et al. Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density. Cell 1997; 89: 309-19.

Skripitz R, Böhling S, Rütther W, Aspenberg P. Stimulation of implant fixation by parathyroid hormone (1-34) a histomorphometric comparison of PMMA cement and stainless steel. Journal of Orthopaedic Research 2005; 23: 1266-1270.

Skripitz R, Aspenberg P. Implant fixation enhanced by intermittent treatment with parathyroid hormone. J Bone Joint Surg Br 2001; 83(3): B437-40.

Smolen JS. Autoantibodies in rheumatoid arthritis. Manual of biological markers of disease. Dordrecht (The Netherlands),1996; Kluwer Academic Publishers.

Southard TE, Southard KA, Krizan KE, Hillis SL, Haller JW, Keller J, Vannier MW. Mandibular bone density and fractal dimension in rabbits with induced osteoporosis. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 2000; 89(2): 244-9.

Starck WJ, Epker BN. Failure of osseointegrated dental implants after diphosphonate therapy for Osteoporosis: A case report. Int J Oral Maxillofac Implants 1995; 10: 74-78.

Streckfus CF, Johnson RB, Nick T, Tsao A, Tucci M. Comparisi3n of alveolar bone loss, alveolar bone density, salivary and gingival crevicular fluid IL-6 concentrations in healthy premenopausal women on estrogen therapy. J Gerontology A Biol Med Sci 1997; 52: M343-M351.

---

Swoboda JR, Kiyak HA, Darveau R, Persson GR. Correlates of periodontal decline and biologic markers in older adults. *J Periodontol* 2008; 79(10): 1920-6.

Taguchi A, Tanimoto K, Suei Y, Ohama K, Wada T. Relationship between the mandibular and lumbar vertebral bone mineral density at different postmenopausal stages. *Dentomaxillofac Radiol* 1996; 25: 130-135.

Tanaka M, Ejiri S, Toyooka E, Kohno S, Ozawa H. Effects of ovariectomy on trabecular structures of rat alveolar bone. *J Periodontal Res* 2002; 37(2): 161-5.

Tezal M, Wactwski-Wende J, Grossi SG, Dmochowski J, Genco RJ. Periodontal disease and the incidence of tooth loss in postmenopausal women *J Periodontol* 2005; 76 1123-1128.

Tokugawa Y, Shirota T, Ohno K, Yamaguchi A. Effects of bisphosphonate on bone reaction after placement of titanium implants in tibiae of ovariectomized rats. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2003; 18(1): 66-74.

Troen BR. Molecular mechanisms underlying osteoclast formation and activation. *Exp Gerontol* 2003; 38: 606-14.

Trueta J. The role of blood vessels in osteogenesis. *J Bone Joint Surg Br* 1963; 45: 402.

Tsolaki IN, Madianos PN, Vrotsos JA. Outcomes of Dental Implants in Osteoporotic Patients. A Literature Review. *J Prosthodont* 2009 [Epub ahead of print]

Turner AS, Mallinckrodt CH, Alvis MR, Bryant HU. Dual-energy X-ray absorptiometry in sheep: experiences with in vivo and ex vivo studies. *Bone* 1995; 17(4): 381S-387S.

---

Turner AS. Animal models of osteoporosis-necessity and limitations. *Eur Cell Mater* 2001; 1: 66-81.

Turner RT, Maran A, Lotinun S, Hefferan T, Evans GL, Zhang M. Animal models for osteoporosis. *Rev Endocr Metab Disord* 2001; 2: 117-27.

Vázquez Gámez MA, Montoya MJ, Gómez de Tejada MJ et al. Niveles séricos de osteoprotegerina en mujeres sanas y osteoporóticas. *REEMO* 2003; 12(3): 63-7.

Viera-Negrón YE, Ruan WH, Winger JN, Hou X, Sharawy MM, Borke JL. Effect of ovariectomy and alendronate on implant osseointegration in rat maxillary bone. *J Oral Implantol* 2008; 34(2): 76-82.

