

EVALUACIÓN EXPERIMENTAL DE BIFOSFONATOS: ASPECTOS BÁSICOS Y REGULATORIOS

Nélida Mondelo*

Investigación y Desarrollo, Gador S.A.

Resumen

La evaluación experimental de los bifosfonatos ha sido -y sigue siéndolo- muy prolífica en modelos animales e *in vitro* para la generación de evidencias que sustenten el uso terapéutico de los mismos en distintas situaciones clínicas, bajo distintas vías o regímenes de administración, y para el conocimiento de su mecanismo de acción.

Las autoridades sanitarias, aun en el caso de drogas que, como los bifosfonatos, poseen una alta selectividad de acción, requieren estudios de farmacología de seguridad y toxicológicos convencionales (agudos, de larga duración y en condiciones especiales) para definir efectos sobre sistemas esquelético y no esqueléticos, estimar dosis humanas equivalentes seguras, identificar parámetros de monitorización y proveer márgenes de seguridad durante las distintas etapas de investigación clínica.

Destacando las diferencias entre lo básico y lo regulatorio, el artículo ofrecerá un panorama general de:

- Los aspectos mecanicísticos tales como los relacionados con la inhibición de la farnesil pirofosfato sintetasa.
- Los efectos farmacodinámicos de los bifosfonatos en distintos modelos de osteopenia generalizada o localizada (deprivación estrogénica, inducida por fármacos u otras drogas, mediada por PTHrp de origen tumoral, enfermedad periodontal, metástasis ósea, osteólisis peri-implantes, entre otros) y las herramientas necesarias para su evaluación (densitométricas, histomorfométricas, biomecánicas, bioquímicas, etc.)
- Las evidencias surgidas de los estudios de toxicología general o específicos con relevancia clínica

y la importancia de las buenas prácticas de laboratorio durante su realización.

- Los potenciales nuevos usos (incluyendo extra-esqueléticos) y diferentes formas de liberación (liposomas, conjugados y localizadas).

Palabras clave: bifosfonatos, modelos experimentales, olpadronato.

Experimental Evaluation of Bisphosphonates: Basic and Regulatory Aspects

Summary. *Pharmacodynamic evaluation of bisphosphonates has been -and still is- highly prolific in animals and in vitro models to generate evidences that give support to their therapeutic use in different clinical situations under different administration routes or schedules and, also, to explain their mechanisms of action.*

As part of the requirements of health authorities, and even in the case of drugs like bisphosphonates which have highly specific actions, safety pharmacology and conventional toxicological studies (acute toxicity, repeated-dose studies and special toxicity studies) are necessary for the preliminary identification of skeletal and non-skeletal target organs of toxicity, for the estimation of safe human-equivalent doses, and to identify monitoring parameters during different stages of clinical investigation.

Highlighting the differences between basic and regulatory aspects, this article will provide a general review of the following issues:

- *Mechanistic pathways such as the ones related to the inhibition of farnesyl-pyrophosphate synthase.*
- *Pharmacodynamic effects in different models of generalized or localized osteopenias (estrogenic*

* Dirección postal: Crámer 2462, C1428CTN. Buenos Aires. Correo electrónico: nmondelo@gador.com.ar

depletion, drug-induced, associated to PTHrP-producing tumors, periodontitis, peri-implant osteolysis, among others), and the necessary tools: bone densitometry, histomorphometry, biomechanics, clinical chemistry, etc.

- *Evidence arising from conventional toxicology or safety pharmacology studies and the importance of their conduction under good laboratory practice standards.*
- *Potential new uses (including non-skeletal uses) and different delivery systems (liposomes, conjugates, local administration).*

Key words: *bisphosphonates, experimental models, olpadronate.*

1. Introducción

La serie de experimentos que dio origen a los bifosfonatos (BPs) como familia de compuestos osteoactivos es ya parte de la historia de la terapéutica ósea. Dichos experimentos se inspiraron en las evidencias de la acción del pirofosfato sobre la homeostasis cálcica y su extrema labilidad ante las pirofosfatasa intestinal y renal, lo cual le restaba posibilidades terapéuticas. La búsqueda de derivados biológicamente más estables, el posterior diseño de los bifosfonatos con un carbono en lugar del oxígeno central del pirofosfato y los artículos publicados a fines de la década de 1960, en *Nature* y *Science*, iniciaron toda una época, que desde hace más de 30 años nos enriquece continuamente con nuevos modelos experimentales, mejores conocimientos de modos de acción y nuevas oportunidades de uso clínico.^{1,2}

Hoy contamos con derivados de aquellas estructuras originales (NoN-BPs), y con otros, más potentes, con nitrógeno en una de sus cadenas laterales, lineal o cíclica (N-BPs), para administración oral o intravenosa, presentados en formas farmacéuticas líquidas o sólidas, de uso continuo o cíclico y para un importante número de patologías óseas que incluyen las complicaciones de las neoplasias malignas. Mientras tanto, se espera reunir más evidencia experimental y clínica para otras formas menos convencionales de administración, otros esquemas, combinaciones y otros usos, tal vez extra-esqueléticos.

La evaluación no-clínica (experimental) de los bifosfonatos ha estado presente desde sus orígenes y en cada una de las etapas de su evolución. Los ensayos *in vitro* permitieron reconocer su mecanismo de acción celular/molecular y, actualmente, intentan explicar acciones antitumorales, inmunomoduladoras, antiparasitarias, la contribución de células no-osteoclasticas a su eficacia global, y también sus efectos no deseados. La evaluación farma-

codinámica constituye el soporte más apropiado para los estudios de eficacia clínicos, y si la especie animal, la vía de administración, el esquema, la dosis y el modelo son adecuados, la extrapolación al humano puede ser muy directa. La farmacocinética experimental otorga relevancia a aquellas especies en las que un bifosfonato se absorbe, distribuye y excreta de manera similar a la encontrada en el hombre, y es una herramienta de investigación esencial durante la búsqueda de derivados más biodisponibles, con diferente grado de afinidad y retención esquelética o acumulación en tejidos blandos, para el estudio de interacciones con otras drogas o nutrientes y para la detección de potenciales órganos de toxicidad. Y finalmente, la toxicología experimental, con un gran peso regulatorio y cuyo objetivo máximo es la caracterización del perfil toxicológico y su reversibilidad, el establecimiento de la relación entre dosis y tipo de exposición, la estimación de las dosis seguras y los parámetros de monitoreo clínico para "la primera vez en humanos" y luego, para cada una de las siguientes etapas de investigación clínica.

Este artículo, que no intenta ser exhaustivo, recorrerá distintos modelos experimentales: los que establecieron un antes y un después, los más relevantes para la autoridad sanitaria y también aquellos inesperados o promisorios que contribuyeron, en distintas épocas y en distintas regiones, incluyendo nuestro país, al conocimiento del mecanismo de acción, al establecimiento de nuevos candidatos, más potentes o más seguros, de nuevas indicaciones terapéuticas, nuevos esquemas y formas de administración y, reconociendo diferencias y debilidades, seguramente permitirán, en el futuro, nuevas revelaciones.

