

EFFECTOS EXPERIMENTALES DE OLPADRONATO Y PAMIDRONATO SOBRE LA MASA ÓSEA

NÉLIDA MONDELO¹, MARIANO D. PARMA¹, VIRGINIA A. PELUFFO¹, JOSÉ R. ZANCHETTA², ENRIQUE PICCINNI¹, ESTEBAN MONTUORI^{1*}

¹ Departamento de Farmacología Experimental, Gador, Buenos Aires

² Instituto de Investigaciones Metabólicas, Buenos Aires

Resumen: La ovariectomía y la inmovilización en ratas, han demostrado ser modelos útiles de osteopenia y se considera que imitan algunos aspectos de la osteoporosis humana asociada a déficit de hormonas ováricas y ausencia de uso mecánico del hueso. La administración de Pamidronato (APD)* y Olpadronato (OLPA)*, un nuevo aminobisfosfonato dimetilado, resultó eficaz para prevenir, con esquemas orales continuos (APD: 8 y OLPA: 0.8 mg/kg/día) o intravenosos intermitentes (APD: 1.25 y OLPA: 0.075 mg/kg cada 15 días), la pérdida ósea trabecular mediada por inmovilización (ciaticectomía unilateral), por defecto en la secreción de estrógenos (ovariectomía bilateral) o por ambas, sin manifestaciones de deterioro de la masa ósea cortical. En un modelo de osteopenia por deprivación estrogénica pre-establecida, OLPA evitó la progresión de la pérdida ósea (0,15 mg/kg i.v. cada 15 días) y restauró (0,30 - 0,60 mg/kg i.v. cada 15 días) la densidad mineral ósea (trabecular y compacta) afectada. La diferente acción de OLPA y APD sobre hueso trabecular y compacto parece acompañar la diferente respuesta de éstos frente a los estímulos negativos: las mejores respuestas fueron más evidentes en las regiones trabeculares, más lábiles. OLPA presentó similar eficacia y una potencia 5 a 10 veces superior cuando se lo comparó con APD. Posee un elevado margen de seguridad. En consecuencia, puede considerárselo en posición ventajosa para su uso en aquellas patologías óseas que resulten beneficiadas con el empleo de bisfosfonatos.

Palabras clave: pamidronato, olpadronato, masa ósea, osteopenia

La menopausia y la inmovilización constituyen dos situaciones de importancia clínica asociadas con pérdida de masa ósea. Es bien conocido que la deprivación estrogénica durante la menopausia produce un aumento del recambio óseo con un inadecuado acople entre reabsorción y formación ósea. Como consecuencia del mismo, ocurre una marcada disminución del hueso trabecular y una más lenta disminución del hueso cortical. Por otra parte, existen evidencias de que la inmovilización estimula la reabsorción y deprime la forma-

ción ósea siendo el hueso trabecular el principal afectado^{1,2,3}.

Por tratarse de un inhibidor de la reabsorción ósea, se buscó establecer la base experimental racional para el empleo clínico de Olpadronato (OLPA), un nuevo aminobisfosfonato dimetilado⁴, evaluando su capacidad de prevención o restauración de la masa ósea en modelos de ovariectomía y/o inmovilización por neurectomía en ratas⁵. Se empleó Pamidronato (APD) como droga de referencia, de forma de poder estimar

* fallecido el 10 de octubre de 1995

Dirección postal: Dra. Néilda Mondelo, Dpto. de Farmacología Experimental, GADOR S.A., Crámer 2462, 1428 Buenos Aires, Argentina

***Olpadronato (INN):** 3-dimetilamino-1-hidroxipropiliden-1,1-bisfosfonato, sal monosódica (IG-8801, dimetil-APD).
Pamidronato: 3-amino-1-hidroxipropiliden-1,1-bisfosfonato, sal disódica (IG 7913, APD)

potencia y eficacia de OLPA en relación a uno de los bisfosfonatos mejor conocido.

Materiales y métodos

Se emplearon ratas Wistar, de ambos sexos, de 2-3 meses de edad al inicio de los experimentos, criadas y mantenidas en el Bioterio de Gador S.A. de acuerdo a los principios de Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (NIH, 1985).

