



VNIVERSITAT
DE VALÈNCIA

Facultat de Medicina i Odontologia
Departamento de Estomatología

**ESTUDIO CLÍNICO, RADIOGRÁFICO Y PLASMÁTICO DE LA
OSTEONECROSIS DE LOS MAXILARES POR BISFOSFONATOS
EN UN GRUPO DE 183 PACIENTES**

TESIS DOCTORAL
PROGRAMA DE DOCTORADO EN ODONTOLOGÍA

PRESENTADA POR: LETICIA BAGÁN DEBÓN
DIRECTORES: PROF. JOSÉ VICENTE BAGÁN SEBASTIÁN
PROF^ª. YOLANDA JIMÉNEZ SORIANO



VNIVERSITAT
DE VALÈNCIA

El Prof. José Vicente Bagán Sebatión, Catedrático de Medicina Bucal del Departamento de Estomatología de la Universitat de València y Jefe del Servicio de Estomatología y Cirugía Maxilofacial del Hospital General Universitario de Valencia

La Prof. Yolanda Jiménez Soriano, Profesora titular de Manifestaciones orales de Enfermedades Sistémicas del Departamento de Estomatología de la Universitat de València,

CERTIFICAN

Que la presente tesis doctoral original de Leticia Bagán Debón titulada: ESTUDIO CLÍNICO, RADIOGRÁFICO Y PLASMÁTICO DE LA OSTEONECROSIS DE LOS MAXILARES POR BISFOSFONATOS EN UN GRUPO DE 183 PACIENTES, ha sido realizada bajo nuestra dirección y supervisión, y a nuestro juicio, reúne los requisitos para su lectura y obtención del grado de Doctor en Odontología.

Y para que así conste a los efectos oportunos, firmamos el presente certificado en Valencia a 29 de Marzo del 2016.

Prof. Dr. José V. Bagán Sebatión

Prof^a. Yolanda Jiménez Soriano

INDICE

Introducción	1
I. Concepto de osteonecrosis por bisfosfonatos	11
II. Prevalencia e incidencia de osteonecrosis de los maxilares	15
III. Factores etiopatogénicos	21
IV. Manifestaciones clínicas de la osteonecrosis por bisfosfonatos	28
V. Diagnóstico	32
VI. Estadios de la osteonecrosis por bisfosfonatos	39
VII. Prevención	48
VIII. Tratamiento	52
Justificación, hipótesis y objetivos	57
Material y métodos	63
I. Diseño del estudio y selección de pacientes	65
II. Metodología	70
II. Análisis estadístico	78
Resultados	81
I. Análisis descriptivo de los datos clínicos en el grupo de 183 pacientes con osteonecrosis (ONM)	83
II. Análisis comparativo de la densidad ósea, en las tomografías computarizadas, entre el grupo de ONM, la zona sana contralateral de los enfermos con ONM y un grupo control	100
III. Análisis comparativo en los niveles plasmáticos de RANKL y OPG entre el grupo de pacientes que han tomado bisfosfonatos y han desarrollado ONM, el grupo de pacientes que han tomado el fármaco y no han desarrollado ONM y el grupo control	110
IV. Asociaciones entre el tipo de administración del bisfosfonato con el resto de variables clínicas, así como con RANKL y OPG	117

V. Relación entre las variables clínicas, densidad ósea y niveles plasmáticos de RANKL y OPG con la exposición de hueso necrótico mediante análisis de regresión logística	136
VI. Relaciones entre las variables clínicas con RANKL y OPG mediante análisis de regresión lineal múltiple	138
Discusión	141
I. Factores epidemiológicos y etiopatogénicos	145
II. Manifestaciones clínicas de la osteonecrosis por bisfosfonatos	154
III. Diagnóstico	159
IV. Estadios de la osteonecrosis por bisfosfonatos	169
V. Determinación plasmática de los niveles séricos de RANKL y OPG	170
Futuras líneas de investigación	174
Conclusiones	177
Referencias bibliográficas	181
Anexos	
I. Artículos publicados, sobre el tema de la tesis y en los que la doctorando es coautora	195
II. Índice alfabético	237
III. Listado de tablas	242
IV. Listado de figuras	246
V. Glosario de abreviaturas	250

INTRODUCCIÓN

En los últimos años se han publicado numerosos artículos de la osteonecrosis de los maxilares (ONM) producidas por fármacos. Ello ha provocado un incremento del interés y preocupación por este tema en el ámbito odontológico a nivel mundial. El signo característico de esta importante complicación o reacción adversa es la existencia de una zona maxilar o mandibular con exposición ósea e infectada, muchas veces acompañada de dolor.

La forma más frecuente es la asociada a los bisfosfonatos (BF), si bien más recientemente se han descrito otras ONM en relación con otros fármacos antirresortivos, como los inhibidores del ligando del receptor activador para el factor nuclear $\kappa\beta$ (RANKL), los que actúan sobre el factor de crecimiento vascular endotelial y los que pertenecen al grupo de los inhibidores de la tirosina quinasa.

Los bisfosfonatos, antiguamente denominados difosfonatos, fueron sintetizados a inicios del año 1865 por químicos alemanes para prevenir el depósito industrial de carbonato cálcico en las chimeneas, siendo usados principalmente como agentes anticorrosivos (1).

En el año 1960, fueron introducidos por primera vez con fines terapéuticos debido a la gran afinidad que presentan con el tejido óseo, inhibiendo la conversión de fosfato cálcico amorfo a hidroxiapatita, por lo que se reducía la disolución de los cristales óseos.

Treinta años más tarde, en 1990, se propusieron como tratamiento de la osteoporosis en mujeres en estados postmenopáusicos o con patologías en las que se originan lesiones osteolíticas (2).

Los bisfosfonatos son compuestos sintéticos análogos de la molécula de pirofosfato endógeno, en la que la estructura P-O-P un átomo de carbono, sustituye el átomo central, quedando del siguiente modo: P-C-P; y en los que la presencia de este doble grupo fosfónico les confiere una particular resistencia y estabilidad a la hidrólisis (2).

La gran afinidad que presentan por el calcio, facilita que se unan específicamente a la hidroxiapatita que es la molécula con mayor cantidad de calcio del tejido óseo. Cuando se produce una destrucción de masa ósea por medio de los osteoclastos, los bisfosfonatos, que están unidos a la hidroxiapatita, se depositan en altas concentraciones en el espacio donde se ha producido la resorción inhibiendo la consiguiente actividad de los osteoclastos (3).

En primer lugar, comenzaron a utilizarse los bisfosfonatos no nitrogenados, o de primera generación, tales como el etidronato, clodronato y tiludronato. Sin embargo, actualmente se emplean los bisfosfonatos nitrogenados; entre los que se encuentran el alendronato, risedronato, ibandronato, pamidronato y ácido zoledrónico, que son mucho más potentes que los anteriores (1). También se pueden clasificar según el procedimiento de síntesis y sus propiedades en función de que sean de primera, segunda o tercera generación (Tabla 1, Fig. 1).

ESTRUCTURA QUÍMICA	BISFOSFONATO	POTENCIA RELATIVA	NOMBRE COMERCIAL
Primera generación	Etidronato	10	Osteum, Bonefos
	Clodronato		
Segunda generación	Tiludronato	10	Skelid
	Pamidronato	100	Aminomux, Pamidronato, Pamdosa
	Alendronato	500	Osteopor, Alendronato, Bones, Gerial, Marvil, Osteonato
Tercera generación	Risedronato	2000	Orafix, Dronacal, Ridronato
	Ibandronato	1000	Adromux, Bonviva, Femorel, Ibandrion, Idena, Bondronat
	Zoledronato	10000	Aclasta, Zodronic, Zometa, Acido Zoledrónico

Tabla 1. Clasificación según la estructura química y época de síntesis de los bisfosfonatos.

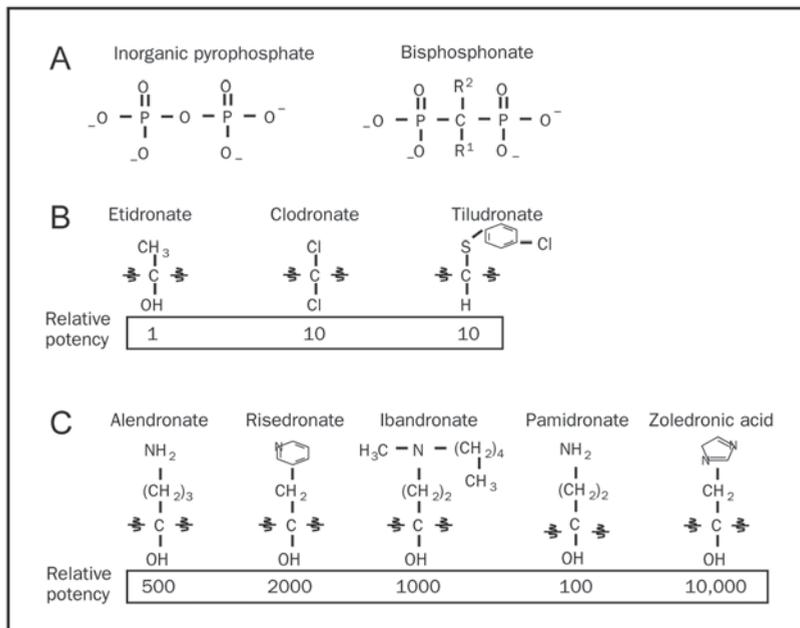


Fig. 1. Estructura química y potencias relativas aproximadas de los bisfosfonatos.

(Tomada de Drake MT, Clarke BL, Khosla S. Bisphosphonates: Mechanism of Action and Role in Clinical Practice. *Mayo Clin Proc.* 2008;83:1032-45).

La actividad de los bisfosfonatos nitrogenados es mucho más potente que la de los no nitrogenados; así por ejemplo, el ácido zoledrónico presenta una potencia 100.000 veces superior a la del etidronato (1).

Por lo tanto, los fármacos antirresortivos, como son los bisfosfonatos utilizados para el tratamiento de la osteoporosis y otras patologías osteolíticas, pretenden incrementar la resistencia del hueso, conservando su microarquitectura e induciendo un balance positivo en el remodelado óseo.

Su mecanismo de acción consiste en la inhibición de la activación o reclutamiento de los osteoclastos mediado por diferentes citoquinas, tales como la interleuquina-1 (IL-1) y el factor de necrosis tumoral (TNF) (2). Se origina una disminución del turnover óseo, que es la velocidad con que se produce el “recambio óseo” para poder mantener sus condiciones normales de resistencia (Fig. 2).

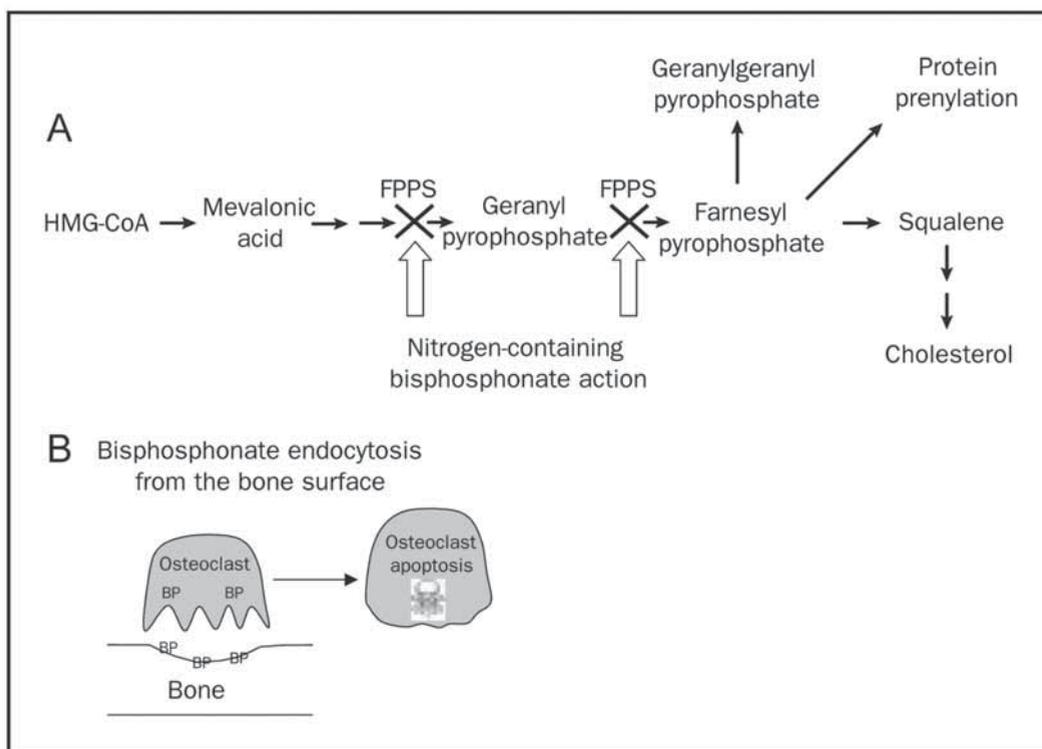


Fig. 2. A. Los bisfosfonatos nitrogenados inhiben selectivamente la farnesil pirofosfato sintetasa (FPP) dentro de los osteoclastos. B. La endocitosis del bisfosfonato por parte de los osteoclastos conlleva a la inhibición FPPS y a la apoptosis de los osteoclastos. BP = bisfosfonatos nitrogenados; HMG -CoA = 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A. (Tomada de Drake MT, Clarke BL, Khosla S. Bisphosphonates: Mechanism of Action and Role in Clinical. Practice. Mayo Clin Proc. 2008;83:1032-45).

Además, los bisfosfonatos presentan propiedades antitumorales; tales como, la inhibición de la adhesión de las células tumorales al tejido óseo (3), la inhibición de la proliferación e invasión de las células tumorales, la inducción de apoptosis en varias líneas celulares malignas y la inhibición de la actividad proteolítica de las metaloproteinasas de la matriz ósea (4).

La biodisponibilidad por vía oral de estos fármacos es del 1-2%, produciendo efectos adversos sobre el tracto digestivo, ocasionando una irritación esofágica lo que motiva el que su utilidad por esa vía, sea escasa en el campo de la oncología, siendo tratados mayoritariamente por vía intravenosa (5).

Los bisfosfonatos provocan una alteración a nivel óseo, aumentándose la actividad osteoblástica, formación ósea, y reduciendo la actividad osteoclástica “degradación y re-absorción ósea” (Fig. 3,4).

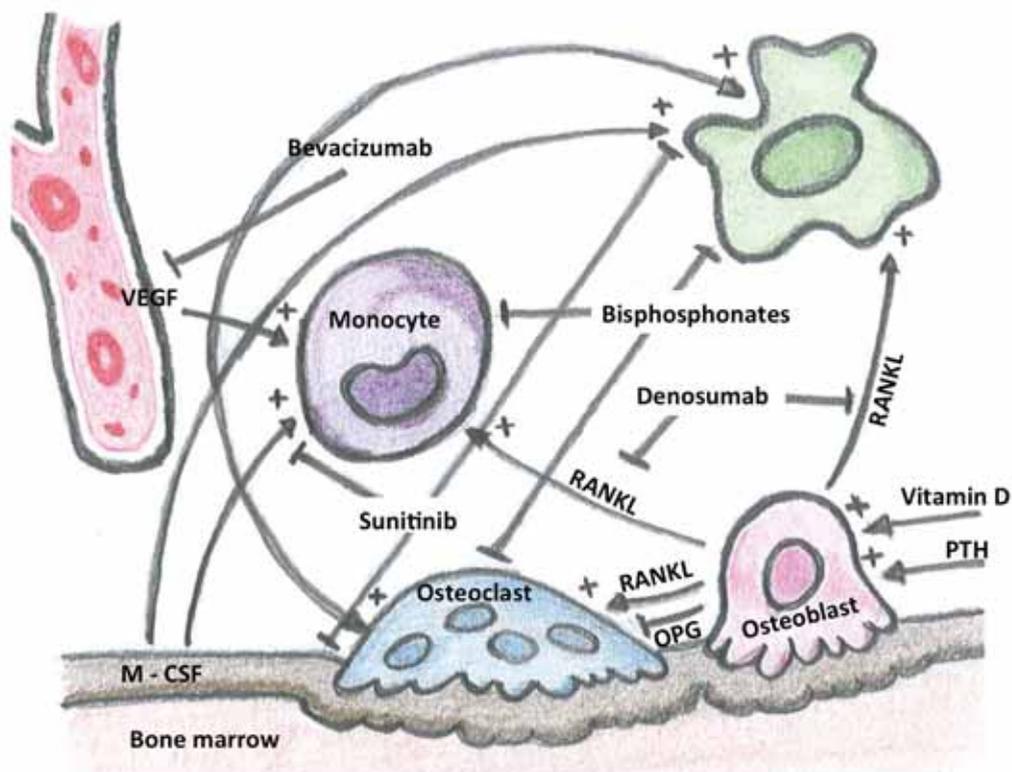


Fig. 3. Fisiología de la homeostasis ósea y mecanismos de interacción con otros medicamentos con el recambio óseo. M - CSF = factor estimulante de colonias de macrófagos, OPG = osteoprotegerina, PTH = hormona paratiroidea, RANKL = receptor activador del factor nuclear κ - B ligando. (Modificada de Troeltzsch M, Woodlock T, Krieglstein S, Steiner T, Messlinger K, Troeltzsch M. *Physiology and Pharmacology of Nonbisphosphonate Drugs Implicated in Osteonecrosis of the Jaw*. J Can Dent Assoc 2012;78:85).

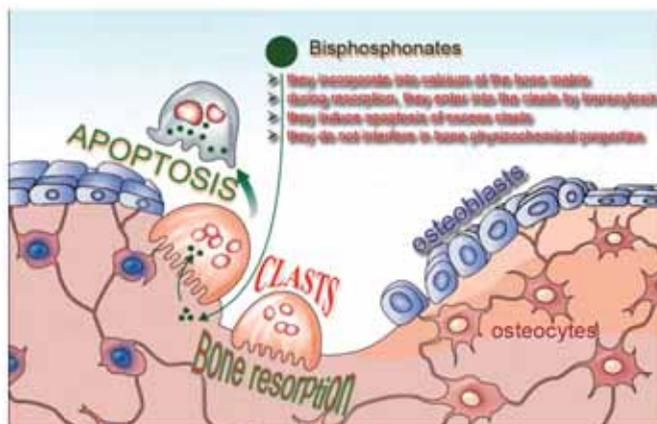


Fig. 4. Acción de los bisfosfonatos sobre el hueso y sus procesos de resorción mediados por los osteoclastos.

(Tomada de Consolaro A. Bisphosphonates: opinion or scientific-based restrictions?. *Dental Press Implantol.* 2014 Apr-June;8(2):10-9). (Figura publicada con la autorización solicitada al autor del artículo Dr. A. Consolaro).

El tejido óseo está formado por una matriz mineralizada extracelular y por células especializadas, como son los osteoblastos, los osteocitos y los osteoclastos. El componente inorgánico más importante, son los cristales de hidroxiapatita que al unirse a las fibras de colágeno confieren al hueso sus características principales a nivel de rigidez, flexibilidad y resistencia (6).

Asimismo, el componente orgánico más abundante, siendo un 90% de la matriz, es el colágeno tipo I, que otorga resistencia a la elongación en los huesos. Mientras que el otro 10% está formado por proteínas tales como la osteocalcina (OCN), que es una pequeña proteína de la matriz sintetizada por los osteoblastos y plaquetas, dependiente de las vitaminas D y K, la osteonectina que es una glicoproteína con gran afinidad por el colágeno tipo I, por el calcio y por la hidroxiapatita, las sialoproteínas, factores de crecimiento y las proteínas séricas (7).

A nivel histológico, el hueso es un tejido mineralizado, innervado y vascularizado, que está estructurado en una matriz osteoide que se encuentra organizada en laminillas. Su disposición es la que determina que el hueso sea esponjoso o cortical, estando ambos formados por osteonas. Por un lado, el hueso esponjoso o trabecular está formado por laminillas óseas que forman una red de cavidades en cuyo interior albergan la médula ósea (8). El hueso cortical o compacto está constituido por conductos de Havers recubiertos a su vez de laminillas dispuestas de forma concéntrica donde se encuentran situados los osteocitos.

Tanto el hueso esponjoso como el cortical están formados también por células especializadas, matriz orgánica y fase mineral. En el hueso conviven diferentes tipos de células, estas se encuentran dentro del propio tejido o en el estroma de la propia médula ósea. En la tabla 2 se recogen las cinco estirpes de células descritas en el trabajo publicado por Friedenstein (9) en el año 1976, como son los osteoblastos, fibroblastos, condroblastos, mioblastos y adipocitos (Tabla 2).

ESTROMA MEDULAR	TEJIDO ÓSEO
Células madre hematopoyéticas	Osteoblastos
Células madre mesenquimales	Pre-osteoblastos
Adipocitos	Osteocitos
Macrófagos	Osteoclastos
Mastocitos	Pre-osteoclastos

Tabla 2. Células óseas.

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

Los osteoblastos (del griego στέον, osteon = hueso y βλαστ, blastos = germen) son células diferenciadas, de 20-30 μm , con forma poliédrica, citoplasma basófilo, un retículo endoplásmico y un aparato de Golgi. Estas proceden de células pluripotenciales mesenquimales procedentes de la médula ósea, periostio, endostio y pericitos vasculares (10). Los osteoblastos sintetizan la matriz orgánica o también llamada sustancia osteoide y expresan una enzima denominada fosfatasa alcalina (ALP), la cual permite la mineralización del hueso a un ritmo de 1-2 μm al día.

Su principal misión consiste en sintetizar proteínas colágenas y no colágenas de la matriz orgánica del hueso, así como dirigir la disposición de las fibrillas de la matriz extracelular, también contribuyen a la mineralización de la sustancia osteoide y sintetizan citoquinas específicas para mediar en la reabsorción producida por los osteoclastos.

En los seres humanos su vida media es de aproximadamente de 1 a 10 semanas, tras este periodo se produce un mecanismo de apoptosis y se transforman en células de revestimiento o en osteocitos, estas son las células más abundantes del hueso, tienen forma estrellada. Su cuerpo está en el interior de lagunas óseas, y se comunican entre sí a través de los conductos calcóforos que están llenos de fluido óseo extracelular. De este modo, estas células se organizan formando un sincitio de células que están interconectadas representando una única estructura, formando una gran superficie de contacto en el interior y hacia la superficie ósea, para conseguir

de este modo oxígeno y nutrientes. Representando estadios más avanzados de maduración, constituyendo con el endostio una capa protectora de la superficie del hueso, teniendo un papel importante en la activación del remodelado óseo (11).

Los osteoclastos (del griego osteon, ‘hueso’, y klastos, ‘que rompe’, es decir, ‘las células que rompen el hueso’), son las células que se encargan de la reabsorción ósea. Son multinucleadas, ricas en vacuolas y mitocondrias; miden alrededor de 100 μm . Contienen fosfatasa ácida tartrato resistente (TRAP) que permiten la desfosforilación de proteínas. Estas células proceden de células madre hematopoyéticas medulares llamadas “Unidades Formadoras de Colonias de Granulocitos y Macrófagos” (CFU-GM), precursoras de macrófagos y monocitos (12). Estas células presentan en la membrana un borde en cepillo, responsable de la reabsorción ósea y una zona rica en microfilamentos con integrinas que sirven para poder anclarse a la matriz.

Los osteoblastos participan activamente en la formación de osteoclastos. Así, el factor estimulante de las colonias de macrófagos (M-CSF) producido por los osteoblastos es fundamental en las primeras fases de la osteoclastogénesis, en la formación de células gigantes multinucleadas (11).

La osteoclastogénesis es regulada por tres moléculas clave: la osteoprotegerina (OPG), que es proteína sintetizada por osteoblastos y pre-osteoblastos, el ligando situado en la superficie de osteoblastos y pre-osteoblastos (RANKL) y el receptor del anterior situado en la membrana de osteoclastos y pre-osteoclastos (RANK) (12).

El RANKL conocido anteriormente como ODF (osteoclast differentiation factor) es una citocina transmembrana que pertenece a la superfamilia del factor de necrosis tumoral (TNF) (13). La interacción entre RANKL y su receptor RANK permite una activación de la diferenciación y de la actividad osteoclástica, aumentando de este modo la reabsorción ósea. Asimismo, los efectos del RANKL son inhibidos por la osteoprotegerina (OPG), que es una proteína circulante creada por los osteoblastos y pre-osteoblastos perteneciente a la superfamilia de los receptores de TNF (14).

Cuando se unen la OPG y el RANKL se bloquea la unión de RANKL a RANK y se inhibe la diferenciación osteoclástica. Por ello, tanto la OPG, el RANK y el RANKL son importantes reguladores de la osteoclastogénesis (15).

Este tejido óseo, está sometido a un constante fenómeno de renovación celular, llamado remodelado óseo, que consiste en un proceso de reabsorción y formación dentro de una misma área, creando un recambio continuo del tejido.

Consta de cuatro fases sucesivas, tales como: Activación, resorción, inserción y formación. Todo ello, está producido por múltiples unidades funcionales celulares, denominadas unidades básicas de remodelado, compuestas por osteoclastos, osteoblastos, así como su aporte vascular, nervioso y el tejido conectivo acompañante. Todo ello se regula mediante un componente enzimático de autorregulación y regulación externa por un sistema hormonal. Presentan una vida media de 6 hasta 9 meses, llegando a estar activas entre 1,5 y 2 millones de ellas de forma simultánea (6).

Este fenómeno de homeostasis ósea y mineral, puede ser modificado por la acción de diversos fármacos, en particular por los bisfosfonatos. La tasa de remodelado óseo es el tiempo que tarda el nuevo hueso en reparar o reemplazar el hueso preexistente. Según diversos estudios (16,17) en un año se estima que se remodela el 3-4% del hueso cortical (exterior) y el 25-30% del hueso trabecular (interior).

En esta tabla 3 se resumen las principales indicaciones y características farmacológicas de los bisfosfonatos intravenosos y orales más usados en el mercado.

Nombre bisfosfonato genérico	Nombre comercial	Casa farmacéutica	Presencia de nitrógeno	Vía Administrac.	Enfermedad en que es utilizado	Potencia	Dosis
Alendronato	Fosamax® Osteo-max®	Merk	Si	Oral	Osteoporosis	1000	10 mg/día, 70 mg/sem
Risedronato	Actonel®	Procter & Gamble	Si	Oral	Osteoporosis	1000	5mg/día, 35 mg/sem
Ibandronato	Boniva®	Roche	Si	Oral	Osteoporosis	1000	2,5 mg/día, 150 mg/mes
Pamidronato	Aredia®	Novartis	Si	IV	Quimioterapia	1000-5000	90 mg/3 sem
Zoledronato	Zometa®	Novartis	Si	IV	Quimioterapia	10000 +	4 mg/3 sem
Zoledronato	Aclasta® Reclast®	Novartis	Si	IV	Osteoporosis	10000 +	5 mg/año
Denosumab	Xgeva®	Amgen Europa B.V.		SC	Quimioterapia		120 mg/4 sem
Denosumab	Prolia®	Amgen Europa B.V.	Anticuerpo monoclonal humano	SC	Osteoporosis		60mg/ 6 mes

Tabla 3. Principales indicaciones y características farmacológicas de los bisfosfonatos. IV: intravenoso, SC: subcutánea.

I. CONCEPTO DE OSTEONECROSIS POR BISFOSFONATOS

La osteonecrosis de los maxilares producida por fármacos antirresortivos del hueso, tales como los bisfosfonatos orales e intravenosos, es una forma especial de osteomielitis crónica, de progresión lenta, acompañada o no de dolor, con presencia de exposiciones óseas mandibulares y/o maxilares con un hueso típicamente necrótico y sin tendencia a la curación de forma espontánea (18).

Esta entidad fue inicialmente descrita en el año 2002 por Marx y Stern (18), en cuyo estudio presentaban casos de osteonecrosis de los maxilares en pacientes que habían recibido pamidronato para el tratamiento de sus metástasis óseas (19).

Posteriormente, en el año 2003, Marx (20) presentó la primera serie de casos de osteonecrosis de los maxilares en pacientes tratados con bisfosfonatos intravenosos durante el tratamiento de su cáncer, y desde entonces ha habido un número creciente de publicaciones sobre este tema (21). El objetivo de estos tratamientos era controlar las alteraciones del metabolismo del calcio existentes en estos pacientes, como es la hipercalcemia tumoral maligna, o bien eventos esqueléticos asociados a las metástasis óseas de los tumores sólidos, tales como sucede en el cáncer de mama, pulmón, próstata y también en pacientes con Mieloma Múltiple.

Asimismo, se ha descrito que estos fármacos antirresortivos mejoran la supervivencia del cáncer, junto a los efectos beneficiosos descritos en la hipercalcemia maligna y otros eventos óseos. Sin embargo, con su uso se han descrito efectos adversos importantes como la señalada osteonecrosis de los maxilares por bisfosfonatos.

Así pues, tal y como se ha mencionado anteriormente, en el año 2003 fueron publicadas por Marx (20) las primeras series amplias de casos de osteonecrosis de los maxilares por bisfosfonatos. Ya entonces se vislumbraba una creciente aparición de casos de ONM dada la gran cantidad de pacientes que tomaban este fármaco a nivel mundial, de hecho es uno de los 19 fármacos más prescritos en Medicina (22).

Los pacientes que presentó Marx (20) habían recibido pamidronato 90 mg (Aredia®) y especialmente el ácido zoledrónico 4 mg (Zometa®), por lo que se empezó a sospechar acerca de la posible influencia de estos fármacos en la etiología de dicha patología de los maxilares.

A partir de ese momento y tras la aparición de muchos otros casos nuevos de osteonecrosis, se confirmó lo descrito por Marx (20) acerca de la estrecha relación entre la aparición de osteonecrosis y la toma de estos fármacos. Esta osteonecrosis de los maxilares no había sido detectada en los ensayos clínicos previos a la comercialización de estos fármacos.

Estos fármacos, como el pamidronato y especialmente el ácido zoledrónico, se emplean para el tratamiento de cánceres metastásicos, cáncer de mama principalmente así como en el Mieloma Múltiple.

En las últimas décadas se ha confirmado también la utilidad de los BF en el tratamiento de la osteoporosis, la enfermedad de Paget, la osteogénesis imperfecta, la enfermedad de McCune-Albright o ante otras situaciones como la prevención de la enfermedad ósea tras el trasplante de órganos (23).

Posteriormente se publicaron diversos estudios, tales como los de Ruggiero *y cols.* (24) en 2004, que describieron la aparición de osteonecrosis por bisfosfonatos en 63 pacientes, de los cuales 56 pacientes habían recibido bisfosfonatos por vía intravenosa durante al menos 1 año y 7 pacientes estaban en tratamiento con bisfosfonatos por vía oral durante un largo periodo de tiempo.

En el año 2005, Bagán *y cols.* (25) publicaron la aparición de 10 nuevos casos, siendo esta la primera serie europea publicada en una revista internacional de impacto. Asimismo, publicaciones posteriores tales como las de Marx *y cols.* (26) en 2005, presentaron una serie creciente con 119 nuevos casos.

En el año 2006, el Colegio Americano de Reumatología (ACR) describió la Osteonecrosis de los maxilares como una lesión intraoral con hueso expuesto de color blanco amarillento, en ocasiones asociado a una fístula intra o extraoral. Del mismo modo, Sambrook *y cols.* (27) ese mismo año la definieron como “área de hueso expuesto que persiste más de 6 semanas tras una cirugía oral” pudiendo estar asociado a dolor e infección.

También ese año 2006 se creó un grupo de trabajo entre Australia y Nueva Zelanda (27), donde pusieron de manifiesto que no existía ninguna definición clara dada hasta el momento para esa entidad. Estos autores sugieren definirla como “área de hueso expuesto que persiste más de 6 semanas”. Indicando que se debería sospechar esta patología en pacientes que presentasen en la región maxilofacial una zona de exposición ósea tras una cirugía oral, existiendo síntomas asociados como dolor e infección.

La Asociación Americana de Cirujanos Orales y Maxilofaciales (AAOMS), en el año 2007, definió la osteonecrosis como una exposición de hueso necrótico en la región maxilofacial que persiste durante más de 8 semanas en pacientes que están recibiendo o han recibido tratamiento con bisfosfonatos y que no tienen historia anterior de radioterapia en los maxilares (28).

Asimismo, en ese mismo año 2007, la Sociedad americana para la investigación ósea y mineral (ASBMR) habla de “*caso confirmado de osteonecrosis*” cuando existe un área

de hueso expuesto en la región maxilofacial, que no ha curado en 8 semanas después de haber sido identificada por un profesional, en un paciente que ha recibido anteriormente tratamiento con fármacos antirresortivos y que no ha sido tratado con radioterapia en la región maxilofacial. Es un “*caso sospechoso*” cuando hay un área de hueso expuesto en la región maxilofacial, que también ha sido identificada por un profesional de la salud y se mantiene durante más de ocho semanas (29).

Un año más tarde, en el 2009, la Asociación Americana de Cirujanos Orales y Maxilofaciales (AAOMS) realizó una puesta al día sobre el tema, sin llegar a introducir cambios en la definición propuesta por ellos mismos en el año 2007, la cual se ha mantenido hasta el año 2014. Sin embargo, propusieron una nueva clasificación de estadios, introduciendo el nuevo estadio denominado 0, para pacientes que no presentan hueso expuesto pero que tienen síntomas muchas veces inespecíficos. Asimismo, autores como Bedogni *y cols.* (30) o Colella *y cols.* (31) entre otros, opinaban que debería reformularse la definición de BRONJ, ya que de otro modo quedaban excluidos los pacientes de este estadio 0.

Solicitaban que la definición de BRONJ debería incluir no sólo los casos en los que hay hueso expuesto, sino también aquellos en los que existiese hueso necrótico no visible clínicamente, y debería hacerse un diagnóstico y una nueva clasificación basándose no solo en la clínica sino también en los hallazgos radiográficos.

Otros autores tales como Junquera y Gallego en 2008 (32), Bagán *y cols.* en 2009 (21), Mawardi *y cols.* en 2009 (33), también sugirieron que la ONM puede producirse sin exposición ósea y siendo sus principales características clínicas la presencia de fístulas, dolor y alteraciones radiográficas, pero ninguno de ellos tenían áreas de hueso expuesto.

Por otra parte, posteriormente se han publicado casos en los que se asocia la osteonecrosis maxilar con otros agentes antirresortivos como el denosumab o con medicaciones oncológicas que son antiangiogénicas como el sunitinib, el sorafenib, el bevacizumab o el sirolimus. En consecuencia, algunos autores (34,35) propusieron otros términos como osteonecrosis de los maxilares inducida por fármacos u osteonecrosis maxilar asociada a fármacos antirresortivos.

Finalmente, en el año 2014 la Asociación Americana de Cirujanos Orales y Maxilofaciales (AAOMS) propuso un cambio en la nomenclatura a favor del término “Osteonecrosis de los maxilares relacionada o debida a fármacos” (medication-related osteonecrosis of the jaw (MRONJ)) (36).

En la puesta al día de la AAOMS del año 2014 (14,36), además de introducir este cambio en el nombre de la patología, también se modifica su definición, considerando que un paciente tiene MRONJ si están presentes todas las características que se detallan a continuación:

1. Tratamiento actual o previo con agentes antirresortivo o antiangiogénicos.
2. Hueso expuesto o fístula intra o extraoral en la región maxilofacial que se comunica con el hueso y que persiste durante más de 8 semanas.
3. No hay historia previa de radioterapia de los maxilares ni enfermedad metastásica obvia en los mismos.

Más recientemente, en 2015, el grupo de trabajo internacional sobre ONM (International Task Force on Osteonecrosis of the Jaw) (37) define la ONM como:

1. Hueso expuesto en la región maxilofacial que no cura en 8 semanas, tras ser identificado por un profesional sanitario (Fig. 5).
2. Exposición a un agente antirresortivo.
3. No hay historia previa de radioterapia en la región craneofacial.