2. La evaluación experimental del mecanismo de acción de los bifosfonatos y modelos de aplicación: un aspecto básico

2.1 El modo fisicoquímico de acción: su relación con la odontología y el diagnóstico por imágenes

El comportamiento fisicoquímico de los bifosfonatos, gracias a una interesante conexión suizo-norteamericana, justificó su primer uso en humanos en el campo de la odontología y del diagnóstico por imágenes.³

Por su afinidad a la hidroxiapatita y la posibilidad de generar radiofármacos transportadores de ^{99m}Tc al hueso, con alta eficiencia de marcación, prácticamente inauguraron una nueva era en el diagnóstico por imágenes del esqueleto.⁴ Por su comportamiento dual al adsorberse a la hidroxiapatita, disminuyendo su solubilidad y afectando la etapa de

nucleación y formación del cristal, previenen la formación de cálculos dentales sin afectar el esmalte. Recientemente, se ha empleado un modelo modernizado de rata alimentada con una dieta calculogénica, empleando técnicas difractométricas para estudio cristalino, para evaluar un nuevo bifosfonato para esta antigua indicación.^{2, 3, 5}

2.2 El modo celular/molecular de acción de los bifosfonatos

2.2.1 En el osteoclasto

Células con actividad macrofágica permitieron distinguir entre NoN-BPs y N-BPs. Los primeros, confundiendo al mecanismo enzimático celular que conduce a la síntesis de ATP formando un análogo tóxico: el adenosin 5'-(beta, gamma-diclorometileno) trifosfato, no hidrolizable, cuya acumulación citosólica provoca la muerte celular; y los segundos, inhibiendo a la farnesil pirofosfato sintetasa (FPPS).^{6, 7} Luego de varios intentos con otros sistemas enzimáticos, los grupos de M. Rogers en Gran Bretaña y S. Papapoulos en Holanda, casi simultáneamente y con elegantes experimentos con macrófagos J744 y FPPS aislada, pudieron demostrar la correlación entre esta inhibición enzimática -que impide la formación de intermediarios isoprenoides tales como farnesil pirofosfato y geranyl geranyl pirofosfato-, la inhibición de la isoprenilación post-translacional de las pequeñas trifosfatasas de guanosina (GTPasas), los cambios morfológicos del osteoclasto y la actividad antiresortiva *in vivo e in vitro* (Tabla 1).⁷⁻¹² El osteoclasto, con grandes posibilidades de elevar

localmente la concentración del bifosfonato por resorción de la hidroxiapatita, casi como un acto suicida y por un proceso de pinocitosis en fase fluida, permitirá su ingreso al interior celular tras lo cual se inhibirá la activación de las pequeñas GTPasas (Rho, Rac, CDc42, RhoA, Rab y Ras, entre otras).^{9, 13} De esta forma se pierde el borde rugoso, se impide la formación de anillos de actina y la reorganización del esqueleto, se afecta el tránsito vesicular y la transición de la matriz ósea degradada y puede ocurrir apoptosis.⁹ Distintos autores, incluyendo a Mandalunis y col. en Buenos Aires, con inhibidores de caspasas o estudios histológicos sobre tibias de ratas, sugieren que la inhibición de la resorción ósea es independiente de la apoptosis osteoclastica (y ocurre con dosis o concentraciones menores).^{14, 15}

2.2.2 En otras células del esqueleto

Distintas evidencias *in vitro* tales como la liberación de osteocalcina, aumento de la actividad de fosfatasa alcalina y la expresión aumentada de genes para BMP-2, colágeno tipo I y osteocalcina, e inhibición del efecto apoptótico de glucocorticoides sugieren la acción de algunos bifosfonatos sobre osteoblastos y osteocitos (R. Boland, T. Bellido y col., en Argentina y Estados Unidos, entre otros), disociando en algunos casos (lidronato, por ejemplo) el efecto pro-apoptótico sobre osteoclastos del efecto anti-apoptótico sobre estas células. Otros autores reportaron similar efecto inhibitorio de bifosfonatos sobre la apoptosis de condrocitos bovinos inducida por dexametasona.¹⁶⁻¹⁸

Bifosfonato	Inhibición de FPPS (μM) CI 50	Actividad antiresortiva ósea	
		In vitro Liberación de ^{45}Ca (nM) CI 50	In vivo Modelo del retinoide DI 50, iv
No N-BP			
Clodronato	100 (0% de inhibición)	---	---
N-BP			
Pamidronato	27,50 \pm 2,80	5	*
Aminopamidronato	---	30	---
Olpadronato	3,25 \pm 0,60	0,5	0,022 mg/kg
Amino-olpadronato (lidronato)	100 (0% de inhibición)	>>100	> 12,5 mg/kg

Tabla 1: Inhibición de FPPS y actividad antiresortiva ósea.

Concentración inhibitoria 50 (CI 50, promedio \pm error estándar) de FPPS aislada de cerebro bovino (van Beek E et al.¹¹) y en 2 modelos asociados a potencia antiresortiva ósea: inhibición de liberación de ^{45}Ca de explantos óseos *in vitro* (van Beek E et al.¹¹) y modelo del retinoide en ratas tiroparatiroidectomizadas (adaptado de Trechsel U et al.¹²; datos en archivo, Gador SA).

* En experimento no simultáneo, pamidronato presentó una DI 50 = 0,5 mg/kg.

2.2.3 Mas allá del esqueleto: los linfocitos T gamma-delta, los parásitos y las células tumorales

Inicialmente con pamidronato y *a posteriori* con alendronato e ibandronato (pero no con NoN-BPs), se demostró la activación y expansión selectiva de linfocitos T gamma-delta en cultivos de células mononucleares de sangre periférica de humanos sanos.¹⁹ Por el importante rol que se atribuye a este tipo celular en inmunoterapia como primera línea de defensa frente a diferentes formas de cáncer y enfermedades infecciosas, este hallazgo generó gran interés y, finalmente el asombro, tras la demostración de la excelente correlación entre la potencia activadora de los linfocitos T gamma-delta que expresan el receptor Vgamma 9Vdelta2 con la potencia inhibitoria de la enzima FPSS recombinante humana ($R = 0,88$; $p = 0,002$; con 9 derivados) o con la misma enzima expresada por *Leishmania major* ($R = 0,82$; $p < 0,0001$; 45 compuestos) y, en consecuencia, con la potencia antiresortiva ósea.²⁰ Un ejemplo muy ilustrativo surge de la comparación de concentraciones efectivas (CE) de olpadronato, alendronato y lidadronato en este sistema (CE50: 46, 53 y 371 μM) y las dosis inhibitorias (DI) de la hipercalcemia en el modelo del retinoide (DI 50: 0,022; 0,011 y $>12,5$ mg/kg, respectivamente), la actividad inhibitoria de la FPSS indicada en **Tabla 1** y el efecto en el modelo de rata ovariectomizada que se detalla en **Tabla 2**.²⁰

Y siempre ligado a su mecanismo más íntimo de acción sobre la FPSS, una enzima que ha mantenido un alto nivel de conservación durante el proceso evolutivo, varios organismos microscópicos resultan blanco de acción de los bifosfonatos. Todo comenzó con la curiosa correlación entre potencia antiresortiva e inhibición del crecimiento *in vitro* de *Dictyostelium discoideum* y se reflejó en los últimos años, con el trabajo pionero de Docampo y colaboradores, tras publicar los resultados antiproliferativos de pamidronato sobre amastigotes de *T. cruzi* intracelulares y sobre la parasitemia en un modelo murino de Chagas agudo. Hasta la fecha, varios otros microorganismos con relevancia patológica, otros blancos moleculares y nuevos productos de diseño están siendo investigados con este enfoque.²¹⁻²⁴

Varios bifosfonatos, en cultivos de distintas líneas celulares tumorales -mama, próstata, mieloma múltiple, para citar las más populares- inhiben su proliferación o inducen apoptosis, en forma aislada o ejerciendo un efecto sinérgico con terapias antineoplásicas específicas.²⁵⁻²⁷

2.3 Modelos farmacodinámicos *in vivo*

Tal como adelantara en la introducción, la farmacodinamia experimental proporcionará la racionalidad y brindará soporte a los diferentes estudios clínicos de eficacia, que finalmente permitirán a la autoridad sanitaria tomar la decisión final de "aceptabilidad" de un nuevo derivado o una nueva indicación y a los futuros investigadores, "validar" la adecuabilidad de tales modelos.