Se mantuvieron en un ambiente climatizado, con ritmo de luz y oscuridad de 12 horas, fueron alimentadas con una dieta comercial (Nutrimento-Roedores, dieta 1 especial) y recibieron agua potable de red. Los animales permanecieron en ayunas durante las 9 horas previas y las 2 horas posteriores a la administración oral, que se efectuó con sonda gástrica. La administración intravenosa se realizó por inyección en vena lateral de la cola.

Se efectuó distribución al azar de los animales en los distintos grupos experimentales.

La administración de las drogas se inició 1-2 días después de efectuar ovariectomía bilateral (OVX) y/o ciatictecomía unilateral izquierda (CXI), en los modelos de prevención ó 13 semanas después, en el modelo de restauración de la masa ósea.

La evaluación del efecto óseo se efectuó mediante la medición del contenido mineral óseo (CMO) por densitometría y el cálculo de la densidad mineral ósea (DMO) como relación de CMO/área considerada. Se empleó un densitómetro Norland XR-26 marca II/HS con filtración dinámica y con un software para pequeños animales que permitió la evaluación del CMO y la DMO en porciones representativas de hueso trabecular (fémur distal, columna vertebral) y compacto (fémur central). Los registros densitométricos se efectuaron sobre fémures aislados de cada animal y columna vertebral "in vivo" al finalizar cada ensayo ^{6,7}.

Los datos densitométricos se analizaron mediante un análisis de varianza seguido por el test de Newman Keul's, de manera de comparar los grupos controles (normales y sometidos a cirugía) entre sí y con respecto a aquellos tratados con bisfosfonatos.

El esquema de administraciones varió según el experimento: administración oral diaria de 0,2-0,4-0,8-1,6 mg/kg de OLPA y 2-4-8 mg/kg de APD (Ensayo 1) y administración intravenosa quincenal de 0,075-0,15-0,30 mg/kg de OLPA

(Ensayo 2) de 0,125-0,25-0,50 mg/kg de OLPA y 1,25-2,5-5,0 mg/kg de APD (Ensayo 3) y de 0,15-0,30-0,60 mg/kg de OLPA (Ensayo 4).

La duración total de los experimentos fue de 11- 13 (Ensayos 1, 2 y 3) y 25 semanas (Ensayo 4)

Ambos bisfosfonatos fueron sintetizados en Gador S.A.

Resultados

Ensayo 1: Prevención de pérdida de masa ósea en ratas ovariectomizadas e inmovilizadas (ciatictecomía unilateral izquierda) con administración oral, diaria de OLPA y APD.

Tras 11 semanas de deprivación estrogénica, se produjo una significativa disminución de la densidad mineral en la región distal del fémur derecho (no inmovilizado y posiblemente sobrecargado) (-9,4 %) y no en la región central del mismo (-2,6 %). Ambos bisfosfonatos evitaron la pérdida ósea trabecular, en relación con las dosis administradas. (Figura 1).

Cuando la deprivación estrogénica se acompañó con una disminución en el uso mecánico del fémur (tal la situación del fémur izquierdo), los cambios densitométricos fueron muy marcados, detectándose disminuciones porcentuales significativas del orden del 20 % en región distal y del 12 % en región central. OLPA y APD resultaron menos efectivos para prevenir la pérdida ósea trabecular en esta situación de severa osteopenia y, sólo lo consiguieron, parcialmente, con las dosis mayores. Ninguno de los 2 bisfosfonatos modificó la DMO del tercio central. (Figura 2).

En este modelo experimental, las curvas dosis-respuesta obtenidas con ambos bisfosfonatos resultaron paralelas al considerar la región distal femoral derecha y no la izquierda. Esto permitió estimar para OLPA una potencia aproximadamente 5-10 veces superior a la de APD.

Ensayo 2: Prevención de la pérdida de masa ósea en ratas ovariectomizadas e inmovilizadas (ciatictecomía unilateral izquierda) con la administración intravenosa intermitente de OLPA.

