

ESTUDIOS MORFOLOGICOS DE LOS CRISTALES DE HIDROXIAPATITA TRATADOS CON PAMIDRONATO DISODICO

LIDIA E. HEIN, REYNALDO L. GRASSI, EMILIO J. A. ROLDAN**, DANIEL GREGORI*, MARIA E. VARELA, ENRIQUE P. PICCINI**

*Departamentos de Química e Ingeniería Química y CIC Provincia de Buenos Aires; * Departamento de Geología, Universidad Nacional del Sur, Bahía Blanca; ** Gador SA, Buenos Aires*

Resumen Con técnicas de rayos-x y espectrometría se estudiaron los efectos "in vitro" del pamidronato disódico sobre la morfología de los cristales de hidroxiapatita. Los estudios se realizaron sobre hidroxiapatita sintética expuesta a diferentes tiempos, 48, 120 y 168 horas y concentraciones, $1 \times 10^{-5}M$, hasta $1 \times 10^{-4}M$ de pamidronato. Se realizaron algunas observaciones adicionales "in vivo" en polvo de vértebras y tibias de conejos, jóvenes y maduros, tratados con pamidronato. La técnica de rayos-x reveló la existencia de un cristal puro en el sistema hexagonal y el análisis de adsorción mostró la completa afinidad del pamidronato por la hidroxiapatita. En la preparación "in vitro" el pamidronato demostró modificar algunos planos con tendencia a alargar la forma del cristal, especialmente con las concentraciones elevadas. En el material proveniente de animales jóvenes se observan cambios más marcados en las epífisis. En muestras aisladas de los animales maduros se verifican cristales más cortos en las vértebras, y más alargados en la diáfisis de las tibias. En las condiciones del experimento, se concluye que los bisfosfonatos pueden modificar "in vitro" la forma del cristal, al menos en concentraciones altas. Además se muestran ejemplos de cambios "in vivo" que pueden estar afectados por factores regionales. Dada la limitación de estas últimas observaciones, la extrapolación de los resultados a la mujer osteoporótica tratada requerirá de mayor información. Puede sugerirse, sin embargo, que toda medicación que afecte las células óseas (todos los anti-osteoporóticos conocidos) pueden alterar la calidad de la hidroxiapatita y se necesitarán de estudios cristalográficos para evaluar los efectos de la misma sobre la calidad material del hueso.

Palabras clave: hidroxiapatita, pamidronato, cristalografía

Los amino-bisfosfonatos son agentes que utilizados en ciertas dosis, inducen un mejoramiento en la competencia mecánica del esqueleto^{1, 3}, hecho que se aprovecha para el tratamiento de las osteoporosis, una enfermedad de los huesos en la cual existe una fragilidad mayor a la normal y predisposición a las fracturas.

La fragilidad típica de la osteoporosis es producto de una pérdida neta de masa ósea (cantidad) y alteraciones en la microestructura del hueso

(calidad). En parte, ambos defectos son motivados por la excesiva actividad de la Unidad Multicelular Osea, conocida con las siglas del inglés BMU. Actualmente se trata a la osteoporosis con medicaciones que, actuando sobre la BMU, tienden a aumentar el contenido mineral óseo (cantidad). Sin embargo, la ganancia neta de masa ósea no siempre implica una disminución de la fragilidad del hueso como ha sido demostrado en modelos experimentales y por evidencias clínicas^{1, 4, 5}. Quiere decir que los defectos cualitativos que la enfermedad provoca sobre el material óseo también tienen su importancia. Probablemente, la variación en la tasa de fracturas

Dirección postal: Reinaldo L. Grassi, Dpto de Química e Ingeniería Química, Universidad Nacional del Sur, 8000 Bahía Blanca, Argentina.

óseas, promovida por algunos medicamentos, se deba más a acciones directas o indirectas sobre la calidad del hueso que a la cantidad de mineral que puedan azarosamente acumular en una región esquelética determinada.

