

# Alendronato administrado en el foco de fractura. Estudio experimental en conejos

JAVIER E. NUÑEZ, LUIS S. RUCHELLI, CESAR BARTOLOMEO, JORGE O. FLORES,  
SANTIAGO L. IGLESIAS, CHRISTIAN A. ALLENDE NORES

*Instituto Allende de Cirugía Reconstructiva, Sanatorio Allende, Córdoba*

Recibido el 13-2-2017. Aceptado luego de la evaluación el 7-7-2017 • Dr. JAVIER E. NUÑEZ • javi\_nu286@hotmail.com

## RESUMEN

**Introducción:** El objetivo de este estudio experimental fue evaluar el resultado radiológico e histológico del empleo de alendronato colocado localmente en el foco de fracturas de fémur en conejos.

**Materiales y Métodos:** Se utilizaron 30 conejos a los cuales se les fracturó el fémur derecho y se los dividió en tres grupos de 10 animales cada uno. A los conejos del grupo 1 se les colocó una solución con alendronato en el foco de fractura; los del grupo 2 fueron sometidos al mismo procedimiento a los siete días de la fractura y el grupo 3 era de control. Se realizó la evaluación radiográfica en el momento de la fractura y a los 42 días del procedimiento. Se evaluaron las características del callo óseo mediante anatomía patológica, radiología y tomografía computarizada.

**Resultados:** Se evaluaron 24 conejos (2 conejos del grupo 2 y 4 del grupo 3 murieron). El análisis histológico reveló moderada formación ósea en los tres grupos, sin diferencias estadísticamente significativas ( $p = 0,8336$ ). Según los resultados de los estudios por imágenes, no existieron diferencias estadísticamente significativas en el tamaño del callo óseo entre los grupos para los dos estudios (radiografía:  $p = 0,777$  y tomografía:  $p = 0,349$ ).

**Conclusión:** El alendronato colocado localmente en el foco de fractura, en la etapa aguda y luego de una semana, no alteró, de manera estadísticamente significativa, el proceso normal de consolidación, determinado por anatomía patológica y radiología, a las seis semanas de la fractura de fémur en conejos.

**Palabras clave:** Alendronato; consolidación; fractura.

**Nivel de Evidencia:** II

## ALENDRONATE ADMINISTERED AT THE FRACTURE SITE. EXPERIMENTAL STUDY IN RABBITS

## ABSTRACT

**Introduction:** The aim of this experimental study was to evaluate the radiologic and histological results of the use of alendronate administered locally at the fractures site in rabbits.

**Methods:** The fractured right femur of 30 rabbits was used for evaluation. The animals were distributed in three groups of 10 rabbits each. A solution with alendronate was placed at the fracture site in group 1; the same procedure was performed 7 days after the fracture in group 2, and group 3 functioned as control. Radiographic evaluation was performed at the time of the fracture and at day 42. Radiological, PA and CT-scan evaluations of bone callus characteristics in each rabbit were performed.

Conflicto de intereses: Los autores no declaran conflictos de intereses.

**Results:** Twenty-four rabbits were evaluated (2 rabbits in group 2 and 4 in group 3 died). Histological evaluation evidenced moderate bone formation in the three groups without statistically significant differences ( $p=0.8336$ ). Concerning imaging studies, there were no statistically significant differences in the size of bone callus among groups for both studies (X-rays:  $p=0.777$  and CT:  $p=0.349$ ).

**Conclusion:** The use of alendronate administered locally at the fracture site, in the acute period and after one week, did not alter the normal consolidation process determined by PA and radiology, six weeks after femur fracture in rabbits.