Al final del ensayo, se detectó disminución densitométrica significativa en columna vertebral (-12 %) y en tercio femoral distal (-11%) pero no central (-1,8 %) de fémur derecho. OLPA evitó, aún con la menor dosis empleada, la pérdida trabecular ósea. Produjo un aumento significativo de la DMO cortical con la dosis intermedia (Figuras 3 y 4).

La marcada disminución de la DMO registrada en fémur distal izquierdo (-24 %) pudo prevenirse con OLPA, con la menor dosis administrada. En región central, si bien no se registraron variaciones significativas atribuibles al tratamien-

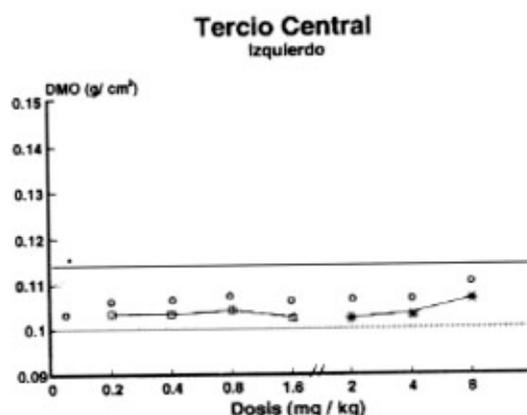
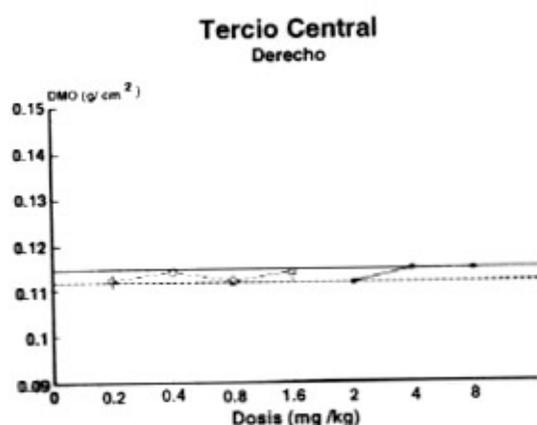
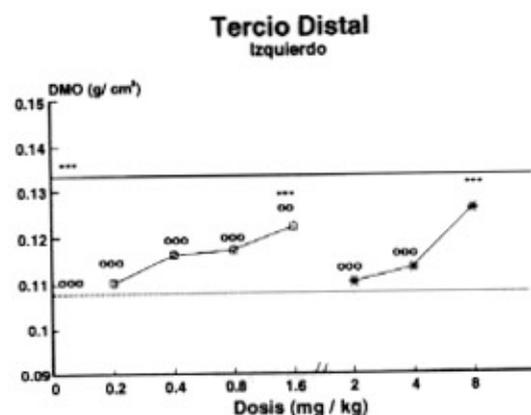
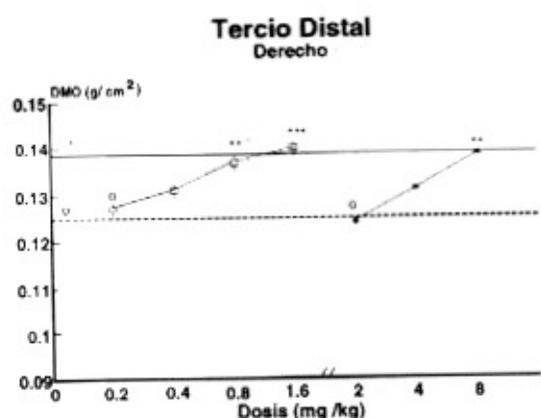


Figura 1: DMO (g/cm^2) de tercios distal o central en fémur derecho (deprivación estrogénica) de ratas OVX/CXI (.....), normales (—) y OVX-CXI tratadas con distintas dosis orales de OLPA (\square) y de APD (\star). Los valores representados corresponden al promedio grupal \pm ES ($n=5-6$ / grupo) (Ver detalles en el texto).
 \star , $\star\star$, $\star\star\star$ $p < 0.05, 0.01$ y 0.001 vs ratas OVX-CXI ; \circ $p < 0.05$ vs ratas normales