Los amino-bisfosfonatos son agentes sintéticos que actúan inhibiendo la frecuencia de activación de la BMU. A su vez, el grado de activación de la BMU influye sobre las propiedades materiales del tejido óseo⁶⁻⁷. Dicho material está mayormente compuesto por una matriz de colágeno, en gran parte de tipo I, en el seno de la cual crecen los cristales de hidroxiapatita. Estos cristales tienen un aspecto poligonal, anguloso, de aproximadamente 30 y 60 Amstrongs de ancho y de alto. Están compuestos mayormente por fosfatos y calcio. La cantidad, crecimiento, forma, agrupamiento y disposición espacial de los cristales, es decir, gran parte de la calidad material del hueso, depende de la actividad de la BMU, que a su vez es modificable por los bisfosfonatos. Más aún, por su analogía química con el pirofosfato inorgánico, los bisfosfonatos se adsorben a los cristales y podrían directamente modificar su crecimiento y solubilidad, alterando su morfología.

Mediante las pruebas biomecánicas de huesos tratados con amino-bisfosfonatos se obtiene cierta información general sobre las variaciones provocadas en las propiedades del material óseo, como el módulo de elasticidad y el estrés o la deformación elástica límite². Pero, el efecto particular de los bisfosfonatos sobre los cristales de hidroxiapatita, no ha sido descrito.

En este trabajo se describen los efectos "in vitro" del pamidronato disódico, un bisfosfonato ampliamente utilizado para el tratamiento de las osteopatías médicas, sobre la morfología de los cristales de hidroxiapatita sintéticos. Secundariamente se comunican algunas observaciones realizadas "in vivo" a partir de cristales provenientes de huesos de conejos tratados con pamidronato. Estas últimas aportan una evidencia de los efectos mediados por la interacción de diversos factores.

Material y métodos

Obtención de los cristales de hidroxiapatita. La preparación de hidroxiapatita $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, fue llevada a cabo mediante el procedimiento de N. Rígoli y col⁸, que es una modificación de la técnica de E. Hayek. Se ad-

ciona una solución de $\text{PO}_4\text{H}(\text{NH}_4)$ a pH 9,9 sobre la solución de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ a pH 10,5, con agitación energética. Se forma un gel que es filtrado, lavado repetidas veces con agua y secado en estufa a una temperatura de 120°C, para someterlo luego a tratamiento térmico en mufla. Este preparado se controló por difracción de rayos x, espectrofotometría infrarroja y Raman.

Además, de conejos tratados "in vivo" con pamidronato se extrajeron las vértebras y tibias, separándose en estas las epífisis y diáfisis; las que fueron pulverizadas para el análisis cristalográfico.

Estudios morfológicos del cristal. La morfología del cristal se determinó por la medición de los distintos planos del mismo. Para ello se realizaron estudios de rayos x con un equipo Rigaku Geigerflex de goniómetro horizontal y de amplio ángulo de barrido. Cada una de las muestras fue montada sobre la moldura de un portamuestra especial de vidrio, levemente presionado para evitar pérdidas. Se coloca el portamuestra en el goniómetro y se irradia en las siguientes condiciones de trabajo: corriente 15mA, voltaje 35kV, potencia 1KV, zona de exploración 2-60° 2θ, velocidad 4°/minuto. Las intensidades de las reflexiones registradas se expresaron en cuentas por segundo.

En el análisis de las muestras tratadas con diferentes concentraciones de pamidronato se pudieron reconocer dos etapas:

Etapa I; Análisis automático, donde el equipo filtra las reflexiones debidas a la emisión $\text{K}\alpha_2$, establece las posiciones angulares de las difracciones, calculando mediante la Ley de Bragg los valores espaciados, expresándolos en Angstroms. Etapa II; Análisis manual, ejecutando por el operador, permite eliminar o introducir reflexiones, que el equipo, ya sea por falta de cristalinidad o nivel bajo de conteo ponderó en forma errónea. En esta etapa de estudio se realiza la integración de las difracciones con el objeto de establecer el tamaño de los cristalitas. La medición del tamaño de éstos, está basada en la ecuación desarrollada por Scherrer⁹, la cual se expresa de la siguiente manera:

$$D = k\lambda/\beta \cos \theta$$

Donde "D" representa el valor del cristallito, expresado en Amstrongs; k es una constante que depende de la geometría del equipo, λ es la longitud de onda de la radiación empleada; β es el ancho de la banda de difracción, medida a la mitad de su altura y θ es el ángulo de Bragg. El valor de λ permanece constante durante todo el estudio y corresponde a 1,53 Å, que es el valor de emisión del anticátodo de Cobre. Durante la etapa de integración, el equipo de difracción calcula el valor de β y el valor de θ , para la banda de difracción seleccionada por el operador. Una vez determinados estos valores se procedió al cálculo de "D", mediante el programa Size, el cual computa la ecuación de Scherrer, solicitando los valores de β , θ , la denominación de Muller del plano a estudiar y el