**Key words:** Alendronate; union; fracture.

**Level of Evidence:** II

## Introducción

Los bifosfonatos son compuestos químicos cuyo principal efecto es la inhibición de la reabsorción ósea. Inhiben la acción de los osteoclastos y, también, actuarían sobre los osteoblastos y osteocitos.<sup>1</sup> Los bifosfonatos utilizados clínicamente comparten las siguientes propiedades farmacológicas: son incorporados principalmente por los huesos, se unen fuerte a los cristales de hidroxapatita, suprimen la reabsorción ósea mediada por los osteoclastos, son retenidos en el esqueleto, durante mucho tiempo y son eliminados por la orina sin metabolizar.<sup>2</sup>

La mayoría de las fracturas consolidan mediante el llamado proceso de consolidación secundaria que tiene tres fases: inflamación, reparación y remodelación.<sup>3</sup> En cuanto al efecto de los bifosfonatos en la consolidación de las fracturas, se han publicado estudios realizados en niños con osteogénesis imperfecta tratados con bifosfonatos por vía intravenosa, y estos fármacos no influyeron en la consolidación ósea.<sup>4</sup> En otras publicaciones, los bifosfonatos se administraron por vía subcutánea inmediatamente después de la fractura y no se observó un porcentaje más alto de falta de consolidación ósea.<sup>5</sup> Ruchelli y cols. reportaron que el alendronato asociado localmente a aloinjertos ayuda a mejorar la osteointegración de estos últimos, y que no se asocia a riesgos locales o sistémicos, aun en dosis elevadas.<sup>6</sup>

El objetivo de este estudio experimental fue evaluar el resultado radiológico e histológico de la administración local de alendronato en el foco de fracturas de fémur de conejos.

## Materiales y Métodos

Se utilizaron 30 conejos neozelandeses adultos, de sexo indeterminado. El procedimiento fue aprobado por el Comité Institucional de Ética de Investigación en Salud del Sanatorio Allende. Se trabajó sobre el fémur derecho en todos los casos. Los conejos se distribuyeron aleatoriamente en tres grupos de 10 animales cada uno y fueron evaluados antes de la cirugía para descartar enfermedades o malformaciones. Habitaron en jaulas individuales a una

temperatura ambiente de 22-25° C, fueron alimentados con comida balanceada para conejos (aproximadamente 150-200 g/día) y agua *ad libitum*.

A todos los conejos se les realizó una inducción anestésica con ketamina (1 mg/kg) y diazepam (3-5 mg/kg) por vía intramuscular; antes del procedimiento, los animales estuvieron en ayuno de alimentos y de hidratación, por 8 y 2 horas, respectivamente. Se realizó una fractura en la diáfisis femoral derecha siguiendo un patrón transversal en todos los casos. Para ello, se utilizaron dos clavos y un escoplo de punta roma protegiendo siempre las partes blandas con compresas.

A los animales del grupo 1, se les colocó una solución con alendronato en el foco de fractura, los del grupo 2 fueron sometidos al mismo procedimiento, a los 7 días de la fractura, y los del grupo 3 actuaron como control (no se les colocó solución de alendronato a nivel de la fractura). Todos los procedimientos fueron guiados por radioscopia (Figura 1). La solución de alendronato se preparó disolviendo 2 comprimidos de alendronato de 70 mg en 20 ml de solución salina estéril; a los conejos de los grupos 1 y 2, se les inyectaron 2 cm<sup>3</sup> de la solución de alendronato a nivel del foco de fractura, mediante guía radioscópica. Después del procedimiento, se efectuó un entablillado en el miembro fracturado para limitar su movilización.

A los 42 días del procedimiento, se realizó la evaluación radiográfica, momento en el cual los conejos fueron sacrificados. Se evaluaron las características del callo óseo mediante anatomía patológica, radiología y tomografía computarizada, estableciendo el tamaño del callo óseo formado a las 6 semanas, midiendo la distancia (en mm) desde la cortical femoral hacia el punto más saliente del callo óseo en un corte tomográfico y una proyección radiográfica estándar, seleccionada por el mismo operador, en todos los casos.

A los fines del examen histológico, los cortes de los especímenes se obtuvieron seccionando a través del punto medio del defecto y, luego, se incluyeron en parafina. Se realizaron múltiples cortes de 6 mm de espesor con micrótopo y se los tiñó con hematoxilina-eosina para microscopia de luz convencional, con el propósito de estudiar la formación ósea y la vascularización mediante una escala con tres categorías: escasa, leve y moderada.