2.3.1 Inhibición de la resorción ósea inducida por retinoides

Los retinoides, derivados de la vitamina A, son un potente estímulo para la resorción ósea osteoclástica y en tan sólo 4 días reflejan esta propiedad con una marcada hipercalcemia en ratas tiroparatiroidectomizadas (TPTX). El "modelo del retinoide" desarrollado por H. Fleisch y col. hace casi 20 años es, tal vez, de los pocos modelos experimentales *in vivo* que en el corto plazo permiten estimar y relacionar potencia antiresortiva ósea de una serie de diferentes bifosfonatos (**Figura 1**), con una buena capacidad cualitativa-predictiva.¹²

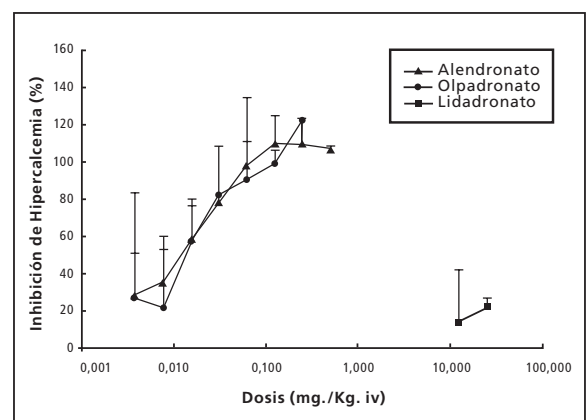


Figura 1: Prevención de la hipercalcemia inducida por retinoide en ratas TPTX.

Prevención de la hipercalcemia inducida por retinoide Ro-136298 -donación Hoffmann-La Roche- subcutáneo en ratas TPTX (n: 2-7/grupo) con dosis únicas intravenosas de tres N-BPs según modelo adaptado de U. Trechsel y col.¹²

2.3.2 Modelo preventivo de la pérdida ósea en la rata ovariectomizada

Es muy bien conocido el efecto deletéreo de la privación estrogénica sobre el hueso trabecular y compacto en el humano y en otras especies animales como ratas, ovejas, primates no humanos. Por su disponibilidad, fácil manejo, costo, factibilidad

de empleo de un número estadísticamente apropiado de animales, facilidad para obtener fluidos biológicos y el reconocimiento por parte de las autoridades regulatorias, la rata ovariectomizada ha sido y es el animal más popular cuando se trata de mimetizar a la post-menopausia humana. Los bifosfonatos, con diferente grado de potencia y eficacia, previenen la pérdida de masa/densidad mineral ósea en este modelo de alto recambio. Ya que hay evidencias que indicarían que estos cambios sólo explican parcialmente la resistencia ósea, y además existe el temor de que un incremento exagerado de masa ósea, no acompañado por una mejoría en la arquitectura del hueso, pueda afectar la calidad del mismo, mientras las nuevas tecnologías no permitan evaluar confiablemente la calidad del hueso humano, la autoridad regulatoria se apoya en resultados experimentales como aproximación más temprana.²⁸ Sólo en animales o en material cadavérico se admiten las técnicas destructivas de análisis como el ensayo de flexión en 3 puntos o la resistencia a la compresión del cuerpo vertebral, mediante equipos de análisis universal de materiales y *softwares* específicos.

Se trata, básicamente, de cuantificar parámetros estructurales tales como resistencia ósea a la fractura (carga máxima o carga a la fractura), la rigidez (pendiente de la curva carga-desplazamiento), el grado de "desplazamiento" y la cantidad de trabajo (área bajo la curva) hasta la fractura final o hasta el punto de inflexión que señala el pasaje entre la fase elástica -con cambios reversibles- y plástica -microfracturas irreversibles- del hueso (Figura 2).

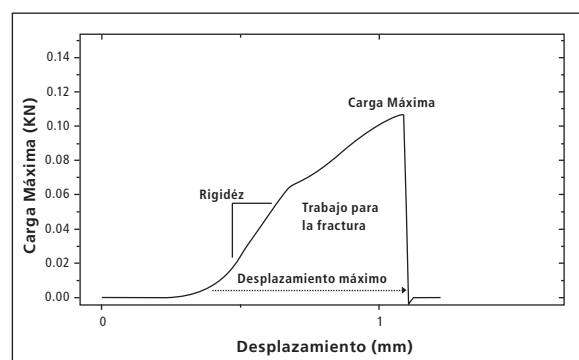


Figura 2: Ensayo de flexión femoral de 3 puntos: curva típica de carga-desplazamiento

Curva típica de carga-desplazamiento en un ensayo de flexión de 3 puntos en diáfisis femoral de rata (equipo Instron 4411, 11 mm de distancia entre apoyos, 2 mm/segundo de velocidad de cruceta). Los parámetros biomecánicos estructurales básicos se describen en el texto.

La Figura 3 muestra la relación directa entre el valor de carga máxima en región diafisaria, un parámetro estructural del hueso como un todo y el

peso femoral (relacionado a su vez con el peso del animal). Al normalizar los resultados considerando tamaño, forma y distribución ósea en la pieza en estudio, mediante fórmulas de ingeniería que incluyen al momento de inercia seccional (flexión de diáfisis femoral) o al área (compresión de cuerpo vertebral) podrá determinarse la calidad intrínseca del material óseo (Tabla 2).²⁹

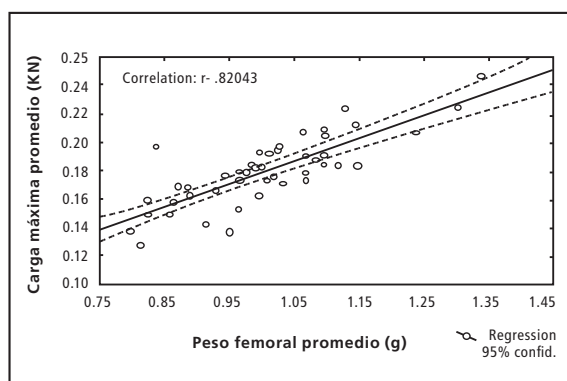


Figura 3: Correlación entre carga máxima (diáfisis) y peso de fémur de rata en ensayo de flexión de 3 puntos

Correlación de carga máxima (diáfisis central) y peso de fémur de ratas macho de aproximadamente 8 meses de edad (fémures de estudio no relacionado con bifosfonatos, Cardinali y col.; datos en archivo, Gador SA).