Figura 2: DMO (g/cm^2) de tercios distal o central en fémur izquierdo (deprivación estrogénica más inmovilización) de ratas OVX/CXI (.....), normales (—) y OVX-CXI tratadas con distintas dosis orales de OLPA (\square) y de APD (\star). Los valores representados corresponden al promedio grupal \pm ES ($n= 5-6$ /grupo) (Ver detalles en el texto).
 \star , $\star\star$, $\star\star\star$ $p < 0.05$ y 0.001 vs ratas OVX-CXI ; \circ , $\circ\circ$, $\circ\circ\circ$ $p < 0.05, 0.01, 0.001$ vs ratas normales.

resultaron indetectables las diferencias significativas observadas entre DMO de grupo control normal y grupo OVX-CXI, sugiriendo cierto efecto adicional sobre la masa ósea cortical. (Figura 5)

Ensayo 3: Prevención de la pérdida de masa ósea en ratas macho inmovilizadas (caiectomía unilateral izquierda) con la administración intravenosa intermitente de OLPA y APD.

En el fémur derecho, no inmovilizado, se observó el efecto inhibitorio de ambos bisfosfonatos

sobre la reabsorción ósea endógena, con lo cual, en todos los grupos que recibieron OLPA o APD, los valores densitométricos resultaron muy superiores a los del grupo control no hemiciectomizado. Esto ocurrió principalmente en las subregiones femorales predominantemente trabeculares (+20-30 %) aunque, sin significación estadística, también se manifestó en el hueso compacto (tercio central femoral). (Figura 6)

El fémur izquierdo, afectado por el desuso debido a la caiectomía unilateral, permitió demostrar el efecto preventivo de ambos bisfosfonatos sobre la osteopenia inducida por este mecanis-

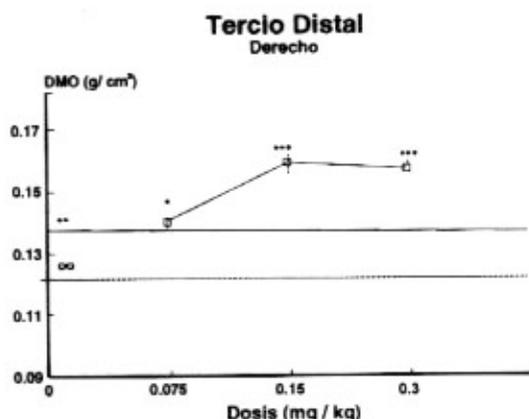
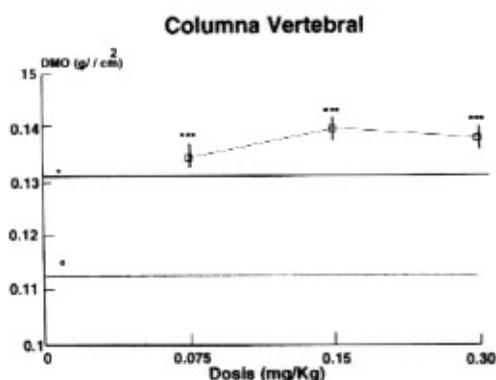


Figura 3: DMO (g/cm²) de columna vertebral de ratas OVX/CXI (.....), normales (—) y OVX-CXI tratadas con distintas dosis intravenosas de OLPA (□). Los valores representados corresponden al promedio grupal ± ES (n=5-6/grupo) (Ver detalles en el texto)
 *, *** p< 0.05 y 0.001 vs ratas OVX-CXI p< 0.05 vs ratas normales

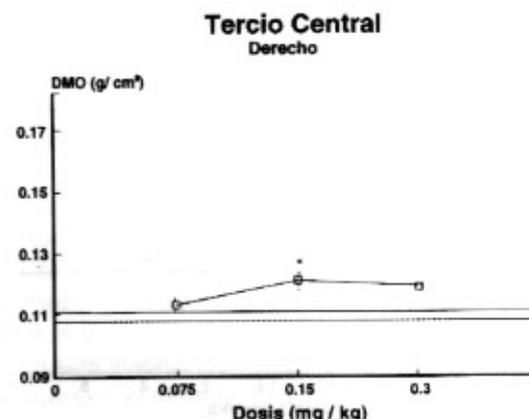


Figura 4: DMO (g/cm²) de tercios distal o central en fémur derecho (deprivación estrogénica) de ratas OVX/CXI (.....), normales (—) y OVX-CXI tratadas con distintas dosis intravenosas de OLPA (□). Los valores representados corresponden al promedio grupal ± ES (n= 5-6/grupo) (Ver detalles en el texto)
 *, **, *** p< 0.05, 0.01 y 0.001 vs ratas OVX-CXI ; ∞ p< 0.01 vs ratas normales