**Figura 1.** A. Colocación de alendronato en el foco de fractura. B. Radiografía de consolidación de la fractura a las 6 semanas. C. Tomografía computarizada. Consolidación de la fractura. D. Reconstrucción tridimensional.

Las mediciones del tamaño del callo óseo con estudios por imágenes fueron las variables de respuesta o dependientes para las cuales se estimaron mediante máxima verosimilitud las diferencias entre los tres grupos analizados. Para ello se ajustaron modelos generalizados con distribución gama (dada la asimetría de la distribución empírica en cada grupo) usando una variable de clasificación o factor de tratamiento considerando tres niveles: alendronato en fractura aguda, alendronato una semana después de la fractura y el grupo control. Luego, se estimaron medidas de asociación (cociente de chance) entre las escalas de consolidación, la vascularización y las características del callo óseo y los grupos, a los fines de establecer si existen distribuciones diferentes entre estos en relación con las características cualitativas observadas. Esto último se llevó a cabo con pruebas de ji al cuadrado. Los análisis estadísticos se realizaron con el programa Stata V13 (StataCorp, Texas, 2013). Se consideró un nivel de significación  $\alpha = 0,05$ .

## Resultados

La evaluación se efectuó a los 42 días de la fractura, momento en el que los conejos fueron sacrificados. En la evaluación final, se incluyó a 24 conejos, por el fallecimiento de dos conejos del grupo 2 y cuatro del grupo 3 (grupo control). La tasa de mortalidad fue del 0,20% y 40%, respectivamente. El estudio histológico se realizó en estos 24 animales: 10 eran muestras de tejido óseo de fémur con alendronato local (grupo 1); ocho, de tejido óseo con alendronato local colocado a la semana de la fractura (grupo 2) y seis, de los animales de control (grupo 3).

En cuanto a los resultados evaluados por estudios por imágenes, no se hallaron diferencias estadísticamente significativas respecto al tamaño del callo óseo entre los grupos para los dos estudios (radiología:  $p = 0,777$  y tomografía computarizada:  $p = 0,349$ ) (Tabla, Figura 1).

Histológicamente se observó una moderada formación ósea en los tres grupos sin diferencias estadísticamente