La Tabla 2 refleja la diferente respuesta densitométrica del hueso cortical -central- y trabecular -distal- de la rata frente a los estímulos deletéreos (ovariectomía) y beneficiosos (alendronato y olpadronato). Los cambios densitométricos y de los parámetros biomecánicos estructurales que, aun sin significación estadística, sugieren una tendencia de deterioro/protección o falta de efecto en diáfisis femoral según el grupo experimental, se manifiestan sin embargo, significativamente, cuando se considera el estrés máximo, un parámetro indicativo de calidad del material óseo constitutivo.

Grupo	DMO en fémur (g/cm ²)		Carga máxima (KN)	Trabajo hasta fractura (mJ)	Stress máximo (MPa)
	Distal	Central			
SHAM	0,265 ± 0,042*	0,206 ± 0,042	96,0 ± 6,8	43 ± 5	94,0 ± 6,2*
OVX	0,206 ± 0,041**	0,200 ± 0,030	92,0 ± 3,2	37 ± 4	86,2 ± 5,1**
Olpadronato	0,294 ± 0,036*	0,222 ± 0,020	103,6 ± 5,4**/**	51 ± 8*	99,6 ± 5,1*
Alendronato	0,274 ± 0,034*	0,223 ± 0,029	105,3 ± 5,4**/**	50 ± 6*	98,2 ± 3,7*
Lidaronato	0,204 ± 0,032**	0,187 ± 0,024	89,5 ± 6,0	37 ± 9**	85,9 ± 5,5**

Tabla 2. Densidad mineral ósea (DMO, DXA) de fémur central y distal y parámetros biomecánicos estructurales (ensayo de flexión femoral de 3 puntos) en ratas, 16 semanas luego de la ovariectomía. N: 10/grupo. Los valores representan promedios ± desvío estándar. Los N-BPs (6, 3 y 10 mg/kg para olpadronato, alendronato y lidaronato, respectivamente) se administraron por vía oral, 1 vez por semana, a partir de la cirugía. El momento de inercia de la sección de fractura se estimó mediante análisis de imágenes (Optimas) sobre corte transversal de diáfisis femoral (sierra Exakt) de 0,5 mm de espesor inmediato al sitio de fractura. Se consideró diferencia estadísticamente significativa cuando $p \leq 0,05$ (* versus grupo OVX y ** versus grupo SHAM).

Junto a resultados densitométricos y biomecánicos y asociado a la necesidad de conocer la microarquitectura ósea, se requieren estudios histológicos/histomorfológicos estáticos y dinámicos para complementar el requisito regulatorio que obliga a un prolongado período de administración en al menos 2 especies animales y niveles de dosis suficientes para definir "margen de seguridad para la calidad ósea" incluyendo al menos una dosis 5 veces superior a la óptima.²⁸

2.3.3 En el animal normal

Los experimentos destinados a evaluar seguridad de bifosfonatos en distintos sistemas del organismo -los estudios toxicológicos- requieren del uso de dosis muy superiores a las mínimas eficaces en lo que sería el equivalente al voluntario sano: la rata normal. Por nuestro particular interés en el comportamiento óseo, se analizaron numerosos fémures y un buen número de columnas vertebrales de ratas y ratones normales tratados con olpadronato. En uno de estos estudios, con una duración máxima de 2 años y administración oral, pudo apreciarse, en coincidencia con otros autores, el mantenimiento del efecto máximo dosis-dependiente (*end-point* densitométrico) independientemente de la continuidad del tratamiento.³⁰

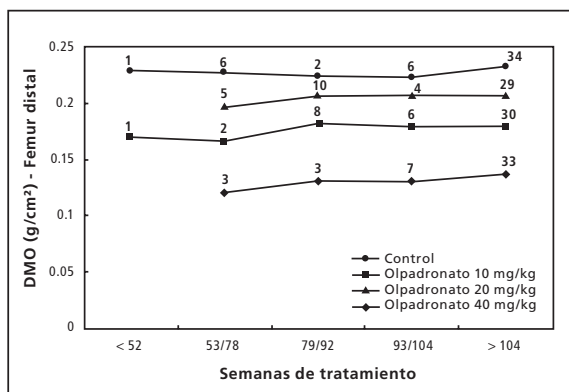


Figura 4: Densidad mineral ósea de fémur de rata hembra normal durante el tratamiento con olpadronato oral hasta un máximo de 104 semanas.

Densidad mineral ósea (DXA) en fémur distal de ratas normales hembras, con olpadronato (oral, diario, intención de tratamiento durante 104 semanas). Por razones propias del envejecimiento, un pequeño número de animales (indicado en el gráfico) muere o es sacrificado antes del fin programado del estudio. El número de animales que completó el período previsto se indica en ">104"

2.3.4 Modelos en odontología, traumatología y otros

Modelos de periodontitis y de reparación ósea post-exodoncia en rata, se han empleado en nuestro país para demostrar el efecto preventivo de olpadronato (aplicación tópica en bolsa periodontal) sobre la destrucción ósea alveolar y su acción sistémica sobre el proceso reparativo. Tal vez, del modelo de reparación alveolar en ésta u otra especie podamos esperar en el futuro alguna contribución acerca de los mecanismos que llevan a la osteonecrosis maxilar/mandibular, entidad que últimamente se ha relacionado especialmente con la administración sistémica de altas dosis de los bifosfonatos más potentes, tras intervenciones odontológicas en pacientes con cáncer; eventualmente, nos permitirá distinguir las diferencias entre distintas entidades químicas.³¹⁻³³

Para el evitamiento de osteólisis peri-implantes, una complicación mayor de este tipo de intervenciones, se han desarrollado varios diseños experimentales, entre los cuales se destacan aquéllos en que el implante es recubierto con una asociación de fosfato de calcio y bifosfonatos de forma que el hueso en contacto sea la única región esquelética expuesta a la droga.^{34, 35} Este modelo intenta responder a la hipótesis que señala que son las partículas derivadas del implante las iniciadoras de una respuesta inflamatoria mediada por macrófagos residentes, activación de osteoclastos y resorción ósea en la interfase implante-hueso. Como prueba de concepto, y para confirmar la alta calidad del hueso peri-implante, se demostró en ratas una mayor resistencia mecánica al *pull out* de un implante condilar de titanio recubierto con zoletronato/fosfato de calcio.³⁵

Innumerables modelos experimentales simulando patologías óseas de muy diversa naturaleza han sido utilizados aquí y en el exterior para evaluar eficacia de bisfosfonatos. En nuestro país, S. Zeni y col. han contribuido al conocimiento de la acción beneficiosa de distintos bifosfonatos en modelos de ratas hipertiroideas, con insuficiencia renal, bajo terapia con inmunosupresores, y últimamente, mostrando la relevancia de la hipovitaminosis D para la respuesta protectora en modelo de rata ovariectomizada.³⁶⁻³⁹ Ferretti y col., hace ya muchos años, describieron los efectos de etidronato y pamidronato en la repercusión biomecánica de la osteopenia por corticoides en ratas jóvenes y en nuestro propio laboratorio, ratas hemiciaticectomizadas fueron el modelo de osteopenia por desuso empleado para conocer el comportamiento de olpadronato y pamidronato.^{40, 41}