mo. El efecto, que fue significativo aún con las menores dosis empleadas ocurrió, predominantemente en hueso trabecular. En la mediodiáfisis femoral, los valores densitométricos registrados sugieren cierta protección ósea cortical con OLPA. (Figura 7)

Si bien la magnitud de las dosis seleccionadas no permitió la obtención de claras curvas dosis-respuestas (las respuestas fueron aparentemente máximas), el perfil de las mismas permitió mostrar la similitud entre ambos bisfosfonatos en su acción trabecular y la mayor potencia relativa (aproximadamente 10 veces superior) de OLPA respecto a APD. Corroboró además, que ambos pueden lograr, en adecuadas dosis, eficacia óptima en la prevención de la pérdida de masa ósea por inmovilización.

Ensayo 4: Restauración de la masa ósea luego de osteopenia inducida por ovariectomía, con la administración intravenosa intermitente de OLPA.

La deprivación estrogénica disminuyó los valores densitométricos del fémur y columna vertebral. Esta disminución se manifestó a los 3 meses de la cirugía y continuó, aparentemente en menor grado, durante los 3 meses siguientes. La

región central, donde predomina el hueso compacto, es la que ofreció mayor resistencia a estos cambios. En esta región, las diferencias densitométricas observadas a los 6 meses de la ovariectomía, se encontraron en el límite de la significación estadística (p=0.06) (Fig. 8 y 8a).

En todos los casos, el tratamiento con OLPA evitó que la pérdida de masa ósea continuara (menor dosis) o revirtió ese efecto observándose restauración parcial o total de los valores densitométricos con las dosis intermedias y mayores.

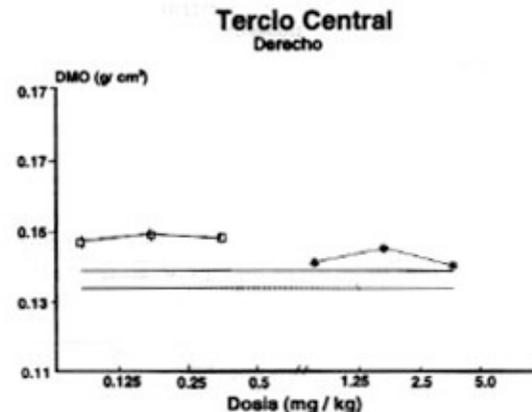
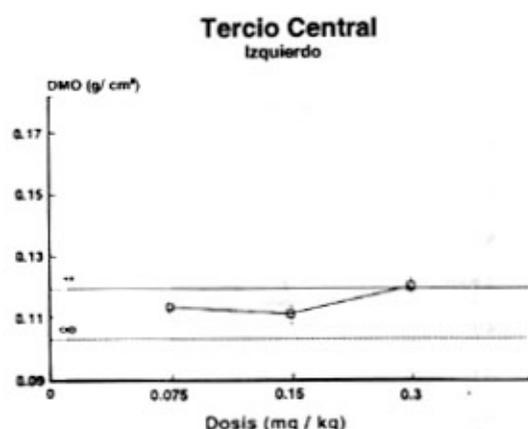
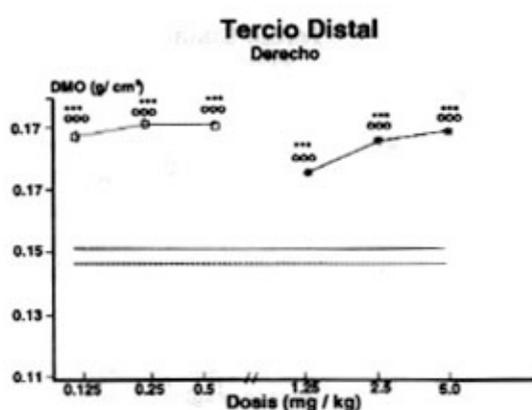
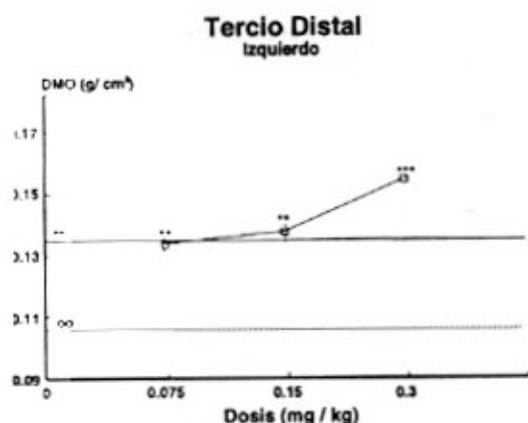