**Tabla.** Valores observados del tamaño del callo óseo (mm) formado en los tres grupos, a las 6 semanas

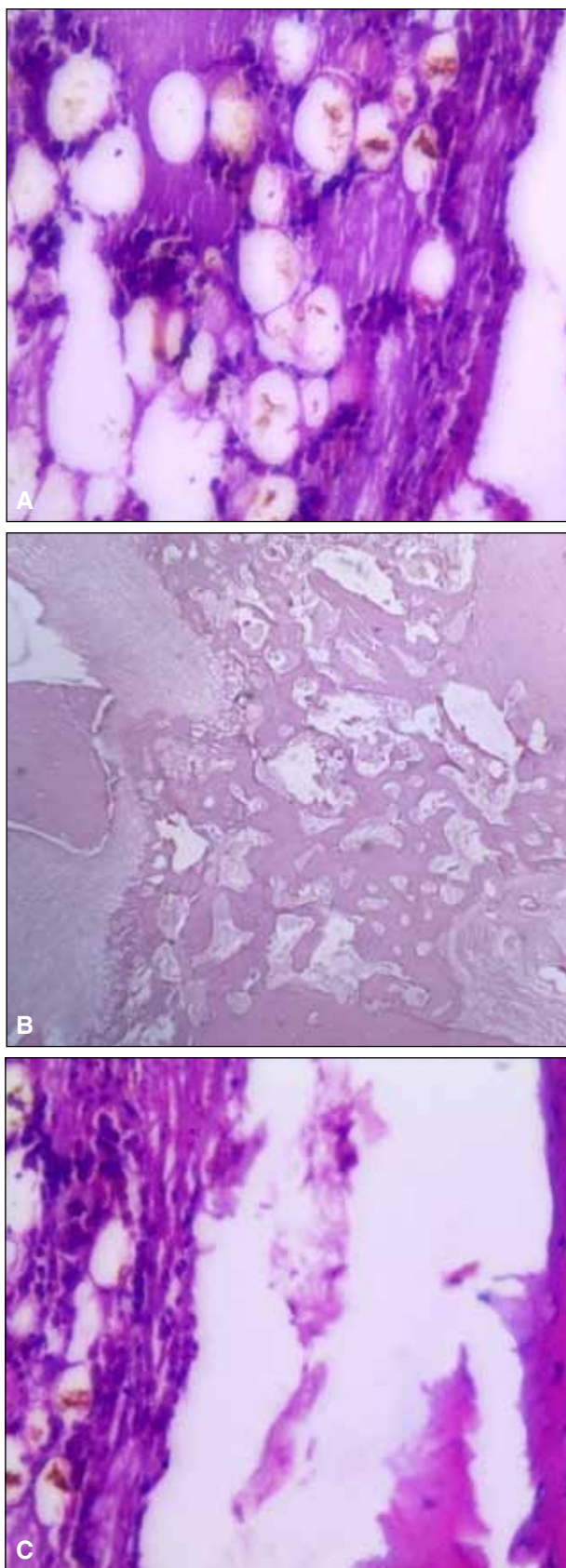
Estudios por imágenes	Grupo 1 Alendronato en la etapa aguda	Grupo 2 Alendronato a la semana de la fractura	Grupo 3 Control
Imagen radiográfica (mm)	6,23	8,10	3,86
	4,01	2,82	5,60
	9,02	3,89	3,87
	6,50	4,94	3,67
	3,25	7,79	5,78
	11,47	7,41	6,27
	3,50	6,87	
	2,65	1,94	
	6,40		
	4,10		
Media (desviación estándar) (mm)	5,7 (2,39)	5,47 (2,89)	4,84 (1,16)
Tomografía computarizada	6,36	5,33	4,01
	4,26	3,54	2,19
	4,30	4,59	3,25
	4,58	7,01	4,32
	3,15	3,36	2,23
	3,34	2,23	3,45
	2,23	4,87	
	3,89	2,98	
	4,37		
	2,54		
Media (desviación estándar) (mm)	3,90 (1,18)	4,2 (1,82)	3,24 (0,88)

significativas ( $p = 0,8336$ ) (Figura 2). En la Figura 3, se muestran los patrones histológicos observados, según una escala de tres categorías (escaso, leve y moderado) respecto de la formación ósea y la vascularización; el grupo 2 presentó los mejores resultados en cuanto a la vascularización ( $p = 0,3976$ ) y tuvo mayor formación ósea que los otros dos grupos (aunque sin significancia estadística).