Wactawski-Wende J, Hausmann E, Hovey K, Trevisan M, Grossi S, Genco RJ. The association between osteoporosis and alveolar crestal height in postmenopausal women. *J Periodontol* 2005; 76(11Suppl): 2116-24.

Walsh LJ, Wong CA, Pringle M, Tattersfield AE. Use of oral corticosteroids in the community and the prevention of secondary osteoporosis: a cross-sectional study. *BMJ* 1996; 313: 344 - 6.

Whyte MP, Wenkert D, Clements KL, McAlister WH, Mumm S. "Bisphosphonate-induced osteopetrosis. *N Engl J Med* 2003; 349(5): 457-63.

Wowern Nv. General and oral aspects of osteoporosis:a review. *Clin Oral Invest* 2001; 5: 71-82.

Wronski TJ, Lowry PL, Walsh CC, Ignaszewski LA. Skeletal alterations in ovariectomized rats. *Calcif Tissue Int* 1985; 37(3): 324-8.

Wronski TJ, Walsh CC, Ignaszewski LA. Histologic evidence for osteopenia and increased bone turnover in ovariectomized rats. *Bone* 1986; 7(2): 119-23.

---

Xiropaidis AV, Qahash M, Lim WH, Shanaman RH, Rohrer MD, Wikesjo UM, Hall J. Bone-implant contact at calcium phosphate-coated and porous titanium oxide (TiUnite) modified oral implants. *Clin Oral Implants Res* 2005; 16(5): 523-9.

Yamaguchi A, Komori T, Suda T. Regulation of osteoblast differentiation mediated by Bone Morphogenetic Proteins, Hedgehogs, and Cbfa1. *Endocr Rev* 2000; 21: 393-411.

Young MF. Bone matrix proteins: more than markers. *Calcif Tissue Int* 2003; 72: 2-4.

---

## Aportaciones científicas

### **Mandibular bone mineral density in an experimental model of osteoporosis in rabbits**

M Bellido, MI Almagro, S Castañeda, R Largo, C Gómez-Vaquero, R Cortez, G Herrero-Beaumont.

Osteoporos Int 2008; 19 (Suppl 1): S105-S106.

Presentado en el 8th European Congress on Clinical and Economic Aspects of Osteoporosis and Osteoarthritis (ECCEO), 9-12 April 2008, Istanbul, Turkey

### **Mandibular bone mineral density in an experimental model of osteoporosis in rabbits**

M Bellido, S Castañeda, MI Almagro, R Largo, C Gómez-Vaquero, R Cortez, G Herrero-Beaumont.

Calcified Tissue Int 2008; 82 (Suppl 1): S61.

Presentado en el 35th European Symposium Calcified Tissues. Barcelona, May 2008.

### **Parathormone, but not alendronate, improves osseointegration of dental titanium implants into the tibia in a rabbit model of ovariectomy plus glucocorticoid-induced osteoporosis. (A09002300)**

MI Almagro, M Bellido, J A Román-Blas, S Castañeda, R Largo, R Cortez, G Herrero-Beaumont.

Presentado en el 31th Annual Meeting of the American Society Bone Mineral Research (ASBMR). Denver, CO, USA, 11-15 September, 2009.

---

**PTH mejora la osteointegración de los implantes de titanio en la tibia de conejos con osteoporosis (OP) inducida mediante ovariectomía y administración de glucocorticoides.**

MI Almagro, M Bellido, J A Román-Blas, S Castañeda, R Largo, R Cortez, G Herrero-Beaumont.

Presentado en el XIV Congreso SEIOMM 2009, Santander, 27-30 de octubre, 2009.

**Parathormone, but not alendronate, improves osseointegration of dental titanium implants into the tibia in a rabbit model of ovariectomy plus glucocorticoid-induced osteoporosis.**

MI Almagro, M Bellido, J A Román-Blas, S Castañeda, R Largo, R Cortez, G Herrero-Beaumont.

Invitación para el IOF WCO-ECCEO10 Congress en Florencia (Italia), 05-08 de Mayo 2010.

**Intermittent PTH (1-34), but not alendronate, improves oxidized titanium implant osseointegration in experimental osteoporosis.**

J A Román-Blas, MI Almagro, M Bellido, S Castañeda, R Largo, Schüpbach P, Cortez R, G Herrero-Beaumont.