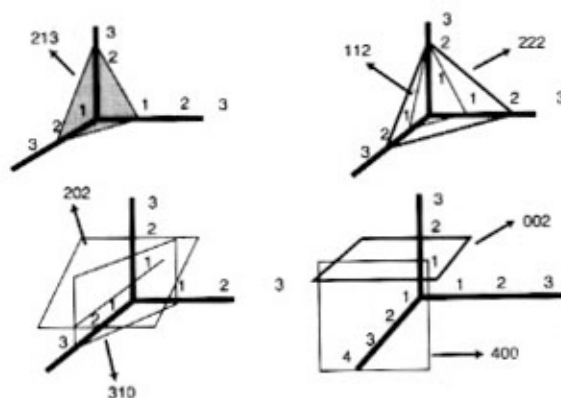


Fig. 1.- Cristalinidad de hidroxiapatita. Esquema de la ubicación espacial de los planos medidos sobre los ejes hkl, de acuerdo con la notación de Müller.

valor de la constante k (figura 1). Finalizada la secuencia de computación se obtiene un número, en Å, que representa la distancia, tomada en forma perpendicular, que hay entre el plano inclinado y el origen de coordenadas del sistema cristalográfico al cual pertenece el cristal estudiado.

También se estudiaron los cristales de hidroxiapatita mediante espectros de infrarrojo, realizados con un espectrofotómetro Nicolette, modelo 520-FTIR, aplicándose una resolución de 4 cm^{-1} , los resultados fueron el promedio de 20 barridos. Los espectros Raman fueron realizados mediante un accesorio FRA 106, montado sobre un banco óptico de un espectrofotómetro transformada de Fourier, Bruker IFS 66. La fuente de excitación es la línea de 1064 nm de un láser de estado sólido Nd/YAG. Se estableció también el área superficial por adsorción de gas nitrógeno (BET), indicando una superficie de $60 \text{ m}^2/\text{g}$. Todas las experiencias se efectuaron por duplicado y los resultados se expresan por el promedio de la muestra.

Calidad del bisfosfonato. El amino-bisfosfonato estudiado es el pamidronato o 3-amino-1-hidroxipropilideno-1,1-bisfosfonato disódico (APD- Na_2), sintetizado por Gador SA, de Buenos Aires. En nuestro laboratorio se realizó la caracterización cristalina de este compuesto mediante rayos x, espectrofotometría de infrarrojo, calorimetría diferencial (SCD) y análisis termogravimétrico (TEG).

Adsorción del bisfosfonato y soluciones de estudio. Todos los estudios de adsorción fueron realizados con una solución equilibrada con hidroxiapatita, por lo que el efecto potencial de la disolución de los cristales durante la experiencia fue minimizada. Esta solución fue preparada a fuerza iónica constante, 10 M formada por $0,09$ en CaCl_2 y $0,01$ en barbital, después de realizar varias experiencias, a fin de evitar la precipitación de APD-Ca; posteriormente se agregaron $1,5 \text{ g}$ de hidroxiapatita, por cada litro de solución buffer, su pH fue ajustado a $7,0$ con hidróxido de calcio y posteriormente agitada durante 3 días a temperatura de 20°C y luego filtrada con Millipore.

Se le hicieron ensayos de fósforo y calcio con resultado negativo. A partir de esta solución equilibrada se efectuaron diferentes tiempos de contacto con APD- Na_2 : 48, 120 y 168 horas, con soluciones de concentración: $1 \times 10^{-5} \text{ M}$, $3 \times 10^{-5} \text{ M}$, $8 \times 10^{-5} \text{ M}$ y $1 \times 10^{-4} \text{ M}$ de complejante, a temperatura de 20°C , luego se filtró utilizando Millipore. La hidroxiapatita así tratada, fue estudiada por rayos x y microscopía electrónica. La solución resultante fue titulada con sulfato de Cu (II) de concentración $2,24 \times 10^{-4} \text{ M}$, con borato de sodio como buffer de pH 9,9; mediante un electrodo de iones específicos de Cu, a fin de establecer las cantidades de APD- Na_2 adsorbidas sobre hidroxiapatita, usándose la diferencia entre las concentraciones iniciales y las medidas por potenciometría. En todos los casos se trabajó con blancos de solución equilibrada y APD- Na_2 .