2.3.5 Modelos experimentales relacionados con cáncer: hipercalcemia humoral maligna y prevención/tratamiento de complicaciones óseas metastásicas

Tradicionalmente, ratas o ratones con tumores secretores del péptido relacionado con la parathormona -PTHrp- (u otros factores humorales, en una minoría) que, sin metástasis, afectan al hueso a distancia del tumor primario, han sido empleados como soporte para estudios clínicos de hipercalcemia humoral maligna en humanos.⁴² El comportamiento dual de PTHrp, que estimula la reabsorción tubular renal del calcio además de la resorción ósea, nos permitió explicar la acción de olpadronato sobre el componente óseo, enlenteciendo la marcada y rápida hipercalcemia (Tabla 3) y protegiendo en forma completa la severa osteopenia en ratón provocada por el adenocarcinoma pulmonar mixto sólido-papilar P07 (tumor cedido por el Instituto de Oncología A. Roffo) en ratones. Este tumor conduce, en el término de 1 mes, a niveles circulantes de PTHrp muy superiores (10,1 pM) a los niveles de animales controles normales (0,8 pM) (Figura 5).⁴³

Grupo	Día 19	Día 23	Día 28
Control normal	1,32 ± 0,01	1,33 ± 0,01	1,35 ± 0,01
Control portador	1,45 ± 0,05	1,53 ± 0,09	1,88 ± 0,31
Portador + olpadronato	1,34 ± 0,03	1,41 ± 0,03	1,51 ± 0,15

Tabla 3: Evolución de la calcemia en ratones portadores de adenocarcinoma pulmonar murino.

Niveles de calcio iónico en ratones portadores de tumor P07 (Instituto Roffo) tratados con olpadronato (1 mg./kg. día, subcutáneo, durante 28 días) Los valores representan promedios ± desvío estándar.

Durante los últimos años se incrementó notablemente el número de modelos experimentales destinados a comprender el mecanismo por el cual los bifosfonatos resultan preventivos de las complicaciones esqueléticas en procesos malignos con metástasis óseas, buscando evidencias de su acción en distintas etapas de la progresión de un tumor: la proliferación de las células tumorales, la generación de vasos sanguíneos como paso esencial para el crecimiento de un tumor (angiogénesis), la adhesión de células malignas a la matriz ósea y finalmente la invasión ósea.

Hay, además de las evidencias *in vitro* ya mencionadas sobre proliferación y apoptosis, un creciente número de evidencias experimentales *in vivo*, que indican que los bifosfonatos pueden disminuir la carga esquelética tumoral. Podría ser que las concentraciones de bifosfonatos potencialmente alcanzables en la vecindad de los osteoclastos resorptivos fueran suficientes para inducir apoptosis de células

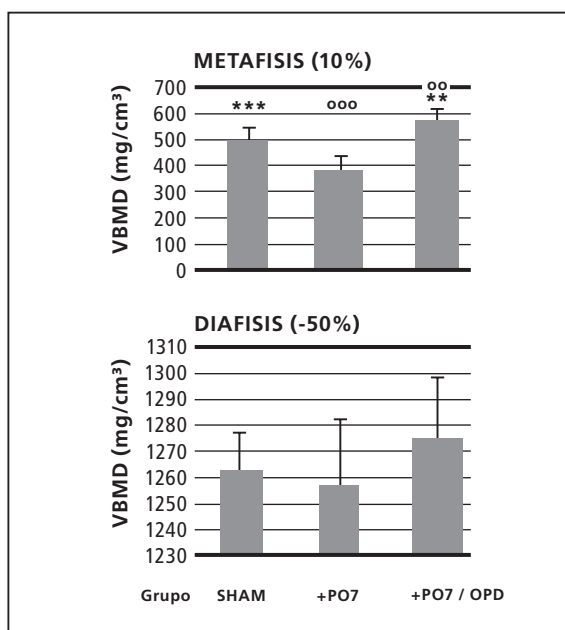


Figura 5: Densidad mineral ósea volumétrica en fémur de ratones portadores de adenocarcinoma pulmonar maligno P07.

Densidad mineral ósea volumétrica (VBMD) (metáfisis y diáfisis, promedios ± desvíos estándar) (pQCT) en fémur de ratones SHAM y portadores de tumor P07 (+P07) tratados con olpadronato (1 mg/kg.día subcutáneo) (+P07/OPD), a 28 días post-implante del tumor. **/** p<0,05/0,001 versus +P07; **** p<0,05/0,001 versus SHAM.

malignas -de mieloma, por ejemplo- o que se trate de una acción tumoral indirecta, hipótesis lógica muy difundida y asociada a la deprivación que sufrirían las células tumorales de los factores de crecimiento celular almacenados en hueso e interrumpiendo lo que ha dado en llamarse "círculo vicioso de retroalimentación positiva". Tras este concepto, se han publicado elaborados modelos experimentales, en su mayoría con animales inmunodeprimidos SCID o nude implantados con células tumorales de origen humano, demostrando la disminución de las áreas de metástasis y osteólisis radiológicas y en consecuencia de la destrucción de estructuras óseas (ibandronato y zoledronato), la progresión de tumores que expresan proteínas fluorescentes en el esqueleto entero (olpadronato) o destinados a la evaluación de potenciales nuevos derivados con menor afinidad ósea y mayor posibilidad de acción antitumoral directa.⁴⁴⁻⁴⁶

Pamidronato y zoledronato han mostrado efecto anti-angiogénico en modelos de vascularización de membrana corioalantoidea de huevo de gallina y de revascularización inducida por testosterona en próstata de ratas castradas, entre otros.^{47, 48}

Empleando matriz ósea obtenida de hueso cortical o trabecular, varios N-BPs presentaron una potencia "anti-adherencia de células malignas" que, sorpresivamente, presentó una clara correlación con

su potencia antirresortiva.⁴⁹ La invasión de células malignas, uno de los eventos tempranos durante la formación de metástasis, requiere proteólisis local de la matriz extracelular y tanto la membrana basal como el estroma intersticial constituyen barreras a superar, por lo cual varios trabajos experimentales consideraron y probaron la acción inhibitoria de distintos bifosfonatos frente a las metaloproteinasas responsables del clivaje de los componentes de la matriz.⁵⁰

El dolor óseo es un dramático componente del proceso metastásico. Un modelo murino de dolor óseo en cáncer, confinando células tumorales en un espacio reducido de médula ósea femoral, que comparte muchas de las características del equivalente humano, mostró, con alendronato, la reducción significativa de la destrucción de fibras sensoriales que inervan el hueso, los cambios neuroquímicos en sistema nervioso central y periférico propios de la sensibilización además de los reconocidos efectos sobre la destrucción ósea. Se espera que este tipo de modelo permita conocer más sobre la intervención en los múltiples componentes del dolor en cáncer de nuevos o reconocidos bifosfonatos desarrollados para enfermedad metastásica ósea y con los cuales ya hay evidencias clínicas muy alentadoras.⁵¹