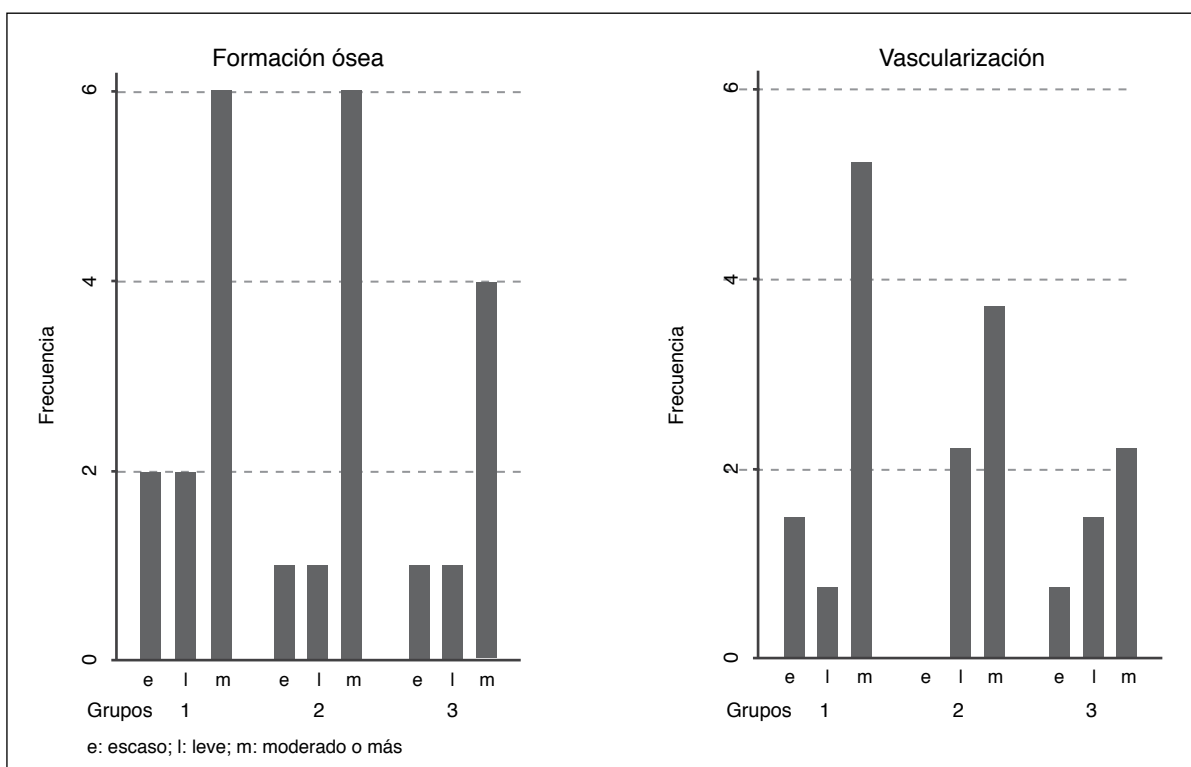
## Discusión

El tiempo en que consolidan las fracturas y la estimulación de la formación del callo óseo representan áreas de constante evaluación e investigación. Los intentos por desarrollar fármacos para acelerar y estimular la formación ósea aun no han sido exitosos. Los estudios publicados sobre el efecto de los bifosfonatos en la consolidación de las fracturas son muy variables, porque utilizan distintos bifosfonatos, a distintas dosis, con distintas formas de administración, en modelos experimentales de fracturas variados y también son diferentes los métodos de medición. En este trabajo experimental que se basó en estudios radiológicos, tomográficos e histológicos, fue posible determinar que el uso de alendronato (bifosfonato de segunda generación) colocado localmente en el área de fractura no afectó el proceso inicial (primeras 6 semanas) de consolidación, de manera significativa, en fracturas diafisarias de fémur de conejos. Vale destacar como limitación que, en nuestro estudio, se analizó el tamaño del callo óseo, pero histológicamente se obtuvo, de forma subjetiva, un patrón de consolidación, sin mediciones (histomorfometría) ni inmunohistoquímica, es decir, no se pudo medir, con precisión, el número de osteoclastos y osteoblastos en cada una de las muestras. Destacamos como debilidad también la falta de mediciones de las variables con el transcurso del tiempo.

Se han llevado a cabo diversos estudios experimentales en animales para observar la influencia de los bifosfonatos en el callo de fractura; se han publicado reportes sobre el efecto del icandronato<sup>7-9</sup> y del clodronato<sup>10-13</sup> administrado por vía subcutánea, en la consolidación de las fracturas de ratas. Autores diversos han estudiado el efecto del raloxifeno, los estrógenos y el alendronato por vía oral en la consolidación ósea de ratas ovariectomizadas;<sup>14</sup> también, se han utilizado perros para estudiar el efecto del tiludronato y el etidronato,<sup>15,16</sup> del ibandronato<sup>17</sup> y del alendronato,<sup>18</sup> por vía subcutánea, en la consolidación ósea. Adolphson estudió el efecto del clodronato por vía subcutánea, sobre el callo de fractura, en mujeres que sufrieron una fractura de Colles y fueron tratadas de forma ortopédica con reducción bajo anestesia local e inmovilización con férula antebraquio-palmar. El autor midió la densidad mineral ósea del callo, y observó un aumento de la mineralización del callo en el grupo tratado con clodronato, no se detectó ningún caso de pseudoartrosis.<sup>5</sup> En



▲ **Figura 2.** A. Cristales de alendronato. B. Tejido óseo y cartilaginoso. C. Cristales de alendronato y osteocitos.