Estadística. A fin de obtener una cuantificación de la variación de la cristalinidad, los datos de ancho de pico, valor angular de la difracción y diferentes constantes fueron introducidas en el programa computarizado "Size", el cual calculó la distancia que hay entre el centro de coordenadas imaginario del cristal y el plano elegido. La diferencia entre el crecimiento de los planos se analizó con la prueba de comparación de regresiones lineales por "Statistica" (StatSoft Inc, Tulsa, USA).

Resultados

Control de la preparación de APD-hidroxiapatita. Los estudios de hidroxiapatita con espectroscopia infrarroja o Raman, con las distintas concentraciones de APD- Na_2 y distintos tiempos de contacto, no resultaron concluyentes con esas metodologías. La espectroscopia Raman mostró un enorme fluorescencia de fondo, debido a este inconveniente no se pudo visualizar la adsorción. En los espectros infrarrojos, las zonas de adsorción coincidieron con las bandas propias de la hidroxiapatita, por lo que tampoco esta técnica dio resultados significativos.

En cambio, los difractogramas de rayos X indicaron la presencia de hidroxiapatita pura, cristalinizada en el sistema hexagonal (figura 2) y mediante esta técnica se pudo establecer los efectos que el agregado del APD- Na_2 causó en la cristalinidad de la hidroxiapatita.

Morfología del cristal de hidroxiapatita, in vitro. Los resultados obtenidos con los diferentes tratamientos de la hidroxiapatita con pamidronato en diferentes tiempos de contacto y concentraciones, se observan en la figura 3.

Cuando se mantuvo el tiempo constante y se varió la concentración de APD- Na_2 , para un tiempo

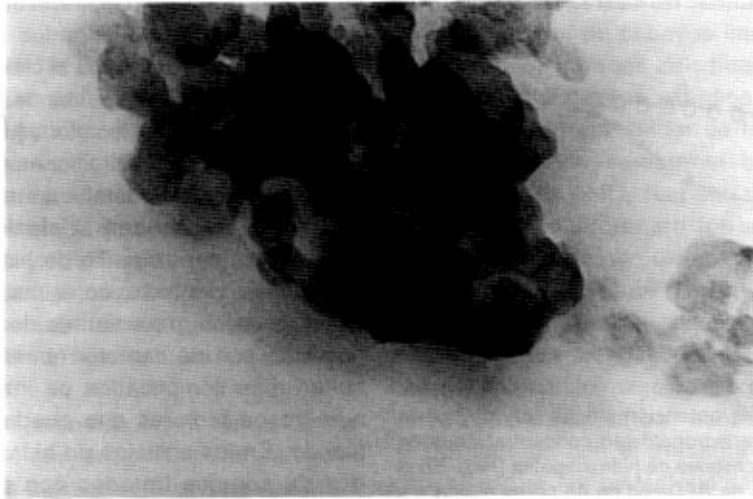


Fig. 2.- Fotomicrografía de los cristales de hidroxiapatita sintetizados para el estudio de difracción de rayos X (aumento x 200.000).

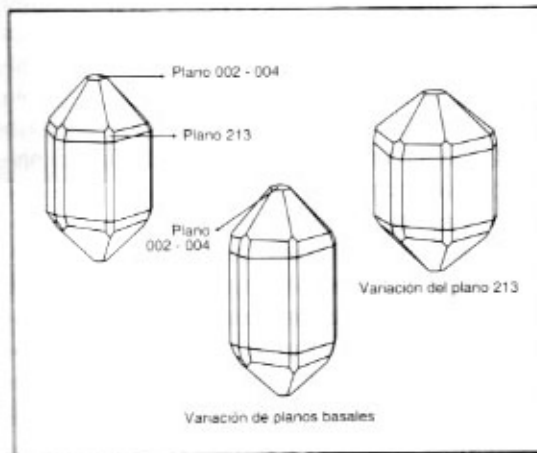


Fig. 3.- Planos del cristal de hidroxiapatita que experimentan variaciones al ser expuestos al pamidronato.