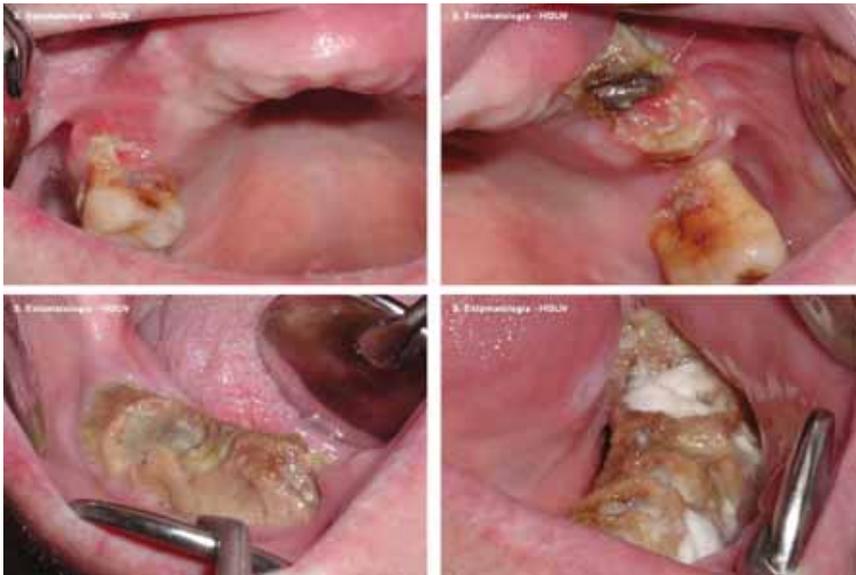


Fig. 5. Osteonecrosis de los maxilares en los cuatro cuadrantes.

II. PREVALENCIA E INCIDENCIA DE OSTEONECROSIS DE LOS MAXILARES

1. PACIENTES ONCOLÓGICOS TRATADOS CON BISFOSFONATOS

En pacientes oncológicos con metástasis óseas se emplean dosis mucho más elevadas de bisfosfonatos para conseguir una mayor inhibición de los osteoclastos que en los pacientes con Osteoporosis; siendo por lo tanto mucho mayor la prevalencia e incidencia de ONM en pacientes con enfermedades malignas que en la osteoporosis. En los primeros se usan bisfosfonatos intravenosos y habitualmente el ácido zoledrónico para reducir las complicaciones y el dolor en pacientes que la enfermedad maligna se ha extendido a los huesos del organismo. Este fármaco suele administrarse junto con otros medicamentos quimioterápicos.

La prevalencia de osteonecrosis de los maxilares en pacientes con cáncer que han sido tratados con bisfosfonatos intravenosos, según diversos autores, oscila entre el 0% y el 0,18% (38,39).

La incidencia de osteonecrosis en pacientes oncológicos que han recibido estos fármacos intravenosos está descrita en un rango que oscila desde 0 al 12,22 por cada 100.000 pacientes/año. En estos pacientes con cáncer la incidencia varía de forma significativa en función de la dosis y el tiempo de administración del fármaco antirresortivo (36).

Algunos otros autores describen cifras de incidencia que van desde 0 hasta 90 por cada 100.000 pacientes-año, tal como lo describen investigadores como Lyles *y cols.* (40), Powell *y cols.* (41) o Tennis *y cols.* (42). El riesgo de desarrollar una ONM para otros autores, es de 0 a 0,019%, es decir de 0 a 1,9 casos por cada 10.000 pacientes con cáncer (38).

Aunque no es motivo de esta investigación, pero si comparamos con el denosumab cuando se emplea oncológicamente, Smith *y cols.* (43) en un ensayo controlado en 1432 hombres con cáncer de próstata, 716 pacientes tratados con denosumab y 716 con placebo, se diagnosticaron 33 casos de ONM debido al denosumab, lo que supone una incidencia acumulada del 5%, y sin embargo no se registró ningún caso de osteonecrosis en el grupo placebo.

En un meta-análisis recientemente publicado por Troeltzsch *y cols.* (44) en el que se estudiaron simultáneamente siete ensayos controlados, el denosumab se asoció con un riesgo global del 1,7% de desarrollar una osteonecrosis de los maxilares. Se comparó con los que tomaban bisfosfonatos y con un grupo control sano que habían recibido placebo. Sin embargo, concluyeron que en la actualidad no hay suficientes datos para determinar si existe una diferencia en el riesgo de ONM en pacientes que han recibido dosis altas de denosumab frente a pacientes que han recibido dosis altas de bisfosfonatos intravenosos.

Estos autores también determinaron que la supresión de la terapia antiresortiva puede mejorar y en algunos casos hasta hacer desaparecer las lesiones de osteonecrosis por bisfosfonatos, aunque indican que esos datos requieren de mayores estudios prospectivos (44).

Las neoplasias primarias malignas que más frecuentemente son tratadas con bisfosfonatos intravenosos son las de mama, pulmón y próstata; así como el Mieloma Múltiple. Según diversas publicaciones, la mayor incidencia de aparición de ONM, se produce en pacientes tratados con bisfosfonatos intravenosos como el ácido zoledrónico (45); si bien no se encuentran diferencias en la incidencia de ONM entre pacientes con Mieloma Múltiple y cáncer de próstata (46).

Los principales factores de riesgo en el desarrollo de osteonecrosis de los maxilares, son: el empleo de los bisfosfonatos intravenosos, a mayor número de ciclos de ácido zoledrónico mayor riesgo (36), el que hayan recibido corticosteroides de forma asociada (47) y también quimioterapia simultáneamente (48); así como los tratamientos quirúrgicos a nivel oral, como son las extracciones dentales (46,49,50) la enfermedad periodontal, las prótesis dentales que ocasionen efectos irritativos o traumáticos en la mucosa oral de apoyo (46,51) o la existencia de una diabetes mellitus en el paciente (47).

En la tabla 4 se resumen diversas publicaciones acerca de la incidencia y prevalencia de osteonecrosis de los maxilares en estos pacientes que están recibiendo o han recibido bisfosfonatos intravenosos.

2. PACIENTES CON OSTEOPOROSIS TRATADOS CON BISFOSFONATOS

Según Ruggiero *y cols.* (52) en el año 2008 alrededor de 5 millones de pacientes mayores de 55 años estaban recibiendo bisfosfonatos orales para la osteoporosis. En un estudio realizado recientemente en Estados Unidos, 7 de cada 100 personas adultas estaban recibiendo bisfosfonatos orales como tratamiento para la osteoporosis (53).

Existen múltiples publicaciones de series de casos (24,54) estudios observacionales retrospectivos (55,56), y estudios de ensayos clínicos randomizados (57,58), acerca de la frecuencia de aparición de osteonecrosis de los maxilares en pacientes con osteoporosis. Sin embargo, hay muy pocos estudios de cohortes prospectivos, por lo tanto existen escasas evidencias acerca de la incidencia exacta de esta patología en estos pacientes.

Autor, Año	Tipo estudio	Fármaco	Razón de Incidencia (número de nuevos casos durante un periodo de tiempo dado)			Prevalencia (número de nuevos casos en una población)	
			ONM/total	Tiempo	Incidencia por 100.000 pac/año	ONM total	Prevalencia
Grbic, 2008	ECA	BF IV	BF: 1/3889 PBO: 1/3876	3 años 3 años	8.6 8.6		
Lyles, 2007	ECA	BF IV	BF: 1065 PBO: 1062	1.9 años	0 0		
Lapi, 2013	C & CC	BF	61/65,220	3 años	36.6		
Devogelaer, 2007	C	BF IV	0/119	5 años	0		
Powell, 2012	C	BF IV BF	1/201	7 años	90 68		
Cartsos, 2008	CR	BF IV BF Oral				9/1751 150/176889	0.00514 0.000848
Fellows, 2011	CR	BF IV BF Oral				2/367067 6/572589	0.000005 0.00001
Lyles, 2007	ECA	BF IV				0/2127	0
Powell, 2012	CR	BF IV				ND	0.005
Sieber, 2013	CR	BF IV				0/272	0
Taylor, 2013	CR	BF Oral BF IV				5/202 8/23	0.025 0.348
Yao, 2008	CR	BF				0/22	0
Lo, 2010	SC	BF				9/8572	0.00105
Jadu, 2007	SC	BF IV				21/655	0,03

Tabla 4. Incidencia de ONM con bisfosfonatos intravenosos.

*SC: series de casos, CC: caso-control, CP: cohortes prospectivo, CR: cohortes retrospectivo, ECA: ensayo clínico aleatorizado, MA: metanálisis, OP: osteoporosis, BF: bisfosfonato, IV: intravenoso, ND: no disponible, BPO: bisfosfonatos orales. (Tabla modificada de: Khan AA y cols. *Diagnosis and Management of Osteonecrosis of the Jaw: A Systematic Review and International Consensus J Bone Miner Res.* 2015 Jan;30:3-23).

Autor, Año	Tipo estudio	Fármaco	Razón de Incidencia (número de nuevos casos durante un periodo de tiempo dado)			Prevalencia (número de nuevos casos en una población)	
			ONM/total	Tiempo	Incidencia por 100.000 pac/año	ONM total	Prevalencia
Tennis, 2012	C	BF Oral BF IV	BF: 2/8468 No BF: 13/26376	ND	15 26		
Walter, 2008	C	BF IV				8/43	0,186
Zervas, 2006	SC	BF IV				28/254	0,11
Hoff, 2008	SC	BF IV				16/1338	0,012
Coleman, 2011	ECA	BF IV	11/1665	3 años	220		
Crawford, 2009	C		4/126	4,33 años	733		
Mavrokokki, 2007	CR	BF Oral BF IV				ND	0.0001- 0.0004 0.0088- 0.0115
Corso, 2007	C	BF IV	4/126	2 años	3302		
Dimopoulos, 2009	C	BF IV	16/128	2,33 años	5365		
Ding, 2012	C	BF IV	1/181	4,2 años	132		
Hines, 2009	ECA	BF IV	1/395	1 año	253		
Ibrahim, 2008	C	BF IV	8/539	4,5 años	330		

Tabla 4. cont. Incidencia de ONM con bisfosfonatos intravenosos.

*SC: series de casos, CC: caso-control, CP: cohortes prospectivo, CR: cohortes retrospectivo, ECA: ensayo clínico aleatorizado, MA: metanálisis, OP: osteoporosis, BF: bisfosfonato, IV: intravenoso, ND: no disponible, BPO: bisfosfonatos orales. (Tabla modificada de: Khan AA y cols. *Diagnosis and Management of Osteonecrosis of the Jaw: A Systematic Review and International Consensus* J Bone Miner Res. 2015 Jan;30:3-23).

La prevalencia de osteonecrosis de los maxilares en estas personas que toman bisfosfonatos orales es menor que la existente en los pacientes que reciben bisfosfonatos intravenosos por procesos oncológicos, siendo entre un 0 y un 0,04%, e incluso algunos otros estudios señalan cifras de prevalencia menores del 0,001% (39,59).

Según Barach *y cols.* (49) existe una asociación entre la toma de fármacos antirresortivos orales y la aparición de lesiones de osteonecrosis de los maxilares con un odds ratio de 12,2 y un intervalo de confianza del 95% (4,3-35). Asimismo, Felsenberg *y cols.* (60) indicaron en su estudio una prevalencia de osteonecrosis en pacientes tratados con bisfosfonatos orales de <1/100.000. Coincidiendo con Lo *y cols.* (61) que evaluaron la base de datos de Kaiser y hallaron una prevalencia, en aquellos pacientes que habían estado recibiendo más de dos años estos fármacos, con un rango comprendido entre 0,05% y el 0,21%.

Según publicaciones realizadas por diversos autores (62-64) la incidencia de osteonecrosis en pacientes que toman bisfosfonatos orales está situada entre 1,04 hasta 69 por cada 100,000 pacientes/año, siendo inferior a los pacientes que toman fármacos antirresortivos intravenosos (65). Por otro lado, la incidencia de osteonecrosis en pacientes que toman denosumab para osteoporosis oscila desde 0 hasta 30,2 por cada 100.000 pacientes/año (66).

Coincidiendo diversos autores de Suecia (64), Australia (67) y Estados Unidos (68) señalan que la incidencia de osteonecrosis es muy baja cuando se toman bisfosfonatos orales, siendo aproximadamente de un 0,067%. Por lo que concluyen que no existe riesgo a destacar o significativo de desarrollar lesiones de ONM en pacientes que toman bisfosfonatos orales tras una cirugía menor. Por el contrario, indican que en los pacientes que han recibido o están recibiendo bisfosfonatos intravenosos el riesgo de desarrollar una osteonecrosis se multiplica por cuatro tras una cirugía menor, coincidiendo con las publicaciones realizadas por Pazianas *y cols.* (69).

En la tabla 5, se resumen diversas publicaciones acerca de la incidencia y prevalencia de osteonecrosis de los maxilares en estos pacientes que toman bisfosfonatos orales.

Autor, Año	Tipo estudio	Patología	Fármaco	Razón de Incidencia (número de nuevos casos durante un periodo de tiempo dado)			Prevalencia (número de nuevos casos en una población)	
				ONM/total	Tiempo	Incidencia por 100.000 pac/año	ONM total	Prevalencia
Lapi, 2013	C & CC	OP	BF	61/65,220	3 años	36.6		
Powell, 2012	C	OP	BF IV BF	1/201	7 años	90 68		
Cartsos, 2008	CR	OP	BF IV BF Oral				9/1751 150/176889	0.00514 0.000848
Fellows, 2011	CR	OP	BF IV BF Oral				2/367067 6/572589	0.000005 0.00001
Taylor, 2013	CR	OP	BF Oral BF IV				5/202 8/23	0.025 0.348
Yao, 2008	CR	OP	BF				0/22	0
Lo, 2010	SC	OP	BF				9/8572	0.00105
Etminan, 2008	CC	OP	BF Oral	ND	5.25 años	26.7		
Khan, 2011	C	OP	BF Oral	13/ND	3 años	1.04		
Tennis, 2012	C	OP	BF Oral BF IV	BF: 2/8468 No BF: 13/26376	ND	15 26		
Ulmner, 2014	C	OP	BF Oral	ND	2 años	67-69		
Iwamoto, 2011	CR	OP	BF Oral				0/151	0
Grant, 2008	SC	OP	BF Oral				0/115	0
Hong, 2010	CR	OP	BF Oral				7/12752- 7/9882	0.0005- 0.0007
Lo, 2010	CR	OP	BF Oral				9/8572	0.0010
Malden, 2012	SC	OP	BF Oral				1/4545	0.00022
Mavrokokki, 2007	CR	OP	BF Oral BF IV				ND	0.0001- 0.0004 0.0088- 0.0115
Yamazaki, 2012	CR	OP	BF Oral				ND	0.0038- 0.0081
Sedghizadeh, 2009	SC	OP	BF Oral				9/208	0.04

Tabla 5. Incidencia de ONM con bisfosfonatos orales.

*SC: series de casos, CC: caso-control, CP: cohortes prospectivo, CR: cohortes retrospectivo, ECA: ensayo clínico aleatorizado, MA: metanálisis, OP: osteoporosis, BF: bisfosfonato, IV: intravenoso, ND: no disponible. (Tabla modificada de: Khan AA y cols. *Diagnosis and Management of Osteonecrosis of the Jaw: A Systematic Review and International Consensus J Bone Miner Res.* 2015 Jan;30:3-23).

III. FACTORES ETIOPATOGÉNICOS

A pesar de que la primera serie de casos de osteonecrosis de los maxilares se describió en el año 2003, la etiopatogenia no está del todo clara en la actualidad, ya que principalmente se desconoce si la necrosis precede o es consecuencia de la infección ósea. La principal acción de los bisfosfonatos sobre el hueso es inhibir la acción osteoclástica, como hemos descrito anteriormente en este capítulo de introducción (6).

La angiogénesis es un proceso que conlleva el crecimiento, migración y diferenciación de las células endoteliales para poder formar nuevos vasos sanguíneos. Por lo tanto, esta angiogénesis influye significativamente en el crecimiento y en la invasión tumoral, como ocurre en las metástasis de tumores sólidos (2).

Los bisfosfonatos presentan propiedades antiangiogénicas (70,71), que consisten en una inhibición o reducción de la formación de nuevos vasos sanguíneos a partir de vasos ya preexistentes. Esta inhibición de la angiogénesis también se ha implicado en el proceso patológico del desarrollo de la osteonecrosis de los maxilares (71).

Igualmente, otros fármacos tales como el sunitinib (72) y el bevacizumab (73) son usados por su capacidad antiangiogénica en pacientes con cáncer, inhibiendo la diferenciación y la función de los osteoclastos, aumentando la apoptosis de estos, lo que nos lleva a una disminución de la remodelación de los osteoclastos y por tanto de la resorción ósea. Todo ello ha sido relacionado con la aparición de lesiones de osteonecrosis.

A pesar de que en su mecanismo de acción los bisfosfonatos actúan principalmente sobre el osteoclasto, algunos estudios *in vitro* (74, 75) informan acerca de su toxicidad sobre los tejidos blandos; con un aumento de la apoptosis o disminución de la proliferación de algunas células, sin embargo no se hallaron fenómenos de toxicidad sobre los tejidos blandos con el denosumab.

La farmacogenómica también puede influir en el riesgo de los pacientes a desarrollar una osteonecrosis de los maxilares. Se ha sugerido que polimorfismos tanto en el farnesil pirofosfato sintasa (76) como en los genes del citocromo P450 CYP2C8 (77) pueden predisponer a los pacientes para desarrollar lesiones de osteonecrosis.

Según diversos autores (47,78), los corticosteroides que son hormonas esteroideas que se usan como fármacos antiinflamatorios e inmunosupresores, pueden retardar la cicatrización de las heridas y alterar la microflora oral, aumentando de este modo el riesgo de infección y de ONM. Saad *et al.* (78) en su estudio hallaron una cierta asociación entre la aparición de osteonecrosis mandibular y el uso de corticosteroides.

Otras situaciones sistémicas que favorecen el desarrollo de osteonecrosis son la anemia, con cifras de hemoglobina menores de 10 g/dL y la diabetes con valores superiores a 120 mg/dl (47).

Los principales factores locales desencadenantes de la osteonecrosis de los maxilares son las intervenciones quirúrgicas que se realizan en la cavidad oral, y sobre todo las extracciones dentales, así como la presencia de infecciones dentales y periodontales (26). Existen diversos estudios (79,80) en los que se ha comprobado que al realizar una extracción en un diente con enfermedad periodontal o infección periapical existe un riesgo elevado de desarrollar una osteonecrosis en esa zona.

La cirugía dentoalveolar, como hemos señalado antes, es considerada como el factor desencadenantes de mayor riesgo para desarrollar una ONM. Diversos estudios han descrito que en pacientes con ONM, la extracción de un diente es el precipitante más frecuente, ya que entre el 52-61% de los pacientes se les había realizado una extracción previa (36) (Fig. 6).

Asimismo, en un estudio de casos-controles de pacientes con cáncer tratados con Zoledronato, el riesgo de ONM, ante una extracción dental, aumentaba en un 16% frente a los pacientes controles (51). En un estudio de cohortes longitudinal de una muestra de pacientes con cáncer que tomaban bisfosfonatos intravenosos, predominantemente Zoledronato, la extracción dental se asoció con un riesgo 33 veces mayor de desarrollar una posible osteonecrosis (46).

A nivel de bisfosfonatos orales, según un estudio prospectivo (81) de 194 pacientes que tomaban estos fármacos y a los que se les hizo al menos una extracción dental de un diente, tan solo un paciente desarrolló ONM, siendo la estimación del riesgo del 0,5%.

Según la última publicación de Ruggiero *y cols.* (36), se desconoce el riesgo exacto y real que tienen los pacientes que han estado expuestos a estos fármacos antirresortivos a desarrollar ONM ante intervenciones quirúrgicas tales como la colocación de un implante o intervenciones conservadoras como la endodoncia o bien tratamientos periodontales. Debido a la ausencia de datos al respecto, los autores anteriores consideraron que el riesgo tras la colocación de un implante, una endodoncia con apiceptomía o un procedimiento periodontal quirúrgico, en el que se requiera la exposición y manipulación ósea, es comparable al de una extracción dental.

El uso de prótesis dentales también se ha asociado con un mayor riesgo de ONM. En un estudio realizado por Vahtsevanos *y cols.* (46) en una muestra de 1.621 pacientes con cáncer tratados con Zoledronato intravenoso, ibandronato, o pamidronato se comprobó que los pacientes portadores de prótesis tuvieron un riesgo dos veces superior.

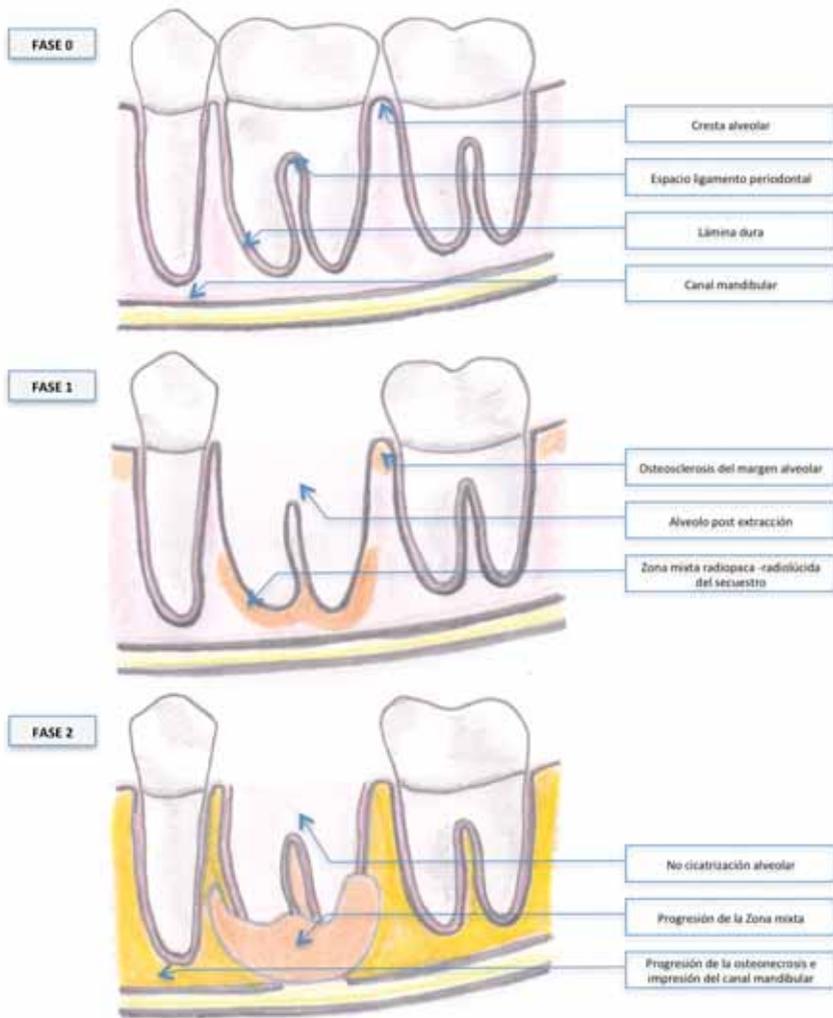


Fig. 6. Esclerosis ósea progresiva ante una extracción mandibular en un paciente que desarrolla osteonecrosis por bisfosfonatos. (Modificado de Arce K, Assael LA, Weissman JL, Markiewicz MR. *Imaging findings in bisphosphonate-related osteonecrosis of jaws.* J Oral Maxillofac Surg. 2009 May;67(5 Suppl):75-84).

Asimismo, Tsao y cols. (47) indicaron que entre el 71% y el 84% de los pacientes con osteonecrosis de los maxilares tenían periodontitis, lo que sugiere que puede ser un factor de riesgo. La periodontitis es una enfermedad inflamatoria del periodonto que se encuentra relacionada con un biofilm oral que contiene numerosos patógenos bacterianos específicos y que pudiesen influir o contribuir al desarrollo de una ONM.

A partir de las publicaciones anteriores, también se realizaron diversos estudios en animales que intentaban demostrar que la combinación de fármacos antirresortivos sobre el hueso, junto con la inflamación o infección bacteriana son suficientes para inducir lesiones de osteonecrosis (82,83).

La enfermedad periodontal activa, la patología periapical, los procesos quirúrgicos que originen una exposición ósea, como una simple extracción dental, y los traumatismos e irritaciones continuas en la mucosa deberían provocar, en condiciones normales, un aumento en la actividad de los osteoclastos (84). Los osteoblastos, tratan de originar un hueso nuevo, pero al no existir esa remodelación y eliminación de hueso por los osteoclastos en los pacientes tratados con bisfosfonatos, este no se reabsorbe tal como fisiológicamente debería suceder y al final acaba siendo necrótico y se infecta (85).

También es importante destacar, como hemos señalado anteriormente en este mismo apartado, que se produce una alteración vascular en esa área, inhibiéndose la angiogénesis, que es un proceso fisiológico y que consiste en la formación de nuevos vasos sanguíneos a partir de los vasos preexistentes (86). La existencia de bacterias a nivel oral también propicia la formación del secuestro y la osteomielitis.

En la cavidad oral existen cientos de microorganismos, por lo que se incrementa el riesgo de infección tras un simple procedimiento dental como una extracción; además debemos tener en cuenta que la mayoría de los pacientes con cáncer están tratados con fármacos inmunosupresores. Todos estos factores, unidos a una posible mala higiene bucal por parte del paciente, hacen que el hueso quede expuesto a la flora microbiana, y se infecte produciendo el típico cuadro clínico de dolor, inflamación, infección con supuración y finalmente fenómenos de necrosis ósea (87).

En los tejidos óseos, según diversos estudios (88,89), se observaron colonias de agregados de bacterias y leucocitos polimorfonucleares, así como presencia de microfilms bacterianos que podrían estar relacionados con la resorción osteoclástica (90), por lo que podrían contribuir en el proceso de necrosis ósea.

En los primeros estudios en los que se estudiaron especímenes de hueso necrótico de pacientes con osteonecrosis de los maxilares, se detectó sobre todo la presencia de *Actinomyces* (91). Incluso, otros estudios hablan de un biofilm complejo, formado por una

combinación de hongos, virus y otros microorganismos, que podrían requerir terapias mucho más sofisticadas para poder eliminarlos (88,92).

En un estudio realizado por Tsurushima *y cols.* (93) en el que se inyectó Zoledronato en ratas, se produjo una estimulación local con *Actinobacillus Aggregatibacter* liofilizados, produciéndose extensas osteonecrosis maxilares en estos animales.

En los estudios que analizan los efectos de los bisfosfonatos sobre las células inmunológicas, se ha observado que pueden inhibir la activación y la proliferación de los linfocitos T, así como la supresión de varias citoquinas: interleuquina-1 β (IL-1 β), interleuquina-6 (IL-6) y el factor de necrosis tumoral α (TNF- α), todo lo cual favorece la infección (87).

Así pues, la interleuquina-1 β , la interleuquina-6, la interleuquina-8 o el factor de necrosis tumoral, que es una citoquina también proinflamatoria e inmunomoduladora, que es producida por un amplio conjunto de células tales como, macrófagos, monocitos, linfocitos B y T, células NK, así como queratinocitos y fibroblastos que son células que no pertenecen al sistema inmune, todas estas citoquinas promueven la destrucción ósea (93).

Por el contrario algunas otras citoquinas presentan, sobre todo, efectos beneficiosos, como es el caso de la interleuquina-4 (IL-4), interleuquina-10 (IL-10), interleuquina-11 (IL-11), los factores de crecimiento insulínicos (IGFs), las proteínas morfogénicas óseas (BMP), el factor de crecimiento transformante β (TGF- β), la proteína relacionada con la hormona paratiroidea (PTHrP), que promueven el aumento de la producción ósea (94).

El TNF- α , lleva a cabo su función mediante la acción de dos receptores, denominados (TNFR1 y TNFR2), que se expresan en la mayoría de las células. El TNFR1, es el principal receptor que se encarga de la señalización intercelular, mientras que el TNFR2 tan solo potencia esta acción (94). También, está demostrado que incrementa la sensibilidad de cualquier célula a la estimulación de TNF- α , aunque según Amar *y cols.* (95) a nivel experimental también se ha demostrado que el TNFR2 puede reducir la respuesta inflamatoria. Las formas solubles actúan como inhibidores de forma natural de la actividad del TNF- α , debido que se produce una competición por esta citoquina con los receptores transcelulares, bloqueando de este modo su actividad (94). Por ello, el papel tanto del TNFR1 y del TFNR2 no sólo se limita a la transducción de señales, sino que también efectúa funciones autorreguladoras extracelulares, que repercuten sobre la biodisponibilidad de TNF- α .

Por todo ello, para evitar una excesiva respuesta inflamatoria, que tenga como consecuencia una gran destrucción tisular, la función del TNF- α debe ser controlada y regulada. Esta acción la efectúan las interleuquinas antiinflamatorias, IL-10, IL-4 y también las formas solubles de sus receptores. Estas citoquinas inhiben la unión del ligando junto con los receptores mediante una concurrencia competitiva, mediante el bloqueo de su acción y el de

la señalización intracelular. En un estudio experimental realizado por Stewart *y cols.* (96) en el que se emplearon receptores solubles in vivo se consiguió inhibir procesos patológicos tales como inflamaciones dérmicas, artritis reumatoide y procesos autoinmunes.

Hace unos años el consumo de tabaco se consideraba un factor de riesgo para el desarrollo de la ONM; sin embargo en estudios más recientes realizados por diversos autores (47,51), el uso del tabaco no se halló relacionado con la aparición de la ONM.

En lo referente al papel del ligando de receptor activador para el factor nuclear κ B (RANKL), el Receptor Activator of Nuclear Factor κ B (RANK) y la osteoprotegerina (OPG) en la osteonecrosis de los maxilares, Dinisio *y cols.* (97) en su modelo experimental observaron que la activación de RANK/RANKL en el hueso necrótico mandibular de sujetos tratados con bisfosfonatos conduce a la diferenciación y activación de los osteoclastos. Además en su estudio, suponen un vínculo de unión entre los patógenos, tales como lipopolisacáridos que son producidos por las bacterias que colonizan e infectan el hueso necrótico y los alrededores de éste, y la vía de señalización RANK/RANKL/OPG. Así pues, la activación de los osteoclastos podría ser un mecanismo de protección del tejido óseo necrótico para poder eliminar la infección, ya que se observó una reducción mediante técnicas de inmunohistoquímica de la sialoproteína ósea (BSP), lo que indica un deterioro en los mecanismos de remodelación fisiológica, mientras que la expresión del factor de crecimiento endotelial-vascular (VEGF) se mantenía similar, tanto en las muestras de hueso necrótico como en las de hueso sano.

A su vez, procesos fisiológicos como lo es la oclusión dentaria originan sobre las fibras del ligamento periodontal una tensión y compresión que desencadena el inicio de la remodelación ósea, favoreciéndose de este modo el acúmulo de bisfosfonatos en esta zona inhibiendo la acción de los osteoclastos (98).

Los osteocitos y osteoblastos del hueso alveolar activan la remodelación ósea como respuesta a las fuerzas mecánicas, mediante la expresión local de diversas citoquinas, y con la aparición de nuevos osteoclastos que proceden de las células madre hematopoyéticas medulares, denominadas "*unidades formadoras de colonias de granulocitos y macrófagos*" (99).

En el proceso de inducción y de maduración de los osteoclastos u osteoclastogénesis, el factor estimulante de colonias de macrófagos (CSF-1), el receptor asociado a la activación del factor nuclear kappa-beta, su ligando (RANKL) y la osteoprotegerina, desempeñan también un papel importante a partir de células provenientes de la línea granulocito-macrófago (14).

Asimismo, las células del ligamento periodontal y los fibroblastos gingivales, juegan también un papel fundamental en la osteoclastogénesis que involucra por lo menos 24 genes

distintos a través del eje RANK/RANKL/OPG, cuya expresión diferencial regula la resorción y la densidad ósea (100). Se ha demostrado que el trauma mecánico sobre las células del ligamento periodontal, aumenta la expresión del RANKL (ligando situado en la superficie de osteoblastos y pre-osteoblastos).

Para la activación de la diferenciación y la actividad osteoclástica es necesaria la interacción entre el RANK (receptor del ligando RANKL que se encuentra situado en la membrana de osteoclastos y pre-osteoclastos) y el RANKL que es una citoquina transmembrana perteneciente a la familia del factor de necrosis tumoral (TNF) (14).

Los efectos del RANKL se encuentran inhibidos por la osteoprotegerina (OPG) que es una proteína circulante producida por los osteoblastos y pre-osteoblastos, perteneciente a la superfamilia de los receptores de TNF, también segregada por los fibroblastos gingivales y las células del ligamento periodontal (87).

Cuando se unen RANKL y OPG, se inhibe la unión del RANKL a RANK, anulando de este modo la diferenciación osteoclástica. Por ello, tanto la OPG, como el RANK y el RANKL son importantes reguladores de la osteoclastogénesis (15).

Tiranathanagul y cols. (101) demostraron que con la presencia de *Actinobacillus Aggregatibacter* se aumentan, de forma significativa, los niveles de RANKL, sin embargo los niveles de OPG no se vieron alterados en las células periodontales humanas.

IV. MANIFESTACIONES CLÍNICAS DE LA OSTEONECROSIS POR BISFOSFONATOS

La ONM por bisfosfonatos presenta una serie de manifestaciones clínicas muy típicas que la hacen fácilmente reconocible. La definición de ONM propuesta por Ruggiero en 2009 (36) ha sido modificada recientemente en 2014, para evitar que se confunda con procesos de cicatrización retardada y también para poder evaluar correctamente la evolución clínica de las lesiones.

Según la publicación inicial realizada por Marx (26) se acepta como criterio diagnóstico, la presencia de una exposición ósea mandibular o maxilar con hueso necrótico visible. Existen algunos casos en los que se produce una supuración a través de una fístula oral en el proceso alveolar antes de producirse la exposición ósea.

A nivel internacional, existe un claro consenso en cuanto a la localización de las lesiones, siendo más frecuentes en la mandíbula (64-83%) que en el maxilar (8-22.5%), pero también hay ocasiones en que pueden aparecer en ambos maxilares (4,5%) siendo más frecuente en la zona de molares y premolares (36).

Puede afectar tanto a hombres como a mujeres, aunque la mayor prevalencia de esta patología la encontramos en la población femenina, debido probablemente a que es un reflejo de la enfermedad subyacente para la cual se prescriben estos fármacos, es decir la osteoporosis y el cáncer de mama (45,102).

La edad media de los pacientes con ONM, según diversos estudios entre los que se encuentra el de Stumpe *y cols.* (45) está situada entre 65 y 67 años. Existen algunos estudios que indican que edades más elevadas es un factor de riesgo para el desarrollo de una ONM. Sin embargo Vahntsevanos *y cols.* (46) determinaron que después de ajustar los posibles factores de confusión, la edad no estaba relacionada con un mayor riesgo de padecer ONM.

Hay muy pocos datos que describen la aparición de ONM en la población pediátrica. En un estudio observacional, Brown *y cols.* (103) revisaron cuarenta y dos pacientes pediátricos que habían recibido tratamiento con bisfosfonatos intravenosos durante una media de seis años y medio, y a pesar de que se realizaron tratamientos dentales invasivos, en estos pacientes no se describieron casos de ONM. Sin embargo, se requieren más estudios sobre estos pacientes para poder determinar la prevalencia real en la población infantil.

En un estudio realizado por Marx *y cols.* (20) en 97 pacientes con ONM y seguidos durante un año o más, nueve de ellos (9,9%) tuvieron episodios intermitentes de dolor que requirieron un ajuste de las pautas antibióticas e irrigaciones diarias en clínica con Clorhexidina al 0,12%. Sin embargo, el 90,1% restante permanecieron sin dolor ni ninguna alteración inflamatoria en la zona. Tampoco ninguno de los pacientes desarrolló una fractura de la mandíbula.