▲ **Figura 3.** Diagrama de barras para las características observadas en la formación ósea y la vascularización luego de las 6 semanas.

otros estudios en los que se evalúa el efecto de los bifosfonatos sobre la pérdida ósea tras la inmovilización para el tratamiento de determinadas fracturas, los bifosfonatos se administraron inmediatamente después de la fractura y no se observó un aumento del retraso de la consolidación ósea.<sup>19,20</sup> Diferentes autores estudiaron los bifosfonatos de primera generación (etidronato, tiludronato) y observaron que se producía un retraso e incluso una inhibición de la consolidación de las fracturas producidas en perros, de forma dosis dependiente y de carácter reversible, ya que las fracturas consolidaban al interrumpir el tratamiento.<sup>15,16,21</sup>

Goodship y cols. demostraron que el pamidronato no tiene efectos adversos sobre la restauración de la integridad mecánica de un hueso largo después de la fractura.<sup>22</sup> Recientemente, en un estudio que comparó la consolidación ósea radiográfica en pacientes con fractura de radio distal tratados con bifosfonatos y un grupo control que no recibía este tipo de tratamiento, se reportó que el tratamiento con bifosfonatos conlleva un aumento del tiempo necesario para lograr la consolidación de la fractura, aunque esta diferencia es inferior a una semana y, por lo tanto, no es clínicamente relevante.<sup>23</sup> Li y cols. reportaron que, cuando los individuos son tratados con alendronato, la remodelación del callo se suprime de forma importante, se produce un callo con mayor contenido de hueso inma-

duro, persistencia de la línea de fractura y menor contenido de hueso cortical en comparación con los otros grupos.<sup>7,8,24</sup> Peter y cols. llevaron a cabo estudios en perros, donde un grupo recibió alendronato por vía oral, durante 16 semanas, después de la fractura, y se obtuvieron callos 2-3 veces más grandes que en los perros no tratados durante ese período, tal vez debido al retraso en la remodelación del callo. Estos autores, así, demuestran que la administración crónica de alendronato no tiene efectos adversos en la consolidación, la resistencia o la mineralización de una fractura provocada en el radio de un perro.<sup>18</sup> En tanto, en nuestro estudio, se evidenció que el uso de alendronato administrado localmente en el foco de fractura no trae consecuencias negativas al proceso inicial de consolidación en conejos.

### Conclusión

Los resultados de este trabajo experimental muestran que la administración de alendronato local en el foco de fractura, de forma aguda y luego de una semana, no alteró, de manera estadísticamente significativa, el proceso normal de consolidación determinado por anatomía patológica y radiología, a las seis semanas de la fractura de fémur en conejos.