En la actualidad (Febrero 2010), artículo en revisión para Journal of Bone and Mineral Research.

**Anexo**

**A. Resultados detallados histomorfometría**

Grupo	N° conejo	Lado analizado	Area de contacto global				Area entre las 2 primeras espiras				Area fuera de las 2 primeras espiras				Area entre las 4 espiras siguientes				Area fuera de las 4 espiras siguientes				
			Contacto/ μm	%	Media / conejo	Media / grupo	Desviación estandar	%	Media / conejo	Media / grupo	Desviación estandar	%	Media / conejo	Media / grupo	Desviación estandar	%	Media / conejo	Media / grupo	Desviación estandar	%	Media / conejo	Media / grupo	Desviación estandar
OP + PTH	RC-01	Izq.	1305,4	41,0	39,5	40,3	10,3	58,0	45,6	63,5	11,7	46,4	50,3	72,2	13,2	25,6	20,3	28,7	9,0	0,2	4,0	19,0	7,4
		Dcha.	1290,6	37,9				33,2				54,1				15,1				7,8			
	RC-04	Izq.	231,82	39,7	46,2			75,1	62,7			86,5	61,4			52,1	29,5			48,8	26,9		
		Dcha.	1330,15	52,7				50,4				36,2				6,8				4,9			
	RC-05	Izq.	1712,3	40,4	54,5			85,6	86,3			84,0	88,5			13,6	35,1			6,3	22,7		
		Dcha.	1852,3	68,6				87,0				93,0				56,7				39,0			
	RC-26	Izq.	n.a	n.a.	27,9			n.a.	66,2			n.a.	82,4			n.a.	22,7			n.a.	19,3		
		Dcha.	815,4	27,9				66,2				82,4				22,7				19,3			
RC-27	Izq.	800,66	26,7	26,4	51,2	60,3	86,7	85,6	15,1	17,8	10,6	16,3											
	Dcha.	785,26	26,2		69,4		84,5		20,5		21,9												
RC-28	Izq.	1242,12	41,4	33,9	71,8	70,1	71,6	71,8	7,8	28,3	0,4	19,5											
	Dcha.	794,35	26,5		68,4		71,9		48,9		38,6												
RC-32	Izq.	1100,17	36,7	43,2	54,8	60,6	65,0	64,0	21,8	30,0	11,0	15,8											
	Dcha.	1494	49,8		66,4		63,0		38,1		20,6												
RC-34	Izq.	1377,85	45,9	50,9	68,0	56,3	73,7	73,7	28,7	46,0	14,6	27,4											
	Dcha.	1675,92	55,9		44,6		73,6		63,3		40,1												
OP + ALN+	RC-07	Izq.	191,35	6,4	11,4	17,7	4,8	74,1	81,4	67,4	8,3	64,8	77,1	80,0	10,9	25,3	22,1	22,6	6,6	24,5	21,3	20,6	7,8
		Dcha.	493,35	16,5				88,8				89,5				19,0				18,1			
	RC-09	Izq.	884	28,2	19,3			76,2	67,5			83,4	84,6			39,0	22,2			33,2	20,4		
		Dcha.	313,03	10,4				58,7				85,8				5,4				7,5			
	RC-21	Izq.	754,67	25,1	20,5			72,1	61,4			87,7	79,1			29,3	24,8			29,6	28,9		
		Dcha.	473,18	15,8				50,7				70,4				20,4				28,2			
RC-35	Izq.	668	22,9	16,4	65,9	69,2	90,0	90,4	19,6	14,6	17,3	10,8											
	Dcha.	294,33	9,8		72,5		90,7		9,7		4,2												
RC-36	Izq.	461,7	15,2	24,8	69,2	68,0	84,5	88,7	21,4	33,9	16,2	29,4											
	Dcha.	1031	34,4		66,8		92,9		46,4		42,5												
RC-40	Izq.	574,82	19,2	14,0	66,0	57,1	82,6	60,4	33,7	18,0	25,7	13,0											
	Dcha.	266,24	8,9		48,3		38,2		2,3		0,2												
OP + ALN-	RC-18	Izq.	1325,7	42,3	34,0	21,3	11,0	73,8	64,9	66,4	5,7	86,6	74,1	79,1	4,9	37,1	28,8	23,2	14,8	39,5	39,3	23,5	17,6
		Dcha.	771,6	25,7				56,0				61,6				20,5				39,1			
	RC-19	Izq.	775,47	25,9	17,2			73,7	75,0			81,3	81,9			6,1	17,5			0,0	12,6		
		Dcha.	258,28	8,6				76,4				82,5				29,0				25,2			
	RC-20	Izq.	126	4,2	5,6			68,4	61,0			87,6	74,3			0,9	4,4			0,1	6,1		
Dcha.		211	7,0	53,5		60,9	7,8	12,0															
RC-41	Izq.	831,7	27,7	28,8	69,2	69,1	89,2	85,3	19,1	44,4	15,1	45,4											
	Dcha.	871,8	29,8		69,0		81,3		69,6		75,7												
RC-42	Izq.	505,2	16,8	20,8	69,1	62,1	83,8	80,2	5,8	20,8	0,7	14,1											
	Dcha.	741,3	24,7		55,2		76,6		35,7		27,5												