Según la presencia de hallazgos clínicos como son la presencia de infección, dolor u otras complicaciones, tales como las fracturas patológicas o fístulas extraorales, la AAOMS estableció un sistema de clasificación de la ONM en diferentes estadios (20). Igualmente, y basándose en un sistema de algoritmos terapéuticos, según el estado en el que se encuentre el paciente, se establecieron unas guías terapéuticas.

Solo se puede considerar que los pacientes presentan ONM, si concluyen en ellos las siguientes características:

- Paciente que está tomando o haya estado en tratamiento con agentes antirresortivos o antiangiogénicos. En el caso que nos corresponde, en la presente investigación, serían bisfosfonatos orales, como tratamiento para la osteoporosis o intravenoso, por padecer un proceso maligno.
- Presencia de una o varias lesiones ulceradas en la mucosa de los procesos alveolares con hueso expuesto o evidencia de hueso a través de una fístula intraoral o extraoral en el área maxilofacial que persiste durante más de ocho semanas de evolución (Fig. 7 a y b).
- Que no existan antecedentes de radioterapia en la zona o metástasis en los maxilares.

Es importante tener en cuenta que los pacientes con riesgo de ONM o con una osteonecrosis ya establecida, también pueden presentar otras condiciones clínicas comunes en la odontología clínica que no deberían confundirse con ONM. Situaciones tales como: osteítis alveolar, sinusitis, la simple gingivitis y la periodontitis, caries, patología periapical, odontalgia, neuralgias atípicas y trastornos de la articulación temporomandibular.

La elaboración de estos criterios, fue muy importante, ya que permitió resolver uno de los principales problemas de la ONM como son su identificación y su diagnóstico.

Según los protocolos y consensos sobre ONM, a la hora de diagnosticar este tipo de lesiones, se establecieron los siguientes síntomas y signos (20):

- *Dolor*: Suele ser progresivo y mantenido. En ocasiones es necesario la toma de abundantes y altas dosis de analgésicos para poder controlarlo, aunque también otras veces puede ser asintomática.
- *Supuración*: Salida de material purulento a través de alguna fístula gingival.
- *Exposición de un hueso necrótico* maxilar o mandibular a través de una solución de

continuidad de la mucosa. Habitualmente estas exposiciones se sobreinfectan por gérmenes como *Actinomyces*. La exposición ósea suele presentar un diámetro entre 0,5-2 cm y es frecuente la aparición de varias zonas expuestas de forma simultánea en un mismo paciente.

También es posible que exista ONM sin evidenciarse el hueso necrótico expuesto a través de fístulas y supuración intra o extraoral.



Fig. 7a. Osteonecrosis de los maxilares en estadio inicial.



Fig. 7b. Osteonecrosis de los maxilares con supuración y fistula extraoral a través de la piel de la cara.

Clínicamente, las lesiones comienzan muchas veces con una alveolitis postexodoncia, aunque hay casos espontáneos (36) que suele progresar hacia una osteomielitis cursando con dolor, movilidad dentaria, tumefacción, supuración purulenta, parestesias en el territorio del nervio dentario inferior. Este proceso se origina, sobre todo, tras una exodoncia oral o un procedimiento quirúrgico, como hemos señalado ampliamente en el apartado anterior de esta introducción.

Las lesiones pueden aumentar de tamaño con el paso del tiempo, sobre todo en el caso de los bisfosfonatos intravenosos pudiendo llegar a observarse la presencia de fístulas a piel, comunicación con senos maxilares y aumento de volumen de los tejidos blandos cervicofaciales con áreas de celulitis y abscesificación. Pueden incluso originar, aunque no es muy frecuente, fracturas mandibulares. Debemos tener en cuenta que las lesiones son muy parecidas a las de la osteorradionecrosis, siendo la localización más frecuente la zona de molares mandibulares.

Suelen localizarse más frecuentemente en la mandíbula que en el maxilar superior, y sobre todo a nivel de los molares. Según Dixon *y cols.* (104) el grado de remodelado óseo fisiológico a nivel de la cresta alveolar es 10 veces mayor que el de la tibia, 5 veces mayor que en la zona del canal mandibular, y 3,5 veces superior al de las corticales mandibulares. Por lo tanto se podría decir que se produce un mayor acúmulo de bisfosfonatos a nivel del hueso alveolar. En la actualidad, no existen referencias en la literatura científica de una posible afectación de otros huesos del organismo (19).

Es muy frecuente la presencia de agregados bacterianos y de leucocitos polimorfonucleares, así como de microfilms bacterianos, que se encuentran asociados a una activa resorción osteoclástica en la superficie del hueso (88,89). Estas lesiones mandibulares expuestas a la cavidad oral, es muy frecuente que se sobreinfecten, habitualmente por gérmenes, habiéndose descrito con frecuencia asociadas a *Actinomyces*, que estimulan la resorción ósea contribuyendo directamente a la necrosis (90). Por ello es muy importante una exhaustiva higiene por parte del paciente mediante irrigaciones con Clorhexidina 0,12% diaria y revisiones periódicas por su odontólogo.

V. DIAGNÓSTICO

Mediante la clínica y los antecedentes del paciente es suficiente para poder establecer un diagnóstico de ONM, aunque pueden ser de gran utilidad algunas pruebas diagnósticas, pero no son esenciales en el diagnóstico inicial del paciente. El estudio histopatológico del hueso expuesto sirve para poder diferenciar una osteonecrosis de una metástasis ósea. También el cultivo y antibiograma de las muestras tomadas es útil para poder conocer el espectro bacteriano existente y la sensibilidad de estos microorganismos frente a los diferentes antibióticos disponibles.

El diagnóstico clínico se basa en la historia y la exploración física del paciente. Las radiografías hechas en clínica son pruebas relativamente inespecíficas, sobre todo al principio cuando la descalcificación no es muy marcada, aunque la presencia de una esclerosis ósea localizada o generalizada, acompañada de un engrosamiento de la lámina dura, pueden ayudar a predecir la futura localización de posibles necrosis óseas (105).

Por lo tanto, una escasa osificación en el lugar donde se ha realizado una extracción previa, también puede ser una manifestación temprana de osteonecrosis. Otro signo importante es la esclerosis notable de la lámina dura en la zona del hueso alveolar.

Según Khosla *y cols.* (29), cuando la patología ya se ha establecido, hay poca necesidad de técnicas de imagen diagnósticas complementarias ya que la presencia de hueso expuesto junto con otros signos y síntomas que pueden visualizarse a nivel clínico, permiten el diagnóstico de ONM. Sin embargo estos autores afirman que pueden tener su importancia en el diagnóstico temprano de osteonecrosis de los maxilares.

Las técnicas de imagen más empleadas en la actualidad en el diagnóstico de lesiones del paciente con osteonecrosis de los maxilares pueden incluir radiografías simples, la ortopantomografía (OPM) y la tomografía Computarizada (TC). Por el contrario, la resonancia magnética (RM) y la imagen funcional con gammagrafía ósea nuclear y tomografía por emisión de positrones (PET) son de limitado uso en el diagnóstico de la ONM, por lo que se requieren futuras investigaciones en estos campos (106).

Las radiografías intraorales y las panorámicas son herramientas muy útiles para el diagnóstico de lesiones óseas ya que son fáciles de realizar, tienen un bajo costo y suponen muy poca radiación para el paciente. Con las radiografías intraorales se obtienen imágenes de alta resolución que son necesarias para la evaluación de las características iniciales de las lesiones óseas, tales como, el ensanchamiento del ligamento periodontal o el engrosamiento de la lámina dura (107).

Asimismo, es muy importante el correcto diagnóstico de posibles lesiones de caries, enfermedad periapical o enfermedad periodontal, ya que suponen importantes factores de riesgo para el desarrollo de futuras lesiones de osteonecrosis de los maxilares (108).

Las radiografías panorámicas suponen también una buena herramienta diagnóstica, ya que proporcionan una buena evaluación de ambos maxilares, incluyendo las estructuras adyacentes; tales como: el seno maxilar, la cavidad nasal y el canal mandibular. Los principales hallazgos radiográficos son el aumento de densidad trabecular, incompleta reosificación del alveolo tras una extracción, formación de secuestros óseos, engrosamiento del canal mandibular y formación de nuevo hueso perióstico (109-111) (Fig. 8).

Por todo ello, el uso de estas dos herramientas diagnósticas son útiles para poder evaluar la presencia de patologías dentales, así como para evaluar la severidad y extensión de lesiones óseas de ONM y para el seguimiento de los pacientes en las sucesivas revisiones.

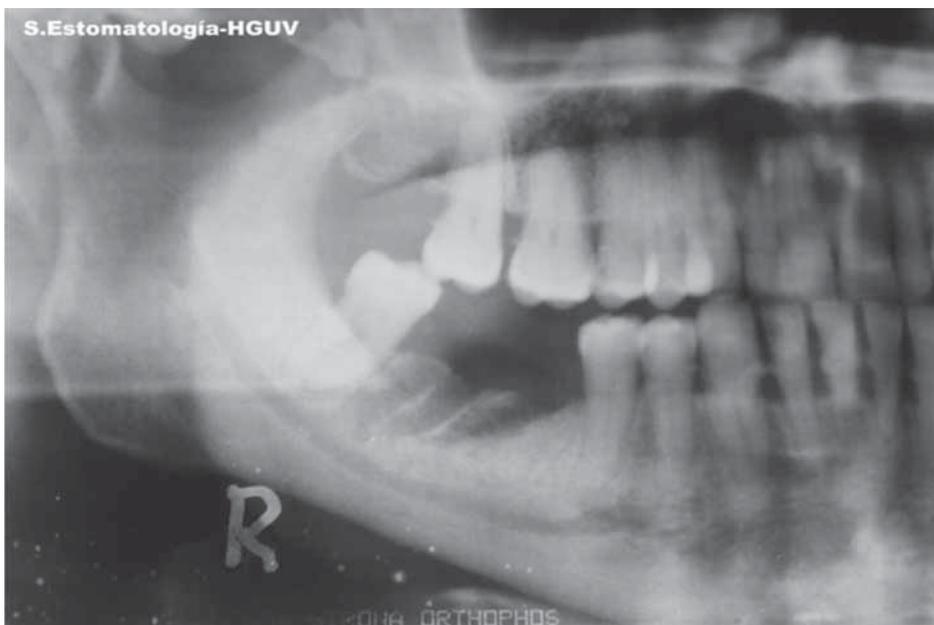


Fig. 8. Zona de osteólisis en la mandíbula.

Sin embargo, la tomografía computarizada presenta claras ventajas frente a las imágenes en dos dimensiones. En primer lugar, se puede examinar la arquitectura cortical y trabecular, así como zonas de esclerosis ósea, erosión cortical reacción ósea perióstica, ya que los cambios radiográficos se extienden más allá de las áreas de necrosis expuestas clínicamente (112,113).

Los hallazgos más comunes en la TC, son áreas de osteolisis, erosión cortical, zonas de esclerosis ósea, formación de hueso perióstico, zonas de secuestro óseo, así como formación de una fístula que evita una completa cicatrización del alveolo. Por lo general, todos estos cambios radiográficos, se extienden más allá de las áreas que pueden ser vistas clínicamente. Además la TC es de gran utilidad para la delimitación de la extensión de las lesiones y planificación quirúrgica de la intervención (110,114).

La tomografía computarizada presenta claras ventajas frente a las imágenes en 2D, como son las radiografías intraorales y la ortopantomografía, en la visualización de las características de la ONM. De este modo, pueden ser evaluadas la arquitectura cortical y trabecular del maxilar y de la mandíbula, así como la presencia de un posible secuestro óseo o de una reacción perióstica. También es muy importante la perfecta visualización que nos permite ver la integridad de las estructuras adyacentes, lo que facilita de forma precoz la detección de futuras lesiones de osteonecrosis (110) (Fig. 9).



Fig. 9. Imagen de TC (corte sagital) de una evidente zona osteolítica mal definida.

La tomografía computarizada de haz cónico presenta ventajas similares a las de la tomografía computarizada, ya que permite visualizar tridimensionalmente las superficies óseas, pero con una radiación significativamente menor. Además si se emplea un pequeño campo de visión (FOV) se pueden diagnosticar lesiones periodontales y periapicales (115).

Diversos autores han realizado estudios mediante diferentes técnicas de imagen, como la tomografía computarizada, la resonancia magnética, la escintigrafía y radiografía panorámica y periapical. Según Bianchi *y cols.* (116) en un estudio de 32 pacientes con osteonecrosis de los maxilares, compararon las alteraciones óseas en una radiografía panorámica con las de una TC obteniendo como resultado que la TC detectó mayores alteraciones en casi el doble de los pacientes. Las radiográficas panorámicas no llegaron a detectar los secuestros óseos en la mitad de los casos, frente a la TC donde hallaron alteraciones estructurales del hueso trabecular y erosiones del hueso cortical. Del mismo modo, Bedogni *y cols.* (30) en un estudio retrospectivo multicéntrico realizado sobre la TC DE 799 pacientes con osteonecrosis de los maxilares, midieron la extensión de las lesiones, siendo estas medidas más exactas en la TC que en las radiografías convencionales. Intentaron relacionar los estadios propuestos por la AAOMS en el año 2009 con los hallazgos radiográficos del estudio, concluyendo que los estadios de la AAOMS no tienen la capacidad de identificar de una forma correcta la extensión de la afectación ósea.

La resonancia magnética, puede detectar la afectación de la médula ósea, los tejidos blandos, las linfadenopatías y los haces nerviosos. Según algunos autores, ofrece ventajas similares a la tomografía computarizada en la evaluación de los cambios óseos de los maxilares, sin embargo parece ofrecer mayor información en la evaluación de los cambios óseos en la primera etapa de la osteonecrosis de los maxilares.

Según diversos autores (117,118) la resonancia magnética ofrece hallazgos más consistentes mediante la disminución de la intensidad de la señal de la médula ósea que pueden preceder a la aparición de las lesiones óseas. De manera muy similar a la TC, la RM muestra una capacidad mucho mayor de detectar cambios óseos en comparación con las radiografías panorámicas; sin embargo, también es cierto que puede llegar a fallar cuando se realizan mediciones de la extensión de los cambios óseos y de las lesiones (118).

En el año 2015, Bagan *y cols.* (54) estudiaron el grado de esclerosis ósea en 43 casos, mediante el estudio de las TC, relacionando el grado de esclerosis ósea, los síntomas clínicos y la extensión de las lesiones óseas, que se encontraban en diferentes estadios, comparándolo con un grupo control de 40 individuos que no presentaban ningún tipo de lesión ósea. Hallaron que los pacientes con osteonecrosis de los maxilares presentaban más esclerosis que los controles ($p < 0,01$), y este grado aumentaba a medida que lo hacía el estadio clínico de la osteonecrosis, correlacionándose a su vez con la extensión de la radiolucidez.

Los estudios de medicina nuclear crean imágenes en base a la gammagrafía y el PET. La gammagrafía ósea realizada mediante el empleo de ^{99m}Tc -MDP (Metilén difosfonato) o con ^{99m}Tc -hidroximetileno-difosfonato (HDP) esta técnica presenta un alta sensibilidad para la detección temprana de la osteonecrosis. La gammagrafía ósea muestra un incremento de la absorción de los radionúclidos, que son isótopos radiactivos y un aumento de la perfusión; produciendo por tanto una gran acumulación de sangre. En el 67,5% de los pacientes con osteonecrosis se produce un incremento de captación de ^{99m}Tc -MDPy de HDP en aquellas zonas que más tarde desarrollarían un área de osteonecrosis, por lo tanto la gammagrafía puede ser una herramienta útil en el diagnóstico precoz de lesiones de ONM (119).

En la tomografía por emisión de positrones o PET, sola o en combinación con la TC también es usada en la evaluación de pacientes con osteonecrosis de los maxilares, mediante el empleo de fluoruro de sodio marcado con flúor 18 (^{18}F -Naf) y fluorodesoxiglucosa marcado con flúor 18 (^{18}F FDG). En el estudio (120) se observó un incremento de la captación de FDG directamente proporcional al aumento de la gravedad de la ONM. Sin embargo, debido al limitado número de pacientes del estudio, no se ha podido establecer conclusiones concluyentes.

Según Tyndall *y cols.* (121) no es necesaria una exploración radiográfica exhaustiva en aquellos pacientes que han recibido o están recibiendo fármacos antirresortivos a bajas dosis, si no presentan signos y síntomas característicos de osteonecrosis de los maxilares.

Por lo tanto, en aquellos pacientes que han recibido o están recibiendo altas dosis de bisfosfonatos y presentan sintomatología, el CBCT y la TC pueden ayudar en el diagnóstico precoz de la osteonecrosis, mediante los posibles cambios de la arquitectura trabecular y cortical (121).

En la tabla 6, se presenta un estudio de análisis de los hallazgos radiográficos de pacientes con osteonecrosis de los maxilares por bisfosfonatos.

Autor	Año	Tipo de estudio	Número de casos	Técnica imagen	Conclusiones
Bianchi	2007	Serie de casos	32	TC vs Panorámica	El uso de radiografías panorámicas era limitado en cuanto a la evaluación de ONM frente a la TC.
Raje	2008	Serie de casos	11	Panorámica, TC, RM, FDG-PET	Las imágenes radiográficas y funcionales confirmaron los sitios de ONM diagnosticados clínicamente.
Triester	2009	Serie de casos	39	Panorámica	Hallazgos radiográficos de esclerosis e irregularidades en la superficie ósea correlacionado con la clínica de ONM.
O’Ryan	2009	Cohortes	59	TC y escintigrafía	Desarrollo posterior de ONM en las zonas marcadas por la gammagrafía.
Takaishi	2010	Caso control	6	Panorámica	Método puede ser útil en la detección de un aumento de DMO alveolar cerca de la lesión necrótica en sujetos con riesgo inminente de ONM.
Treister	2010	Serie de casos	7	CBCT vs panorámica	Hallazgos radiográficos de esclerosis e irregularidades en la superficie ósea correlacionado con la clínica de ONM.
Popovic	2010	Serie de casos	11	TC y RM	La ONM presenta una gran variedad de tipos de imágenes que pueden ayudar a determinar la extensión de la enfermedad y realizar un seguimiento de la progresión.
Fleisher	2010	Serie de casos	68	Panorámica y periapical	El ensanchamiento del ligamento periodontal puede ser un indicador más sensible que la prueba de CTX en relación al riesgo de ONM.

Tabla 6. Estudio de los hallazgos radiográficos en pacientes con ONM.

ONM: osteonecrosis de los maxilares; TC: tomografía computarizada; RM: resonancia magnética; FDG-PET: Fluorodesoxiglucosa - Tomografía por emisión de positrones; DMO: densidad mineral ósea; CBCT: tomografía computarizada de haz cónico. (Tomada de Bagan JV, Cibrian RM, Lopez J, Leopoldo-Rodado M, Carbonell E, Bagán L. Sclerosis in bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws and its correlation with the clinical stages: study of 43 cases. *Br Oral Maxillofac Surg.* 2015; 53:257-62).

Autor	Año	Tipo de estudio	Número de casos	Técnica imagen	Conclusiones
Hutchinson	2010	Caso control	10	TC	Evidente osteoesclerosis en áreas sintomáticas típicas del estadio 0.
Stockmann	2010	Series de casos	24	Panorámica, TC y RM	RM y TC son de uso limitado para la evaluación preoperatoria de la extensión de las lesiones de ONM.
O’Ryan	2012	Series de casos	30	TC	Los pacientes a los que se les ha realizado una extracción y los que presentan condiciones comórbidas, con exposiciones óseas presentan una curación prolongada.
Rocha	2012	Caso control	30	Panorámica	Facilita la identificación temprana de alteraciones óseas.
Walter	2014	Caso control	129	Panorámica	La prevalencia y la gravedad de la enfermedad periodontal en pacientes con ONM es mayor que en controles sanos.
Hamada	2014	Caso control	20	TC	Hallaron diferencias significativas entre el Estadio 0, Estadio 1-3, no ONM y controles sanos en relación con la radiodensidad, pero no hallaron diferencias significativas entre el Estadio 0 y el Estadio 1-3 del grupo de pacientes con ONM.
Rugani	2014	Cohortes	5	TC vs Panorámica	Los signos radiológicos por sí solos no son suficientes para confirmar la presencia de ONM; siendo obligada la presencia de signos clínicos.

Tabla 6 (cont.) Estudio de los hallazgos radiográficos en pacientes con ONM.

ONM: osteonecrosis de los maxilares; TC: tomografía computarizada; RM: resonancia magnética; FDG-PET: Fluorodesoxiglucosa - Tomografía por emisión de positrones; DMO: densidad mineral ósea; CBCT: tomografía computarizada de haz cónico. (Tomada de Bagan JV, Cibrian RM, Lopez J, Leopoldo-Rodado M, Carbonell E, Bagán L. Sclerosis in bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws and its correlation with the clinical stages: study of 43 cases. *Br Oral Maxillofac Surg.* 2015; 53:257-62).

VI. ESTADIOS DE LA OSTEONECROSIS POR BISFOSFONATOS

En base a los datos clínicos y también radiológicos antes referidos se han propuesto varias clasificaciones o estadios de la osteonecrosis de los maxilares.

Ruggiero *y cols.* propusieron en el año 2006 (122) una clasificación para la ONM que se clasificaban según 3 estadios: estadio 1 cuando existía una exposición ósea asintomática, es decir sin signos ni síntomas de infección, estadio 2 cuando además de hueso expuesto/necrótico había evidencia clínica de infección; y estadio 3 cuando además de lo anterior aparecían otros signos como son las fracturas patológicas, fístulas extraorales o la osteolisis se extendía hasta el borde inferior mandibular.

En el año 2007 la Asociación Americana de Cirujanos Orales y Maxilofaciales (28) basándose en esta clasificación, pero además del grupo de pacientes con BRONJ, con sus 3 estadios, incluyó otro grupo de pacientes, aquellos que estaban en riesgo. Los pacientes en riesgo eran aquellos que no tenían hueso expuesto/necrótico evidente, ni sintomatología, pero habían sido tratados con BF orales o intravenosos.

Una de la más utilizada es la que en el año 2009 (31) propuso la AAOMS, modificando su anterior clasificación propuesta en el año 2007, introduciendo un nuevo estadio denominado 0, para pacientes que presentaban sintomatología inespecífica, tales como dolor, movilidad dental, fístulas, alteraciones radiográfica, pero sin evidencia clínica de hueso expuesto.

Se han propuesto otras clasificaciones en las que se introducía el concepto de que podía existir ONM a pesar de que el hueso no estuviera expuesto, así por ej. autores tales como McMahon *y cols.* (123) en su estudio propusieron que podía haber un estadio temprano de la ONM, sintomático o no, en el que todavía no se ha expuesto el hueso, ya que según sus estudios realizados los primeros cambios óseos se producen a nivel medular y no cortical, y que el detectarlo en momentos iniciales mejoraría el pronóstico y el tratamiento de estos pacientes. Por ello consideraban que era necesario utilizar métodos diagnósticos de imagen e histopatológicos que permitieran categorizar los diferentes estadios de la ONM de una forma más exacta. Propusieron categorizarla en 6 estadios (Tabla 7), además pensaban que un estadio 0 podría ser útil para identificar aquellos pacientes en riesgo.

Otros autores, tales como Junquera y Gallego (32) en 2008 o Mawardi *y cols.* (33) en 2009 también sugirieron que la osteonecrosis de los maxilares puede estar presente sin necesidad de que existiese una exposición ósea, sobre todo en estadios iniciales, siendo las principales características clínicas recogidas en sus estudios: presencia de fístulas, dolor y alteraciones radiográficas. Por lo que propusieron incluir un estadio nuevo 0_s cuando se produce una lesión "sospechosa de BRONJ" y a su vez dos subcategorías: 0_{ss} si había síntomas, y 0_{sa} si eran

asintomáticos. Asimismo, Bagán *y cols.* (21) incluyeron también en el estadio 1, 2 y 3 lesiones con fístula pero sin hueso expuesto y subdividieron el estadio 2 en 2_a y 2_b según respondieran o no al tratamiento conservador.

Sin embargo, autores como Yoneda *y cols.* (124), aunque aceptan la definición de la AAOMS para la ONM, propusieron una clasificación según 4 estadios, en base a la situación de la enfermedad en Japón en ese momento. Esta clasificación, básicamente es la misma que la de la AAOMS del 2009, pero en el estadio 0 se incluye también como síntoma la hipoestesia o anestesia del labio inferior y como signo, la presencia de bolsas periodontales profundas (Tabla 7).

Otros autores como Bagán *y cols.* en 2012 (125), quisieron validar la clasificación de la AAOMS del 2009, con un estudio retrospectivo de 126 casos de ONM debida a bisfosfonatos intravenosos y orales, mediante la comparación de ambos grupos, determinando si todos los casos podían ser asignados a uno de los estadios propuestos. Tras el estudio, observaron un gran número de casos de ONM sin hueso expuesto en el grupo de BF orales, y mayor número de casos avanzados, tales como estadios 2 o 3, en el grupo de BF intravenosos. Además hubo 6 casos que no se pudieron asignar a ningún estadio puesto que a pesar de presentar fístulas extraorales y fractura mandibular, no había áreas de hueso expuesto, por ello propusieron una nueva modificación de la clasificación de Ruggiero *y cols.* (36) para que en su estadio 3 se incluyera el término “hueso expuesto y necrótico o una fístula oral sin hueso expuesto...”. (ver tabla 7).

Sin embargo, autores tales como Bedogni *y cols.* (30) en 2012 entre otros, opinaban que debería modificarse el término de osteonecrosis de los maxilares ya que de otro modo quedaban excluidos los pacientes del estadio 0 (31) (Tabla 8). Basándose en casos clínicos ya publicados por otros autores y en los hallazgos clínicos habituales, propusieron que la definición de osteonecrosis de los maxilares debería incluir no sólo los casos con hueso expuesto, sino también aquellos que tuviesen un hueso necrótico, aunque todavía no se hubiesen manifestado signos de exposición ósea, y que debería hacerse un diagnóstico y clasificación basado no sólo en la clínica sino también en los hallazgos radiológicos (30,31). Del mismo modo, en ese mismo año, Patel *y cols.* (34), en la que se modifica la clasificación de la AAOMS de 2009, para introducir a aquellos pacientes sin exposición ósea y guiar el tratamiento, distinguen entre pacientes con hueso expuesto y sin hueso expuesto y dentro de estos últimos los asintomáticos pertenecerían al estadio 1, mientras que los sintomáticos estarían en el estadio 2 o 3 (Tabla 9).

Recientemente, se han descrito casos de osteonecrosis de los maxilares producidas en pacientes que estaban recibiendo o habían recibido denosumab (126), este es un fármaco que pertenece al grupo de los anticuerpos mononucleares. En junio del 2010 su utilización

fue aprobada en Estados Unidos por la FDA para ser empleado en el tratamiento de la osteoporosis en mujeres posmenopaúsicas que presentan un alto riesgo de fracturas. Por ello se ha incluido estos nuevos fármacos en la definición propuesta por Ruggiero *y cols.* en el año 2014 (36), pasándose a llamarse “*osteonecrosis relacionada con medicamentos*”, para poder incluir otros fármacos antirresortivos y terapias antiangiogénicas.

Asimismo, Schiodt *y cols.* en 2014 (127), consideraron que la osteonecrosis de los maxilares con y sin exposición ósea son parte de una misma patología por lo que, basándose en la clasificación que anteriormente Patel *y cols.* (34) habían realizado en el año 2012, propusieron eliminar el estadio 0 y clasificar ambas (con y sin exposición) en el estadio 1,2 ó 3 (Tabla 9).

La clasificación última es la propuesta por Ruggiero y la AAOMS en 2014 (36) actualizando su anterior clasificación (31) propuesta en el año 2009, correlacionándola con estrategias terapéuticas según el estadio en que se encuentre el paciente:

- **En riesgo**: Pacientes que han sido tratados con terapia antiresortiva o antiangiogénica por vía oral o intravenosa, que no presentan sintomatología ni hueso necrótico aparente.

- **Estadio 0** (Variante sin exposición ósea): No existe una evidencia clínica de hueso necrótico pero hay hallazgos clínicos muy variados como describimos a continuación, sin observarse cambios radiográficos específicos.

- *Síntomas*:

- Odontalgia no explicable por causa odontológica.
- Dolor óseo en los maxilares que puede irradiarse a la región de la articulación temporomandibular (ATM).
- Dolor en los senos maxilares, que puede asociarse a inflamación y engrosamiento de las paredes del seno.
- Función neurosensorial alterada.

- *Hallazgos clínicos*:

- Movilidad dental no explicable por periodontitis.
- Fístula periapical o periodontal que no se asocia a necrosis pulpar por trauma, caries o restauraciones.

- *Hallazgos radiográficos:*

- Pérdida o reabsorción del hueso alveolar no explicable por periodontitis.
- Cambios en el patrón trabecular-hueso denso sin haber formación de hueso nuevo en los alveolos de dientes exodonciados.
- Zonas de osteoesclerosis en el hueso alveolar o alrededor de la basal.
- Engrosamiento u oscurecimiento del ligamento periodontal (engrosamiento de la lámina dura, esclerosis, y disminución del espacio del ligamento periodontal).

- **Estadio 1:** Hueso expuesto o fístula intra o extraoral en la región maxilofacial que penetra hasta el hueso, el paciente se encuentra asintomático y sin evidencia de infección. Pueden presentar además, hallazgos radiográficos como los mencionados en el estadio 0 en la zona del hueso alveolar (Fig. 10).

- **Estadio 2:** Hueso expuesto o fístula intra o extraoral en la región maxilofacial que penetra hasta el hueso, con infección que se evidencia por dolor y eritema en la región o hueso expuesto con supuración. Pueden presentar además, hallazgos radiográficos como los mencionados en el estadio 0 en la zona del hueso alveolar (Fig. 11).

- **Estadio 3:** Hueso expuesto o fístula intra o extraoral en la región maxilofacial que penetra hasta el hueso con dolor, infección y al menos uno de los siguientes signos:

- Hueso necrótico que se extiende más allá de la región del hueso alveolar (borde inferior o rama mandibular, seno maxilar y cigoma en el maxilar).
- Fístula extraoral (Fig. 12).
- Fractura patológica mandibular (Fig. 13).
- Comunicación oro-antral u oro-nasal.
- Osteolisis que se extiende al borde inferior de la mandíbula o al suelo del seno.



Fig. 10. Osteonecrosis de la mandíbula con exposición de hueso necrótico, vertiente lingual.



Fig. 11. Osteonecrosis de la mandíbula con exposición de hueso necrótico y supuración.

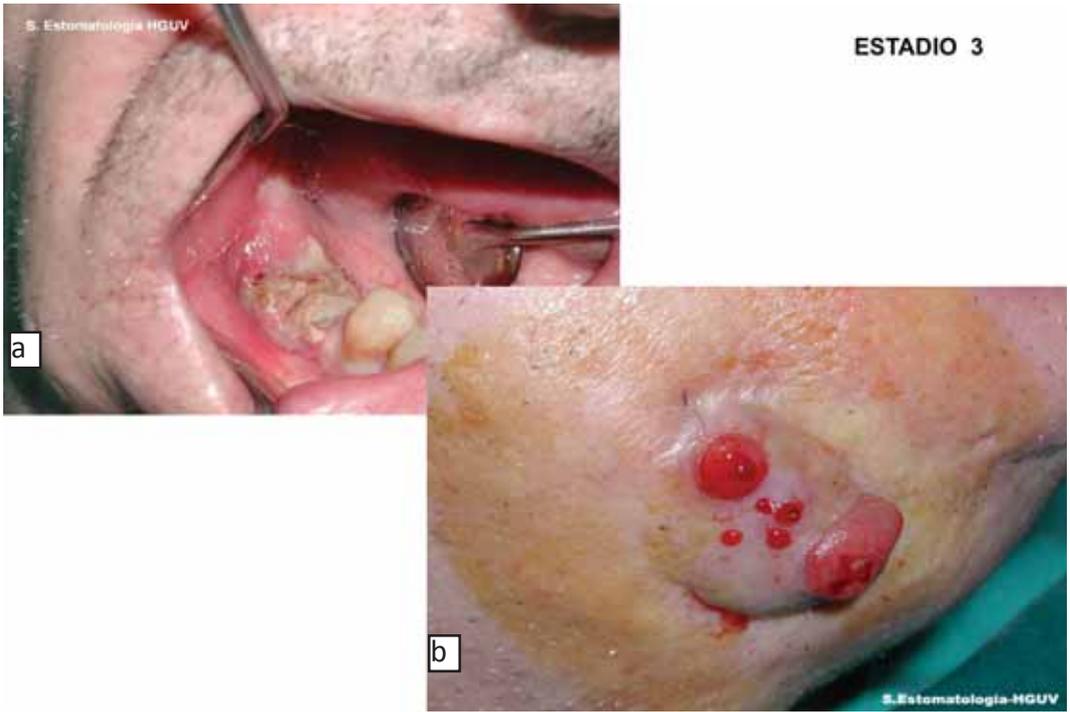


Fig. 12. a. Osteonecrosis con zona de exposición en mandíbula. b. Fistulización cutánea de la imagen anterior.

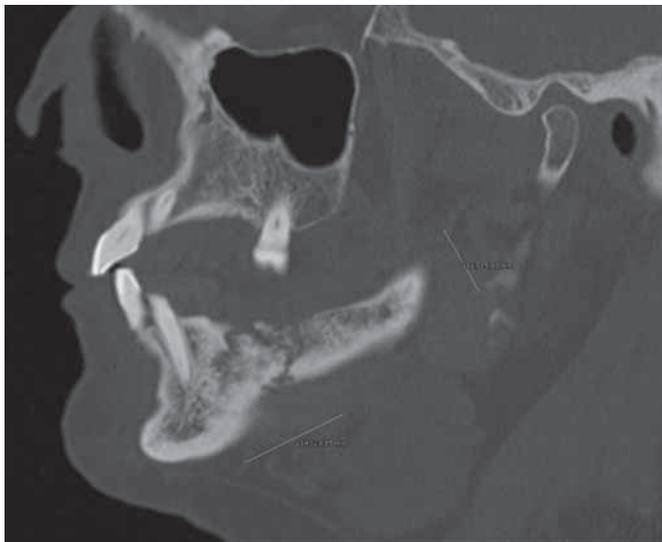


Fig. 13. Imagen de TC con fractura mandibular patológica.