2.3.6 Direccionamiento de fármacos: liposomas y otros

La reclusión de bifosfonatos en liposomas les permite acceder al sistema mononuclear fagocítico y, al igual que en el osteoclasto, si la dosis es suficientemente alta, producirán lisis y depleción de macrófagos o monocitos: se trata de un fenómeno "suicida". A la fecha, liposomas con clodronato y en algunos casos con alendronato, se han empleado en forma experimental en modelos de artritis reumatoidea, enfermedades neurológicas como la encefalomiелitis alérgica experimental, terapia génica, direccionamiento de fármacos, evitamiento de restenosis tras inserción de *stents* endovasculares, y, en nuestra Academia Nacional de Medicina, en modelos de trombocitopenia experimental, vinculada con la regulación de la megacariocitosis por macrófagos del microambiente medular.⁵²⁻⁵⁴

Es muy atractiva la idea de aprovechar el osteotropismo de los bifosfonatos para direccionar moléculas que interesa concentrar en el esqueleto. De hecho, ya se ha mencionado un ejemplo que logró trascender la fase experimental como lo es el acarreamiento de ^{99m}Tc con fines diagnósticos. En varias publicaciones se emplearon conjugados de bifosfonatos con analgésicos, drogas antineoplásicas, estrógenos, osteoprotegerina, proteínas morfogenéticas u otras, con la intención de sumar o

sinergizar efectos o, simplemente, usar al bifosfonato como transportador. Ciertos inconvenientes (falta de clivaje del conjugado o captación por el sistema mononuclear fagocítico) deberán ser superados antes de la aplicación clínica de este tipo de enfoques.⁵⁵

2.4 Aspectos básicos y regulatorios de la farmacocinética

Los estudios farmacocinéticos constituyen un requisito regulatorio y formal, exigido fundamentalmente como herramienta predictiva del comportamiento de una droga en el humano antes de su primer uso y, *a posteriori*, para revalidar la utilidad de la especie animal utilizada en estudios farmacotoxicológicos si, como en el caso de los bifosfonatos, puede demostrarse similaridad de comportamientos. Por ejemplo, como en humanos, ¹⁴C-olpadronato en ratas se distribuye rápidamente desde la sangre hasta el hueso ($t_{1/2}$ de distribución: 15 minutos), tiene una rápida eliminación renal y permanece en el esqueleto durante un largo período de tiempo (> 7 días) (datos en archivo, Gador SA). Relacionando la radioactividad presente en idénticas "áreas de interés" vertebrales en imágenes centellográficas por vías oral e intravenosa, se estimó una biodisponibilidad oral del 1% para ^{99m}Tc-lidadronato y un perfil de distribución y excreción similar a otros bifosfonatos en humanos y animales.⁵⁶

Desde el aspecto básico, los estudios farmacocinéticos experimentales tienen un rol relevante a la hora de ensayar nuevos derivados, conjugados o no, asociaciones y sus eventuales interacciones, nuevos regímenes de administración o sistemas originales de liberación, establecer especificidad de acción, relacionar con situaciones de afectación de las vías de excreción y correlacionar con su farmacodinamia y, al igual que ésta, con diseños más flexibles, no regulatorios, pueden desafiarse pre-conceptos.

2.5 Toxicología regulatoria y no tanto

Los estudios toxicológicos incluirán administraciones únicas (toxicidad aguda) o reiteradas (toxicidad crónica, carcinogénesis), en condiciones especiales (reproducción, gestación), emplearán las vías relevantes para el uso clínico (oral, intravenosa, localizada) y diferentes niveles de dosis (las máximas deberán demostrar un efecto tóxico) y en diferentes especies animales normales. Sus resultados tendrán gran impacto regulatorio y, al igual que la aparición de eventos adversos durante las etapas clínicas, podrán constituirse en el disparador de nuevas exigencias regulatorias.⁵⁷ Deberán seguirse

lineamientos pre-establecidos de diseño experimental, muchos de ellos armonizados (Conferencia Internacional de Armonización-ICH) y normas estrictas de calidad (buenas prácticas de laboratorio-GLP) para que autoridades sanitarias de alta exigencia los consideren aceptables.^{58,59}

La gran especificidad de acción de los bifosfonatos los ha favorecido desde el punto de vista de la toxicidad extra-esquelética.⁶⁰ La mayoría de los efectos tóxicos experimentales observados están asociados a altas dosis o altas concentraciones en zonas de contacto (irritación local de mucosas), vías de excreción (nefrotoxicidad) o por su acción farmacológica exagerada (inhibición extrema de la resorción ósea), pudiendo distinguirse algunas diferencias por características individuales de los distintos integrantes de la familia. Estos efectos llevaron al desarrollo de un importante número de modelos específicos o de la cuantificación de parámetros no solicitados, excediendo las exigencias regulatorias y tendientes a explicar los mecanismos subyacentes. En nuestro laboratorio se emplearon conejos (por su mayor sensibilidad) y ratas simultáneamente administradas con antiinflamatorios no esteroides (para sensibilizar a la mucosa gástrica) como modelos para destacar las diferencias de irritación de mucosas oral, esofágica y gástrica entre olpadronato, alendronato y pamidronato. En los estudios de administración parenteral, se evaluaron particularmente los parámetros de funcionalidad renal (*clearance* de creatinina). Olpadronato intravenoso en ratas (dosis diarias acumuladas hasta 50 mg/kg durante 1 mes, equivalentes a dosis humanas de aproximadamente 500 mg.) no afectaron ni la histología ni la funcionalidad renal. En ratas hembras administradas con altas dosis orales de olpadronato (10, 30 y 90 mg/kg) durante el apareamiento y la gestación temprana, la respuesta antiresortiva exagerada se reflejó en la disminución no significativa pero evidente, dosis-dependiente, de los niveles de calcio iónico sanguíneo (1,18; 1,15 y 1,06 mM para un valor promedio normal de 1,23 mM). Similares dosis en hembras no preñadas no permitieron apreciar esa misma tendencia. Este hecho podría explicarse por la mayor demanda de calcio durante ese período y a su vez, justifica las dificultades durante el parto descriptas en estas condiciones experimentales para todos los bifosfonatos conocidos (datos en archivo, Gador SA).

De estos y otros estudios toxicológicos se extraerá finalmente la información sobre órganos blancos de toxicidad y las dosis con las que no se observan efectos adversos (NOAEL) para estimar las dosis equivalentes humanas (HED) e iniciar o continuar estudios clínicos con un margen de seguridad aceptable para las autoridades de alta vigilancia sanitaria.

2.6 Conclusiones

La investigación básica y la evaluación farmacodinámica/farmacocinética de los bifosfonatos admiten gran flexibilidad de diseños y el desafío de paradigmas. Nos facilitaron el conocimiento de sus mecanismos y sitios de acción, generaron la base racional para nuevas indicaciones, y esperamos que en el futuro nos permitan detectar moléculas con perfiles diferenciales, con mejor biodisponibilidad oral, para administraciones más localizadas o sencillas y tal vez, para usos extra-esqueléticos.

En gran medida, nuestra libertad se encuentra restringida en los diseños toxicológicos convencionales, con un gran peso regulatorio, debiendo adoptar lineamientos específicos de diseño y aplicar buenas prácticas de laboratorio estándar con el objetivo primordial de anticipar eventuales riesgos durante las primeras exposiciones humanas.