Figura 5: DMO (g/cm^2) de tercios distal o central en fémur izquierdo (deprivación estrogénica más inmovilización de ratas OVX/CXI (.....), normales (—) y OVX-CXI tratadas con OLPA (\square)). Los valores representados corresponden al promedio grupal \pm ES ($n = 5-6/\text{grupo}$)
 ** $p < 0.01$ y 0.001 vs ratas OVX-CXI; ∞ $p < 0.01$ vs ratas normales

Figura 6: DMO (g/cm^2) de tercios distal o central en fémur derecho (no inmovilizado) de ratas CXI (.....), normales (—) y CXI tratadas con distintas dosis intravenosas de OLPA (\square) y de APD (*). Los valores representados corresponden al promedio grupal \pm ES ($n=5-6/\text{grupo}$) (Ver detalles en el texto)
 *** $p < 0.001$ vs ratas OVX-CXI, ∞ $p < 0.001$ vs ratas normales

Conclusiones

La ovariectomía y la inmovilización en ratas han demostrado ser modelos útiles de osteopenia y se considera que imitan algunos aspectos de la osteoporosis humana asociada a déficit de hormonas ováricas y ausencia de uso mecánico. Ambas situaciones combinadas producen cambios osteopénicos particularmente severos⁵ lo cual se reflejó con claridad, en ratas hembras, a las 11-13 semanas en nuestras condiciones experimentales. En sitios femorales, ricos en hueso trabecular, la DMO disminuyó aproximadamente un 10 o un 20 % según se consideren regiones óseas afectadas por la deprivación

estrogénica o aquellas simultáneamente inmovilizadas. En sitios femorales predominantemente compactos, la DMO no resultó significativamente modificada ante la falta de estímulo hormonal, mientras que disminuyó aproximadamente un 12% cuando se asoció al "no uso" mecánico del fémur.

En ratas macho, la sección del nervio ciático con la consiguiente inmovilidad durante un período aproximado de 3 meses, redujo la masa ósea trabecular (-17 %) y en menor grado la masa ósea compacta (-6%).

Igual tendencia se apreció con la supresión del estímulo ovárico durante 6 meses en ratas hembras en columna vertebral (-13 %) y en re-