po de contacto de 48 horas, ocurrió un leve crecimiento del plano 002, un comportamiento aleatorio en el 213 y uno más marcado en el plano 004. Cuando el tiempo de contacto fue de 120 horas, hubo estabilidad en el 002 y crecimiento neto en los planos 004 y 213. Con el tiempo de contacto de 168 horas se comprueba el crecimiento en los tres planos mencionados. El crecimiento en los planos basales está directamente relacionado a las mayores concentraciones. El plano 213 presenta un crecimiento notorio desde $8 \times 10^{-5}M$ a $1 \times 10^{-4}M$. El tiempo de contacto no influyó significativamente sobre el tipo de variación en los planos estudiados (p:n.s.).

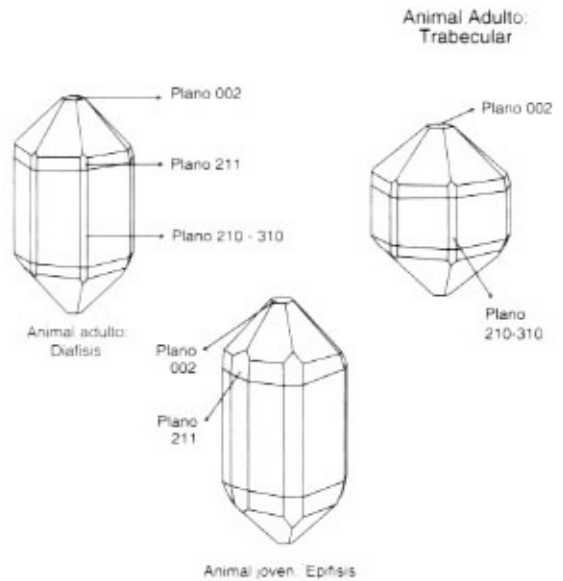


Fig. 4.- Efectos del pamidronato sobre la cristalinidad "in vivo" de la hidroxiapatita en muestras obtenidas de la diáfisis y epífisis de tibia de un conejo joven y de trabéculas de vértebra de un animal adulto.

Ejemplos de cristales tratados in vivo. Los datos "in vivo" se resumen en la figura 4. Los planos que experimentan cambios son el 002, 211, 210 y 310. En las muestras provenientes de animales jóvenes (n:3), existe crecimiento de los planos 002 y 211, tanto en epífisis como en diáfisis, con respecto de los no tratados. Siendo

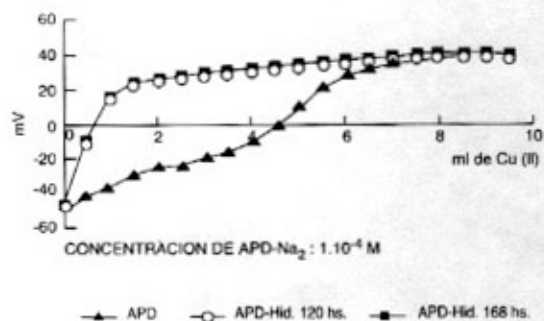
POTENCIOMETRIA del APD- Na_2 

Fig. 5.- Titulaciones potenciométricas (en mV) de la adsorción del pamidronato (en concentraciones de 1×10^{-4} M) a los cristales de hidroxiapatita (Hid). En el gráfico, la curva de APD-Hid de 48 horas queda superpuesta con la de los otros tiempos.

la variación más notoria en epífisis. En el grupo de animales adultos (n:4) se presenta un decrecimiento del plano basal 002 y variaciones en los planos 210 y 310, tanto en el material proveniente de vértebras, donde el cristal tiende a acortarse, como en la diáfisis de tibia, el cristal tiende a alargarse, siendo la variación más notoria en el material vertebral.