Este artículo ha pretendido ejemplificar con algunos modelos experimentales, la forma en que los bifosfonatos, luego de su tímida irrupción en la terapéutica humana, poco a poco y a fuerza de evidencias, fueron abriendo el camino que actualmente los encuentra como referentes para distintas entidades patológicas del hueso.

Agradecimientos

A quienes en la Argentina, aun en aquellas épocas en que sólo constituían una esperanza para una enfermedad huérfana, contribuyeron al conocimiento de los efectos de los bifosfonatos: los deseados y los que no lo son tanto, a veces precaria o equivocadamente y otras con excelencia, pero siempre, con el fuego sagrado para saber "qué más pueden ofrecer".

Recibido: mayo de 2006. Aceptado: junio de 2006.

Referencias

1. Fleisch H, Russell RG, Simpson B, Muhlbauer RC. Prevention by a diphosphonate of immobilization "osteoporosis" in rats. *Nature* 1969; 223: 211-2.
2. Fleisch H, Russell RG, Francis MD. Diphosphonates inhibit hydroxyapatite dissolution in vitro and bone resorption in tissue culture and in vivo. *Science* 1969; 165: 1262-4.
3. Williams KR. The Bisphosphonates story: from detergents to bone disease. *J Chem Educ* 2004; 81: 1406-7.
4. Thrall JH. Technetium-99m labeled agents for skeletal imaging. *Crit Rev Clin Radiol Nucl Med* 1976; 8: 1-31.
5. Sikder MN, Itoh M, Iwatsuki N, Shinoda H. Inhibitory effect of a novel bisphosphonate, TRK-530, on dental calculus formation in rats. *J Periodontol* 2004; 75: 537-45.
6. Frith JC, Monkkonen J, Blackburn GM, Russell RG, Rogers MJ. Clodronate and liposome-encapsulated clodronate are metabolized to a toxic ATP analog, adenosine 5'-(beta, gamma-dichloromethylene) triphosphate, by mammalian cells in vitro. *J Bone Miner Res* 1997; 12:1358-67.
7. Luckman SP, Hughes DE, Coxon FP, Graham R, Russell G, Rogers MJ. Nitrogen-containing bisphosphonates inhibit the mevalonate pathway and prevent post-translational prenylation of GTP-binding proteins, including Ras. *J Bone Miner Res* 1998; 13: 581-9.
8. van Beek E, Pieterman E, Cohen L, Lowik C, Papapoulos S. Farnesyl pyrophosphate synthase is the molecular target of nitrogen-containing bisphosphonates. *Biochem Biophys Res Commun* 1999; 264: 108-11.
9. Rogers MJ. From molds and macrophages to mevalonate: a decade of progress in understanding the molecular mode of action of bisphosphonates. *Calcif Tissue Int* 2004; 75: 451-61.
10. Dunford JE, Thompson K, Coxon FP, et al. Structure-activity relationships for inhibition of farnesyl diphosphate synthase in vitro and inhibition of bone resorption in vivo by nitrogen-containing bisphosphonates. *J Pharmacol Exp Ther* 2001; 296: 235-42.
11. van Beek E, Pieterman E, Cohen L, Lowik C, Papapoulos S. Nitrogen-containing bisphosphonates inhibit isopentenyl pyrophosphate isomerase/farnesyl pyrophosphate synthase activity with relative potencies corresponding to their antiresorptive potencies in vitro and in vivo. *Biochem Biophys Res Commun* 1999; 255: 491-4.
12. Trechsel U, Stutzer A, Fleisch H. Hypercalcemia induced with an arotinoid in thyroparathyroidectomized rats. New model to study bone resorption in vivo. *J Clin Invest* 1987; 80: 1679-86.
13. Thompson K, Rogers MJ, Coxon FP, Crockett J C. Cytosolic entry of bisphosphonate drugs requires acidification of vesicles after fluid-phase endocytosis. *Mol Pharmacol* 2006; 69: 1624-32.
14. Halasy-Nagy JM, Rodan GA, Reszka AA. Inhibition of bone resorption by alendronate and risedronate does not require osteoclast apoptosis. *Bone* 2001; 29: 553-9.
15. Escudero ND, Bozal CB, Tomasi VH, Lacave M, Ubios AM, Mandalunis PM. Effect of olpadronate on osteoclasts: histochemical study. *Bone* 2006; 38: S5 (Abstract).
16. Vázquez G, Santillán G, Boland R, Roldán E, Pérez-Lloret A. Modulation of cytosolic calcium levels in osteoblast-like osteosarcoma cells by olpadronate and its amino-derivative IG-9402. *Calcif Tissue Int* 2003; 72: 215-21.
17. Plotkin LI, Weinstein RS, Parfitt AM, Roberson PK, Manolagas SC, Bellido T. Prevention of osteocyte and osteoblast apoptosis by bisphosphonates and calcitonin. *J Clin Invest* 1999; 104: 1363-74.
18. Van Offel JF, Schuerwegh AJ, Bridts CH, Stevens WJ, De Clerck LS. Effect of bisphosphonates on viability, proliferation, and dexamethasone-induced apoptosis on articular chondrocytes. *Ann Rheum Dis* 2002; 61: 925-8.
19. Kunzmann V, Jomaa H, Feurle J, Bauer E, Herderich M, Wilhelm M. Stimulation of gamma delta T cells by aminobisphosphonates used in treatment of bone disorders. *Blood* 1997; 90(Suppl): 575 (abstract).
20. Sanders JM, Ghosh S, Chan JM, et al. Quantitative structure-activity relationships for gammadelta T cell activation by bisphosphonates. *J Med Chem* 2004; 47: 375-84.
21. Rogers MJ, Watts DJ, Russell RG, et al. Inhibitory effects of bisphosphonates on growth of amoebae of the cellular slime mold *Dictyostelium discoideum*. *J Bone Miner Res* 1994; 9: 1029-39.
22. Urbina JA, Moreno B, Vierkotter S, et al. Trypanosoma cruzi contains major pyrophosphate stores, and its growth in vitro and in vivo is blocked by pyrophosphate analogs. *J Biol Chem* 1999; 274: 33609-15.
23. Martin MB, Grimley JS, Lewis JC, et al. Bisphosphonates inhibit the growth of *Trypanosoma brucei*, *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania donovani*, *Toxoplasma gondii*, and *Plasmodium falciparum*: a potential route to chemotherapy. *J Med Chem* 2001; 44: 909-16.
24. Gabelli SB, McLellan JS, Montalvetti A, Oldfield E, Docampo R, Amzel LM. Structure and mechanism of the farnesyl diphosphate synthase from *Trypanosoma cruzi*: implications for drug design. *Proteins* 2006; 62: 80-8.
25. Santini D, Vespasiani GU, Vincenzi B, et al. The antineoplastic role of bisphosphonates: from basic research to clinical evidence. *Ann Oncol* 2003; 14: 1468-76.
26. Shipman CM, Rogers MJ, Apperley JF, Russell RG, Croucher PJ. Bisphosphonates induce apoptosis in human myeloma cell lines: a novel anti-tumour activity. *Br J Haematol* 1997; 98: 665-72.
27. Ullen A, Lennartsson L, Harmenberg U, Hjelm-Eriksson M, et al. Additive/synergistic antitumoral effects on prostate cancer cells in vitro following treatment with a combination of docetaxel and zoledronic acid. *Acta Oncol* 2005; 44: 644-50.
28. Preclinical and clinical evaluation of agents used in the prevention or treatment of postmenopausal osteoporosis (Draft). *FDA guidance*, April 1994.
29. Turner CH, Burr DV. Experimental Techniques for Bone Mechanics. En: *Bone Mechanics Handbook*, CRC Press, 2nd Edition. 2001: Pp 7-1 a 7-35.
30. Reitsma PH, Bijvoet OL, Verlinden-Ooms H, van der Wee-Pals LJ. Kinetic studies of bone and mineral metabolism during treatment with (3-amino-1-hydroxypropylidene)-1,1-bisphosphonate (APD) in rats. *Calcif Tissue Int* 1980; 32: 145-57.
31. Goya JA, Páez HA, Mandalunis PM. Effect of topical administration of monosodium olpadronate on experimental periodontitis in rats. *J Periodontol* 2006; 77: 1-6.
32. Sivak MG, Mandalunis PM, Guglielmotti MB. Effect of olpadronate on post-tooth healing in rats. A chronodynamic study. *Bone* 2006; 38(Suppl 1): 62 (abstract).
33. Summerlin DJ, Krowiak E, Huntley T, Freeman S, Borrowdale R, Tomich A. Osteonecrosis of the mandible or maxilla associated with the use of new generation bisphosphonates. *Laryngoscope* 2006; 116: 115-20.
34. Sivak MG, Renou SJ, Mandalunis PM, Guglielmotti MB. Effect of olpadronate on peri-implant bone healing: an experimental study in rats. *Bone* 2006; 38: S4 (Abstract).
35. Peter B, Pioletti DP, Laib S, et al. Calcium phosphate drug delivery system: influence of local zoledronate release on bone implant osteointegration. *Bone* 2005; 36: 52-60.