Grupo	N° conejo	Lado analizado	Area de contacto global				Area entre las 2 primeras espiras				Area fuera de las 2 primeras espiras				Area entre las 4 espiras siguientes				Area fuera de las 4 espiras siguientes				
			Contacto/ μm	%	Media / conejo	Media / grupo	Desviación estandar	%	Media / conejo	Media / grupo	Desviación estandar	%	Media / conejo	Media / grupo	Desviación estandar	%	Media / conejo	Media / grupo	Desviación estandar	%	Media / conejo	Media / grupo	Desviación estandar
OP + Placebo	RC-11	Izq.	411,9	13,7	8,5	13,2	4,4	69,0	72,1	61,8	13,9	87,2	81,8	80,0	8,0	20,6	26,4	21,3	6,2	13,4	17,3	13,6	4,7
		Dcha.	97,4	3,2				75,3				76,5				32,2				21,1			
	RC-15	Izq.	588,7	19,6	15,9			42,5	57,3			86,3	89,3			15,3	23,7			5,6	12,9		
		Dcha.	364,4	12,1				72,1				92,2				32,1				20,2			
	RC-44	Izq.	271,67	9,1	8,9			48,5	61,2			64,5	77,4			2,1	21,5			0,0	18,5		
		Dcha.	262,82	8,8				73,9				90,2				40,9				37,0			
	RC-45	Izq.	n.a	n.a	n.a			n.a				n.a				n.a				n.a			
		Dcha.	n.a	n.a				n.a				n.a				n.a				n.a			
RC-46	Izq.	426,89	14,2	18,7	49,8	55,8	55,7	64,7	5,8	27,1	0,1	17,5											
	Dcha.	694,88	23,2		61,8		73,6		48,3		34,9												
RC-47	Izq.	623,1	20,8	18,2	76,3	75,5	87,7	87,0	25,1	25,2	14,9	13,1											
	Dcha.	470,32	15,7		74,8		86,3		25,3		11,3												
RC-48	Izq.	n.a	n.a	12,3		36,2		80,6		11,6		5,5											
	Dcha.	369,9	12,3		72,3		80,6		23,2		5,5												
RC-49	Izq.	0	0,0	10,0	77,9	74,4	78,4	79,0	20,0	13,6	15,7	10,3											
	Dcha.	600,82	20,0		70,8		79,6		7,1		4,8												
Control	RC-23	Izq.	n.a	n.a	13,6	7,9	n.a		66,5	6,9	n.a		77,7	5,5	n.a		16,8	11,1	n.a		12,1	11,5	
		Dcha.	n.a	n.a			n.a				n.a				n.a				n.a				
	RC-24	Izq.	852,73	28,4			20,4	66,0			61,6	74,3			75,0	17,3			10,5	3,9			2,1
		Dcha.	375,9	12,5				57,3				75,7				3,7				0,3			
	RC-25	Izq.	0	0,0			10,9	72,3			62,2	75,5			71,0	35,6			19,9	40,3			20,5
		Dcha.	654,27	21,8				52,1				66,5				4,1				0,7			
	RC-50	Izq.	409,15	13,6			18,9	73,4			73,7	83,1			81,4	2,2			3,2	0,6			0,8
		Dcha.	723,73	24,1				74,0				79,6				4,1				1,0			
RC-51	Izq.	55,77	1,9	3,7	43,0	57,4	60,7	73,3	60,1	36,2	44,9	29,1											
	Dcha.	168,59	5,6		71,8		85,9		12,3		13,3												
RC-52	Izq.	689,4	22,9	22,1	68,5	73,4	69,9	79,8	3,8	13,9	0,0	4,2											
	Dcha.	638,2	21,3		78,3		89,6		24,1		8,3												
RC-53	Izq.	90,57	3,0	5,7	68,3	70,4	81,1	85,5	13,1	17,5	19,8	15,7											
	Dcha.	249,41	8,3		72,6		89,8		21,9		11,5												
RC-54	Izq.	n.n	n.a	n.a	n.a		n.a		n.a		n.a												
	Dcha.	n.a	n.a		n.a		n.a		n.a		n.a												