Adsorción del pamidronato. En el rango de 1×10^{-5} a 1×10^{-4} M, el bisfosfonato es absorbido totalmente, lo que demuestra la gran afinidad de éste por la hidroxiapatita. Los resultados obtenidos a partir de las titulaciones, para una concentración de 1×10^{-4} M, se indican en la figura 5. En la misma, las inflexiones características del ácido fosfónico (curva de APD sin hidroxiapatita) desaparecen al realizar la titulación potenciométrica después del correspondiente tiempo de contacto, indicando la total desaparición del APD libre. Las titulaciones posteriores al contacto, dan un gráfico igual para todos los casos ya que corresponden a la detección del cobre libre, que es agregado como titulante en forma de sulfato de cobre (II).

Discusión

La adsorción de los bisfosfonatos a los cristales de hidroxiapatita es un hecho conocido¹⁰. Las consecuencias de este "anclaje" han sido estudiadas en relación a la acción inhibitoria de la resorción ósea de estos agentes, pero no con res-

pecto a las consecuencias sobre el propio cristal.

El pamidronato provoca el crecimiento "in vitro" del cristal de hidroxiapatita de algunos planos, más notoriamente en los planos basales 002, 004 y al utilizar las concentraciones mayores se alarga el plano 213. Podemos considerar que estos cambios corresponden al efecto aislado de un bisfosfonato en un medio de hidroxiapatita.

En un medio biológico el resultado puede variar. Los datos provenientes de material tratado "in vivo", son de carácter observacionales y resultan más complicados de interpretar por los numerosos factores que pueden estar interactuando. En los cristales de hidroxiapatita obtenidos de conejos tratados con pamidronato, se muestran modificaciones en el plano basal 002 y en los planos 210, 211, 310 que tienden a alargar el cristal en hueso compacto diafisario y a comprimirlo en el hueso trabecular, del cuerpo vertebral. Para determinar si tales modificaciones son positivas, restaría en este modelo determinar los cambios producidos por una ooforectomía o cualquier otro estímulo activador de la BMU, y el efecto del bisfosfonato sobre el cristal del animal ooforectomizado. Además, si se desea la extrapolación de estos datos a la mujer osteoporótica deben plantearse más interrogantes aún, por ejemplo: 1. Las diferencias de especie y de edad, si bien el material óseo parece ser similar entre todos los mamíferos, muchos estudios experimentales se llevan a cabo en animales jóvenes. En estos existen algunas diferencias en la composición mineral de los huesos; por ejemplo, el contenido en Mg es importante en la infancia pero no durante la maduración del esqueleto de cada especie¹¹; 2. La composición del cristal en el humano de edad avanzada también difiere por la relación Ca/P, la que aumenta con la edad, y esto parece tener relación con la solubilidad del material¹¹; 3. El defecto cualitativo provocado por la osteoporosis humana no necesariamente es reproducible en los modelos de osteopenia experimental y 4. La interacción regional del uso desuso mecánico tampoco es reproducible en los modelos experimentales. Efectivamente, los cristales tienden a comprimirse en el material proveniente de las trabéculas de conejos adultos, y a alargarse en las diáfisis de jóvenes y adultos. Este fenómeno parece responder más a un estímulo local que a la dosis administrada del

pamidronato, o en todo caso a la interacción de ambos. La forma del cristal sugiere un compactamiento diferencial "in vivo", ya sea que el hueso deba someterse más a compresiones (muestra de vértebras) o más a estiramientos o flexiones (muestra de diáfisis). Sin embargo estas ideas deberán estudiarse con una metodología distinta. En términos de eficiencia mecánica, esta diferencia regional hace presumir que el bisfosfonato interactúa con estímulos adaptativos locales, contrariamente habría que esperar una deformación uniforme si sólo fuera inducida por el fármaco.