McMahon y cols. (2007)	Bagán y cols. (2009)
<p><u>Estadio 1:</u> Hueso no expuesto/necrótico Dolor maxilar moderado e intermitente Examen dental/mucoso y radiográfico normal Gammagrafía, TC, y RM revelan actividad osteoblástica pero no infección evidente.</p> <p><u>Estadio 2:</u> Hueso no expuesto/necrótico Dolor maxilar moderado pero constante Examen dental/mucoso normal pero las rx muestran cambios escleróticos y radiolúcidos. Gammagrafía, TC, y RM son anormales No hay evidencia de infección</p> <p><u>Estadio 3:</u> Hueso no expuesto/necrótico aparente Dolor maxilar constante y severo que requiere analgesia Edema mucoso, eritema con dolor severo del hueso alveolar Rx dentales, Gammagrafía, TC, y RM anormales Puede haber infección pero de causa no dental</p> <p><u>Estadio 4:</u> <2 cm hueso expuesto/necrótico sin fenestración cortical Dolor maxilar importante y constante que requiere fuerte analgesia Mucosa que bordea el hueso expuesto, eritematosa y tumefacta Tumefacción moderada de los tejidos circundantes sin evidencia franca de infección Rx dentales, Gammagrafía, TC, y RM anormales Descartada patología dental</p> <p><u>Estadio 5:</u> >2 cm hueso expuesto/necrótico con o sin fenestración cortical Dolor maxilar severo y constante que requiere fuerte analgesia Mucosa que circunscribe el hueso expuesto, eritematosa y tumefacta Tumefacción leve a moderada de los tejidos periféricos con o sin supuración purulenta Rx dentales, Gammagrafía, TC, y RM anormales Descartada patología dental</p> <p><u>Estadio 6:</u> >4 cm hueso expuesto/necrótico con fenestración cortical e infección Dolor maxilar severo y constante que requiere fuerte analgesia Olor fétido, Rx dentales, Gammagrafía, TC, y RM anormales Mucosa que circunscribe el hueso expuesto, eritematosa y tumefacta Uno o más de los siguientes: Fractura patológica, fistula extraoral, fistula oro-antral, osteolisis que se extiende al borde inferior mandibular Descartada patología dental</p>	<p><u>Estadio 1:</u> Presencia de hueso expuesto necrótico o pequeña fistula oral sin exposición de hueso necrótico Asintomático</p> <p><u>Estadio 2a:</u> Hueso expuesto necrótico o pequeña fistula oral sin exposición de hueso necrótico Paciente sintomático pero controlado con tratamiento médico</p> <p><u>Estadio 2b:</u> Hueso expuesto necrótico o pequeña fistula oral sin exposición de hueso necrótico Paciente con síntomas pero no controlados con tratamiento médico</p> <p><u>Estadio 3:</u> Fractura patológica, fistula extraoral, osteolisis que se extiende al borde inferior mandibular</p> <p>Bagán y cols. (2012) Los mismos estadios que en su clasificación de 2009 pero además:</p> <p><u>Estadio 3:</u> Hueso expuesto y necrótico o una fistula oral sin hueso expuesto, en pacientes con dolor, infección y uno o más de los siguientes: evidencia radiográfica de necrosis ósea que se extiende más allá del hueso alveolar, fractura patológica, fistula extraoral, comunicación oro-antral, oro-nasal, osteolisis que se extiende al borde inferior mandibular o al suelo del seno</p>
Mawardi y cols. (2009)	Yoneda y cols. (2010)
<p>Proponen modificar la clasificación de la AAOMS de 2007 introduciendo un nuevo estadio llamado 0_s</p> <p><u>Estadio 0_s: "sospechoso" para ONM</u> Ausencia de hueso expuesto Presencia de fistulas, movilidad dental severa, bolsas periodontales profundas, hallazgos radiográficos positivos. 2 subcategorías: <u>Estadio 0_sa:</u> "sospechoso" y sintomático <u>Estadio 0_sa:</u> "sospechoso" y asintomático</p>	<p>Mismas directrices que la AAOMS en su clasificación de 2009 excepto:</p> <p><u>Estadio 0:</u> Incluye hipoestesia o anestesia del labio inferior y/o Bolsas periodontales profundas</p>

Tabla 7. Propuestas de modificación de la clasificación de ONM de la AAOMS por McMahon y cols., Bagán y cols., Mawardi y cols. y Yoneda y cols. Rx: radiografía, RM: resonancia magnética, TC: tomografía computarizada, ONM: osteonecrosis maxilar.

Bedogni y cols. (2012)	Franco y cols. (2014)
<p><u>Estadio 1</u></p> <p>ONM Focal</p> <p><u>Signos y síntomas clínicos:</u> exposición ósea; movilidad dental repentina; no cicatrización alveolo post-exodoncia; fístula mucosa; inflamación; formación de absceso; trismus; seria deformidad mandibular y/o hipoestesia/parestesia de los labios</p> <p><u>Hallazgos en la TC:</u> aumento de la densidad ósea limitada a la región del hueso alveolar (engrosamiento trabecular y/o osteoesclerosis focal), con o sin los siguientes signos: lámina dura esclerótica y con marcado engrosamiento; persistencia de cavidad alveolar; y/o interrupción de la cortical</p> <p><u>1a.</u> Asintomático</p> <p><u>1b.</u> Sintomático (dolor y secreción purulenta)</p> <p><u>Estadio 2</u></p> <p>ONM difusa</p> <p><u>Signos y síntomas clínicos:</u> los mismos que en estadio 1</p> <p><u>Hallazgos en la TC:</u> aumento de la densidad ósea que se extiende hasta la basal (osteoesclerosis difusa), con o sin los siguientes signos: prominencia del canal del nervio alveolar inferior; reacción periosteal; sinusitis; formación de secuestros; y/o fístula oro-antral</p> <p><u>2a.</u> Asintomático</p> <p><u>2b.</u> Sintomático (dolor y secreción purulenta)</p> <p><u>Estadio 3</u></p> <p>ONM complicada</p> <p>Igual que el estadio 2, con uno o más de los siguientes:</p> <p><u>Signos y síntomas clínicos:</u> fístula extra-oral; desplazamiento de muñones mandibulares; salida de fluidos nasales</p> <p><u>Hallazgos en la TC:</u> osteoesclerosis de huesos adyacentes (cigoma, paladar duro); fractura mandibular patológica; y/o osteolisis que se extiende al suelo del seno</p>	<p>Hallazgos clínicos y radiológicos</p> <p><u>Estadio 0</u></p> <p>Hueso no expuesto con hallazgos radiográficos inespecíficos, como osteoesclerosis e hiperplasia periosteal, y síntomas no específicos como dolor</p> <p><u>Estadio I</u></p> <p>Hueso expuesto y/o evidencias radiográficas de hueso necrótico*, o persistencia de cavidad alveolar <2 cm de diámetro mayor con o sin dolor</p> <p><u>Estadio II</u></p> <p>Hueso expuesto y/o evidencias radiográficas de hueso necrótico*, entre 2 y 4 cm de diámetro mayor, con dolor que responde a AINEs y posibles abscesos</p> <p><u>Estadio III</u></p> <p>Hueso expuesto y/o evidencias radiográficas de hueso necrótico*, >4cm de diámetro mayor, con dolor intenso que responde o no a AINEs, abscesos, fístula oro-cutánea y/o del seno maxilar y afectación del nervio mandibular</p>

Tabla 8. Propuesta de clasificación de ONM de Bedogni y cols. y Franco y cols.

TC: tomografía computarizada, AINEs: antiinflamatorios no esteroideos*. Evidencias radiográficas de hueso necrótico: áreas irregulares de hipo e hiper calcificación y/o secuestros óseos.

Patel y cols. (2012)		Schiodt y cols. (2014)	
<p>Hueso expuesto clínicamente Mismos estadios de AAOMS 2009</p>	<p>Ausencia de hueso expuesto <u>Estadio 1 NE</u> Asintomático No evidencia clínica de infección; puede haber hallazgos radiográficos¹</p> <p><u>Estadio 2 NE</u> Sintomático No hueso expuesto necrótico; Evidencia clínica de infección, presencia de fístulas intraorales, tumefacción, dolor, parestesia/disestesia y evidencia radiográfica de necrosis ósea.</p> <p><u>Estadio 3 NE</u> Igual que el estadio 2 NE, y uno o más de los siguientes:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Evidencia radiográfica de necrosis ósea que se extiende más allá del hueso alveolar • Fractura patológica • Fístula extraoral • Comunicación oro antral, oro-nasal • Osteolisis que se extiende al borde inferior mandibular o al suelo del seno 	<p>Hueso expuesto Asintomático <u>Nombre: E-ONJ, estadio 1</u></p> <p>Hueso expuesto Síntomas de infección <u>Nombre: E-ONJ, estadio 2</u></p> <p>Como el estadio 3 de la AAOMS <u>Nombre: E-ONJ, estadio 3</u></p>	<p>Hueso no expuesto Asintomático <u>Nombre: NE-ONJ, estadio 1</u></p> <p>Hueso no expuesto Síntomas de infección <u>Nombre: NE-ONJ, estadio 2</u></p> <p>Hueso no expuesto y necrótico en pacientes con dolor, infección, y uno o más de los siguientes: Hueso no expuesto y necrótico demostrado en imágenes que se extiende más allá de la región del hueso alveolar, esto es, borde inferior y rama en la mandíbula, seno maxilar y cigoma en el maxilar, fractura patológica, fístula extraoral, comunicación oro-antral, oro-nasal, osteolisis que se extiende al borde inferior mandibular o al suelo del seno <u>Nombre: NE-ONJ, estadio 3</u></p>

Tabla 9. Propuestas de estadiaje de ONM de Patel y cols. (2012) y Schiodt y cols. (2014).

¹: osteoesclerosis, rotura cortical, osteolisis, depósito óseo subperiosteal, engrosamiento de la lamina dura, y ensanchamiento del espacio del ligamento periodontal; TC: tomografía computarizada; RM: resonancia magnética; rx: radiografías dentales; AINE: antiinflamatorios no esteroideos; Hueso NE: hueso no expuesto; ONJ: osteonecrosis maxilar; E-ONJ: osteonecrosis maxilar con exposición; NE-ONJ: osteonecrosis maxilar sin exposición.

(Modificada de Gavaldá C, Bagán JV. Concept, diagnosis and classification of bisphosphonate-associated osteonecrosis of the jaws. A review of the literature. Med Oral Patol Oral Cir Bucal. 2016 Jan 31:0 [Epub ahead of print]).

(Tabla publicada con la autorización de la revista Med Oral Patol Oral Cir Bucal que es propietaria del copyright del artículo).

VII. PREVENCIÓN

La AAOMS propuso un enfoque multidisciplinario para el tratamiento y la prevención de pacientes con tratamientos antirresortivos o antiangiogénicos. Proponen y sugieren una conjunción en los planteamientos preventivos, colaborando tanto los médicos, tales como: oncólogos, hematólogos o urólogos que prescriben estos fármacos como los profesionales dentales, como son el estomatólogo, el odontólogo y el cirujano maxilofacial. Manteniendo de este modo una continua comunicación entre ellos, creando de este modo un apoyo importante para la detección temprana de la osteonecrosis de los maxilares. Esto no solo disminuiría considerablemente la incidencia de la osteonecrosis, sino que permitiría a los pacientes disponer de unas condiciones óptimas de salud oral (128,73).

Siguiendo el Consejo del Panel Español de Expertos se propuso un examen exhaustivo de la cavidad oral y una planificación terapéutica dental antes de iniciar cualquier tratamiento antirresortivo, lo cual reducirá, de forma considerable, la incidencia de osteonecrosis de los maxilares (129,130).

En aquellos pacientes con patología ósea, que van a recibir bisfosfonatos por vía oral, no existe ninguna medida preventiva ante la administración de estos fármacos. Pero si que existe un consenso entre los profesionales expertos, acerca de la conveniencia de la realización de aquellos tratamientos necesarios, antes o durante el inicio de la instauración de los bisfosfonatos. Así como, la realización de posteriores revisiones periódicas que permitan mantener y asegurar una buena salud bucodental, minimizando de forma significativa cualquier efecto adverso posible (37).

Sin embargo, el tratamiento con bisfosfonatos por vía intravenosa conlleva un elevado riesgo de generar lesiones de osteonecrosis maxilar, sobre todo en aquellos pacientes que no tienen una buena salud e higiene oral. En ellos la principal medida de actuación, será la realización de un protocolo estandarizado de revisiones bucodentales, donde se detecte tanto la presencia de patología existente, así como el requerimiento de tratamientos quirúrgicos o dentales, como situaciones de riesgo que puedan requerir futuras intervenciones durante la administración del fármaco intravenoso (36).

Por lo tanto, se deberán detectar posibles focos de infección tanto existentes como potenciales, presencias de caries o de obturaciones en malas condiciones, presencia de cordales semi-incluidos o de restos radiculares que puedan producir procesos infecciosos, valoración de ajuste de prótesis parciales fijas o sobre implantes, mediante un estudio clínico basado en pruebas complementarias radiográficas, como son la ortopantomografía, las radiografías periapicales o las aletas de mordida.

Según Dimopoulos *y cols.* (131) se experimentó una disminución, muy significativa en la ONM cuando se habían aplicado medidas preventivas, llegando a ser hasta de tres veces menor de la incidencia de la misma. Asimismo, Vandone *y cols.* (132) mostraron una disminución del 50% en la tasa de incidencia de osteonecrosis en aquellos pacientes que fueron seleccionados y recibieron tratamiento preventivo antes de comenzar con los fármacos antirresortivos. Del mismo modo, Bonacina *y cols.* (133) no hallaron en su estudio ningún caso de osteonecrosis de los maxilares en pacientes que habían sido estudiados y realizados en ellos los tratamientos dentales antes de empezar con los tratamientos de bisfosfonatos intravenosos.

Previamente a cualquier intervención que implique al tejido óseo, el paciente debe siempre ser previamente informado con detenimiento sobre qué es la osteonecrosis de los maxilares, sus posibles riesgos de la intervención y las complicaciones que pueden llegar a aparecer, así como el tratamiento de las mismas. Además, todo ello debe ir recogido e informado en el Consentimiento Informado, cuyo papel tendrá que haber leído y firmado el paciente con antelación.

La suspensión temporal de los fármacos antirresortivos en pacientes con osteoporosis ante una cirugía dentoalveolar, tal y como es una extracción dental, supone una controversia para muchos autores (37,134,135). Sin embargo, según Ruggiero (36) los datos existentes en la literatura científica no son suficientes para aceptar o rechazar los beneficios existentes ante la suspensión de estos medicamentos en los casos con osteoporosis. Sin embargo, sí que supondría teóricamente un beneficio en aquellos pacientes que han estado tomando el fármaco durante más de 3 años, o menos de 3 años pero con tratamiento concomitante con inmunosupresores, siendo considerado por Damm y Jones (135) un enfoque prudente para aquellos pacientes que presentan más riesgo de desarrollar una osteonecrosis, el retirarlo.

Silverman *y cols.* (136) analizaron los riesgos que tenían los pacientes ante fracturas por osteoporosis frente a los posibles beneficios, como son la aparición de efectos adversos como son la osteonecrosis de los maxilares o la fractura atípica del fémur. Para poder decidir la retirada de los bisfosfonatos en los pacientes con moderado y alto riesgo de fractura por osteoporosis en relación con la incidencia de los eventos. Tras los estudios realizados indicaron que hay más riesgo de fractura por osteoporosis, sin olvidar la alta mortalidad y morbilidad que conlleva la fractura vertebral. Sin embargo los datos para calcular este cociente no son exactos y los ensayos clínicos son limitados.

Asimismo, los protocolos internacionales recomiendan la supresión de los bisfosfonatos orales antes de realizar intervenciones que puedan suponer un riesgo, siempre y cuando lo autorice el facultativo especialista que ha realizado la prescripción y que controla al

paciente, desde 3 meses previos a la intervención hasta la curación completa dos o tres meses después de la cirugía. Sin embargo, si el paciente ha tomado bisfosfonatos orales durante menos de tres años y sin inmunosupresores, se puede realizar cualquier tipo de tratamiento sin ninguna medida preventiva específica, aunque siempre debe informarse al paciente de la existencia del posible riesgo, así como la firma del Consentimiento Informado (36) (Tabla 10).

Del mismo modo, en pacientes que han recibido o están recibiendo fármacos intravenosos mensualmente como tratamiento para su enfermedad oncológica, las intervenciones quirúrgicas dentoalveolares deben ser evitadas, si es posible. Sino deberán realizarse de la manera más atraumática posible, legando el alveolo, lavando con suero fisiológico el lecho quirúrgico y suturando los bordes de las heridas, facilitando de este modo la cicatrización.

Se debe administrar profilaxis antibiótica, en los pacientes que han recibido o están recibiendo bisfosfonatos intravenosos, antes y después de cualquier procedimiento invasivo con Amoxicilina/ Acido clavulánico 875/125mg cada 8 horas desde 2 días antes hasta 10 días después (114). Y en casos de alergia a la penicilina, se puede sustituir por Levofloxacin 500 mg cada 12 horas o Doxiciclina 100 mg cada 24 horas. Como medida antiséptica, el paciente deberá enjuagarse con Clorhexidina al 0,12% dos veces al día durante un mínimo de 15 días. Se deberán programar revisiones a los 7-10 días, para retirar los puntos y comprobar la correcta cicatrización de la herida, y al mes para comprobar que se ha producido una reepitelización completa del lecho quirúrgico, sino es así el paciente deberá ser remitido a un centro de referencia en el manejo de esta enfermedad (37).

Los datos son escasos respecto al efecto de la interrupción de estos fármacos intravenosos ante tratamientos dentales invasivos (36). Sin embargo, si se desarrollan lesiones de osteonecrosis de los maxilares, el oncólogo puede considerar según el estado de la enfermedad, la interrupción del tratamiento antirresortivo hasta el momento en que se produzca el cierre total de los tejidos blandos.

Finalmente, en la tabla 11 se recogen unas recomendaciones acerca de los diferentes tratamientos odontológicos que pueden o no deben realizarse en función del riesgo que suponen para el paciente que está o ha estado bajo tratamiento con bisfosfonatos, tanto sean orales como intravenosos.

Autor ,Año	No retirada	Retirada	Reintroducir
Tsao, 2013	BFO < 4 años	> 4 años o <4 años y comorbilidades : 2 meses antes	3 meses después
Damm, 2013	BFO < 4 años	> 4 años o <4 años y comorbilidades/ terapia coadyuvante* : 2 meses antes	Curación ósea completa
Hellestein, 2011	BFO o Dmab <2 años	No es necesaria	
Ruggiero, 2014	BF IV o Dmab BFO >4 años	> 4años en osteoporosis: 3 meses antes	3 meses después
Khan, 2015	BF IV o Dmab BFO >4 años	>4años en osteoporosis o comorbilidades que aumentan el riesgo *	Curación ósea completa
Hasegawa, 2013	BFO	Riesgo de fractura es mínimo y las condiciones sistémicas lo permiten: 3 meses antes	3 meses después

Tabla 10. En la tabla se registran las pautas determinadas por diversos autores ante la supresión de bisfosfonatos orales.

* artritis reumatoide, previos o tratamiento actual con corticoides, diabetes, habito tabáquico; BFO: Bisfosfonato oral; OP: osteoporosis; Dmab: Denosumab; IV: Intravenoso.

	BISFOSFONATOS ORALES	BISFOSFONATOS INTRAVENOSOS
Detartraje	Si	Si
Obturaciones	Si	Si
Endodancias	Si	Si
Reconstrucciones	Si	Si
Tallados y prótesis fija	Si	Si
Raspado y alisado radicular	Precaución	Precaución
Ortodoncia	Precaución	No
Cirugía periodontal	Precaución	No
Exodoncia	Precaución	No
Implante	Precaución	No

Tabla 11. Opciones de tratamiento odontológico durante la terapia con bisfosfonatos según la vía de administración.

(Tomada de Bagan J. Medicina y Patología Bucal.2013. Cap.27. Osteonecrosis de los maxilares por fármacos. pag.438).

VIII. TRATAMIENTO

No existen protocolos aceptados universalmente para el manejo y tratamiento de pacientes con ONM. Numerosas variables contribuyen a la toma de decisiones, factores tales como: la edad, el sexo, tipo de enfermedad; por ejemplo: osteoporosis, Mieloma Múltiple o metástasis ósea, tamaño de la lesión, estadiaje, tiempo de toma de medicamentos (36).

La mayor o menor influencia de estos factores en el pronóstico y curso de la osteonecrosis de los maxilares, así como sobre la respuesta ante su tratamiento es en gran parte desconocida. Por lo que el juicio clínico debe guiar acerca del tratamiento más adecuado en cada caso. Otro factor importante que debemos tener en cuenta, el pronóstico general de los pacientes y su esperanza de vida, así como la capacidad individual para poder hacer frente a sus lesiones. Una lesión de un tamaño similar, en unos pacientes puede no producir ninguna sintomatología, mientras que a otros pueden plantearles una disminución de su calidad de vida (35).

1. TRATAMIENTO CONSERVADOR

El tratamiento de la mayoría de los pacientes con osteonecrosis está dirigido a eliminar los síntomas y el dolor, controlar la infección de los tejidos blandos y del hueso, evitando de este modo la progresión de la necrosis ósea, previniendo de este modo el desarrollo de nuevas lesiones.

Se debe insistir en las medidas de prevención, referidas en el apartado anterior. Se debe concienciar, tanto a los profesionales como a los pacientes, en establecer una correcta pauta de antibióticos antes y después de cada procedimiento dental invasivo (137), así como el cierre adecuado de la herida quirúrgica tras la extracción (138) y el mantenimiento de una buena higiene oral (132,138, 139).

Se deben considerar a todos los pacientes tratados con fármacos antirresortivos, especialmente aquellos que están siendo tratados con bisfosfonatos intravenosos como susceptibles de desarrollar una osteonecrosis en caso de someterse a procedimientos odontológicos invasivos o una cirugía ósea de los maxilares (29,134). Por ello, es fundamental el consentimiento informado a estos pacientes antes de los procedimientos dentales. Los pacientes deben necesariamente que estar bien informados del posible riesgo futuro de ONM.

Una vez establecidas las lesiones de osteonecrosis, la conducta debe ser siempre conservadora en un principio. Basada en un mantenimiento de una óptima higiene bucal sobre todo después de las comidas con Clorhexidina al 0,12%, eliminación de factores irritantes periodontales, como son la placa y las caries. Incluso enjuagues tópicos con antibióticos y si es necesario debido a sobreinfecciones por *Actinomyces*, pueden emplearse antibióti-

cos sistémicos. Todas estas pautas, están avaladas por la Asociación Canadiense de Cirujanos Orales y Maxilofaciales (CAOMS), la AAOMS y por la Asociación Dental Americana (29,140,141), así como por múltiples especialistas (142,143).

Un tratamiento conservador de estos pacientes, es la base del tratamiento de los pacientes con Osteonecrosis de los Maxilares, y aunque estas medidas no lleven a la completa resolución de las lesiones, a largo plazo ya que estamos hablando de una patología de curso lento, puede proporcionar un importante alivio de los síntomas (29).

En los últimos años se están realizando estudios con Teriparatida (péptido humano recombinante de la hormona paratiroidea) en el tratamiento de la ONM en pacientes con osteoporosis con resultados esperanzadores, por lo que puede ser una terapia coadyuvante útil en las ONM por bisfosfonatos (144), sin embargo y como en el caso anterior se precisan más estudios que demuestren su utilidad pues otros autores no comprobaron sus efectos beneficiosos, antes descritos, en las ONM. Sin embargo, no es recomendable usarlo en aquellos pacientes con cáncer, o con antecedentes de radioterapia o con metástasis óseas, y no existen estudios de que la Teriparatida no produzca ningún efecto adverso en estos pacientes (145).

Existen otros estudios experimentales, que se encuentran en la literatura, tales como la aplicación tópica de ozono (146), trasplante de células madre de la médula ósea en la zona lítica (147), adición de Pentoxifilina y Tocoferol a las pautas habituales de antibióticos (148), que según diversos informes (147,149) reducen significativamente los síntomas de la Osteonecrosis y la cantidad de hueso expuesto.

Del mismo modo, estudios realizados *in vitro* sugieren que el Geraniol geraniol podría prevenir la aparición de lesiones de osteonecrosis en pacientes que toman bisfosfonatos (149). También han sido publicados resultados favorables, tras la aplicación de láser de bajo nivel, en relación con el tratamiento conservador y/o quirúrgico, pero son necesarios mayores estudios prospectivos (150,151).

La terapia con oxígeno hiperbárico está en discusión, algunos estudios (28) concluyen que aumenta los beneficios de los tratamientos quirúrgicos y farmacológicos, al estimular la proliferación celular y la cicatrización del tejido blando. Sin embargo, se precisan más estudios a largo plazo para poder determinar su utilidad.

El tratamiento conservador debe ser continuado siempre y cuando no progrese la enfermedad o mientras el dolor pueda ser controlado con estos medios no invasivos.

2. TRATAMIENTO QUIRÚRGICO

Los procedimientos quirúrgicos, también deberían ser muy conservadores y se reservarán solo para los casos más sintomáticos y resistentes a cualquier tipo de tratamiento (36).

Por lo tanto, el tratamiento quirúrgico sólo debe considerarse en casos sintomáticos en los que ha fracasado el tratamiento conservador (152), y debe limitarse a secuestrectomías retirando el menor hueso posible y preservando el periostio para mantener el hueso alejado del contacto directo con la flora oral, con la excepción de los estadios 3 en los que se precisan resecciones óseas.

El objetivo final de las resecciones es mediante una cirugía con un espesor de colgajo total retirar todo el tejido necrótico hasta unos márgenes quirúrgicos sanos, con un hueso viable macroscópicamente de buen aspecto y que tenga un correcto sangrado. Los bordes afilados deben ser suavizados y el cierre de tejidos blandos debe realizarse de forma que no exista tensión en los puntos de sutura (153).

Según Vescovi *y cols.* (150) se logran buenos resultados en el tratamiento de las lesiones cuando se realiza un desbridamiento quirúrgico de las lesiones con láser. Sin embargo, Atalay *y cols.* (154) no encontraron diferencias significativas en comparación con las técnicas quirúrgicas convencionales. Del mismo modo, Martins *y cols.* (155), realizaron un estudio retrospectivo en veintidós pacientes que fueron sometidos a una terapia combinada de antibióticos junto con cirugía seguida de terapia con láser de bajo nivel y plasma rico en plaquetas en la herida quirúrgica, obteniendo buenos resultados. Asimismo, otros autores (156) realizaban el desbridamiento de las lesiones en combinación con factores de crecimiento derivados de plaquetas.

Los antibióticos sistémicos siempre se asocian al tratamiento quirúrgico y durante los 15 días siguientes, así como los enjuagues y/o geles de Clorhexidina al 0,12%, 3 veces al día. Autores tales como, Hoefert y Eufinger (157) sugirieron que la pauta de antibióticos preoperatorios a más largo plazo, durante unos 25-50 días, producían una mejora de los resultados quirúrgicos frente a las terapias de 1-8 días, obteniendo las mayores tasas de éxito en los pacientes con Mieloma Múltiple o que han recibido terapias con bisfosfonatos, frente a aquellos con tumores sólidos.

El tratamiento adyuvante con oxígeno hiperbárico (HBO) en combinación con la cirugía ha sido investigado en diversos estudios (72,158), aunque hacen falta mayores investigaciones con estas innovadoras terapias de combinación.

En el año 2014, Ruggiero *y cols.* y la AAOMS (36), según el estadio en que se encontraba el paciente, propusieron las siguientes pautas de tratamiento:

Pacientes de riesgo: no está indicado ningún tratamiento, tan solo enseñarle normas de higiene al paciente e informarles de los posibles riesgos de desarrollar una osteonecrosis, así como sus síntomas y signos.

Pacientes del **Estadio 0**: estos pacientes deberán recibir un tratamiento sintomático, incluyendo analgésicos y antibióticos, para el control de la infección y del dolor. Incluyendo el tratamiento de otros factores locales tales como caries o enfermedad periodontal.

Pacientes del **Estadio 1**: tratamiento mediante enjuagues bucales antibacterianos, como Clorhexidina al 0,12% varias veces al día, así como un seguimiento clínico constante hasta que se resuelva.

Pacientes del **Estadio 2**: tratamiento sintomático con antibióticos por vía oral, enjuagues bucales antibacterianos de Clorhexidina al 0,12%, control del dolor y desbridamiento para aliviar la irritación de los tejidos blandos y el control de la infección. Deben realizarse cultivos para la confección de un antibiograma para el correcto ajuste del tratamiento. En caso de que el paciente sea alérgico a la penicilina se emplearán Quinolonas, Metronidazol, Clindamicina, Doxiciclina y Eritromicina.

Pacientes del **Estadio 3**: enjuagues orales antibacterianos, analgésicos y antibioterapia, desbridamiento quirúrgico o bien resecciones del hueso afecto, para evitar a largo plazo mayores brotes de infección y el sobre todo el dolor. Posteriormente, se deberá plantear la reconstrucción con placas u obturadores. Aunque en el caso de reconstrucciones con placas, existe una alta probabilidad de fracaso, existen algunos estudios (159,160) de reconstrucción inmediata con hueso vascularizado.

Es aconsejable la realización de un estudio minucioso del hueso reseado, para descartar la presencia de un cáncer metastásico, en aquellos pacientes con una historia de enfermedad maligna.

JUSTIFICACIÓN, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

La osteonecrosis de los maxilares es una forma clínica poco frecuente de osteomielitis crónica, que se encuentra asociada a una inhibición de la actividad osteoclástica, a una alteración del aporte sanguíneo en el lecho vascular del hueso, y a un incremento de la apoptosis por parte de los osteoclastos (36).

Son numerosos los artículos y estudios que se han publicado acerca de la ONM, la mayoría describen casos aislados y series de casos (161,162). En estas publicaciones, los factores de riesgo más frecuentemente descritos, y que se recogen en más del 90% de los casos, son la presencia de una neoplasia de base, y la administración de bisfosfonatos a dosis elevadas por vía intravenosa como terapéutica asociada para dicho proceso maligno. Con una menor frecuencia de casos descritos también se han presentado casos de ONM en pacientes con osteoporosis.

La osteonecrosis de los maxilares se caracteriza por presentar zonas de inflamación y necrosis en los huesos asociadas a procesos inflamatorios. Se han establecido diversos criterios diagnósticos para la clasificación y estadiaje de estos pacientes (36), sin embargo no existen actualmente biomarcadores que nos determinen el riesgo real que estos enfermos tienen para desarrollar áreas de osteonecrosis.

En la mayoría de los casos existe una lesión inflamatoria en el hueso asociada a una infección. Se ha descrito que numerosas interleuquinas juegan un papel importante en estos procesos inflamatorios (163). Las citoquinas son proteínas que participan en múltiples procesos, tanto fisiológicos como patológicos, afectando a las células en funciones tales como el crecimiento, la diferenciación y su muerte (163). Son sintetizadas principalmente por los leucocitos, aunque también pueden intervenir células endoteliales, el timo o la médula ósea. Su principal misión es regular las funciones de las células del sistema inmunitario; tales como su activación, diferenciación, proliferación, quimiotaxis, secreción de anticuerpos, así como la regulación de otras citoquinas. También inician la respuesta inflamatoria, definiendo la magnitud y naturaleza de la respuesta inmunitaria específica (164).

En este sentido, realizamos y publicamos un estudio (165) que analizaba las posibles alteraciones salivales, tanto en la interleuquina 1 alfa (IL-1 α), en la interleuquina-1 antagonista del receptor (IL-1RA), como en la interleuquina 1 beta (IL-1 β) en estos pacientes con ONM. El estudio constaba de tres grupos: grupo 1 con 26 casos de osteonecrosis de los maxilares por bisfosfonatos. Grupo 2 con 29 pacientes que habían recibido bisfosfonatos, pero sin haber desarrollado osteonecrosis en los maxilares. Por último, el grupo 3 formado por 26 pacientes control que no habían sido tratados con bisfosfonatos y no presentaban lesiones de ONM. En todos ellos, se realizó un análisis proteómico de la expresión de estas citoquinas a nivel salival (IL-1 α , IL-1RA e IL-1 β) hallando valores más altos en el grupo 1

que en los grupos 2 y 3. La interleuquina 1 α (IL-1 α) mostraba las mayores diferencias en comparación con el grupo control.

En un momento posterior, también analizamos (166) los niveles salivales y plasmáticos de IL-6 en pacientes con osteonecrosis de los maxilares por bisfosfonatos con el objetivo de investigar si existía alguna relación entre los estadios más avanzados de ONM y los niveles de IL-6. Para ello se estudiaron tres grupos: grupo 1 que constaba de treinta pacientes con osteonecrosis de los maxilares debido a bisfosfonatos intravenosos, el grupo 2 formado por 25 pacientes tratados con bisfosfonatos intravenosos pero sin osteonecrosis de los maxilares y el grupo 3 constituido por 15 controles sanos. En cada caso, se analizaron los niveles salivales y plasmáticos de la IL-6 mediante un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas o ELISA. Se encontraron valores significativamente más altos de IL-6, tanto en saliva como en plasma, en el grupo 1 frente a los grupos 2 y 3. Asimismo, hallamos mayores niveles salivales y plasmáticos de IL-6 en los estadios más avanzados de osteonecrosis de los maxilares, aunque las diferencias no fueron estadísticamente significativas.

Mozatti *ycols.* (167) recientemente publicaron un estudio de 30 pacientes con metástasis óseas tratados con bisfosfonatos intravenosos. Fueron divididos en dos subgrupos según si habían desarrollado osteonecrosis de los maxilares o no. En todos ellos se tomaron unas muestras de tejido de la mucosa oral para analizar los niveles de diversas citoquinas, tales como la IL-1 β , la IL-6, la IL-8 y el TNF- α , así como los factores osteoclastogénicos (RANKL y OPG) y los parámetros de proliferación (HMGR y VEGF), utilizando la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Según sus resultados, la mucosa estimulada por el bisfosfonato intravenoso liberado desde el hueso, puede contribuir al desarrollo de la necrosis ósea debido a la reducción del VEGF (factor de crecimiento endotelial vascular) y a la producción de IL-6, que estimula la actividad de los osteoclastos aumentando de este modo la relación RANKL/OPG (36).

Sin embargo, según hemos podido constatar, son pocos los artículos que han analizado los niveles séricos de RANKL y de la OPG relacionándolos con los hallazgos clínicos en los pacientes con ONM. Por ello, sería deseable realizar estas correlaciones en un número amplio de pacientes y que como luego veremos este aspecto fue un importante objetivo de nuestra investigación.

Asimismo, los estudios radiográficos, también son escasos en la literatura científica y casi todos están efectuados en animales, lo que supone una limitación ya que son difícilmente extrapolables al ser humano.

Recientemente en el año 2014 (54), publicamos un estudio en 43 pacientes que presentaban lesiones de osteonecrosis de los maxilares comparándolo con un grupo control

de 40 casos sin lesiones óseas en los maxilares. Se analizó el grado de esclerosis en los diferentes estadios de la ONM mediante tomografía computarizada, y se estudió la relación existente entre el grado de esclerosis, los síntomas clínicos y la extensión de la radiolucidez. Los pacientes con ONM tenían mayor esclerosis que los controles ($p < 0,01$), el grado de la misma aumentaba con el estadio clínico de ONM y se correlacionaba con la extensión de la radiolucidez. Sin embargo, sería muy interesante comparar la densidad de estas zonas de ONM con las zonas sanas contralaterales en el mismo paciente, hecho que no hicimos en el anterior trabajo, que no está descrito en la literatura hasta ahora y que sería deseable plantearse en una nueva investigación.

Basándonos en los razonamientos anteriores nos planteamos las siguientes hipótesis H_0 :

1. El tipo de administración del fármaco bisfosfonato, intravenosa u oral, no influye en la localización de la ONM, ni en los parámetros clínicos de la misma, así como en el posible estadio clínico.
2. La densidad ósea medida en las tomografías computarizadas es similar en las zonas de ONM a las áreas contralaterales sanas del mismo paciente.
3. Los niveles séricos del ligando de receptor activador para el factor nuclear $\kappa\beta$ (RANKL) y osteoprotegerina (OPG) no muestran diferencias significativas en los pacientes con bisfosfonatos que han desarrollado lesiones de osteonecrosis y los controles sanos.

OBJETIVOS

1. El “primer objetivo” de nuestra investigación consistió en analizar los hallazgos clínicos que definen nuestro grupo con Osteonecrosis de los maxilares por bisfosfonatos, con especial mención a los factores predisponentes, localización, exposición ósea y estadio.
2. El “segundo objetivo” fue comparar los datos obtenidos en las densidades óseas de las tomografías computarizadas, entre un primer grupo de pacientes con lesiones de osteonecrosis que habían tomado bisfosfonatos, otro grupo de controles sanos y finalmente con las áreas contralaterales sanas de los casos del primer grupo.
3. El “tercer objetivo” de nuestro estudio, consistió en comprobar si existían diferencias significativas en los niveles plasmáticos de RANKL y OPG entre en los pacientes con osteonecrosis y el grupo control.
4. El “cuarto objetivo” específico fue constatar si había algún tipo de asociación o independencia entre el tipo de administración del fármaco (intravenoso u oral) y las siguientes variables a nivel clínico: localización, dolor, supuración, fístulas intraorales, fístulas extraorales, exposición ósea y estadio. También valoramos si las medias de RANKL y OPG eran diferentes en función de que se administrase el fármaco de forma intravenosa u oralmente.
5. El “quinto objetivo” establecido fue analizar si alguna de las variables consideradas independientes en el modelo de regresión logística, como fueron la edad, sexo, tipo de administración, localización de la ONM, factores locales, la densidad ósea en las TC_s y los niveles plasmáticos de RANKL y OPG, tenía relación con la variable respuesta binaria exposición ósea.