B. Poster presentado en el congreso ASBMR en Denver (CO, USA) en Septiembre 2009

**PTH, BUT NO ALENDRONATE, IMPROVES OSSEOINTEGRATION OF DENTAL TITANIUM IMPLANTS INTO THE TIBIA OF A RABBIT MODEL OF OVARIECTOMY PLUS GLUCORTICOID-INDUCED OSTEOPOROSIS**

M Isabel Almagro<sup>1,3</sup>, Miriam Bellido<sup>1</sup>, Jorge A Román-Bias<sup>1</sup>, Santos Castañeda<sup>2</sup>, Raquel Largo<sup>1</sup>, Raúl Cortez<sup>3</sup>, Gabriel Herrero-Beaumont<sup>1</sup>

1. Joint and Bone Research Unit. Fundación Jiménez Díaz, Universidad Autónoma, Madrid, Spain.
2. Department of Rheumatology. Hospital de la Princesa, Universidad Autónoma, Madrid, Spain.
3. Dentistry and Oral Surgery Department. Fundación Jiménez Díaz, Universidad Autónoma, Madrid, Spain.



**BACKGROUND**

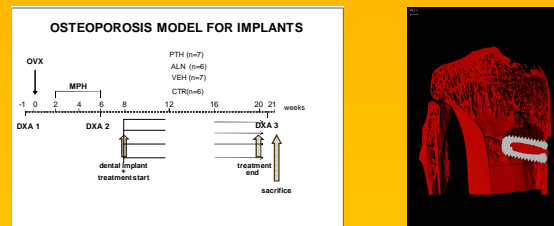
Decrease of bone mass impairs titanium implant osseointegration in animal models and in humans. Preliminary studies carried out in our Laboratory showed that bone mineral density (BMD) in global knee and knee subchondral bone correlated to perialveolar mandibular BMD in our experimental model of ovariectomy (OVX) plus glucocorticoid-induced osteoporosis (OP) in the rabbit. Whether a stimulator of bone formation or an inhibitor of bone resorption could improve implant osseointegration is not fully discerned.

**AIMS**

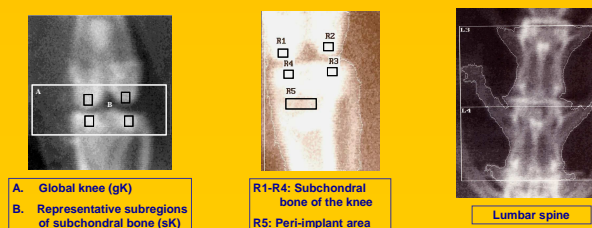
To evaluate the effects of intermittent administration of parathyroid hormone [PTH] (1-34) or continuous alendronate (ALN) on bone response around titanium screws implanted into the tibial proximal metaphysis in a rabbit model of OP.