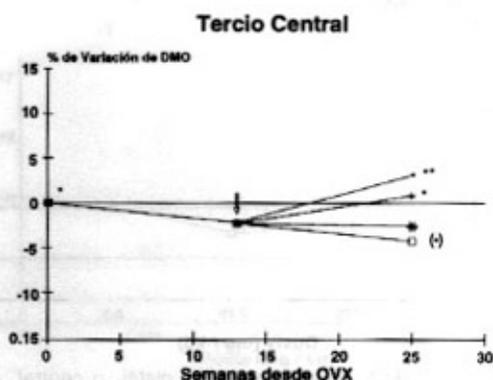
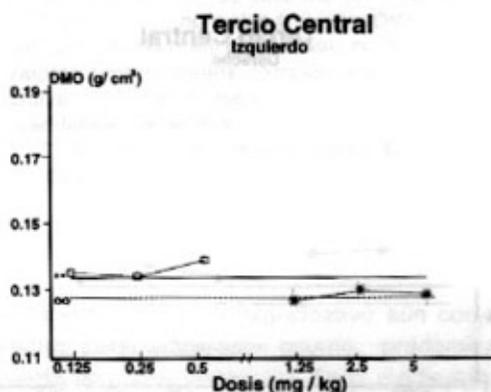
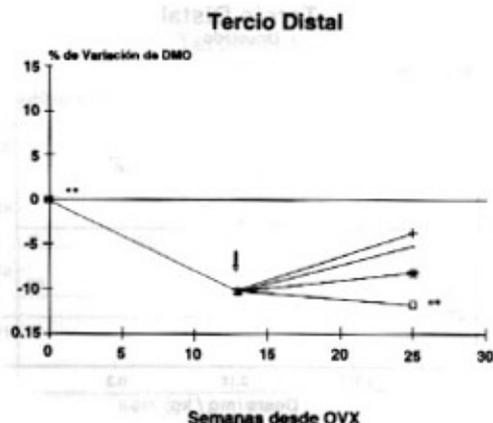
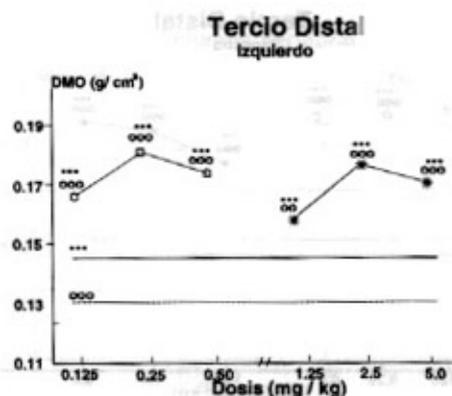


Figura 7: DMO (g/cm^2) de tercios distal o central en fémur izquierdo (inmovilizado) de ratas CXI (—), normales (.....) y CXI tratadas con distintas dosis intravenosas de OLPA (\square) y de APD (\bullet). Los valores representados corresponden al promedio grupal \pm ES ($n=5-6/grupo$) (Ver detalles en el texto) ** , *** $p < 0.01$ y 0.001 vs ratas OVX-CXI \square , \bullet , \blacktriangle $p < 0.01, 0.001$ vs ratas normales

Figura 8a: Variación porcentual de la DMO en columna vertebral, fémur distal y central en ratas OVX controles (\square) o tratadas con 0.15 (*), 0.30 (.) y 0.60 (+) $mg/kg/l.v$ cada quince días de OLPA. La flecha señala el inicio de la administración de OLPA. (*), *, **, *** $p=0.06, p<0.05, 0.01$ y 0.001 vs ratas OVX-CXI ; \square , \bullet , \blacktriangle $p < 0.01, 0.001$ vs ratas normales. Se consignan las diferencias correspondientes a los valores de DMO absoluto

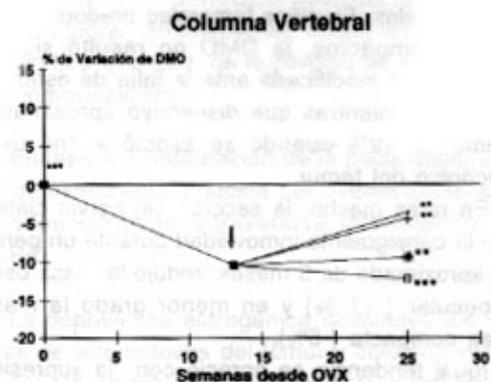


Figura 8

gión central femoral (-4 %, en el límite de la significación estadística).

Los resultados experimentales permitieron confirmar los hallazgos de otros autores en relación a la mayor labilidad del hueso trabecular respecto al compacto y al efecto deletéreo de la inmovilización y de la falta de estrógenos sobre la masa ósea.