MATERIAL Y MÉTODOS

1. Diseño del estudio y selección de pacientes

El estudio es un diseño de casos controles retrospectivo realizado en el Servicio de Estomatología y Cirugía Maxilofacial del Hospital General Universitario de Valencia a partir de pacientes que habían sido visitados desde Septiembre 2005 hasta Diciembre 2015; donde también se recogieron las muestras biológicas destinadas al estudio de investigación que presentamos.

En este diseño de investigación se han realizado tres tipos de estudios (Tabla 12 y Fig. 14):

1.1. Estudio clínico

En este caso estudiamos las características de un grupo de 183 casos con osteonecrosis de los maxilares por bisfosfonatos intravenosos u orales.

1.2. Estudio radiográfico en las tomografías computarizadas

Para este estudio compararemos tres grupos de personas:

1.2.1. Grupo 1 del estudio radiográfico constituido por 30 casos, seleccionados de entre los 183 del estudio clínico.

1.2.2. Grupo 2 del estudio radiográfico integrado por 30 casos, que eran personas sin patología en los maxilares, por lo tanto considerado como grupo control de personas sanas.

1.2.3. Grupo 3 del estudio radiográfico que eran las zonas contralaterales, sanas, de los 30 casos del grupo 1 del estudio radiográfico.

1.3. Estudio plasmático de los niveles sanguíneos de RANKL y OPG

Para realizar este estudio plasmático seleccionamos tres grupos:

1.3.1. Grupo 1 del estudio plasmático constituido por 56 casos de ONM, de entre las 183 del estudio clínico.

1.3.2. Grupo 2 del estudio plasmático integrado por 42 pacientes que habían recibido bisfosfonatos intravenosos pero que no desarrollaron osteonecrosis de los maxilares.

1.3.3. Grupo 3 del estudio plasmático que lo formaban 49 sujetos sanos sin patología alguna en los maxilares y sin haber recibido bisfosfonatos.

La edad media de los 183 casos con ONM fue de $68,22 \pm 12,19$ años (media \pm desviación estándar). El grupo 2 radiológico y los grupos 2 y 3 plasmáticos no presentaban diferencias significativas con el grupo de ONM ($p > 0,05$).

La distribución de varones y mujeres del grupo de 183 pacientes con osteonecrosis fue el siguiente: los varones estuvieron representados por 65 personas (35,5%), las mujeres eran 118 (64,5%). Tampoco hubieron diferencias significativas con el grupo 2 radiológico y los grupos 2 y 3 plasmáticos (valor de la $\chi^2 = 2,607$, siendo la $p > 0,05$).

Hay que señalar y repetir que los grupos 1 radiológico y 1 plasmático fueron subgrupos del grupo original de 183 pacientes con ONM. Por lo tanto, los criterios de inclusión de los *grupos de osteonecrosis* de los maxilares fueron los siguientes:

1. Presentar al menos un área de osteonecrosis mandibular y/o maxilar.
2. El diagnóstico de los pacientes será establecido siguiendo los criterios definidos de ONM (36).
3. Todos los pacientes habrán recibido anteriormente bisfosfonatos intravenosos o bien orales.
4. Descartar que las lesiones óseas fuesen debidas a una metástasis en el maxilar o bien que el paciente hubiese sido irradiado en la esfera cervico-facial.

En el caso del grupo 1 plasmático, debían aceptar voluntariamente el que se les tomasen muestras de sangre para su estudio biomolecular.

En el grupo 1 radiológico, las TC formaban parte del protocolo rutinario asistencial establecido para el diagnóstico, seguimiento y tratamiento de los pacientes con ONM; siendo los únicos requisitos el que tuviesen la osteonecrosis a nivel mandibular, en el área molar para poder hacer adecuadamente las mediciones morfométricas y no presentasen una afectación bilateral mandibular de la ONM. Asimismo, descartamos aquellos casos en los que las imágenes de la TC no fueran de buena calidad.

Los criterios de inclusión-exclusión del *grupo 2 radiológico - control* fueron:

1. Personas de edades y sexo similares (sin diferencias significativas con el grupo de los 30 casos seleccionados de ONM).

2. Se incluirán aquellos casos de pacientes que se les hubiesen hecho tomografías computarizadas del área maxilofacial, por otros motivos y no hubiese patología en los maxilares.
3. Se excluirán si estaban o habían sido tratados con fármacos que alterasen el metabolismo óseo.

Asimismo, los criterios de inclusión en el grupo 2 plasmático, que eran 42 pacientes que tomaron bisfosfonatos pero no habían desarrollado lesiones de ONM, fueron los siguientes:

1. Todos los pacientes habrían recibido anteriormente bisfosfonatos para el tratamiento de sus lesiones malignas o bien orales para su osteoporosis.
2. Tras la exploración clínica y radiográfica, no se observaba ninguna área de osteonecrosis mandibular y/o maxilar. Por lo tanto criterio de exclusión de ONM.
3. Aceptar voluntariamente el que se les tomasen muestras de sangre para su estudio biomolecular.

Los criterios de inclusión-exclusión del *grupo 3 plasmático - control* sanos fueron:

1. Personas de edades y sexo similares (sin diferencias significativas con el grupo 1 y 2 plasmáticos).
2. Se excluirán si padecían alguna enfermedad sistémica.
3. Se excluirán si estaban o habían sido tratadas con fármacos que alterasen el metabolismo óseo.
4. Deberían de aceptar voluntariamente ser incluidos en el estudio para poder realizarles tomas de sangre.

El protocolo se presentó al Comité de Ética e Investigación de la Universitat de València siendo imprescindible que todos los casos y controles firmasen el consentimiento tras su información. Este estudio fue aprobado, por dicho comité, con número de registro **H1417371704425**.

ESTUDIOS	GRUPOS DE PACIENTES	VARIABLES DE ESTUDIO
Estudio clínico	183 Pacientes ONM (BF oral, BF IV)	<ul style="list-style-type: none"> - Edad - Tiempo BF oral o IV - Valor plasmático RANKL y OPG - Sexo - Tipo enfermedad - Tipo BF oral o IV - Corticosteroides - Antiangiogénicos - Factores locales predisponentes ONM - Localización ONM - Dolor - Infección - Supuración - Fístula interna - Fístula externa - Metástasis - Estadio
Estudio radiográfico (TC)	Grupo 1: 30 Pacientes ONM	<ul style="list-style-type: none"> - Osteolisis - Fractura mandibular - Esclerosis ósea canal mandibular - Engrosamiento cortical mandibular - Mezcla de la cortical-medular mandibular - Erosión cortical - Secuestro óseo - Densidad ósea
	Grupo 2: 30 controles sanos	
	Grupo 3: zonas contralaterales sanas, de los 30 Pacientes con ONM	
Estudio plasmático (RANKL y OPG)	Grupo 1: 56 Pacientes ONM	<ul style="list-style-type: none"> - Niveles plasmáticos RANKL - Niveles plasmáticos OPG
	Grupo 2: 42 Pacientes BF no ONM	
	Grupo 3: 49 controles sanos	

Tabla 12. Diseño del estudio estudios realizados en cada grupo.
 ONM: osteonecrosis de los maxilares; BF: bisfosfonatos; IV: intravenosos; TC: Tomografía computarizada;
 RANKL: ligando de receptor activador para el factor nuclear κ B; OPG: osteoprotegerina.

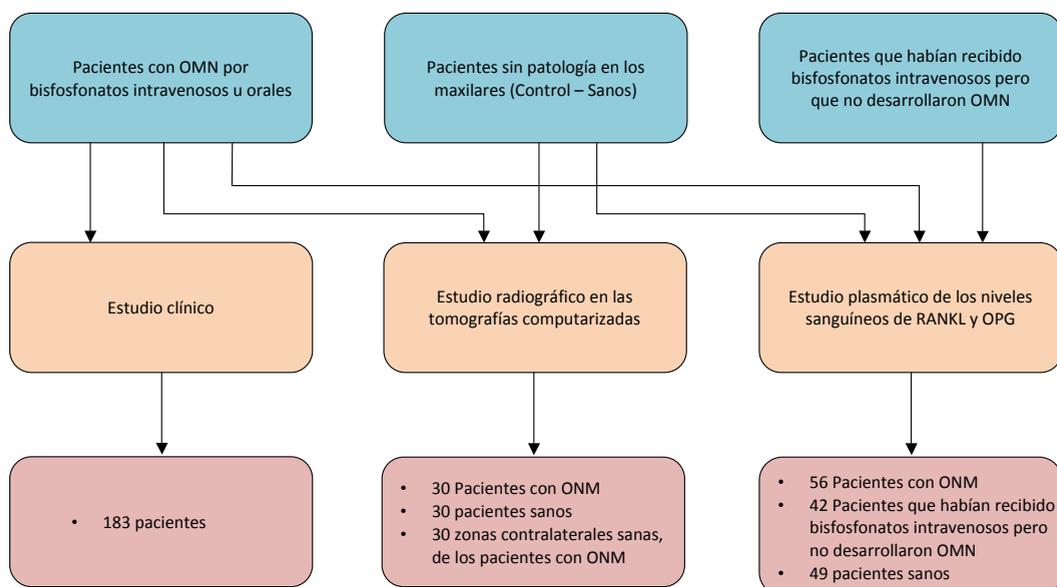


Fig. 14. Diagrama explicativo de los estudios realizados en la investigación, tal como también lo detallamos en la Tabla 12.

2. Metodología

2.1. Estrategias de búsqueda bibliográfica para la identificación de estudios

Se realizó una búsqueda bibliográfica (Fig. 15) mediante dos motores de búsqueda, por un lado en la base de datos de la Biblioteca Nacional de los Estados Unidos: PubMed y MEDLINE; así como también en la base de datos ScienceDirect, Scopus, de artículos publicados desde el año 2002 hasta el año 2015. Se emplearon las siguientes palabras claves mediante diferentes combinaciones: “osteonecrosis maxilar”, “bisfosfonatos”, “radiología”, “interleuquinas”.

En primer lugar, empleando el motor de búsqueda de PubMed se introdujeron las palabras clave: (biphosphonate) AND (osteonecrosis jaw) hallando un total de 1451 artículos. De ellos seleccionamos 381 publicaciones que nos sirvieron como base para el estudio clínico y radiológico. En el caso de las interleuquinas y particularmente para el análisis del RANKL y OPG, hallamos un número muy inferior de artículos, tan solo 18.

La búsqueda se completó con una revisión de las referencias de los artículos seleccionados para identificar estudios adicionales no encontrados en la búsqueda inicial de la literatura. Asimismo, se realizó una búsqueda manual (hasta Diciembre 2015) de las siguientes revistas, que se encuentran indexadas en el Journal Citation Reports®: Clinical Implant Dentistry and Related Research, Clinical Oral Investigations, Clinical Oral Implants Research, Implant Dentistry, International Journal of Oral and Maxillofacial Implants, Journal of Clinical Periodontology, Journal of Oral Implantology, Journal of Oral and Maxillofacial Surgery, Journal of Periodontology, Medicina Oral, Patología Oral y Cirugía Bucal, y Oral Surgery and Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology. Si bien, todas estas revistas también están incluidas en Pubmed y por lo tanto los artículos encontrados también deberían haberse hallado en la búsqueda anterior.

Antes del comienzo del estudio, se establecieron una serie de criterios de inclusión y exclusión. Partiendo siempre de artículos de libre acceso a los textos completos: (i) estudios que incluyan a pacientes con una historia de terapia con bisfosfonatos intravenosos por procesos oncológicos, así como con bisfosfonatos orales para el tratamiento de la osteoporosis, (ii) estudios prospectivos o retrospectivos y serie de casos; y (iii) estudios sobre líneas celulares osteoblásticas y osteoclasticas, así como estudios de biología molecular en pacientes con osteonecrosis. Los siguientes artículos fueron excluidos: (i) series con pocos casos, casos aislados o que hicieran referencia a un informe; y (ii) estudios que carecían de un grupo de control cuando se tratase de estudios radiográficos o de interleuquinas.

En el caso de que existiese más de una publicación sobre el mismo grupo de pacientes que implicase una continuación, sólo se incluyó el estudio que más se acercase a los objetivos de esta revisión o que tuviese la muestra más grande. No se realizó ninguna restricción respecto al año ni al idioma de publicación.

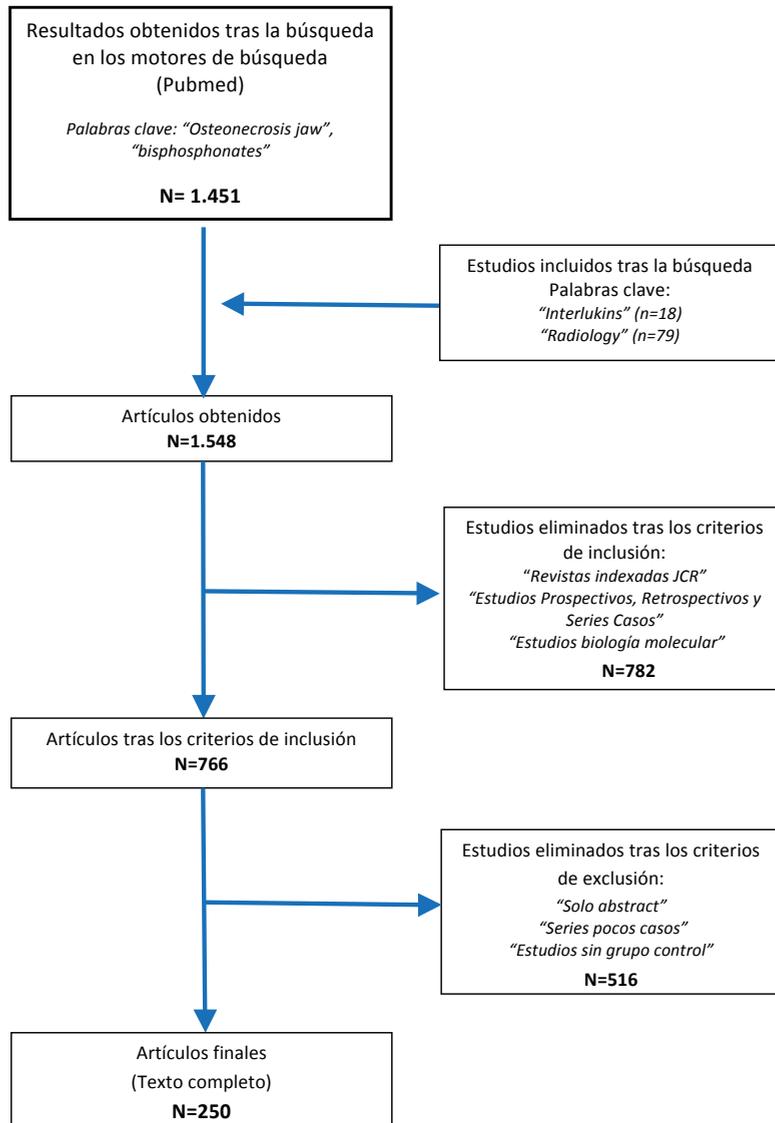


Fig. 15. Diagrama de flujo de la búsqueda bibliográfica en el motor de búsqueda PubMed.

2.2. Metodología realizada en nuestra serie de casos

2.2.1. Estudio clínico de los casos

Se recogió toda la información médica de cada paciente, acerca del tipo de patología base que tuviese; así como el fármaco que habían recibido o estaban tomando, ya fuese oral o intravenoso. También se registró el tiempo de toma del fármaco, en meses si se trataba de un bisfosfonato oral, o el número de ciclos que habían recibido si era un bisfosfonato intravenoso. Así como el motivo por el que tomaban ese fármaco.

En relación a los datos clínicos del grupo de osteonecrosis de los maxilares, además de la edad y sexo se recogieron los síntomas de la ONM, tales como el dolor mantenido y progresivo, si bien en situaciones iniciales el paciente puede encontrarse asintomático.

En la exploración clínica, se observaba si existía supuración a través de una fístula intraoral o bien extraoral; si tenían inflamación en forma de celulitis o abscesificación y por último si existía o no una exposición de hueso necrótico a través de una solución de continuidad de la mucosa.

Su localización “maxilar o mandibular” y su estadiaje, para esto último utilizamos la clasificación de Ruggiero *y cols.* (36) considerando sus cuatro estadios y tal como hemos definido anteriormente y de forma detallada en el apartado de introducción.

2.2.2. Estudio radiográfico de los casos

A todos los pacientes con osteonecrosis de los maxilares se les realizó una radiografía panorámica dental (ortopantomografía) y una tomografía computarizada (TC) para evaluar y confirmar la presencia de lesiones óseas (36); así como para determinar las características radiográficas de los pacientes con ONM.

En el caso de los 30 casos de Osteonecrosis de los maxilares seleccionados con TC para efectuar el estudio radiográfico y morfométrico (grupo 1 radiológico), se analizaron los cortes sagitales, axiales y coronales de las tomografías computarizadas. En los cortes coronales se realizaron las mediciones para medir la densidad ósea y posteriormente compararla con la obtenida en los pacientes controles (grupo 2 radiológico) o bien comparándolo con sus zonas sanas contralaterales (grupo 3 radiológico).

Todas las pruebas radiológicas fueron realizadas en el Servicio de Radiodiagnóstico del Hospital General Universitario de Valencia, mediante el uso de la tomografía computarizada (TC) helicoidal (modelo APV, General Electrics, Cuidado de la Salud, Wakesha, Wisconsin, EE.UU.).

Para el estudio de las áreas de Osteonecrosis de los maxilares, se emplearon los mismos detalles y niveles de ventana en las tres vistas (Windows=4107 y Level=1006), tales como: sagital, axial y coronal. De este modo se confirmaba la presencia de hueso esclerótico, áreas de radiolucidez, irregularidades en las corticales, formación de sequestros óseos o fragmentación de éste, así como cambios o estrechamiento del canal mandibular (116,168).

Se analizó el grado de esclerosis del hueso bajo el área de osteonecrosis, usando el programa ImageJ 1.47v del Instituto Nacional de Salud de Estados Unidos (169). Para analizar el área esclerótica, se seleccionaron tres zonas en la vista coronal del TC para realizar las correspondientes mediciones (Fig. 16).

En primer lugar, se estableció una escala de ajuste en milímetros a partir de las mediciones que se habían realizado en las exploraciones de las tomografías computarizadas, y se cargaron las vistas coronales del TC en el programa ImageJ. Posteriormente, estas imágenes fueron convertidas a escala de grises, que son imágenes de 8bits.

Para poder establecer las mediciones se seleccionó la media \pm la desviación estándar (DS) de todos los valores de grises y el rango correspondiente. En el programa ImageJ, el primer paso para calibrar la imagen consiste en medir el valor medio del gris de fondo para luego compararlo con las áreas seleccionadas. Obteniendo de este modo el valor medio de gris de cada área seleccionada.



Fig. 16. Ejemplo de las mediciones realizadas en el TC para el estudio de la densidad ósea.

2.2.3. Estudio serológico de los niveles plasmáticos de RANKL y OPG

2.2.3.1. Recogida de muestras de suero

La sangre fue recogida en la segunda visita, una semana después de la primera cita. Sólo se recogió una muestra por participante, y siempre tras la firma por parte del paciente del consentimiento informado para su inclusión en el estudio.

Se obtuvieron muestras en 56 pacientes del grupo 1 (ONM), en 42 del grupo 2 (pacientes tratados con BF pero sin desarrollo de ONM) y 49 del grupo 3 (controles sanos), siendo por lo tanto un total de 147 casos. Las muestras de sangre se obtuvieron de una vena periférica del brazo. En el caso de los pacientes de los grupos 1 y 2, los pacientes habían recibido tratamiento con ácido zoledrónico intravenoso (Zometa® Novartis Pharma SpA, Basel, Switzerland) cada 4 semanas o bisfosfonatos orales al menos durante 3 o 4 meses.

La sangre fue inmediatamente centrifugada a 3000 rpm durante 10 minutos. Las muestras fueron congeladas a -80°C hasta la determinación y posterior análisis de las mismas.

2.2.3.2. Análisis de las muestras

Los análisis y determinaciones plasmáticas se hicieron en el laboratorio de Biología Molecular de la Fundación del Hospital General Universitario de Valencia habiéndolos realizado la doctoranda, siendo instruida para ello por parte de la Dra. Adela Serrano.

2.2.3.2.1 Determinación de los niveles plasmáticos de RANKL

La determinación de los niveles plasmáticos de RANKL se realizó mediante un kit de ELISA (BIS-BIO-20452). Este es un ligando de receptor para el factor nuclear $\kappa\beta$, un miembro de la familia de factores de necrosis tumoral (TNF), siendo el principal factor estimulador de la formación de osteoclastos maduros y es esencial para su supervivencia. El RANKL activa su receptor específico, RANK, que se encuentra en los osteoclastos y las células dendríticas. Sus efectos son contrarrestados por la OPG, que actúa como un antagonista del receptor soluble endógeno.

Para la realización de la técnica del ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas o ELISA, (170) se sacaron las muestras del congelador que se encontraban a -80 °C. La placa, los estándares y los controles se encontraban almacenados a -20°C y los reactivos del kit a una temperatura comprendida entre 2 y 8 °C.

La determinación cuantitativa de los niveles en suero del ligando del receptor para el factor nuclear, RANKL, se realizó siguiendo el siguiente protocolo:

En primer lugar, se prepara el estándar, reconstituyéndolo con 5 ml del calibrador RDST (para células o sobrenadante) o RDGF (suero o plasma). A continuación se prepararon las diluciones seriadas, en 7 tubos desde una concentración de 300 pg/ml hasta 3,12 pg/ml.

Se realizaron cinco prelavados de los pocillos con 300 μ l del tampón de lavado diluido. Se añadió 50 μ l del tampón de ensayo en todos los pocillos, seguidamente 150 μ l de estándar, muestra o control en cada pocillo, excepto en el blanco, siempre por duplicado.

Se incubó la placa durante dos horas, en un agitador mecánico a 200 rpm, introducida en una bolsa de aluminio para protegerla de la luz a una temperatura ambiente de 18-24°C. Durante ese tiempo, se preparó una cantidad suficiente de Buffer de lavado (PBS con Tween 20 al 1%), con 20 ml de tampón de lavado y 480 ml de agua destilada, mezclando suavemente para evitar que se formase espuma (Fig. 17).

Una vez transcurridas esas dos horas, se lavó la placa cinco veces con 300 μ l de Buffer de lavado, era importante que no quedasen reactivos y que se fijasen bien los anticuerpos a las muestras.

A continuación se añadieron 200 μ l del anticuerpo de cabra policlonal anti-RANKl biotinilado en todos los pocillos, y 150 μ l de tampón de ensayo en el blanco. Posteriormente se taparon con hojas adhesivas y se incubó durante toda la noche (18-24 horas) a 4°C.

Al día siguiente se lavó la placa 5 veces con 300 μ l con Buffer de lavado. Se añadieron 200 μ l de conjugado a cada pocillo y se dejó incubar durante 1 hora a temperatura ambiente (18-26°C) en la oscuridad. Entonces se añadieron 200 μ l de la solución de sustrato, y se incubó durante 30 minutos en oscuridad.

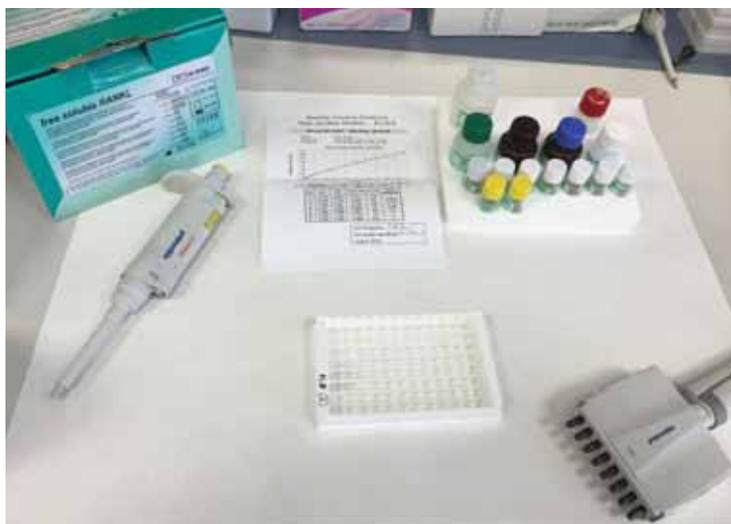


Fig. 17. Determinación del RANKL.

Finalmente se añadieron 50 μ l de la solución de parada (ácido fosfórico 1 M) en toda la placa, y se procedió a leer la absorbancia de cada pocillo en un espectrofotómetro utilizando 450 nm como longitud de onda principal (Fig. 18).



Fig. 18. Espectrofotómetro utilizado para el análisis del RANKL y Osteoprotegerina.

2.2.3.2.2 Determinación de los niveles plasmáticos de Osteoprotegerina (OPG)

La determinación cuantitativa de OPG o Factor Inhibidor de Osteoclasto (OCIF) es una glicoproteína de la superfamilia del receptor de TNF11b en suero, se realizó siguiendo el siguiente protocolo (Fig. 19):

En primer lugar se prepara el estándar, reconstituyendo con 5 ml del calibrador RDST (para células o sobrenadante) o RDGF (suero o plasma). A continuación se prepararon las diluciones seriadas, en 7 tubos desde una concentración de 300 pg/ml hasta 3,12 pg/ml.

Se añadió 150 μ l del tampón de ensayo en todos los pocillos, seguidamente 20 μ l de estándar, muestra o control en cada pocillo, excepto en el blanco, siempre por duplicado. Asimismo, se adicionó 50 μ l de anticuerpo AB (Biotinilado anti OPG) monoclonal de ratón en cada pocillo, excepto en el blanco.

Se incubó la placa durante cuatro horas (en un agitador mecánico a 200 rpm), y se introdujo en una bolsa de aluminio, para protegerla de la luz a una temperatura ambiente de 18-24°C. Durante ese tiempo, se preparó una cantidad suficiente de Buffer de lavado (PBS con Tween 20 al 1%), con 20 ml de tampón de lavado y 480 ml de agua destilada, mezclando suavemente para evitar que se formase espuma.

Una vez transcurridas esas cuatro horas, se lavó la placa cinco veces con 300 μ l de Buffer de lavado, era importante que no quedasen reactivos y que se fijasen bien los anticuerpos a las muestras.

A continuación se añadieron 200 μ l de IL conjugado en todos los pocillos, y se volvió a incubar durante una hora.

Se lavó la placa 5 veces con 300 μ l con Buffer de lavado. Entonces se añadieron 200 μ l de la solución de sustrato, y se incubó durante 30 minutos en oscuridad.

Finalmente se añadieron 50 μ l de la Solución de parada (ácido fosfórico 1 M) en toda la placa, y se procedió a leer la absorbancia de cada pocillo en un espectrofotómetro utilizando 450 nm como longitud de onda principal.



Fig. 19. Determinación de la Osteoprotegerina.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El “*primer objetivo*” de nuestra investigación, consistió en el estudio de los datos clínicos en un grupo de 183 pacientes con Osteonecrosis de los maxilares por bisfosfonatos. Para ello se describió la distribución o la media de las variables: edad, sexo, tipo de enfermedad, fármaco que tomaba el paciente, tipo de administración del fármaco, tiempo de administración del fármaco (intravenoso u oral), localización de la ONM, la existencia de dolor, de inflamación, de supuración, de fístulas introrales o extraorales y el estadio clínico.

El “*segundo objetivo*” fue comparar los datos obtenidos en la tomografía computarizada entre los grupos 1, 2 y 3 radiológicos, particularmente en lo referente a la densidad ósea medida objetivamente en los cortes coronales. Para ello utilizaremos el análisis de varianza cuando comparáramos esos tres grupos. Si se trataba de comparar dos a dos los grupos, usamos la *t* de student.

El “*tercer objetivo*” de nuestro estudio, consistió en analizar si existían diferencias significativas entre los niveles plasmáticos de RANKL y OPG en los pacientes con osteonecrosis y los dos grupos control. Para ello se utilizó una prueba de comparación de medias. En este caso se realizó mediante el análisis de varianza, ya que se verificó previamente mediante la prueba de normalidad de Shapiro-Wilk que la variable RANKL y OPG se distribuían según una ley normal.

El “*cuarto objetivo*” de nuestro estudio consistió en analizar si existía algún tipo de asociación o bien independencia entre el tipo de administración del fármaco (intravenoso u oral) y las siguientes variables a nivel clínico: factores locales desencadenantes, localización, dolor, inflamación, supuración, fístula intraoral, fístula extraoral, exposición ósea y estadio. También valoramos si las medias de RANKL y OPG eran diferentes en función de que se administrase el fármaco de forma intravenosa u oralmente.

En el caso de las variables discretas se ha analizado la existencia de asociación mediante el uso de tablas de contingencia y el estadístico Chi-cuadrado de Pearson.

En el caso de las variables continuas, al igual que en el tercer objetivo, se realizó el análisis mediante la prueba *T*, ya que se verificó previamente mediante la prueba de normalidad de Shapiro-Wilk que la variable RANKL y OPG se distribuye según una ley normal.

El “*quinto objetivo*” marcado, consistió en analizar si alguna de las variables que hasta ahora hemos analizado, tenía relación con la variable respuesta binaria Exposición ósea. En este caso, utilizamos un modelo de regresión logística binaria que nos permitirá comprobar si existe relación entre las variables independientes (edad, sexo, tipo de administración, localización de la ONM, factores locales y niveles plasmáticos de RANKL y OPG) y la variable dependiente binaria Exposición ósea.

Por último también hicimos un análisis de regresión múltiple para comprobar la relación entre las variables cuantitativas del estudio, como RANLK y OPG.

Se consideraron a lo largo de todo el análisis como valores estadísticamente significativos aquellos que obtuvieran un valor de p menor de 0,05.

RESULTADOS

I. – ANÁLISIS DESCRIPTIVO DE LOS DATOS CLÍNICOS EN EL GRUPO DE 183 PACIENTES CON OSTEONECROSIS (ONM)

A continuación vamos a realizar el análisis descriptivo de las siguientes variables en el grupo de 183 pacientes con osteonecrosis de los maxilares:

- *Variables cuantitativas:* Edad, tiempo que han tomado el fármaco intravenoso u oral, valor plasmático de RANKL y OPG y valor medio de la esclerosis ósea en el TC.
- *Variables discretas:* Sexo, tipo de enfermedad, tipo de fármaco, intravenoso/oral, factores locales predisponentes de ONM, localización de la ONM, dolor, inflamación, supuración, fístula interna, fístula externa, metástasis y estadio.

1 – Edad

La edad media de nuestros pacientes era de 68,22 años; con un rango de edades comprendido entre 32 y 89 años; y una desviación típica de 12,19 (ver Tabla 13 y Figura 20).

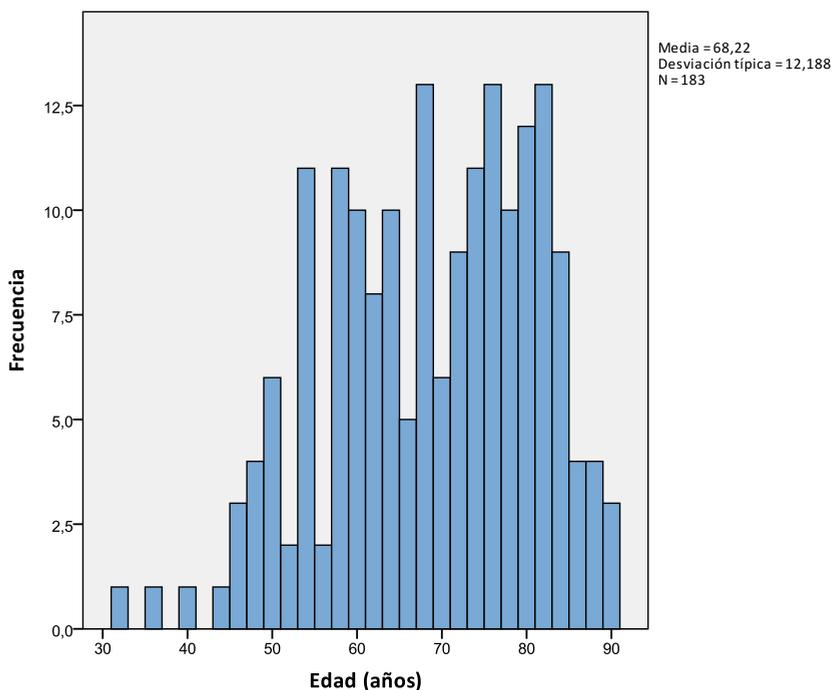


Fig. 20. Histograma de la variable Edad en años (grupo ONM).

	N	Mínimo	Máximo	Media	Desviación típica
EDAD (AÑOS)	183	32	89	68,22	12,19

Tabla 13. Edad en años (grupo ONM).

2 – Sexo

La variable sexo de los pacientes del grupo con ONM tiene la siguiente distribución (ver Tabla 14 y Figura 21). Como observamos en la muestra predominaron las mujeres.

	Tipo	Frecuencia	Porcentaje
SEXO	Mujeres	118	64,5%
	Varones	65	35,5%
	Total	183	100,0%

Tabla 14. Sexo (grupo ONM).

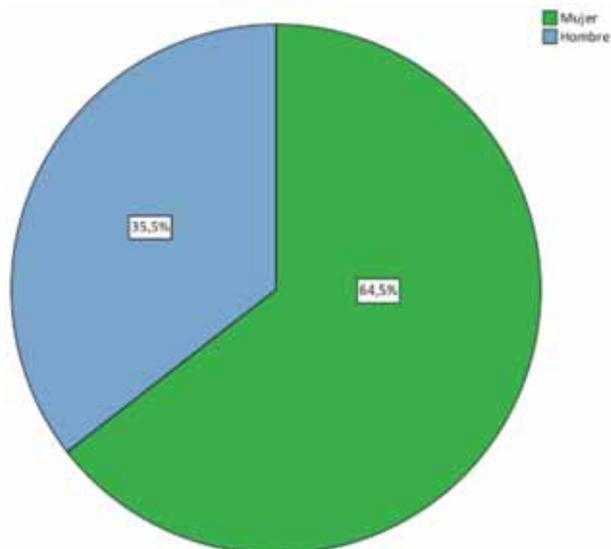


Fig. 21. Diagrama de sectores de la variable Sexo (grupo ONM).

3 – Tipo de enfermedad

Los pacientes del grupo de osteonecrosis presentaban la siguiente distribución de enfermedades donde se constata que lo más frecuente fue el cáncer de mama, el Mieloma Múltiple y la osteoporosis (ver Tabla 15 y Figura 22).

	Tipo	Frecuencia	Porcentaje
TIPO DE ENFERMEDAD	Cáncer de mama	55	30,10%
	Cáncer próstata	22	12%
	Cáncer de pulmón	4	2,20%
	Cáncer renal	4	2,20%
	Cáncer de colon	1	0,50%
	Cáncer de mama y Mieloma Múltiple	1	0,50%
	Mieloma Múltiple	48	26,20%
	Linfoma folicular	1	0,50%
	Osteoporosis	47	25,20%
	Total	183	100,0%

Tabla 15. Tipo de Enfermedad (grupo ONM).