Además, las diferencias en la forma de los cristales provenientes de los experimentos "in vivo", de polvo de trabéculas o epífisis o diáfisis de tibias de conejo, respecto de los cristales tratados "in vitro" puede estar también motivadas por las diferentes concentraciones de pamidronato que ha sido expuesto a los cristales de hidroxiapatita en uno u otro caso. Efectivamente, la concentración de pamidronato estudiada "in vivo" correspondió aproximadamente a las dosis diarias administradas por JL Ferretti y col¹ en los grupos 1 a 3 de ratas intactas sometidas a estudios biomecánicos del fémur (de 4,5 µg/Kg a 0,45 mg/Kg/día) y que cubren el rango de dosis terapéuticas en humanos. Dichos autores estudiaron los efectos del rango completo de dosis de pamidronato, y en los niveles posológicos citados verificaron la producción de un material óseo más competente ante el estímulo deformante, implicando que el pamidronato produce efectivamente una mayor resistencia a la fractura. Es decir, que "in vivo" se han estudiado dosis que producen concentraciones útiles y no tóxicas en el hueso. La extrapolación de las cantidades estudiadas "in vitro" es más compleja. Se ha descrito para el pamidronato actividad sobre las células óseas en concentraciones de $3 \times 10^{-8}M$ o menos, mientras que se requieren concentraciones superiores a $1 \times 10^{-5}M$ para afectar la solubilidad del mineral². Significa que hemos estudiado "in vitro" un rango de concentraciones relativamente altas, siendo la superior, de $1 \times 10^{-4}M$, probablemente tóxica.

En consecuencia los datos arriba descritos deben entenderse en función estricta de las limitaciones del diseño experimental.

Existe el antecedente de P. Fratzl et al³ de estudios "in vivo", quienes comparan el tamaño

y la forma de cristales de hidroxiapatita, obtenida de vértebras de cobayos intactos, de 9 meses de edad, tratados con fluoruro de sodio o alendronato. En estos estudios, se comprueba que el flúor, un acelerador de la BMU, deforma los cristales, en cambio el bisfosfonato, un frenador de la BMU, respeta su conformación biológica. El alendronato fue administrado en dosis de 1 mg/Kg/día. Comparativamente superior a la dosis usual en humanos, pero la cantidad total de moléculas administradas es inferior a la de nuestro experimento. Las distintas técnicas experimentales empleadas no permiten mayores comparaciones con nuestros resultados.

De acuerdo con el presente experimento se concluye que los bisfosfonatos pueden inducir cambios concentración-dependientes en la morfología del cristal de hidroxiapatita. También se postula que en los modelos experimentales "in vivo" los bisfosfonatos pueden interactuar con otros factores adaptativos. Estos últimos deben estudiarse muchos más detalladamente si se desea intentar una extrapolación del fenómeno observado a la problemática de la mujer osteoporótica tratada con el bisfosfonato.

Por último, se sugiere que cualquier medicación que modifique la actividad de la BMU (todos los anti-osteoporóticos conocidos) pueden alterar la calidad del cristal de hidroxiapatita, se adsorban o no al mineral. Este fenómeno sería de importancia porque afectaría las propiedades del hueso independientemente de la ganancia mineral que en él provoquen. En consecuencia, para evaluar el efecto de medicamentos sobre la fragilidad del esqueleto, también se necesita de estudios cristalográficos, en huesos tratados con anti-osteoporóticos.

Summary

Morphological studies of hydroxyapatite crystal exposed to disodium pamidronate

"In vitro" effects of disodium pamidronate on hydroxyapatite crystals morphology, and some "in vivo" data from bone powder of tibia and vertebrae from treated young and mature rabbits are here reported. Hydroxyapatite, synthesized following Rigoli et al method, and bone powder from rabbits were studied with X-ray, infrared and raman emission techniques for crystallographic

analysis. Adsorption studies were also performed with a balanced solution of hydroxyapatite exposed to different times, 48, 120 and 168 hours and concentrations $1 \times 10^{-5}M$, $3 \times 10^{-5}M$, $8 \times 10^{-5}M$ y $1 \times 10^{-4}M$ of pamidronate. Infrared and raman spectrometry were not conclusive due to technical bias, but X-ray diffractograms showed pure hydroxyapatite crystals in an hexagonal system. At constant time, pamidronate concentrations were varied, showing after 48 hours of exposition, a slight growth in the 002 plane, an aleatoric behavior in 213 and a marked increase in 004. After 120 hours, 002 plane is steady with a net growth in 004 and 213. After 168 hours, the 3 mentioned planes grow in proportion to pamidronate concentrations, tending to enlarge the crystal shape. Plane 13 markedly grow with pamidronate $8 \times 10^{-5}M$ a $1 \times 10^{-4}M$, which are biologically high concentrations. Potentiometric assessments, in the 1×10^{-5} to $1 \times 10^{-4}M$ range of concentrations show that bisphosphonate was completely adsorbed to the crystals. Additional "in vivo" observations showed changes in bone powder crystals isolated from pamidronate treated young animals, involving a growing of planes 002 and 211, in samples from both epiphysis and diaphysis, regarding untreated samples. Changes were more evident at epiphysis. In mature rabbits, it was shown a decrease in basal plane 002 and growing at 210, 211 and 310 with a trend to enlarge the crystal shape in diaphysis and to shorten it in vertebrae spongiosa. The "in vivo" doses are equivalent to those used by Ferretti et al. in intact rats with pamidronate low dose groups, showing an improvement of bone material properties and stiffness. Thus, it may rather be lower than the "in vitro" used concentrations.