36. Zeni S, Gómez-Acotto C, Mautalen C. The effect of olpadronate in ovariectomized thyroxine-treated rats. *Bone* 1997; 21: 329-33.
37. Tomat A, Gamba CA, Mandalunis P, et al. Changes in bone volume and bone resorption by olpadronate treatment in an experimental model of uremic bone disease. *J Musculoskelet Neuronal Interact.* 2005; 5: 174-81.
38. Zeni SN, Gregorio S, Gómez-Acotto C, Somoza J, Mautalen C. Olpadronate prevents the bone loss induced by cyclosporine in the rat. *Calcif Tissue Int* 2002; 70: 48-53.
39. Mastaglia SR, Pellegrini GG, Gonzales Chaves M, Mandalunis P, Friedman SM, Zeni SN. The vitamin D insufficiency reduces the protective effect of bisphosphonate on ovariectomy-induced bone loss in rats. *Bone* 2006; en prensa.
40. Ferretti JL, Delgado CJ, Capozza RF, et al. Protective effect of disodium etidronate and pamidronate against the biomechanical repercussion of betamethasone-induced osteopenia in growing rat femurs. *Bone Miner* 1993; 20: 265-76.
41. Mondelo N, Parma MD, Peluffo VA, Zanchetta JR, Piccinni E, Montuori E. Efecto de olpadronato y pamidronato sobre la masa ósea. *Medicina (B. Aires)* 1997; 57(Supl 1): 17-24.
42. Davicco MJ. Parathyroid hormone-related peptide (PTHrP). *Reprod Nutr Dev* 1990; 30: 639-51.
43. Parma M, García C, Diamant M, Klein S, Peluffo V, Piccinni E, Mondelo N. Effect of Olpadronate (OPD) on the hypercalcemia induced by a murine lung adenocarcinoma. *Bone* 1998; 22: 699 (abstract).
44. Neudert M, Fischer C, Krempien B, Baus F, Seibel MJ. Site-specific human breast cancer (MDA-MB-231) metastases in nude rats: model characterisation and in vivo effects of ibandronate on tumour growth. *Int J Cancer* 2003; 107: 468-77.
45. Yang M, Burton DW, Geller J, et al. The bisphosphonate olpadronate inhibits skeletal prostate cancer progression in a green fluorescent protein nude mouse model. *Clin Cancer Res* 2006; 12: 2602-6.
46. Fournier P, Daubine F, Lundy MW, Ebetino FU, Clezardin P. The direct antitumor activity of bisphosphonates in vivo depends on their bone mineral affinity. *Bone* 2006; 38(Suppl): S45 (abstract).
47. Wood J, Bonjean K, Ruetz S, et al. Novel antiangiogenic effects of the bisphosphonate compound zoledronic acid. *J Pharmacol Exp Ther* 2002; 302: 1055-61.
48. Fournier P, Boissier S, Filleur S, et al. Bisphosphonates inhibit angiogenesis in vitro and testosterone-stimulated vascular regrowth in the ventral prostate in castrated rats. *Cancer Res* 2002; 62: 6538-44.
49. van der Pluijm G, Vloedgraven H, van Beek E, van der Wee-Pals L, Lowik C, Papapoulos S. Bisphosphonates inhibit the adhesion of breast cancer cells to bone matrices in vitro. *J Clin Invest* 1996; 98: 698-705.
50. Heikkilä P, Teronen O, Moilanen M, et al. Bisphosphonates inhibit stromelysin-1 (MMP-3), matrix metalloelastase (MMP-12), collagenase-3 (MMP-13) and enamelysin (MMP-20), but not urokinase-type plasminogen activator, and diminish invasion and migration of human malignant and endothelial cell lines. *Anticancer Drugs* 2002; 13: 245-54.
51. Sevcik MA, Luger NM, Mach DB, et al. Bone cancer pain : the effects of the bisphosphonate alendronate on pain, skeletal remodeling and tumor necrosis *Pain* 2004; 111: 169-80.
52. van Rooijen N, van Kesteren-Hendrikx E. Clodronate liposomes: perspectives in research and therapeutics. *J Liposome Research* 2002; 12: 81-94.
53. Barrera P, Blom A, van Lent PL, et al. Synovial macrophage depletion with clodronate-containing liposomes in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2000; 43: 1951-9.
54. Alves-Rosa F, Stanganelli C, Cabrera J, et al. Rapid recovery of platelet count following administration of liposome-encapsulated clodronate in a mouse model of immune thrombocytopenia. *Brit J Haematol* 2002; 116: 357-66.
55. Hirabayashi H, Fukisaki K. Bone-specific drug delivery systems: approaches via chemical modification of bone-seeking agents. *Clin Pharmacokinet* 2003; 42: 1319-30.
56. Mondelo N, Balbuena R, Rácaro G, et al. Marcación con ^{99m}Tc para estimar biodisponibilidad absoluta de un nuevo bisfosfonato. *Libro de Resúmenes del XIII Congreso Argentino de Biología y Medicina Nuclear*. Buenos Aires, 2001 (resumen).
57. Development of Parathyroid hormone for the prevention and treatment of osteoporosis. *FDA Guidance for Industry (Draft)*; May 2000.
58. Safety topics in www.ich.org
59. Organization for Economic cooperation and Development. Good laboratory practice principles, 1998.
60. Mondelo N, Peluffo VA, Parma MD, et al. Toxicología preclínica de bisfosfonatos. *Medicina (B. Aires)* 1997; 57(Supl 1): 93-100.