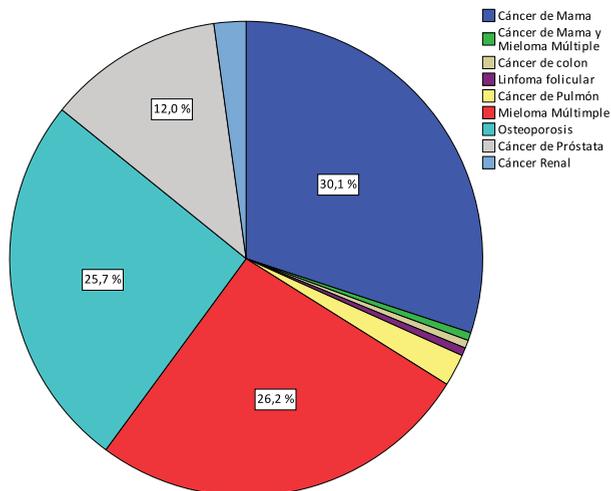


Fig. 22. Diagrama de sectores de la variable Tipo de Enfermedad (grupo ONM).

4 – Tipo de Fármaco

4.1. – Nombre del fármaco

La distribución de fármacos que toman o tomaban los pacientes del grupo de osteonecrosis está descrita en la Tabla 16 y Figura 23.

	Tipo	Frecuencia	Porcentaje
FÁRMACO	Ac. Zoledrónico	132	72,10%
	Alendronato	32	18%
	Ibandronato	12	6,60%
	Risedronato	6	3,30%
	Pamidronato	1	0,50%
	Total	183	100,0%

Tabla 16. Nombre del Fármaco que toman los pacientes (grupo ONM).

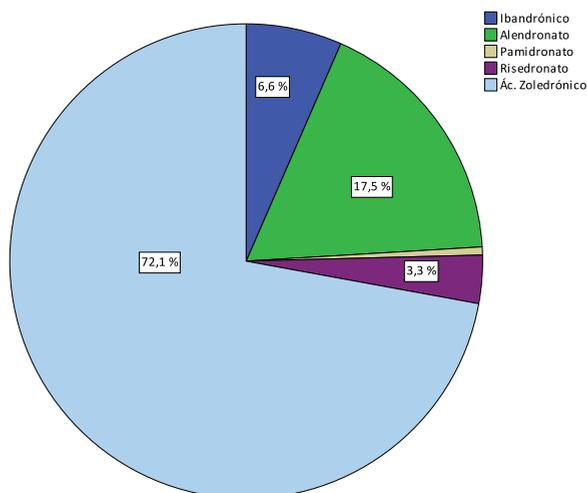


Fig. 23. Diagrama de sectores de la variable Tipo de Fármaco (grupo ONM).

4.2. – Tipo de administración del Fármaco

Los fármacos bisfosfonatos se han clasificado en función del tipo de administración, según fuese intravenosa o bien oral y están referidos en la Tabla 17 y Figura 24.

	Tipo	Frecuencia	Porcentaje
TIPO DE ADMINISTRACIÓN DEL FÁRMACO	Intravenoso	133	72,7%
	Oral	50	27,3%
	Total	183	100,0%

Tabla 17. Tipo de administración del fármaco (grupo ONM).

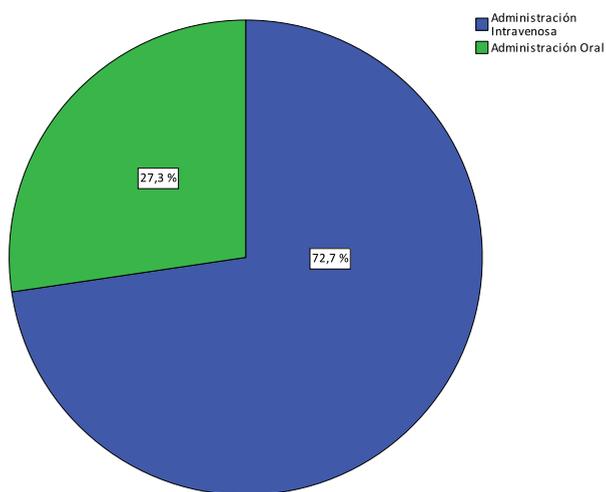


Fig. 24. Diagrama de sectores de la variable Tipo de Administración del Fármaco (grupo ONM).

4.3. – Tiempo de administración de Fármacos intravenosos y orales

Hallamos que el tiempo medio de administración de los fármacos intravenosos era de 25,42 meses, mientras que los fármacos orales se tomaron como promedio durante 85,36 meses, tal y como se puede ver a continuación (ver Tabla 18 y Figuras 25 a la 27).

		N	Mínimo	Máximo	Media	Desviación típica
TIEMPO ADMINISTRACIÓN (MESES)	Fármaco intravenoso	127	1	120	25,42	19,27
	Fármaco Oral	44	12	240	85,36	54,97
	Total	171	1	240	40,84	41,60
	Perdidos	12	-	-	-	-

Tabla 18. Tiempo de administración del fármaco (grupo ONM).

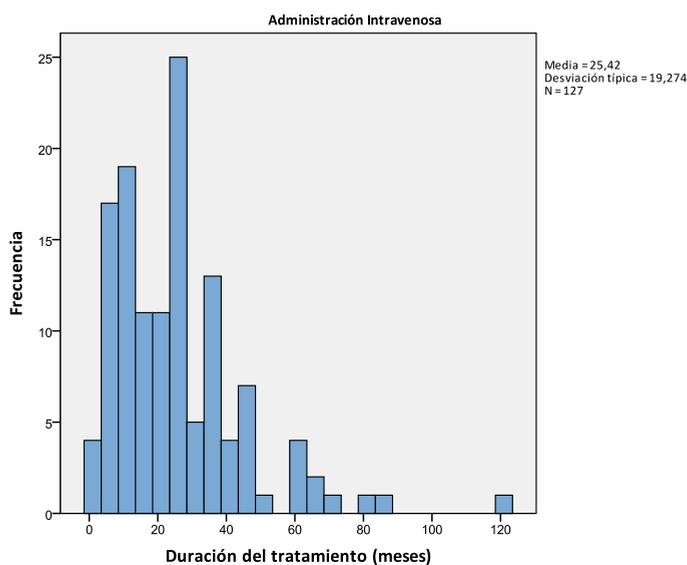


Fig. 25. Histograma de tiempo de administración de los bisfosfonatos intravenosos (grupo ONM).

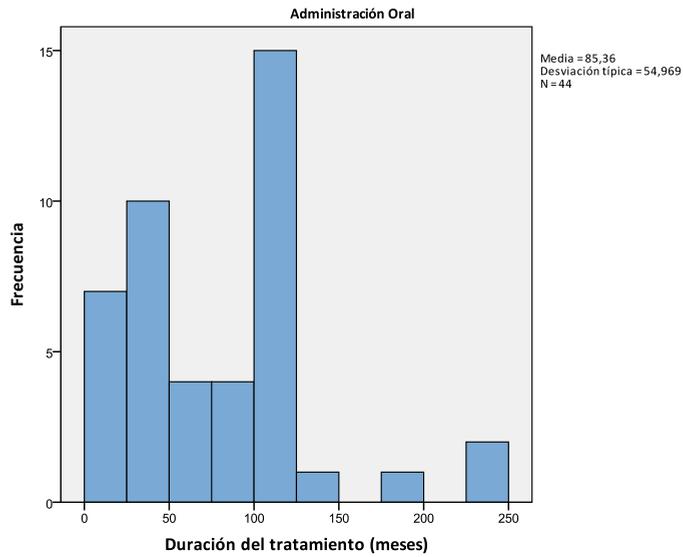


Fig. 26. Histograma de tiempo de administración de los bisfosfonatos orales (grupo ONM).

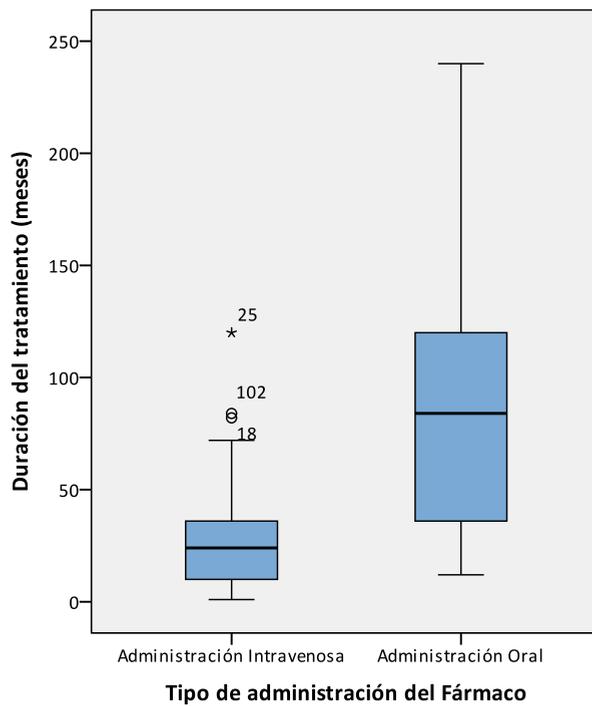


Fig. 27. Diagrama de cajas del tiempo de administración según el tipo de fármaco (grupo ONM).

5 – Datos clínicos

5.1. – Factores Locales predisponentes al desarrollo de ONM

La distribución de los factores de riesgo más frecuentes para desarrollar una osteonecrosis están descritas en Tabla 19 y Figura 28. Lo más frecuente fue la extracción dental.

	Tipo	Frecuencia	Porcentaje
FACTORES LOCALES	Extracción	127	69,40%
	Prótesis	17	9,29%
	Implante	9	4,92%
	Espontánea	7	3,83%
	Extracción y prótesis	1	0,55%
	Desconocido	22	12,02%
	Total	183	100,00%

Tabla 19. Factores Locales favorecedores de osteonecrosis (grupo ONM).

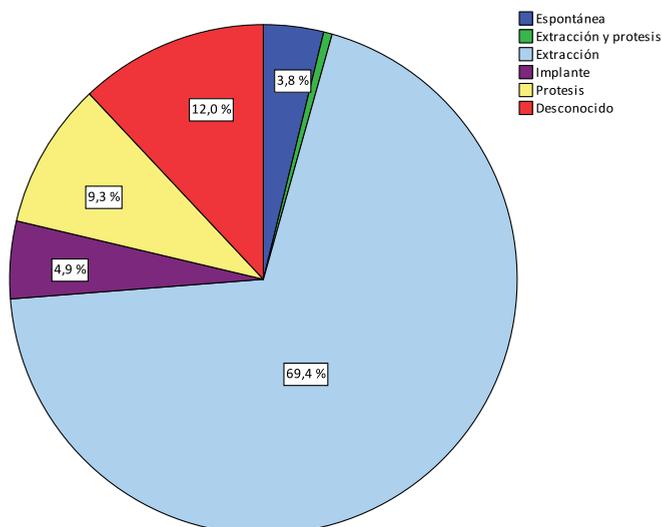


Fig. 28. Diagrama de sectores de Factores Locales favorecedores de osteonecrosis (grupo ONM).

5.2. – Localización

La distribución de la localización de la ONM fue más frecuente en la mandíbula con la siguiente distribución (ver Tabla 20 y Figura 29).

	Tipo	Frecuencia	Porcentaje
LOCALIZACIÓN	Mandíbula	136	74,3%
	Mandíbula y Maxilar Superior	17	9,3%
	Maxilar Superior	30	16,4%
	Total	183	100,0%

Tabla 20. Localización (grupo ONM).

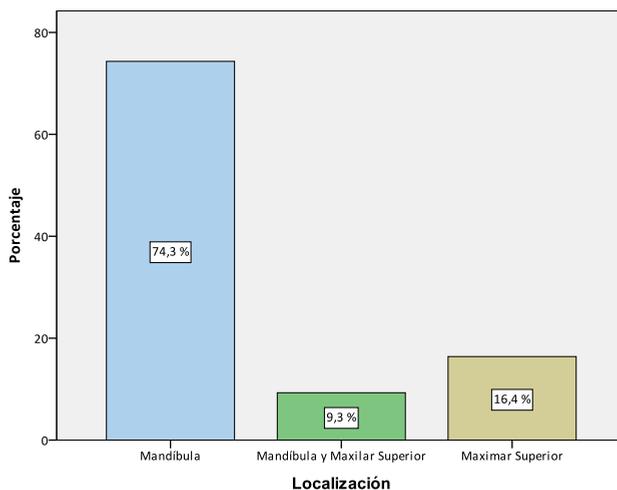


Fig. 29. Diagrama de sectores de la variable Localización (grupo ONM).

5.3. – Dolor

La distribución de los pacientes del grupo de osteonecrosis que tenían dolor fue mayor que los que no lo tenían (ver Tabla 21 y Figura 30).

	Tipo	Frecuencia	Porcentaje
DOLOR	Sí	118	64,5%
	No	65	35,5%
	Total	183	100%

Tabla 21. Dolor (grupo ONM).

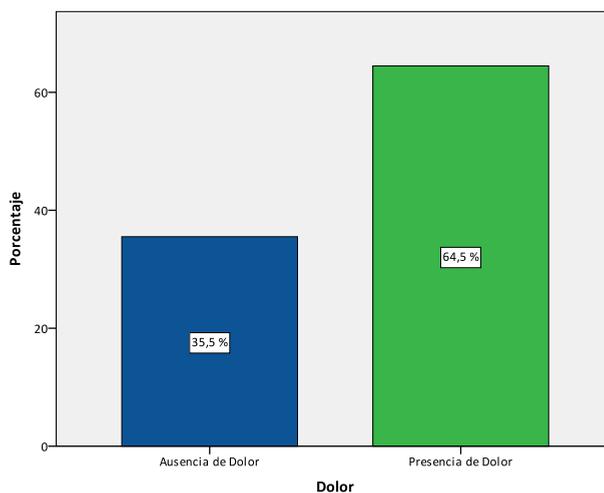


Fig. 30. Diagrama de sectores de la variable Dolor (grupo ONM).

5.4. – Inflamación

La distribución de los pacientes del grupo de osteonecrosis que presentaban inflamación en el área alrededor de la ONM, fue la siguiente (ver Tabla 22 y Figura 31).

	Tipo	Frecuencia	Porcentaje
INFLAMACIÓN	Sí	62	33,9%
	No	212	66,1%
	Total	183	100%

Tabla 22. Inflamación (grupo ONM).

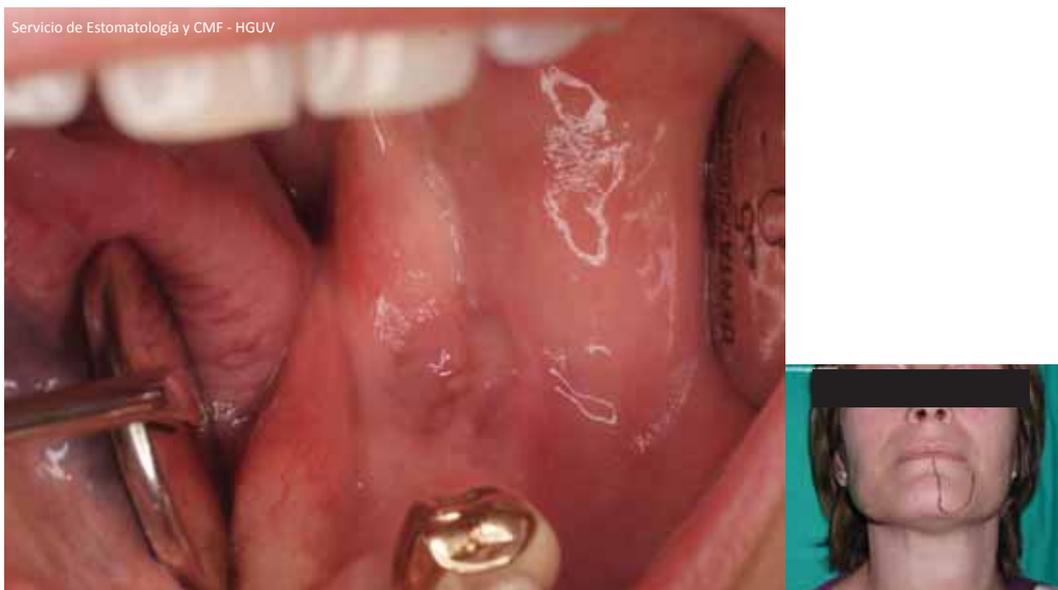


Fig. 31. Inflamación en el reborde alveolar mandibular, junto a infección y una parestesia mentoniana en una paciente con ONM.

5.5. – Supuración

La distribución de los pacientes del grupo de osteonecrosis que han tenido supuración, era muy similar a los que no la tenían (ver Tabla 23 y Figura 32).

	Tipo	Frecuencia	Porcentaje
SUPURACIÓN	Sí	89	48,6%
	No	94	51,4%
	Total	183	100%

Tabla 23. Supuración (grupo ONM).



Fig. 32. Supuración mandibular en un paciente del grupo ONM.

5.6. – Fístula intraoral

La distribución de los pacientes del grupo de osteonecrosis que han presentado fístula *intraoral* fue menor que los que no la tenían (ver Tabla 24 y Figura 33).

	Tipo	Frecuencia	Porcentaje
FÍSTULA INTRAORAL	Sí	65	35,5%
	No	118	64,5%
	Total	183	100%

Tabla 24. Fístula intraoral (grupo ONM).



Fig. 33. Fístula intraoral mandibular con salida de material purulento en un paciente del grupo ONM.

5.7. – Fístula extraoral

En 14 pacientes del grupo de osteonecrosis observamos la presencia de una fístula *extraoral*, tal y como se muestra a continuación (ver Tabla 25 y Figura 34).

	Tipo	Frecuencia	Porcentaje
FÍSTULA EXTRAORAL	Sí	14	7,7%
	No	169	92,3%
	Total	183	100%

Tabla 25. Fístula Extraoral (grupo ONM).



Fig. 34. Fístula Extraoral a piel en el paciente de la figura 32 (grupo ONM).

5.8. – Exposición ósea

La distribución de los pacientes del grupo de osteonecrosis que presentaban exposición ósea fue significativamente mayor que cuando no la había (ver Tabla 26 y Figuras 35 y 36).

	Tipo	Frecuencia	Porcentaje
EXPOSICIÓN ÓSEA	Sí	143	78,1%
	No	40	21,9%
	Total	183	100%

Tabla 26. Exposición Ósea (grupo ONM).

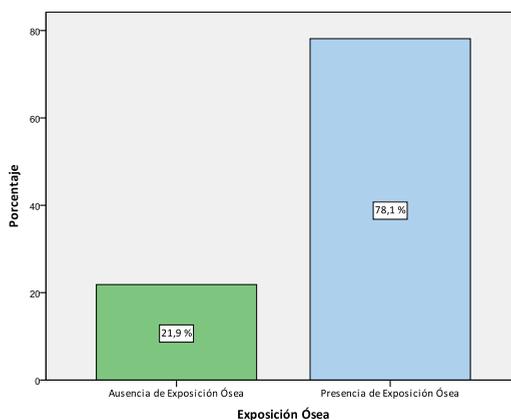


Fig. 35. Diagrama de sectores de la variable exposición ósea (grupo ONM).



Fig. 36. Osteonecrosis maxilar con exposición de hueso necrótico.

5.9. – Estadío clínico de la ONM

La distribución de los diferentes estadios de la enfermedad en el grupo de pacientes con osteonecrosis está descrita en la Tabla 27 y Figura 37. Como se observa el estadio predominante fue el segundo.

	Tipo	Frecuencia	Porcentaje
ESTADIO CLÍNICO	0	8	4,4%
	1	49	26,8%
	2	85	46,4%
	3	41	22,4%
	Total	183	100%

Tabla 27. Estadío (grupo ONM).

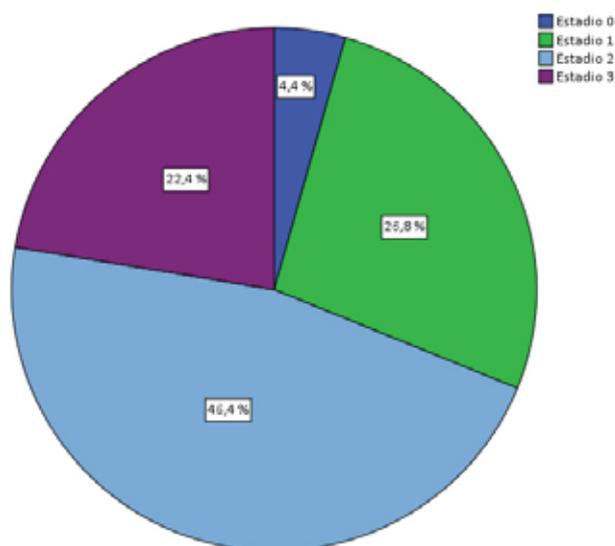


Fig. 37. Diagrama de sectores de la variable estadio clínico (grupo ONM).

En el caso de los pacientes del **estadio 3** los hallazgos que lo definieron fueron los siguientes: 14 (34,1%) tenían una fístula exterior a piel, 33 (80,5%) tenían una exposición de hueso necrótico, 8 (26,7%) de los estadios 3 que tenían afectación mandibular de ONM tuvieron una fractura patológica, 12 (40%) de los estadios 3 que tenían afectación mandibular de ONM tuvieron una osteolisis hasta la basal, 15 (78,9%) de los estadios 3 que tenían afectación maxilar presentaron comunicación orosinusal y 18 (94,7%) de los estadios 3 que tenían afectación maxilar presentaron una afectación del suelo del seno maxilar.

En la tabla 28 se muestra un resumen de los resultados clínicos expuestos en el apartado I.

	Tipo	Frecuencia	Porcentaje
TIPO DE ENFERMEDAD	Cáncer de Mama	55	30,1%
	Cáncer de Próstata	22	12,0%
	Cáncer de Pulmón	4	2,2%
	Cáncer Renal	4	2,2%
	Cáncer de Colon	1	0,5%
	Cáncer de Mama y Mieloma Múltiple	1	0,5%
	Mieloma Múltiple	48	26,2%
	Linfoma folicular	1	0,5%
	Osteoporosis	47	25,7%
FÁRMACO	Ac. Zoledrónico	132	72,1%
	Alendronato	32	18%
	Ibandronato	12	6,6%
	Risedronato	6	3,3%
	Pamidronato	1	0,5%
ADMINISTRACIÓN DEL FÁRMACO	Intravenoso	133	72,7%
	Oral	50	27,3%
FACTORES LOCALES	Extracción	127	69,4%
	Prótesis	17	9,3%
	Implante	9	4,9%
	Espontánea	7	3,8%
	Extracción y prótesis	1	0,6%
	Desconocido	22	12%
LOCALIZACIÓN	Mandíbula	136	74,3%
	Mandíbula y Maxilar Superior	17	9,3%
	Maxilar Superior	30	16,4%
DOLOR	Sí	118	64,5%
INFLAMACIÓN	Sí	62	33,9%
SUPURACIÓN	Sí	89	48,6%
FÍSTULA INTRAORAL	Sí	65	35,5%
FÍSTULA EXTRAORAL	Sí	14	7,7%
EXPOSICIÓN ÓSEA	Sí	143	78,1%
ESTADO CLÍNICO	0	8	4,4%
	1	49	26,8%
	2	85	46,4%
	3	41	22,4%

Tabla 28. Resumen de las variables del grupo con 183 pacientes con ONM.

II. ANÁLISIS COMPARATIVO DE LA DENSIDAD ÓSEA, EN LAS TOMOGRAFÍAS COMPUTARIZADAS, ENTRE EL GRUPO DE ONM, LA ZONA SANA CONTRALATERAL DE LOS ENFERMOS CON ONM Y UN GRUPO CONTROL

1. Estudio descriptivo en los 30 casos seleccionados - Grupo 1 radiológico (pacientes con ONM)

Primero vamos a describir las principales características radiológicas en los TC_s de los 30 enfermos con ONM (Grupo 1), en los que luego se hizo el estudio morfométrico.

Hallamos que el 10% de los pacientes no presentaban **osteolisis**, frente al 90% que si la tenían (ver Tabla 29 y Figuras 38 y 39).

		Número	Porcentaje
OSTEOLISIS	NO	3	10%
	SÍ	27	90%
	TOTAL	30	100%

Tabla 29. Frecuencias de la variable Osteolisis (grupo con ONM).

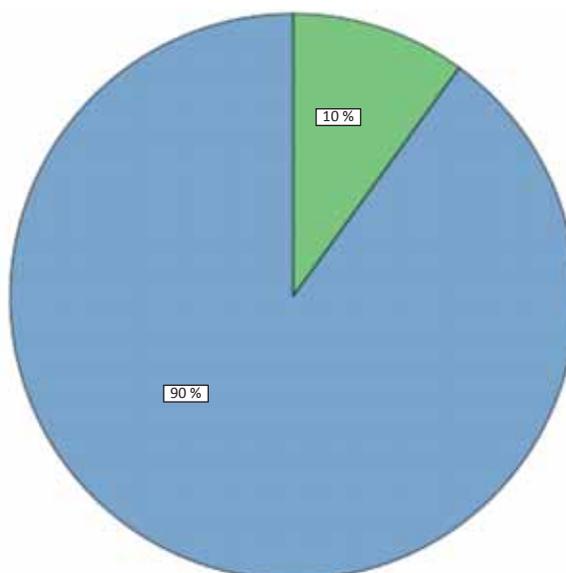


Fig. 38. Diagrama de sectores de la variable Osteolisis (grupo con ONM).



Fig. 39. Corte axial del TC donde se aprecia la osteolisis mandibular.

En segundo lugar, hemos analizado la frecuencia de **fractura mandibular** dentro de los treinta pacientes del grupo con ONM, no presentando ninguno de ellos una fractura mandibular (ver Tabla 30).

		Número	Porcentaje
FRACTURA MANDIBULAR	SI	0	0%
	NO	30	100%
	TOTAL	30	100%

Tabla 30. Frecuencias de la variable fractura mandibular (grupo con ONM).

En tercer lugar, analizamos la existencia de **esclerosis ósea en el canal mandibular**, no presentándose esta en cinco pacientes (16,7%), mientras que los otros veinticinco pacientes sí que presentaban dicho signo radiográfico (83,3%) (ver Tabla 31 y Figuras 40 y 41).

		Número	Porcentaje
ESCLEROSIS DEL CANAL MANDIBULAR	NO	5	16,7%
	SÍ	25	83,3%
	TOTAL	30	100%

Tabla 31. Frecuencias de la variable esclerosis del canal mandibular (grupo con ONM).

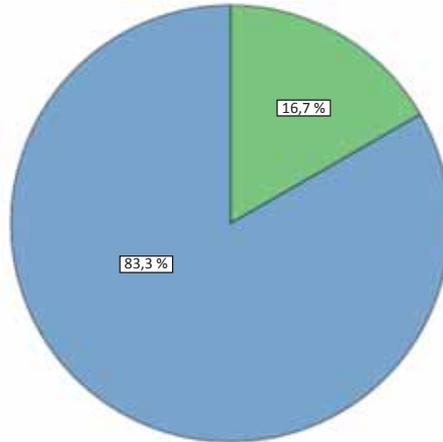


Fig. 40. Diagrama de sectores de la variable esclerosis del canal mandibular (grupo con ONM).



Fig. 41. Notable esclerosis del canal mandibular en la parte derecha.

En cuarto lugar analizamos el **engrosamiento de la cortical mandibular**, encontrándose presente en los 30 pacientes estudiados (ver Tabla 32 y Figura 42).

		Número	Porcentaje
ENGROSAMIENTO DE LA CORTICAL MANDIBULAR	NO	0	0%
	SÍ	30	100%
	TOTAL	30	100%

Tabla 32. Frecuencias de la variable engrosamiento de la cortical mandibular (grupo con ONM).

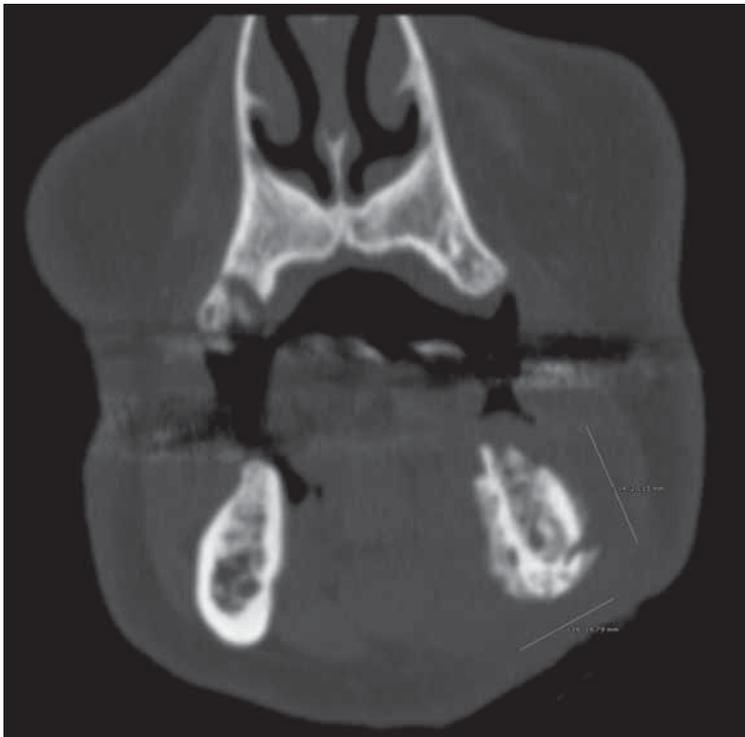


Fig. 42. Engrosamiento de la cortical mandibular, falta de delimitación entre la cortical y medular; así como erosiones de la cortical mandibular.

En el quinto apartado, se analizó la **falta de delimitación entre la cortical y la medular mandibular**, observándose únicamente en seis de los treinta pacientes con ONM (ver Tabla 33 y Figuras 42 y 43).

		Número	Porcentaje
FALTA DE DELIMITACIÓN ENTRE LA CORTICAL Y MEDULAR MANDIBULAR	NO	24	80%
	SÍ	6	20%
	TOTAL	30	100%

Tabla 33. Frecuencias de la variable mezcla de la cortical y la medular mandibular (grupo con ONM).

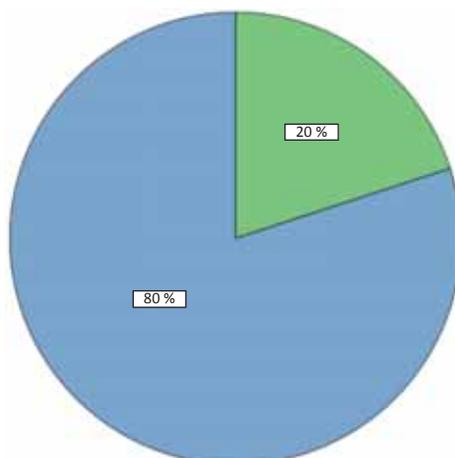


Fig. 43. Diagrama de sectores de la variable mezcla de la cortical y la medular mandibular (grupo con ONM).

En el sexto apartado, se analizó la **erosión de la cortical**, observándose que veinte de los treinta pacientes no la presentaban mientras que los otros diez sí que la tenían (ver Tabla 34 y Figuras 42, 44 y 45).

		Número	Porcentaje
EROSIÓN DE LA CORTICAL	NO	20	66,7%
	SÍ	10	33,3%
	TOTAL	30	100%

Tabla 34. Frecuencias de la variable erosión de la cortical (grupo con ONM).

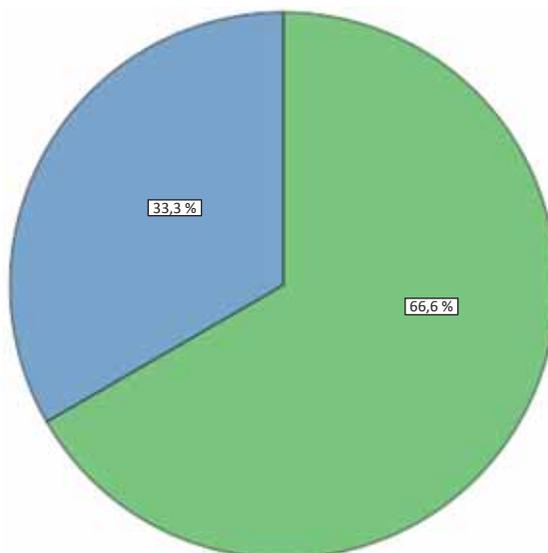


Fig. 44. Diagrama de sectores de la variable Erosión de la Cortical (grupo con ONM).



Fig. 45. Erosión de la cortical mandibular en el TC.

En el séptimo apartado, se analizó la presencia de **secuestro óseo**, observándose que doce de los treinta pacientes no los presentaban mientras que los otros dieciocho sí que lo mostraban (ver Tabla 35 y Figuras 46-48).

		Número	Porcentaje
SECUESTRO ÓSEO	NO	12	40%
	SÍ	18	60%
	TOTAL	30	100%

Tabla 35. Frecuencias de la variable secuestro óseo (grupo con ONM).

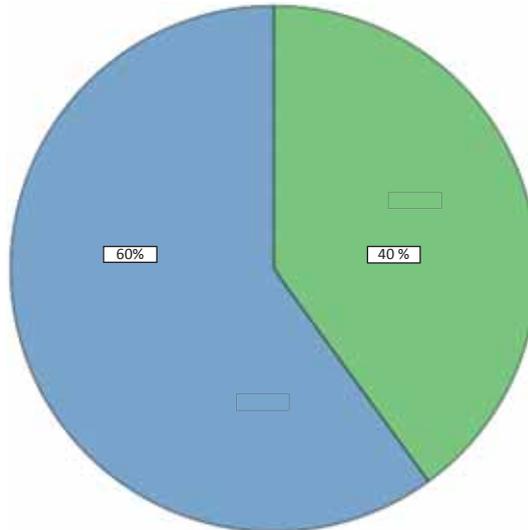


Fig. 46. Diagrama de sectores de la variable Secuestro Óseo (grupo con ONM).



Fig. 47. Secuestro óseo mandibular en el tercer cuadrante. Imagen de TC.

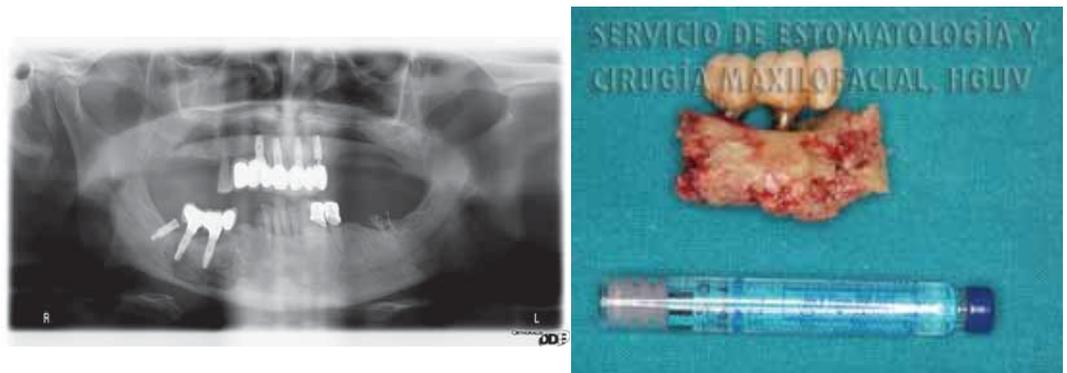


Fig. 48. Secuestro óseo mandibular manifestado en la ortopantomografía (a) y tras su eliminación (b).

En la tabla 36 se muestra un resumen de los resultados radiográficos hallados en los TC_s y expuestos en el apartado II 1.

		Número	Porcentaje
OSTEOLISIS	NO	3	10%
	SÍ	27	90%
FRACTURA MANDIBULAR	NO	30	0%
	SÍ	0	0%
ESCLEROSIS DEL CANAL MANDIBULAR	NO	5	16,7%
	SÍ	25	83,3%
ENGROSAMIENTO DE LA CORTICAL MANDIBULAR	NO	0	0%
	SÍ	30	100%
MEZCLA DE LA CORTICAL Y LA MEDULAR MANDIBULAR	NO	24	80%
	SÍ	6	20%
EROSIÓN DE LA CORTICAL	NO	20	66,7%
	SÍ	10	33,3%
SECUESTRO ÓSEO	NO	12	40%
	SÍ	18	60%

Tabla 36. Resumen de los hallazgos radiológicos en los TC_s de los 30 casos seleccionados con ONM.