## Bibliografía

1. Mochida Y, Bauer T, Akisue T, Brown PR. Alendronate does not inhibit early bone apposition to hydroxyapatite-coated total joint implants. A preliminary study. *J Bone Joint Surg Am* 2002;84(2):226-235.
2. Fleisch H. Bisphosphonates: mechanism of action. *Endocr Rev* 1998;19:80-100.
3. Cruess RL, Dumont J. Basic fracture healing. En: Newton CD, Nunamaker DM. *Textbook of small animal orthopaedic*, Philadelphia: Lippincott; 1985.
4. Munns CFJ, Rauch F, Zeitlin L, Fassier F, Glorieux FH. Delayed osteotomy but not fracture healing in pediatric osteogenesis imperfecta patients receiving pamidronate. *J Bone Miner Res* 2004;19(11):1779-1786.
5. Adolphson P, Abbaszadegan H, Bodén H, Salemyr M, Henriques T. Clodronate increases mineralization of callus after Colles' fracture. A randomized, double-blind, placebo-controlled, prospective trial in 32 patients. *Acta Orthop Scand* 2000;71(2):195-200.
6. Ruchelli L, Allende C, Bruno P, Gutiérrez N, Flores O, Fernández Savoy I. Integración de los aloinjertos óseos impregnados con alendronato: estudio experimental. *Rev Asoc Argent Ortop Traumatol* 2014;79(4):243-249.
7. Li J, Mori S, Kaji Y, Mashiba T, Kawanishi J, Norimatsu H. Effect of bisphosphonate (incadronate) on fracture healing of bones in rats. *J Bone Miner Res* 1999;14(6):969-979.
8. Li C, Mori S, Li J, Kaji Y, Akiyama T, Kawanishi J, Norimatsu H. Long-term effect of incadronate disodium (Ym-175) on fracture healing of femoral shaft in growing rats. *J Bone Miner Res* 2001;16(3):429-436.
9. Linde F, Sorenesen HC. The effect of different storage methods on the mechanical properties of trabecular bone. *J Biomech* 1993; 26(10):1249-1252.
10. Hyvönen PM, Karhi T, Kosma VM, Liimola-Luoma L, Hanijärvi H. The influence of dichloromethylene bisphosphonate on the healing of a long bone fracture, composition of bone mineral and histology of bone in the rat. *Pharmacol Toxicol* 1994;75: 384-390.
11. Koivukangas A, Tuukkanen J, Kippo K, Jamsa T, Hannuniemi R, Vaananen K, et al. Long-term administration of clodronate does not prevent fracture healing in rats. *Clin Orthop* 2003;408:268-278.
12. Madsen JE, Berg-Larsen T, Kirkeby OJ, Falck JA, Nordsletten L. No adverse effects of clodronate on fracture healing in rats. *Acta Orthop Scand* 1998;69(5):532-536.
13. Nyman MT, Paavolainen P, Lindholm TS. Clodronate increases the calcium content in fracture callus. An experimental study in rats. *Arch Orthop Trauma Surg* 1993;112:228-231.
14. Cao Y, Mori S, Mashiba T, Westmore MS, Ma L, Sato M, et al. Raloxifene, estrogen, and alendronate affect the processes of repair differently in ovariectomized rats. *J Bone Miner Res* 2002;17(12):2237-2246.
15. Chastagnier D, Barbier A, de Vernejoul MC, Geusens P, Lacheret F. Effect of two bisphosphonates (tiludronate and etidronate) on bone healing. *J Bone Miner Res* 1993;8:S236.
16. Flora L, Hassing GS, Cloyd CG, Bevan JA, Parfitt AM, Villanueva AR. The long-term skeletal effects of EHDP in dogs. *Metab Bone Dis Rel Res* 1981;3:289-300.
17. Bauss F, Schenk RK, Hört S, Müller-Beckmann B, Sponer G. New model for simulation of fracture repair in full-grown beagle dogs: model characterization and results from a long-term study with ibandronate. *J Pharmacol Toxicol Methods* 2004;50:25-34.
18. Peter CP, Cook WO, Nunamaker DM, Provost MT, Sedor JG, Rodan GA. Effect of alendronate on fracture healing and bone remodeling in dogs. *J Orthop Res* 1996;14(1):74-79.
19. Van der Poest Clement E, Patka P, Vandormael K, Haarman H, Lips P. The effect of alendronate on bone mass after distal forearm fracture. *J Bone Miner Res* 2000;15:586-593.
20. Van der Poest Clement E, Van England M, Ader H, Roos JC, Patka P, Lips P. Alendronate in the prevention of bone loss after a fracture of the lower leg. *J Bone Miner Res* 2002; 17: 2247-55.
21. Lenehan TM, Balligand M, Nunamaker DM, Wood FE Jr. Effect of EHDP on fracture healing in dogs. *J Orthop Res* 1985;3: 499-507.
22. Goodship AE, Walker PC, McNally D, Chambers T, Green JR. Use of a bisphosphonate (pamidronate) to modulate fracture repair in ovine bone. *Ann Oncol* 1994;5:S53-S55.
23. Rozental TD, Makhni EC, Day CS, Bouxsein ML. Improving evaluation and treatment for osteoporosis following distal radial fractures. *J Bone Joint Surg Am* 2008;90:953-961.
24. Li J, Mori S, Kaji Y, Kawanishi J, Akiyama T, Norimatsu H. Concentration of bisphosphonate (incadronate) in callus areas and effects on fracture healing in rats. *J Bone Miner Res* 2000;15(10):2042-2051.