OLPA, administrado mediante un esquema cíclico en dosis bajas intravenosas previno, en ratas y con máxima eficacia, la pérdida ósea inducida por inmovilización (Fig 7), por ovariectomía

(Fig 4) o por ámbas (Fig 5). El esquema de administración oral diaria resultó igualmente eficaz en la prevención mediada por ovariectomía (Fig 1), en forma dosis dependiente, y sugirió la necesidad de dosis orales mayores para lograr la protección completa cuando a ésta se le suma una situación de inmovilidad. (Fig 2). OLPA presentó una potencia 5-10 veces superior a la de pamidronato. Similar relación de potencias encontraron otros autores en modelos "in vitro" de reabsorción de matriz mineralizada en co-cultivo con fuente precursora de osteoclastos⁸ que confirmaron posteriormente con un protocolo clínico en enfermos pagéticos⁹ y nosotros, en un modelo de hipercalcemia inducida por retinoides en ratas^{10,11}.

La pérdida gradual de masa ósea ocasionada por la falta de hormonas ováricas es interrumpida al iniciar la administración de OLPA. De este modo se evitó la progresión de la misma y se obtuvo cierto grado de recuperación de masa ósea trabecular y compacta en relación con las dosis aplicadas. (Fig 8)

La diferente acción de OLPA y APD en hueso trabecular y en hueso cortical, (previamente descrita para APD en osteoporosis involutiva)¹², acompañó la respuesta no uniforme de ambos tipos de hueso ante los estímulos negativos: mejores respuestas fueron evidentes en regiones más afectadas. Leve acción cortical positiva pareció detectarse con OLPA (Fig 5,6,7,8). Estudios biomecánicos adicionales proporcionaron evidencias del efecto restaurador de OLPA con respecto a las consecuencias negativas de la deprivación estrogénica sobre la calidad del hueso cortical¹³.

Los valores densitométricos superiores a animales controles que se registraron, en algunos casos con los niveles más altos de dosis y en otros, cuando las dosis fueron probablemente más altas de lo necesario, pueden estar indicando la supresión de la reabsorción ósea endógena. En otros estudios, en ratas normales tratadas con OLPA esta situación se vió reflejada con marcados incrementos en la densidad mineral de regiones distal y proximal del fémur y menores en la región central del mismo¹⁴.

En conclusión, ambos bisfosfonatos resultaron eficaces para prevenir la pérdida ósea trabecular mediada por la falta de uso mecánico del hueso o por la falta de estímulo ovárico o por ambas,

sin manifestaciones densitométricas de deterioro de la masa ósea cortical. OLPA restauró la masa ósea en un modelo de osteopenia preestablecida. Su mayor potencia relativa (5-10 veces superior a pamidronato) y alto margen de seguridad¹⁵ lo ubican en una posición ventajosa para su uso en aquellas patologías óseas que puedan resultar beneficiadas con el empleo de bisfosfonatos.

Agradecimientos: A Rosario, Carina y Hebe: sin ellas este trabajo no hubiera sido posible. Al Dr J. Ferretti, por sus continuas enseñanzas.

Summary

Experimental effects of olpadronate and pamidronate on bone mass

Ovariectomy and immobilization in rats have demonstrated to be useful models for osteopenia and they are considered to mimic some aspects of human osteoporosis associated with a deficit of ovarian hormones and the absence of mechanical function (disuse of the bone).

Pamidronate (APD) and Olpadronate (OLPA), a new dimethylated aminobisphosphonate, on a continuous oral scheme (APD: 8 and OLPA: 0.8 mg/kg/day) or on an intermittent parenteral scheme (APD: 1.25 and OLPA: 0.075 mg/kg every 15 days) did effectively prevent the trabecular bone loss caused by immobilization (unilateral sciaticectomy), by lack of ovarian stimuli (bilateral ovariectomy) or by both approaches. There were no signs of deterioration in the cortical bone mass.

In a model of preestablished osteopenia, caused by estrogen deprivation, OLPA stopped the progression of the bone mass loss (0.5 mg/kg/i.v. every 15 days) and restored (0.30 - 0.60 mg/kg/i.v. every 15 days) the bone mineral density which had been affected (trabecular and cortical).

The different activity of OLPA and APD on trabecular and cortical regions of long bones seems to accompany their different responses because of negative stimulus: better responses were more evident in the trabecular bone which proved to be more labile.

In these "in vivo" models OLPA's efficacy was similar to APD's but it was roughly 5-10 times more potent. OLPA has a high safety margin. Therefore, it could advantageously be used in those bone diseases which benefit with the use of bisphosphonates.