**METHODS**

**1. EXPERIMENTAL MODEL:** Twenty-six 8 month (3.8–4.8 kg body weight), skeletally mature female NZ rabbits were divided into 4 groups. The first group (Control group; n=6) was sham-operated; the second group was OVX, later treated with intramuscular injections of methylprednisolone hemisuccinate (MPH, 1 mg/kg/day for 4 consecutive weeks) and further injected with saline solution (OP+VEH group; n=7); the third group (OP+ALN group; n=6) was subcutaneously injected with sodium alendronate 0.6 mg/kg/week for 12 weeks and finally, the fourth group (OP+PTH group; n=7) received subcutaneous injections of PTH (Eli-Lilly®) 40 µg/day, 5 days weekly, for 12 weeks, since the eighth week until the twentieth week after OVX. Brånemark System® with TiUnite™ Surface Dental Implants (Nobel Biocare AB, Göteborg, Sweden) were placed in the proximal metaphysis of the tibia in all the animals 8 weeks after OVX. The rabbits were sacrificed 22 weeks after ovariectomy.



**2. BONE MINERAL DENSITY (BMD):** BMD were assessed by dual energy X-ray absorptiometry (DXA) (Hologic® QDR-1000) at peri-implant area, lumbar spine, knee subchondral bone and global knee at baseline, 6 and 22 weeks after OVX.

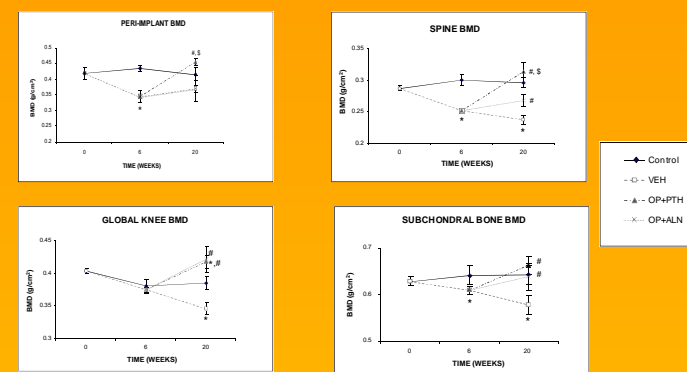


**3. HISTOMORPHOMETRY:** Undecalcified sections were prepared and evaluated by light microscopy. Histomorphometric measurements were obtained using a computer-based image analyzer to quantify the unit bone mass around the implant and the rate of implant-bone contact.

**4. STATISTICAL ANALYSIS:**

**RESULTS**

Figure 1. BMD at the different regions analyzed in the 4 groups at baseline, wk 6 and final time.



BMD measurements are expressed as the mean±SEM. \* p<0.05 vs. controls; # p<0.05 vs. OP+VEH; & p<0.05 vs. OP+PTH.

Figure 2. Effects of alendronate or PTH administration on percentage of bone-to-implant contact (BIC) around the implants in the proximal metaphysis of tibia bone of control and VEH rabbits at week 12 after implant insertion.

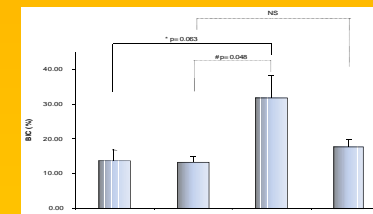
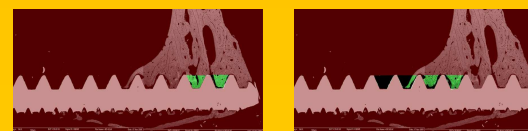


Figure 3. Microradiographic images of the trabecular bone around the titanium implants at week 12 after surgery in a rabbit treated with PTH (1-34).



**CONCLUSIONS**

Our findings suggest that intermittent administration of parathyroid hormone (1-34) improves dental implant osseointegration in ovariectomy plus glucocorticoid-induced osteoporotic bone in the rabbit, by stimulating formation of newly generated trabeculae around dental implants, which it would not occur with alendronate treatment weekly administered.