2. Estudio analítico y comparativo en la densidad ósea entre los tres grupos de estudio

Vamos a realizar la comparación de los niveles de densidad ósea en los tres grupos de estudio: Grupo 1 (30 enfermos ONM), Grupo 2 (30 sujetos sanos) y Grupo 3 (30 zonas sanas contralaterales de los enfermos con ONM).

Al estudiar los niveles de densidad ósea, los treinta pacientes del Grupo 1, tenían una media de 155,43 píxeles y una desviación típica de 37,37. En el Grupo 2 de treinta pacientes sanos, hallamos una media de 87,77 píxeles y una desviación típica de 11,27 y por último los treinta casos del Grupo 3, en los que se analizaron zonas sanas de pacientes con ONM se observó una media de 91,02 píxeles y una desviación típica de 18,38 (ver Tabla 37 y Figura 49).

	N	Media	Desviación típica	Error típico	Intervalo de confianza para la media al 95%	
GRUPO 1	30	155,43	37,37	6,82	141,49	169,39
GRUPO 2	30	87,77	11,27	2,06	83,56	91,98
GRUPO 3	30	91,02	18,38	3,36	84,15	97,88
TOTAL	90	111,41	39,85	4,20	103,06	119,76

Tabla 37. Comparación de los niveles de densidad ósea en los tres grupos.

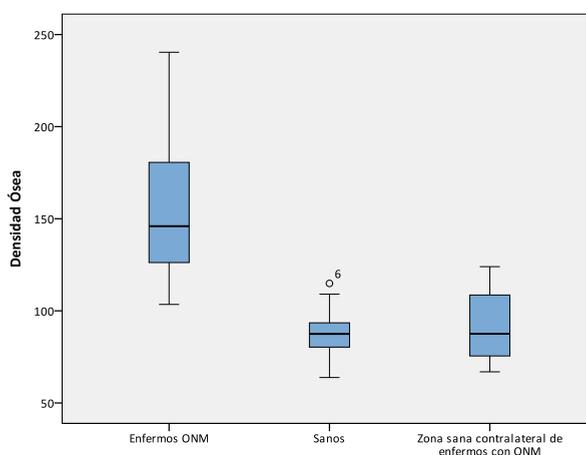


Fig. 49. Diagrama de cajas de los niveles de Densidad Ósea en los tres grupos.

El modelo de análisis de la varianza supone que los grupos son muestras aleatorias de poblaciones normales con igual varianza.

Para ello evaluaremos la normalidad de la población mediante la prueba de Shapiro – Wilk. Obteniendo que tanto el Grupo 1 como el Grupo 3 no presentan una distribución normal (ver Tabla 38).

	Pruebas de normalidad - Shapiro-Wilk		
	Estadístico	gl	Significación
GRUPO 1	0,919	30	0,025
GRUPO 2	0,973	30	0,635
GRUPO 3	0,910	30	0,015

Tabla 38. Estudio de normalidad de los niveles de densidad ósea en los tres grupos.

Al realizar el test de homogeneidad de las varianzas (estadístico de Levene) se obtuvo una $p < 0,01$. Todo ello nos indica que las muestras no siguen una distribución normal, ni tienen variancias similares. Por lo tanto realizamos una prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis para comprobar si existen diferencias significativas entre los tres grupos de pacientes.

Procediendo de este modo, se obtiene un valor de Chi-cuadrado de 55,19, teniendo una alta significación $p < 0,01$ (ver Tabla 39). Lo que significa que hay diferencias significativas entre las medias de densidad ósea de los tres grupos.

Estadísticos de contraste (Prueba de Kruskal-Wallis)	Densidad ósea
Chi-cuadrado	55,19
Significación asintótica.	0,000

Tabla 39. Prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis comparando la densidad ósea en los tres grupos.

Finalmente se realizaron comparaciones múltiples mediante la prueba de Mann – Whitney para determinar entre que grupos existen diferencias significativas, obteniéndose la no existencia de diferencias significativas ($p = 1,000$) entre los Grupos 2 y 3 (pacientes sanos y pacientes enfermos que se les ha medido la densidad ósea de zonas sanas).

Existiendo diferencias significativas entre los pacientes del Grupo 1 y los pacientes del Grupo 2 ($p < 0,001$); y entre los pacientes del Grupo 1 y los pacientes del Grupo 3 ($p < 0,001$).

III. – ANÁLISIS COMPARATIVO EN LOS NIVELES PLASMÁTICOS DE RANKL Y OPG ENTRE EL GRUPO DE PACIENTES QUE HAN TOMADO BISFOSFONATOS Y HAN DESARROLLADO ONM, EL GRUPO DE PACIENTES QUE HAN TOMADO EL FÁRMACO Y NO HAN DESARROLLADO ONM Y EL GRUPO CONTROL

Vamos a realizar la comparación de los niveles plasmáticos de RANKL y OPG en los tres grupos de exposición: Grupo 1 (Osteonecrosis de los Maxilares), Grupo 2 (Bisfosfonatos sin Osteonecrosis) y Grupo 3 (Control).

Los niveles de **RANKL**, analizando en primer lugar los 49 pacientes del grupo control (grupo 3), tenían una media de 0,101 pmol/l y una desviación típica de 0,045. En el grupo 1 de los 56 pacientes con osteonecrosis de los maxilares, hallamos una media de 0,085 pmol/l y una desviación típica de 0,034 y por último los 42 casos con bisfosfonatos sin osteonecrosis presentaban una media de 0,118 pmol/l y una desviación típica de 0,055 (ver Tabla 40 y Figuras de la 50 a la 54).

		N	Media	Desviación típica	Intervalo de confianza para la media al 95%	
RANKL	GRUPO 1	56	0,085	0,034	0,075	0,094
	GRUPO 2	42	0,118	0,055	0,101	0,136
	GRUPO 3	49	0,101	0,045	0,088	0,114
	TOTAL	147	1,051	11,625	-0,831	2,933

Tabla 40. Comparación en los niveles de RANKL entre los tres grupos.

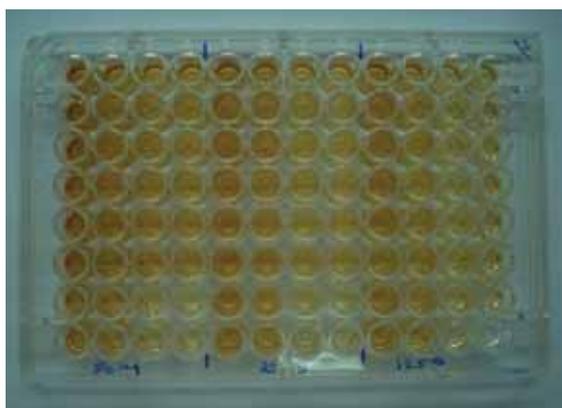


Fig. 50. Muestras para la determinación del RANKL.

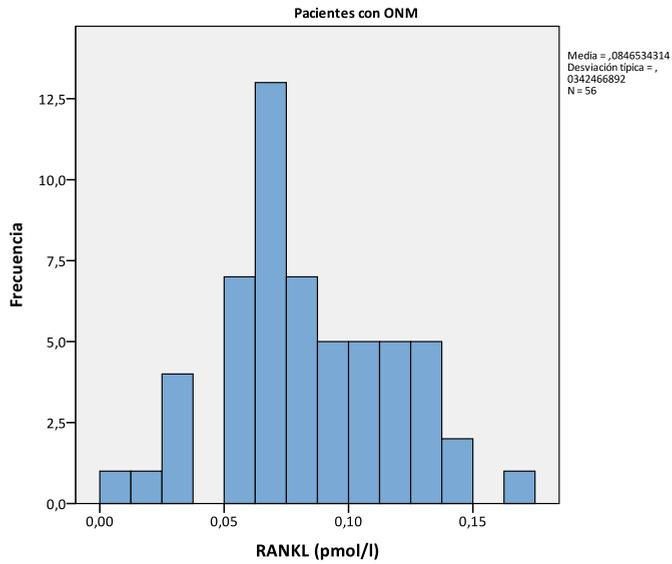


Fig. 51. Histograma de la variable RANKL en pacientes con ONM.

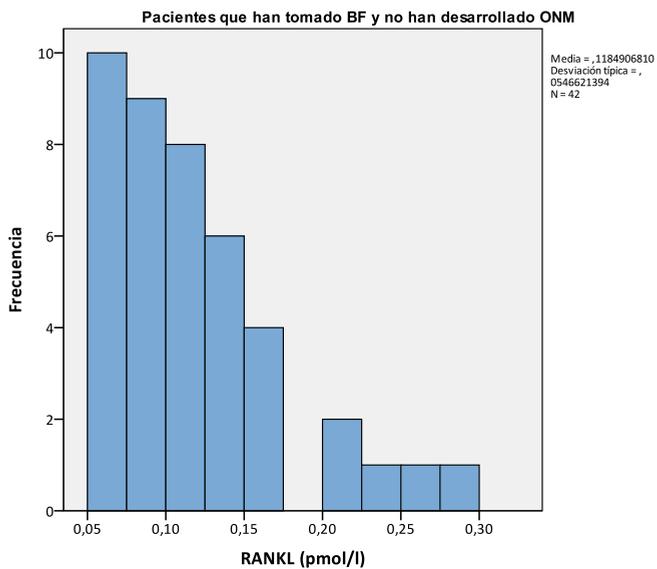


Fig. 52. Histograma de la variable RANKL en pacientes que han tomado BF y no han desarrollado ONM.

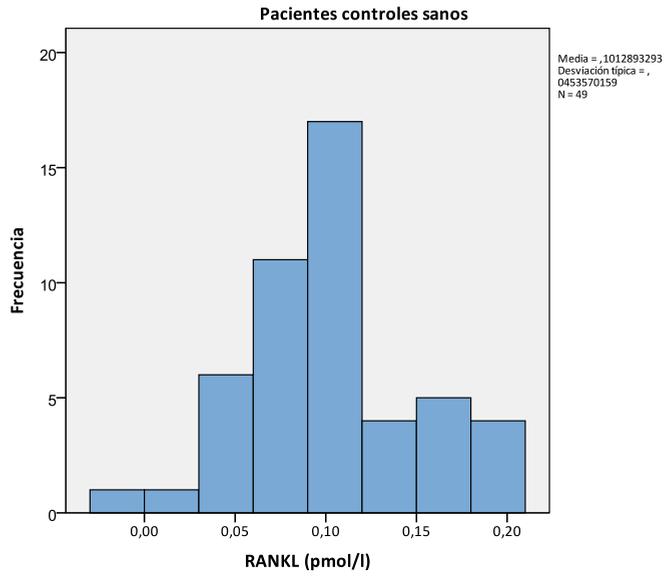


Fig. 53. Histograma de la variable RANKL en pacientes controles sanos.

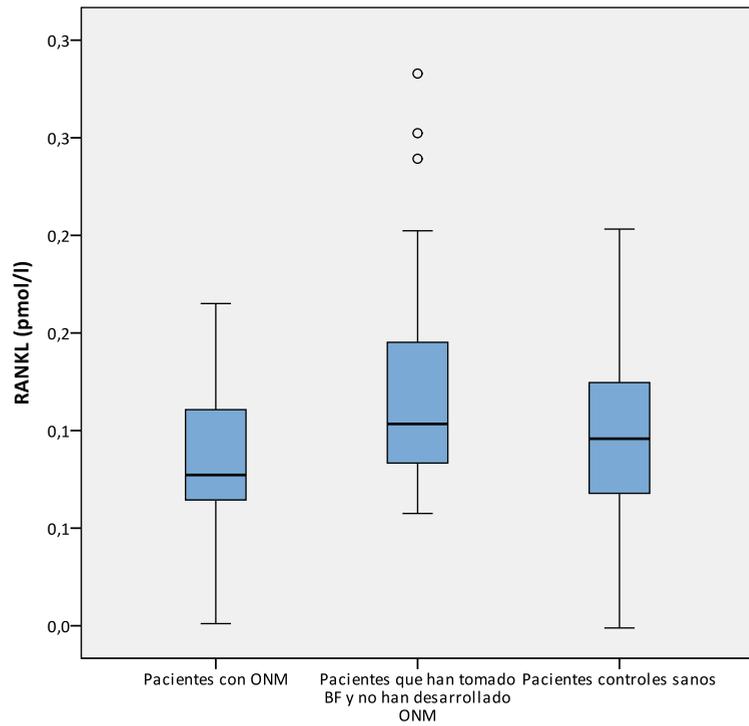


Fig. 54. Diagrama de cajas de la variable RANKL en los diferentes grupos.

En referencia a los niveles de **OPG**, si consideramos los 49 individuos del grupo control (grupo 3), su media era de 0,269 pmol/l y la desviación típica de 0,215. La media en los 58 casos con osteonecrosis de los maxilares fue de 0,327 pmol/l y una desviación típica de 0,362. Por último, el grupo de 42 pacientes con bisfosfonatos sin osteonecrosis tuvieron una media de 0,028 pmol/l y una desviación típica de 0,064 (ver Tabla 41 y Figuras de la 55 a la 58).

		N	Media	Desviación típica	Intervalo de confianza para la media al 95%	
OPG	GRUPO 1	58	0,327	0,362	0,231	0,422
	GRUPO 2	42	0,028	0,064	0,008	0,048
	GRUPO 3	49	0,269	0,215	0,207	0,331
	TOTAL	149	0,225	0,286	0,179	0,271

Tabla 41. Comparación de los niveles de OPG en los tres grupos.

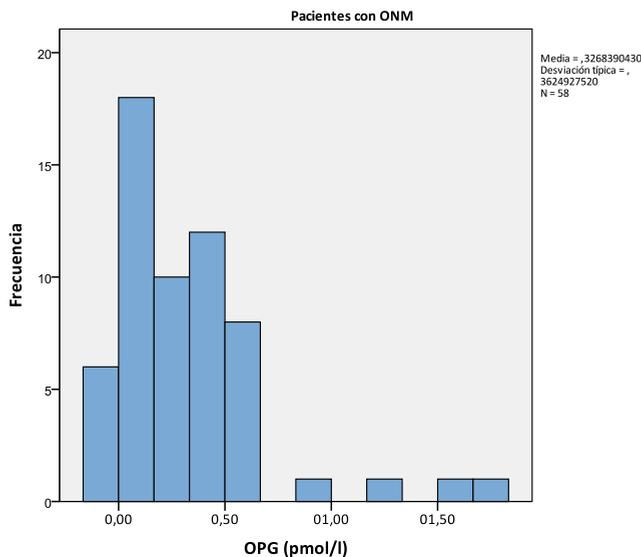


Fig. 55. Histograma de la variable OPG en pacientes con ONM.

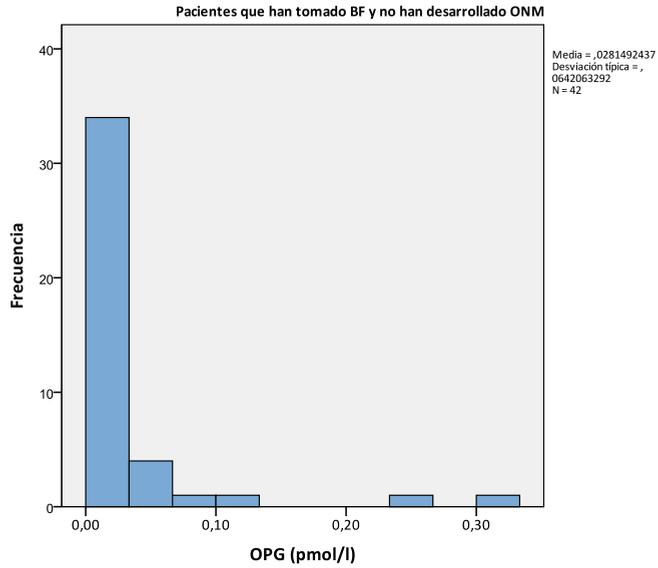


Fig. 56. Histograma de la variable OPG en pacientes que han tomado BF y no han desarrollado ONM.

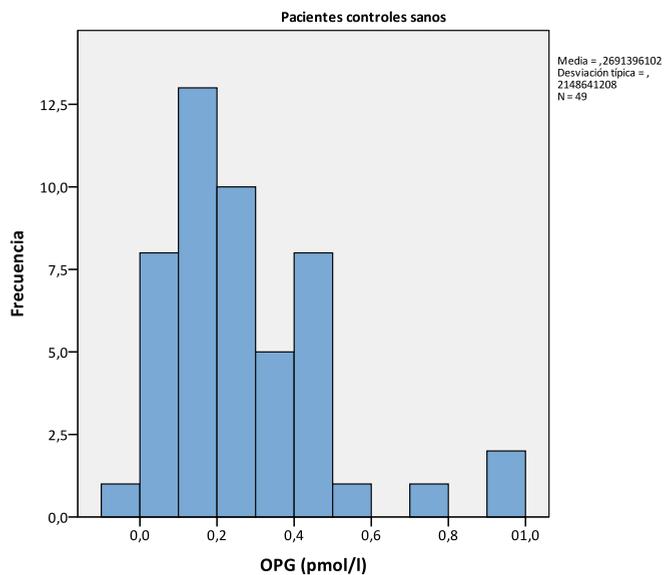


Fig. 57. Histograma de la variable OPG en pacientes controles sanos.

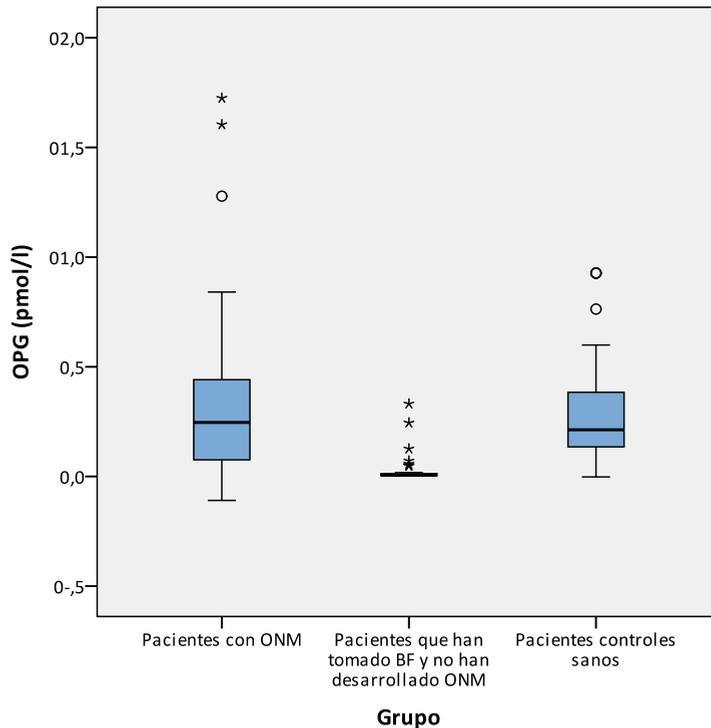


Fig. 58. Diagrama de cajas de la variable OPG en los diferentes grupos.

Al realizar el test de homogeneidad de las varianzas (estadístico de Levene) para el RANKL se obtuvo una $p < 0,05$ y para el OPG una $p < 0,05$.

Ello significa que las muestras no siguen una distribución normal, por lo tanto realizamos una prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis, siendo el valor de Chi-cuadrado para el RANKL de 9,32 y para el OPG un valor de 54,76, teniendo ambos una alta significación $p < 0,01$ (ver Tabla 42).

	Estadísticos de contraste (Prueba de Kruskal-Wallis)	
	RANKL plasma	OPG plasma
Chi-cuadrado	9,32	54,76
Significación asintótica.	0,009	0,000

Tabla 42. Prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis comparando el RANKL y el OPG en los tres grupos.

Finalmente se realizaron comparaciones múltiples mediante la prueba de Mann – Whitney para determinar entre que grupos existen diferencias significativas, obteniéndose la existencia de diferencias significativas entre los Grupos 1 y 2 ($p < 0,02$); y los Grupos 1 y 3 ($p < 0,01$) en los valores de RANKL (no existiendo diferencias significativas entre los Grupos 2 y 3 ($p > 0,216$)).

Del mismo modo, se observó la existencia de diferencias significativas entre cada uno de los tres Grupos para los valores de OPG (con $p < 0,001$ en los tres casos).

IV. ASOCIACIONES ENTRE EL TIPO DE ADMINISTRACIÓN DEL BISFOSFONATO CON EL RESTO DE VARIABLES CLÍNICAS, ASÍ COMO CON RANKL Y OPG

Primero analizaremos si existe algún tipo de asociación o bien independencia entre *el tipo de administración del fármaco* (intravenoso u oral) y las siguientes variables discretas a nivel clínico: factores locales desencadenantes, localización, dolor, inflamación, supuración, fístula intraoral, fístula extraoral, exposición ósea y estadio.

1. – Asociación entre tipo de administración de fármaco y factores Locales desencadenantes

La *asociación* entre las variables tipo de administración de fármaco (intravenoso y oral) y la variable con seis categorías ordenadas Factores Locales (espontánea, extracción, Implantes y Prótesis) es la siguiente (ver Tabla 43 y Figura 59).

		FACTORES LOCALES						Total
		Espontánea	Extracción y Prótesis	Extracción	Implantes	Prótesis	Desconocido	
ADMINISTRACIÓN FÁRMACO	Intravenoso	4 (3%)	1 (0,8%)	88 (66,2%)	8 (6%)	14 (10,5%)	18 (13,5%)	133 (100%)
	Oral	3 (6%)	0 (0%)	39 (78%)	1 (2%)	3 (6%)	4 (8%)	50 (100%)
	Total	7 (3,8%)	1 (0,5%)	127 (69,4%)	9 (4,9%)	17 (9,3%)	22 (12%)	183 (100%)

Tabla 43. Tabla de contingencia: Administración de fármacos vs Factores Locales.

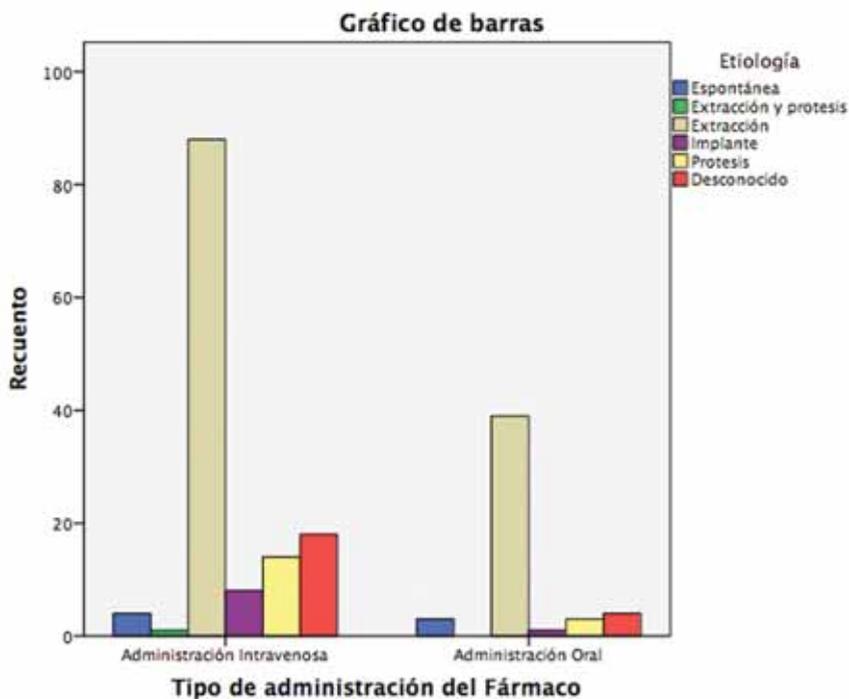


Fig. 59. Diagrama de barras de la variable factores locales en los diferentes grupos de administración del fármaco.

En este caso, no existe asociación entre las variables tipo de administración de fármaco y la variable Factores Locales, pues hemos obtenido un valor de $p = 0,65$ (ver Tabla 44).

	Valor	gl	Sig. Asintótica
Chi-cuadrado de Pearson	5,12	7	0,65
Razón de verosimilitudes	6,09	7	0,53
Número de casos válidos	183		

Tabla 44. Prueba de Chi-cuadrado: Administración de fármacos vs Factores Locales.

2. – Asociación entre tipo de administración de fármaco y la localización

La asociación entre las variables tipo de administración de fármaco (intravenoso y oral) y la variable localización de la ONM (mandíbula, maxilar) es la siguiente (ver Tabla 45 y Figura 60).

		LOCALIZACIÓN			
		Mandíbula	Mandíbula y Maxilar Superior	Maxilar Superior	Total
ADMINISTRACIÓN FÁRMACO	Intravenoso	95 (71,4%)	16 (12%)	22 (16,5%)	133 (100%)
	Oral	41 (82%)	1 (2%)	8 (16%)	50 (100%)
	Total	136 (74,3%)	17 (9,3%)	30 (16,4%)	183 (100%)

Tabla 45. Tabla de contingencia: Administración de fármacos vs Localización.

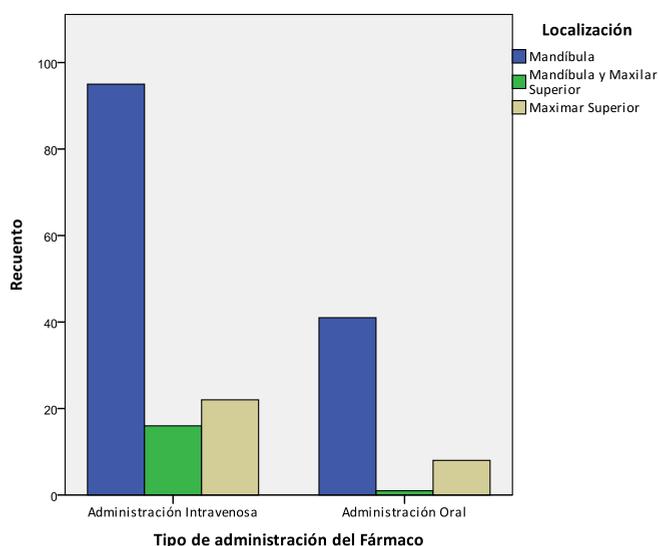


Fig. 60. Gráfico de barras de la variable localización en los diferentes grupos de administración del fármaco.

En este caso, no existe asociación entre las variables tipo de administración de fármaco y la variable localización, pues hemos obtenido un valor de $p = 0,11$ (ver Tabla 46).

	Valor	gl	Sig. Asintótica
Chi-cuadrado de Pearson	4,49	2	0,11
Razón de verosimilitudes	5,74	2	0,06
Número de casos válidos	183		

Tabla 46. Prueba de Chi-cuadrado: Administración de fármacos vs Localización.

3. – Asociación entre tipo de administración de fármaco y dolor

La *asociación* entre las variables tipo de administración de fármaco (intravenoso y oral) y la variable Dolor (sí, no) es la siguiente (ver Tabla 47 y Figura 61).

		DOLOR		
		Sí	No	Total
ADMINISTRACIÓN FÁRMACO	Intravenoso	90 (67,7%)	43 (32,3%)	133 (100%)
	Oral	28 (56%)	22 (44%)	50 (100%)
	Total	116 (64,5%)	65 (35,5%)	183 (100%)

Tabla 47. Tabla de contingencia: Administración de Fármacos vs Dolor.

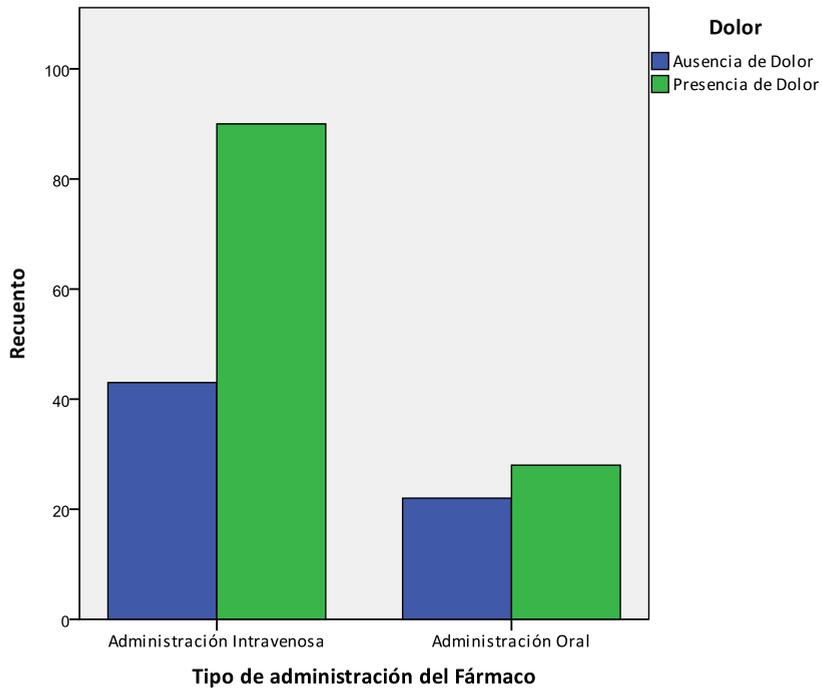


Fig. 61. Gráfico de barras de la variable Dolor en los diferentes grupos de administración del fármaco.

En este caso, no existe *asociación* entre las variables tipo de administración de fármaco y la variable dolor, pues hemos obtenido un valor de $p = 0,142$ (ver Tabla 48).

	Valor	gl	Sig. Asintótica
Chi-cuadrado de Pearson	2,16	1	0,14
Razón de verosimilitudes	2,12	1	0,15
Número de casos válidos	183		

Tabla 48. Prueba de Chi-cuadrado: Administración de fármacos vs Dolor.

4. – Asociación entre tipo de administración de fármaco e inflamación

La *asociación* entre las variables tipo de administración de fármaco (intravenoso y oral) y la variable inflamación (sí, no) es la siguiente (ver Tabla 49 y Figura 62).

		INFLAMACIÓN		
		Sí	No	Total
ADMINISTRACIÓN FÁRMACO	Intravenoso	39 (29,3%)	94 (70,7%)	133 (100%)
	Oral	23 (46%)	27 (54%)	50 (100%)
	Total	62 (33,9%)	121 (66,1%)	183 (100%)

Tabla 49. Tabla de contingencia: Administración de fármacos vs inflamación.

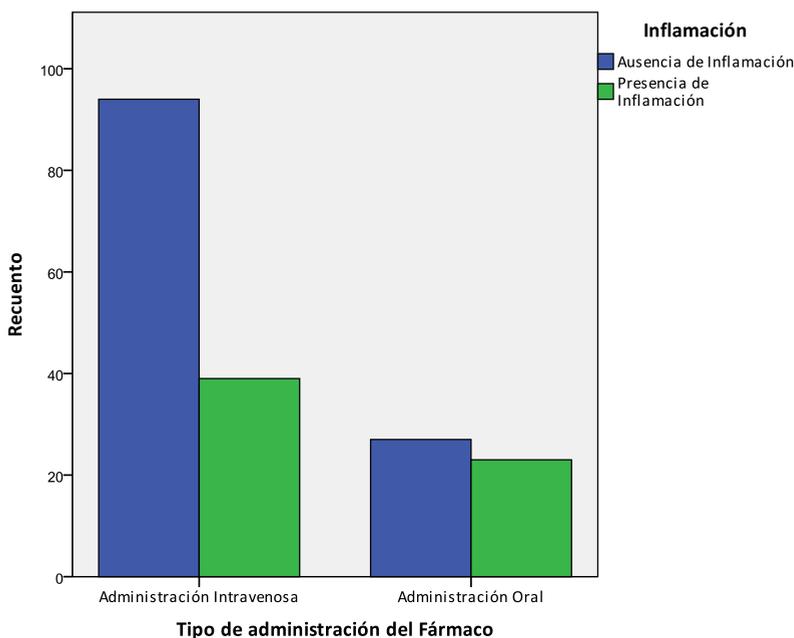


Fig. 62. Gráfico de barras de la variable inflamación en los diferentes grupos de Administración del Fármaco.

En este caso, existe *asociación* entre las variables tipo de administración de fármaco y la variable inflamación, pues hemos obtenido un valor de $p = 0,03$ (ver Tabla 50).

	Valor	gl	Sig. Asintótica
Chi-cuadrado de Pearson	4,51	1	0,03
Razón de verosimilitudes	4,40	1	0,04
Número de casos válidos	183		

Tabla 50. Prueba de Chi-cuadrado: Administración de Fármacos vs inflamación.

5. – Asociación entre tipo de administración de fármaco y supuración

La *asociación* entre las variables tipo de administración de fármaco (intravenoso y oral) y la variable supuración (sí, no) es la siguiente (ver Tabla 51 y Figura 63).

		SUPURACIÓN		
		Sí	No	Total
ADMINISTRACIÓN FÁRMACO	Intravenoso	73 (54,9%)	73 (54,9%)	133 (100%)
	Oral	21 (42,0%)	21 (42%)	50 (100%)
	Total	94 (51,4%)	94 (51,4%)	183 (100%)

Tabla 51. Tabla de contingencia: Administración de Fármacos vs Supuración.

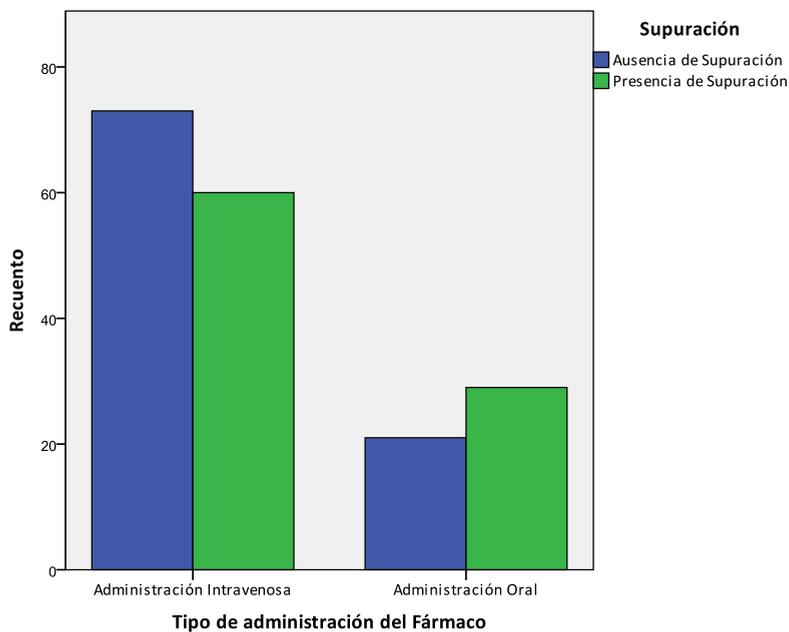


Fig. 63. Gráfico de barras de la variable Supuración en los diferentes grupos de administración del fármaco.

En este caso, no existe *asociación* entre las variables tipo de administración de fármaco y la variable supuración, pues hemos obtenido un valor de $p = 0,12$ (ver Tabla 52).

	Valor	gl	Sig. Asintótica
Chi-cuadrado de Pearson	2,42	1	0,12
Razón de verosimilitudes	2,42	1	0,12
Número de casos válidos	183		

Tabla 52. Prueba de Chi-cuadrado: Administración de Fármacos vs Supuración.

6. – Asociación entre tipo de administración de fármaco y fístula intraoral

La relación entre las variables Tipo de administración de fármaco (intravenoso y oral) y la variable fístula intraoral (sí, no) es la siguiente (ver Tabla 53 y Figura 64).