In concordance with above experimental conditions it can be concluded that bisphosphonates exert morphological changes in hydroxyapatite crystals, in a dose dependent manner, at least when high concentrations are used. In addition, it is postulated that changes observed on "in vivo" samples may be the result with other adaptative factors as for example the local mechanical usage. The latter data were limited, and should be studied with more details if an extrapolation to the bisphosphonate treated osteoporotic women is intended. Finally, it is suggested that any agent that changes BMU activity (all known anti-osteoporotic drugs) may

potentially modify the quality of hydroxyapatite crystals, affecting in turn the bone resistance to fracture, independently from the quantity of bone mass gained. Thus, to help predicting the consequences on skeletal fragility, there is a need to know the direct or indirect effect of drugs on bone crystals.

Bibliografía

1. Ferretti JL, Cointy G, Capozza R, Montuori E, Roldán E, Pérez Lloret A. Biomechanical effects of the full range of useful doses of (3-amino-1-hydroxypropylidene)-1, 1-bisphosphonate (APD) on femur diaphysis and cortical bone tissue in rats. *Bone Miner* 1990; 11: 111-22.
2. Ferretti JL, Delgado CJ, Capozza RF, et al. Protective effects of disodium etidronate and pamidronate against the biochemical repercussion of betamethasone-induced osteopenia in growing rat femurs. *Bone Miner* 1993; 20: 265-76.
3. Cointy GR, Mondelo N, Zanchetta JR, Montuori E, Ferretti JL. Intravenous olpadronate restores ovariectomy-affected bone strength. A mechanical, densitometric and tomographic (pQCT) study. *Bone* 1995; 17 (supl): 373S-378S.
4. Riggs BL, Hodgson SF, O'Fallon, et al. Effect of fluoride treatment on the fracture rate in postmenopausal women with osteoporosis. *N Engl J Med* 1990; 322: 802-9.
5. Guañabens N, Peris P, Monegal F, Pons F, Collado A, Muñoz-Gómez J. Lower extremity stress fractures during intermittent cyclical etidronate treatment for osteoporosis. *Calcif Tissue Int* 1994; 54: 431-4.
6. Thomas T, Vico L, Skerry TM, et al. Architectural modifications and cellular response during disuse-related bone loss in calcaneus of the sheep. *Am J Physiol* 1996; 80: 198-202.
7. Chigire M. Mechanical optimization of bone. *Med Hypoth* 1996; 46: 327-30.
8. Rígoli NS, Keselman HR, L'Argentiere PC. Preparación de hidroxilapatitas y su uso en las hidrólisis de clorobenceno. *Rev Fac Ing Quim (Santa Fe)* 1978/9; 44: 282-9.
9. Scherrer P, Gottinger N. Crystallite size determinations from line broadening and spotty patterns. In: *Handbook of X-rays*, (ed) EF Kaelble, 1967; 17-8.
10. van Beek E, Hoekstra M, van de Ruit M, Lowik C, Papapoulos E. Structural requirements for bisphosphonate actions in vitro. *J Bone Miner Res* 1994; 9: 1875-82.
11. Ravaglioli A, Krajewski A, Celotti GC, et al. Mineral evolution of bone. *Biomaterials* 1996; 17: 617-22.
12. Tenenbaum HC, Torontali M, Sukhu B. Effects of bisphosphonates and inorganic pyrophosphates on osteogenesis in vitro. *Bone* 1992; 13: 249-55.
13. Fratzi P, Schreiber S, Roschger P, et al. Effects of sodium fluoride and alendronate on the bone mineral in minipigs: A small-angle X-Ray scattering and backscattered electron imaging study. *J Bone Miner Res* 1996; 11: 248-53.