		FÍSTULA INTRAORAL		
		Sí	No	Total
ADMINISTRACIÓN FÁRMACO	Intravenoso	46 (34,6%)	87 (65,4%)	136 (100%)
	Oral	19 (38%)	31 (62%)	50 (100%)
	Total	65 (35,5%)	118 (64,5%)	183 (100%)

Tabla 53. Tabla de contingencia: Administración de Fármacos vs Fístula Interna.

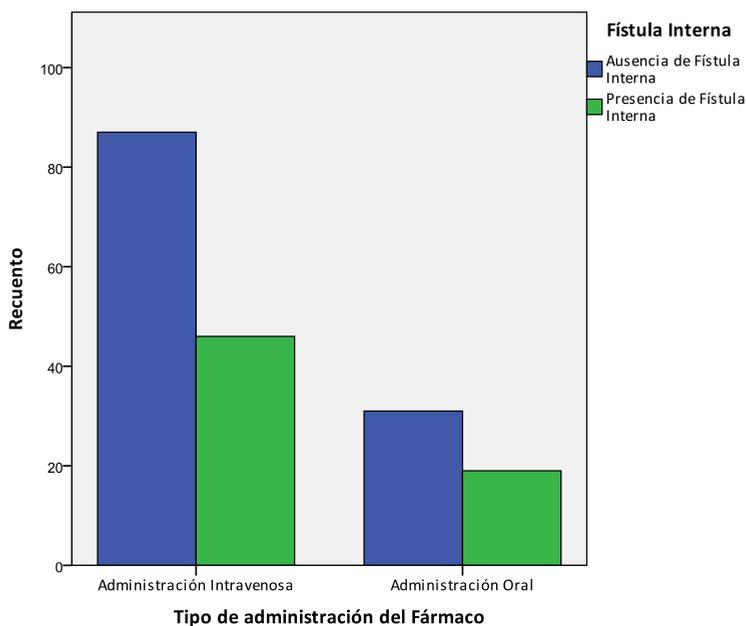


Fig. 64. Gráfico de barras de la variable fístula intraoral en los diferentes grupos de administración del fármaco.

En este caso, no existe asociación entre las variables tipo de administración de fármaco y la variable fístula intraoral, pues hemos obtenido un valor de $p = 0,67$ (ver Tabla 54).

	Valor	Gl	Sig. Asintótica
Chi-cuadrado de Pearson	0,19	1	0,67
Razón de verosimilitudes	0,18	1	0,67
Número de casos válidos	183		

Tabla 54. Prueba de Chi-cuadrado: Administración de fármacos vs Fístula Interna.

7. – Asociación entre tipo de administración del fármaco y fístula extraoral

La asociación entre las variables tipo de administración del fármaco (intravenoso y oral) y la variable fístula extraoral (sí, no) es la siguiente (ver Tabla 55 y Figura 65).

		FÍSTULA EXTRAORAL		
		Sí	No	Total
ADMINISTRACIÓN FÁRMACO	Intravenoso	11 (8,3%)	122 (91,7%)	135 (100%)
	Oral	3 (6%)	47 (94%)	48 (100%)
	Total	14 (7,7%)	169 (92,3%)	183 (100%)

Tabla 55. Tabla de contingencia: Administración de Fármacos vs Fístula Extraoral.

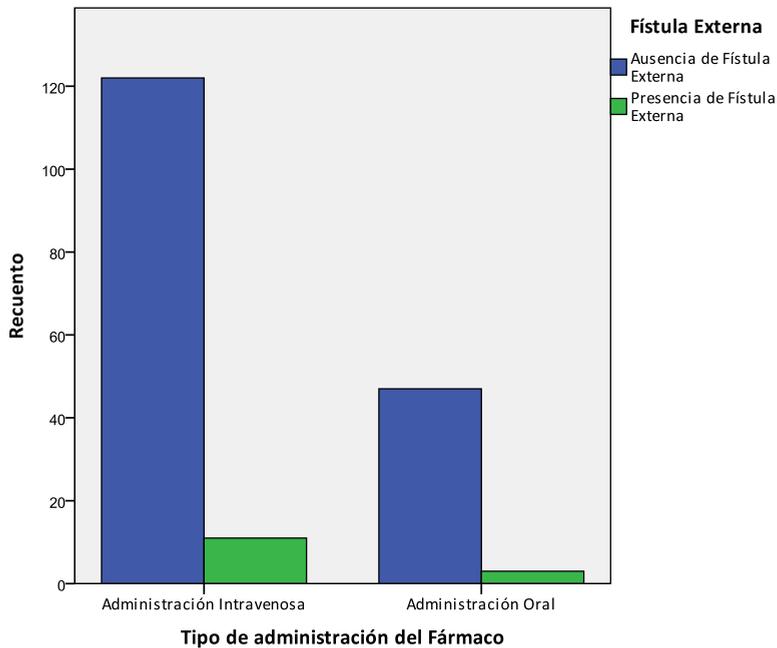


Fig 65. Gráfico de barras de la variable Fístula Extraoral en los diferentes grupos de Administración del Fármaco.

En este caso, no existe asociación entre las variables tipo de administración de fármaco y la variable fístula externa, pues hemos obtenido un valor de $p = 0,61$ (ver Tabla 56).

	Valor	Gl	Sig. Asintótica
Chi-cuadrado de Pearson	0,27	1	0,61
Razón de verosimilitudes	0,28	1	0,60
Número de casos válidos	31		

Tabla 56. Prueba de Chi-cuadrado: Administración de fármacos vs Fístula Externa.

8. – Asociación entre el tipo de administración del fármaco y la exposición ósea

La asociación entre las variables tipo de administración de fármaco (intravenoso y oral) y la variable exposición ósea (sí, no) es la siguiente (ver Tabla 57 y Figura 66).

		EXPOSICIÓN ÓSEA		
		Sí	No	Total
ADMINISTRACIÓN FÁRMACO	Intravenoso	111 (83,5%)	22 (16,5%)	133 (100%)
	Oral	32 (64%)	18 (36%)	50 (100%)
	Total	143 (21,9%)	40 (21,9%)	183 (100%)

Tabla 57. Tabla de contingencia: Administración de Fármacos vs Exposición Ósea.

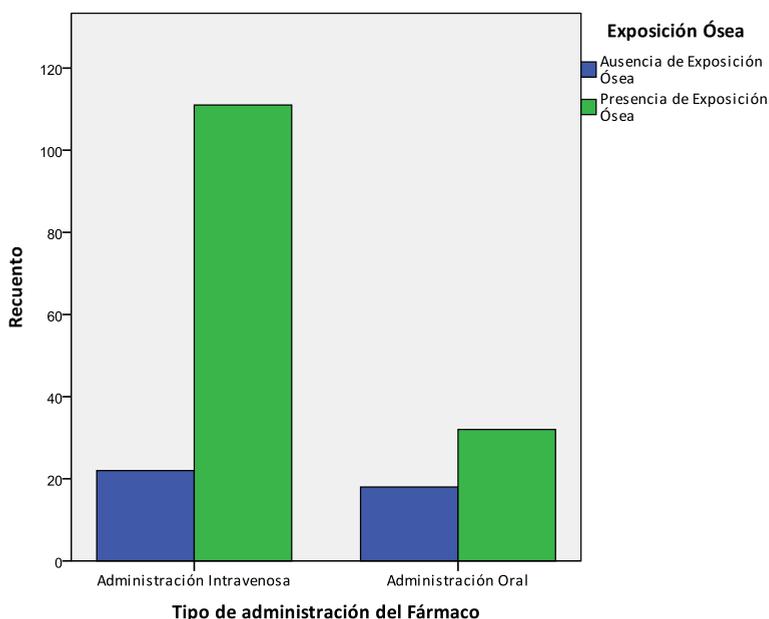


Fig. 66. Gráfico de barras de la variable Exposición Ósea en los diferentes grupos de Administración del Fármaco.

En este caso, existe asociación entre las variables tipo de administración de fármaco y la variable Exposición Ósea, pues hemos obtenido un valor de $p = 0,01$ (ver Tabla 58).

	Valor	GI	Sig. Asintótica
Chi-cuadrado de Pearson	8,06	1	0,01
Razón de verosimilitudes	7,54	1	0,01
Número de casos válidos	183		

Tabla 58. Prueba de Chi-cuadrado: Administración de Fármacos vs Exposición Ósea.

9. – Asociación entre el tipo de administración del fármaco y estadio clínico de ONM

La asociación entre las variables tipo de administración del fármaco (intravenoso y oral) y la variable con cuatro categorías ordenadas Estadio (0, 1, 2 y 3) es la siguiente (ver Tabla 59).

		ESTADIO CLÍNICO				Total
		0	1	2	3	
Administración fármaco	Intravenoso	5 (3,8%)	34 (25,6%)	65 (48,9%)	29 (21,8%)	133 (100%)
	Oral	3 (6%)	15 (30%)	20 (40%)	12 (24%)	50 (100%)
Total		8 (4,4%)	49 (26,8%)	85 (46,4%)	41 (22,4%)	183 (100%)

Tabla 59. Tabla de contingencia: Administración de Fármacos vs Estadio.

En este caso, no existe asociación entre las variables tipo de administración de fármaco y la variable Estadio, pues hemos obtenido un valor de $p = 0,71$ (ver Tabla 60).

	Valor	GI	Sig. Asintótica
Chi-cuadrado de Pearson	1,38	3	0,71
Razón de verosimilitudes	1,36	3	0,62
Número de casos válidos	183		

Tabla 60. Prueba de Chi-cuadrado: Administración de Fármacos vs Estadio.

10. – Medias de RANKL en función del tipo de administración del bisfosfonato

Analizaremos si existían diferencias en las medias de los valores plasmáticos de RANKL según el paciente tomase bisfosfonatos orales o bien intravenosos.

Vamos a utilizar de nuevo una prueba T de comparación de medias.

Para ello, inicialmente comprobaremos que se cumplan los supuestos de igualdad de varianzas y que la distribución muestral de la diferencia entre las dos medias siga una ley normal, de no ser así, usaríamos una prueba no paramétrica U de Mann-Whitney.

Para verificar que la variable RANKL se distribuye según una ley normal, aplicaremos la prueba de normalidad de Shapiro-Wilk (Tabla 61).

	Grupo	Significación
RANKL	Intravenoso	0,18
	Oral	0,97

Tabla 61. Test de normalidad de la Variable RANKL.

Al obtenerse un valor de $p > 0,05$ podemos asumir el supuesto de normalidad y por lo tanto podemos aplicar la prueba t.

Los pacientes que toman el fármaco por vía intravenosa tienen una media de RANKL de 0,08 pmol/l y los pacientes que toman fármaco por vía oral tienen una media del RANKL de 0,09 pmol/l, tal y como se indica a continuación (ver Tabla 62 y Figura 67).

	Grupo	N	Media	Desviación Típica
Niveles plasmáticos de RANKL	Intravenoso	40	0,08	0,03
	Oral	15	0,09	0,04

Tabla 62. Niveles plasmáticos de RANKL en función del tipo de Administración del Bisfosfonato.

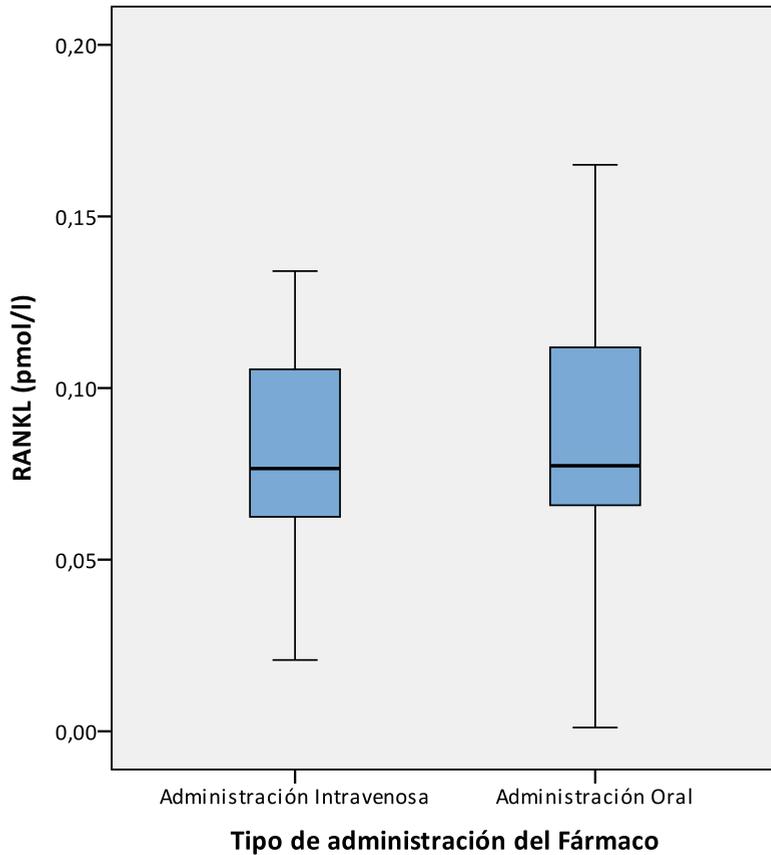


Fig. 67. Gráfico de cajas de la variable RANKL en los diferentes grupos de Administración del Fármaco.

En este caso, la prueba de Levene de comprobación de homogeneidad de la varianzas no da un resultado significativo ($p = 0,17$), con lo que tomaremos los datos de la primera fila de la tabla, que corresponden a la prueba t para variancias iguales.

De este modo, obtenemos un valor de $p = 0,73$, lo que indica que no existen diferencias significativas en los valores de RANKL entre los pacientes que toman fármaco por vía intravenosa y los pacientes que toman fármaco por vía oral (ver tabla 63).

Esto significa que los valores del RANKL no se ven influenciados por el tipo de administración de fármaco, en nuestros pacientes.

	Prueba de Levene		Prueba T			
	F	Sig.	t	gl	Sig.	Dif. medias
RANKL	2,62	0,11	-0,34	53	0,73	-0,004
			-0,29	19,33	0,77	-0,004

Tabla 63. Prueba de muestras independientes RANKL.

11. – Medias de OPG en función del tipo de administración del bisfosfonato

Analizaremos si existían diferencias en las medias de los valores plasmáticos de OPG según el paciente tomase bisfosfonatos orales o bien intravenosos.

Como en el apartado anterior vamos a utilizar de nuevo una prueba T de comparación de medias.

Para ello, inicialmente comprobaremos que se cumplan los supuestos de igualdad de varianzas y que la distribución muestral de la diferencia entre las dos medias siga una ley normal, de no ser así, usaríamos una prueba no paramétrica U de Mann-Whitney.

Para verificar que la variable OPG se distribuye según una ley normal, aplicaremos la prueba de normalidad de Shapiro-Wilk (Tabla 64).

	Grupo	Significación
OPG	Intravenoso	0,001
	Oral	0,003

Tabla 64. Test de normalidad de la variable OPG.

Al obtenerse un valor de $p < 0,05$ no podemos asumir el supuesto de normalidad y por lo tanto aplicamos una prueba no paramétrica U de Mann-Whitney.

Los pacientes que toman el fármaco por vía intravenosa tienen una media de OPG de 0,331pmol/l y los pacientes que toman fármaco por vía oral tienen una media del OPG de 0,333 pmol/l, tal y como se indica a continuación (ver Tabla 65 y Figura 68).

	Grupo	N	Media	Desviación Típica
NIVELES PLASMÁTICOS DE OPG	Intravenoso	43	0,331	0,332
	Oral	14	0,333	0,464

Tabla 65. Niveles plasmáticos de OPG en función del tipo de Administración del Bisfosfonato.

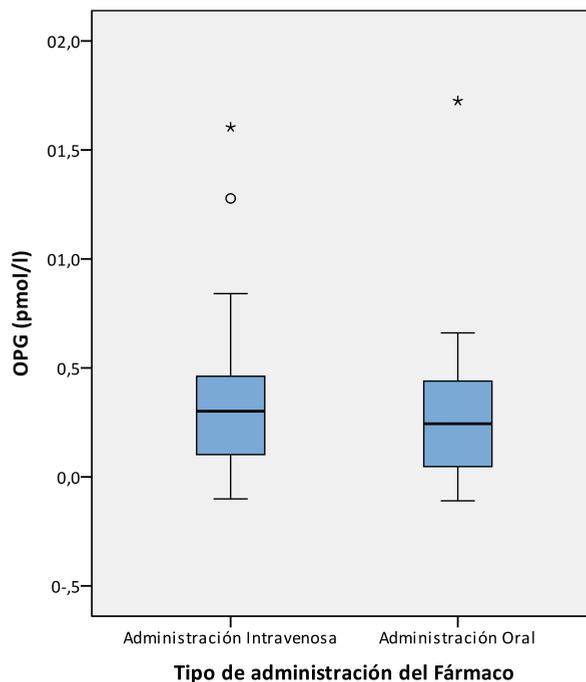


Fig. 68. Gráfico de cajas de la variable OPG en los diferentes grupos de administración del fármaco.

De este modo, obtenemos un valor de $p = 0,69$, lo que indica que no existen diferencias significativas en los valores de OPG entre los pacientes que toman fármaco por vía intravenosa y los pacientes que toman fármaco por vía oral (ver tabla 66).

	OPG (pmol/l)
U de Mann-Whitney	279,500
W de Wilcoxon	384,500
Z	-0,399
Sig. asintom. (bilateral)	0,69

Tabla 66. Prueba no paramétrica U de Mann-Whitney.

Esto significa que los valores del OPG no se ven influenciados por el tipo de administración de fármaco, en nuestros pacientes.

En la Tabla 67 mostramos el resumen de los principales hallazgos comparativos entre los pacientes que habían recibido bisfosfonatos intravenosos y los orales.

		Intravenoso	Oral	Total
ADMINISTRACIÓN FÁRMACO	Espontánea	4 (3%)	3 (6%)	7 (3,8%)
	Extracción y Prótesis	1 (0,8%)	0 (0%)	1 (0,5%)
	Extracción	88 (66,2%)	39 (78%)	127 (69,4%)
	Implantes	8 (6%)	1 (2%)	9 (4,9%)
	Prótesis	14 (10,5%)	3 (6%)	17 (9,3%)
	Desconocido	18 (13,5%)	4 (8%)	22 (12%)
LOCALIZACIÓN	Mandíbula	95 (71,4%)	41 (82%)	136 (74,3%)
	Mandíbula y Maxilar Superior	16 (12%)	1 (2%)	17 (9,3%)
	Maxilar Superior	22 (16,5%)	8 (16%)	30 (16,4%)
DOLOR	Sí	90 (67,7%)	28 (56%)	116 (64,5%)
	No	43 (32,3%)	22 (44%)	65 (35,5%)
INFECCIÓN	Sí	39 (29,3%)	23 (46%)	62 (33,9%)
	No	94 (70,7%)	27 (54%)	121 (66,1%)
SUPURACIÓN	Sí	73 (54,9%)	21 (42,0%)	94 (51,4%)
	No	73 (54,9%)	21 (42%)	94 (51,4%)
FÍSTULA INTRAORAL	Sí	46 (34,6%)	19 (38%)	65 (35,5%)
	No	87 (65,4%)	31 (62%)	118 (64,5%)
EXPOSICIÓN ÓSEA	Sí	111 (83,5%)	32 (64%)	143 (21,9%)
	No	22 (16,5%)	18 (36%)	40 (21,9%)
ESTADIO CLÍNICO	0	5 (3,8%)	3 (6%)	49 (26,8%)
	1	34 (25,6%)	15 (30%)	85 (46,4%)
	2	65 (48,9%)	20 (40%)	41 (22,4%)
	3	29 (21,8%)	12 (24%)	183 (100%)
NIVELES PLASMÁTICOS DE RANKL	N	40	15	55
	Media	0,08	0,09	0,083
	Desviación Típica	0,03	0,04	0,033
NIVELES PLASMÁTICOS DE OPG	N	43	14	57
	Media	0,324	0,333	0,331
	Desviación Típica	0,33	0,464	0,364

Tabla 67. Resumen de la asociación entre la variable forma de administración del bisfosfonato y el resto de variables clínicas; así como con los niveles plasmáticos de RANKL y OPG.

V. – RELACIÓN ENTRE LAS VARIABLES CLÍNICAS, DENSIDAD OSEA Y NIVELES PLASMÁTICOS DE RANKL Y OPG CON LA EXPOSICIÓN DE HUESO NECRÓTICO MEDIANTE ANALISIS DE REGRESIÓN LOGÍSTICA

Vamos a estudiar si alguna de las variables que hasta ahora hemos analizado, tiene relación con la variable respuesta binaria Exposición ósea mediante un estudio de regresión logística

Para ello utilizaremos un modelo de regresión logística binaria que nos permitirá comprobar si existe relación entre las variables independientes (edad, sexo, tipo de administración, localización de la ONM, factores locales, estadio, niveles plasmáticos de RANKL y OPG, densidad ósea en el TC y la variable dependiente binaria Exposición ósea.

Vamos a utilizar el método *Forward-Stepwise* para que las variables se vayan incluyendo al modelo en función de su grado de significación. En este caso calcularemos la significación del modelo con la prueba de la razón de verosimilitud.

Únicamente entra la variable RANKL en el modelo. La prueba de significación global indica que el modelo estimado es significativo ($\chi^2 = 9,89$; $gl = 1$; $p < 0,002$) tal y como se refleja en la Tabla 68.

		Chi-cuadrado	gl	Sig.
Paso 1	Paso	9,89	1	0,002
	Bloque	9,89	1	0,002
	Modelo	9,89	1	0,002

Tabla 68. Significación total del modelo.

La proporción de incertidumbre explicada por los datos por el modelo ajustado, viene determinada por el valor de R^2 de Cox y Snell; y toma un valor de 17 % (ver Tabla 69).

Paso	-2 log de la verosimilitud	R^2 de Cox y Snell	R^2 de Nagelkerke
1	43,78	0,17	0,88

Tabla 69. Incertidumbre del modelo.

El poder de clasificación de la ecuación estimada no es aceptable porque su especificidad es de 45,5% y su sensibilidad (97,6%); por lo tanto ambos no superan el umbral del 75%. El porcentaje total de clasificaciones correctas es del 86,5 %, considerándose como un índice resumen del poder de clasificación del modelo (ver Tabla 70).

		Exposición ósea pronóstico		Porcentaje correcto
		Intravenoso	Oral	
Exposición Ósea Observado	Intravenoso	5	6	45,5
	Oral	1	40	97,6
Total				86,5

Tabla 70. Tabla de clasificación de la ecuación estimada.

Finalmente obtenemos que el modelo estimado por el método de la máxima verosimilitud es el siguiente (Tabla 71):

		B	E.T.	Wald	gl	Sig.	Exp(B)
Paso 1	RANKL	39,30	14,97	6,89	1	0,009	$1,16 \cdot 10^{17}$
	Constante	-1,54	1,06	2,12	1	0,145	0,21

Tabla 71. Variables de la ecuación.

Por lo que la exposición ósea no encuentra relaciones con ninguna de las variables mencionadas anteriormente.

VI. – RELACIONES ENTRE LAS VARIABLES CLÍNICAS CON RANKL Y OPG MEDIANTE ANÁLISIS DE REGRESIÓN LINEAL MÚLTIPLE

Finalmente vamos a estudiar si alguna de las variables cuantitativas, que hasta ahora hemos analizado, tiene relación con las variables cuantitativas RANKL y OPG.

Para ello utilizaremos un modelo de regresión lineal múltiple que nos permitirá comprobar si existe relación entre las variables independientes (edad, duración del tratamiento, densidad ósea) y la variable dependiente cuantitativas RANKL y OPG.

Vamos a utilizar el método *Forward-Stepwise* para que las variables se vayan incluyendo al modelo en función de su grado de significación.

1. Estudio con la variable RANKL

Empezaremos en primer lugar analizando la existencia de algún tipo de relación lineal entre las variables independientes edad, duración del tratamiento, densidad ósea y OPG con la variable dependiente RANKL.

La proporción de variabilidad explicada por los datos por el modelo que mejor ajusta, viene determinada por el valor del Coeficiente de determinación R^2 ; y toma un valor de 41,7 % (ver Tabla 72).

Paso	Coeficiente de correlación múltiple R	Coeficiente de determinación R^2	Coeficiente de determinación ajustado R^2
1	0,646	0,417	0,359

Tabla 72. Incertidumbre del modelo.

La prueba de significación global de la ecuación de regresión, indica que la ecuación de regresión estimada explica una parte significativa ($p=0,023$) de la variabilidad de RANKL (ver Tabla 73).

Modelo	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
4	0,004	1	0,004	7,160	0,023
	0,006	10	0,001		
	0,010	11			

Tabla 73. Incertidumbre del modelo.

Finalmente hallamos el modelo estimado que mejor se ajusta entre las diferentes variables (Tabla 74).

Modelo	Coeficientes no estandarizados		Coeficientes tipificados	t	Sig.	Intervalo de confianza de 95,0% para B		
	B	Error típ.	Beta			Límite inferior	Límite superior	
4	(Constante)	0,10	0,01		9,58	0,002	0,08	0,13
	OPG (pmol/l)	-0,05	0,02	-0,65	-2,68	0,023	-0,10	-0,01

Tabla 74. Variables de la ecuación.

Obteniéndose con una significación de $p = 0,02$ que por cada incremento de 1 pmol/l de OPG, el valor de RANKL disminuye 0,05 pmol/l.

2. Estudio con la variable OPG

Empezaremos en primer lugar analizando la existencia de algún tipo de relación lineal entre las variables independientes edad, duración del tratamiento, densidad ósea y RANKL con la variable dependiente OPG.

En este caso se obtiene el modelo inverso al anteriormente obtenido, la única relación significativa encontrada es entre RANKL y OPG. Esto provoca que los resultados obtenidos sean similares.

La proporción de variabilidad explicada por los datos por el modelo que mejor ajusta, viene determinada por el valor del Coeficiente de determinación R^2 ; y toma un valor de 41,7 % (ver Tabla 75).

Paso	Coeficiente de correlación múltiple R	Coeficiente de determinación R^2	Coeficiente de determinación ajustado R^2
1	0,646	0,417	0,359

Tabla 75. Incertidumbre del modelo.

La prueba de significación global de la ecuación de regresión, indica que la ecuación de regresión estimada explica una parte significativa ($p=0,023$) de la variabilidad de OPG (ver Tabla 76).

Modelo	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
4	0,618	1	0,618	7,160	0,023
	0,864	10	0,086		
	1,482	11			

Tabla 76. Incertidumbre del modelo.

Finalmente hallamos que el modelo estimado que mejor ajusta entre las diferentes variables (Tabla 77):

Modelo	Coeficientes no estandarizados		Coeficientes tipificados	t	Sig.	Intervalo de confianza de 95,0% para B		
	B	Error típ.	Beta			Límite inferior	Límite superior	
4	(Constante)	1,06	0,25		4,168	0,00	0,49	1,63
	RANKL (pmol/l)	-7,84	2,93	-0,65	-2,68	0,02	-14,37	-1,31

Tabla 77. Variables de la ecuación.

Obteniéndose con una significación de $p = 0,02$ que por cada incremento de 1 pmol/l de RANKL, el valor de OPG disminuye 7,84 pmol/l.

DISCUSIÓN

Los bisfosfonatos son fármacos antirresortivos del hueso, que se han convertido en un tratamiento fundamental, tanto para las metástasis óseas de tumores sólidos como para la terapéutica del Mieloma Múltiple. También son utilizados como tratamiento de primera elección para la osteoporosis y osteopenia en mujeres postmenopáusicas, en la enfermedad de Paget y en la osteogénesis imperfecta (163).

La afinidad de los bisfosfonatos por la unión al mineral óseo, y su poder inhibitorio sobre los osteoclastos, crean una fuerte acción antirresortiva, reduciendo el riesgo de fracturas en pacientes con osteoporosis y mejorando la salud general de los huesos de los pacientes con cáncer. Son numerosos los estudios clínicos que han comprobado su eficacia clínica (171,172).

Sin embargo, el empleo de los bisfosfonatos en Oncología ha sido objeto de un gran debate, debido a su asociación, en presencia de ciertos factores de riesgo tanto locales como sistémicos, de osteonecrosis de los maxilares, siendo este un importante efecto adverso que puede afectar negativamente a la calidad de vida del paciente (26,38). Asimismo, el tratamiento de la osteonecrosis, está siendo ampliamente debatido, debido al escaso conocimiento que se tiene sobre su etiología y patogénesis, y a la falta de otras opciones terapéuticas para los pacientes con metástasis óseas (36).

Aunque el primer caso de ONM (20) fue descrito hace poco más de una década, la fisiopatología de este importante efecto adverso aún no ha sido aclarada. Existen múltiples hipótesis que tratan de explicar la localización de la ONM exclusivamente en los maxilares y son varias las explicaciones que pueden justificarla, como una alteración en la remodelación ósea o una excesiva supresión de la resorción ósea más evidente en los huesos maxilares, así como la inhibición de la angiogénesis, junto a una inflamación e infección persistente (74,173,174).

El riesgo de desarrollar una ONM, en pacientes oncológicos según determinados estudios clínicos (38,39), es de 0 a 0.189%, es decir de 0 a 19 casos por cada 10.000 pacientes con cáncer. Según diversas publicaciones, la mayor incidencia de aparición de ONM se produce en pacientes tratados con bisfosfonatos intravenosos para el tratamiento de su enfermedad oncológica, sobre todo tras una extracción dental (45). Algunos estudios (46) no encuentran diferencias en la incidencia de ONM entre pacientes con Mieloma Múltiple y cáncer de próstata.

En nuestra investigación el mayor número de casos se producía con un rango similar, tanto en las pacientes con cáncer de mama metastásico (30,1%), como en aquellos con Mieloma Múltiple (26,2%), siguiéndole en frecuencia el cáncer de próstata (12%); aunque es cierto que este resultado puede estar sesgado debido al número de pacientes que presenta nuestra investigación.

Los estudios de estimación del riesgo para desarrollar ONM en pacientes con osteoporosis tratados con bisfosfonatos orales tienen, en la literatura científica, los niveles de evidencia más bajos y muchas veces debido a que son publicados tras encuestas, estudios de cohortes retrospectivos o tras la determinación del estado de la enfermedad basada en el examen o la revisión de historias clínicas de forma retrospectiva (53).

Las terapias con bisfosfonatos orales que han sido establecidas durante largos periodos de tiempo, según un estudio de encuesta publicado por Lo y cols. (61) presentaban un riesgo de desarrollo de lesiones del 0,1%, es decir 10 casos por cada 10.000. Este riesgo se incrementó a 0,21%, que corresponde a 21 casos cada 10.000 pacientes, cuando estaban tomando este fármaco oral durante más de cuatro años. En contraposición a este estudio, Felsenberg y Hoffmeister (175) describieron una prevalencia de ONM del 0 al 0,00038%, lo que sería menos de un caso por cada 100.000 personas expuestas a este tratamiento.

Por lo tanto y basándonos en los datos publicados en la literatura científica, el riesgo de ONM en pacientes con osteoporosis tratadas con bisfosfonatos orales es muy bajo (173).

Son muchos los pacientes, sobre todo mujeres, mayores de 55 años que toman estos fármacos y baja la prevalencia real de ONM. En nuestra serie presentamos 47 casos de osteonecrosis de los maxilares en relación con BF orales para el tratamiento de la osteoporosis.

El aumento de la concienciación ante este problema y su prevención, así como el reconocimiento de los síntomas y signos de la osteonecrosis, han dado como resultado una detección más temprana de las lesiones (36).

La potencia de los bisfosfonatos y la dosis acumulada representan unos de los mayores factores de riesgo de osteonecrosis. En un análisis multivariante, realizado por Marcin Kos (176) mostró un aumento cinco veces superior en el riesgo de desarrollar ONM, después de la administración de un bisfosfonato más potente como es el Zoledronato en comparación con pamidronato y el ibandronato. Curiosamente, algunos estudios (38,46,50,173) mostraron que aquellos pacientes que tan solo habían recibido una dosis de Zoledronato, presentaban un incremento del riesgo relativo, para desarrollar lesiones de osteonecrosis, de 4,5 a 28 veces superior .

Sin embargo, informes recientes con otros fármacos antirresortivos con diferente mecanismo de acción como el Denosumab, que es un anticuerpo monoclonal inhibidor de la RANKL, lo que conlleva una potente inhibición de la diferenciación y la función de los osteoclastos, mostraron que el riesgo de osteonecrosis dependía más del grado de inhibición del recambio óseo, mediado por los osteoclastos, que del tipo de inhibidor de los mismos (177).

Según Stopeck *y cols.* (178) se observaron ratios similares de osteonecrosis de los maxilares en pacientes tratados con denosumab y con Zoledronato. Sin embargo, el denosumab fue superior al ácido zoledrónico para retrasar o prevenir posible eventos esqueléticos en pacientes con metástasis óseas, incluyendo una clara prevención de la toxicidad renal y la comodidad de la inyección subcutánea frente a la vía intravenosa (177).

Las formas más comunes de metástasis mandibulares en mujeres son tras un carcinoma de mama, suprarrenal, colorrectal, genital y de tiroides; mientras que en hombres, pueden aparecer más frecuentemente metástasis mandibulares tras carcinomas de pulmón, próstata, riñón y tumores adrenales (179).

La mayoría de estas lesiones metastásicas son osteolíticas, a excepción de la de próstata y mama que pueden presentar características escleróticas. Es cuatro veces más común la aparición de metástasis en la mandíbula que en el maxilar superior (111).

FACTORES EPIDEMIOLOGICOS Y ETIOPATOGÉNICOS

1. Sexo

La osteonecrosis de los maxilares puede afectar tanto a hombres como a mujeres, aunque la mayor prevalencia de esta patología la encontramos en la población femenina, debido probablemente a que es un reflejo de la enfermedad subyacente para la cual se prescriben estos fármacos, es decir la osteoporosis y el cáncer de mama (53,102).

Se calcula que en España por cada 3 mujeres tan sólo 1 hombre tiene osteoporosis, por lo que estamos hablando del 13% de la población femenina frente al 4% de la masculina. Pero sólo un 10% aproximadamente recibe tratamiento para esta patología ósea (36,53).

Según el estudio publicado por Bamias *y cols.* (173) en pacientes tratados con bisfosfonatos por motivos oncológicos 10 eran hombres y 7 mujeres. Asimismo, en el estudio de Melo *y cols.* (180) 7 eran hombres y 4 mujeres, o Brados *y cols.* (181) en su estudio de pacientes con Mieloma Múltiple y lesiones de osteonecrosis de los maxilares presentaban un total de 63 hombres frente a 27 mujeres. Sin embargo, en la publicación realizada por Tsao *y cols.* (47) el 45% eran hombres frente al 55% de mujeres. Existen otros estudios (46,78) donde no se recoge el sexo de los pacientes ya que no lo consideran un factor de riesgo.

En nuestro estudio, de los 183 pacientes con osteonecrosis de los maxilares, 118 eran mujeres (64.5%) y 65 hombres (35.5%). Vemos una gran frecuencia del sexo femenino por

el numeroso grupo de pacientes que tuvimos con cáncer de mama y osteoporosis; solo estas dos patologías juntas representaron el 55,3% de la muestra.

2. Edad

La edad media de los pacientes con ONM, según diversos estudios entre los que se encuentra el de Stumpe *y cols.* (45) estaba comprendida entre 65 y 67 años o 64 años según el estudio publicado por Saad *y cols.* (78).

Existen algunas publicaciones que indican que edades más elevadas son factores de riesgo para el desarrollo de una ONM, esto podría ser debido a que los procesos de regeneración tisular disminuyen con los años. Además, en pacientes de mayor edad, las complicaciones de las caries así como las enfermedades periodontales pueden aumentar la necesidad de una cirugía dental o el uso de prótesis dentales, siendo estos factores de riesgo bien conocidos (176).

Hay muy pocos datos que describen la aparición de ONM en la población pediátrica. En un estudio observacional, Brown *y cols.* (103) revisaron cuarenta y dos pacientes pediátricos que habían recibido tratamiento con bisfosfonatos intravenosos durante una media de seis años y medio y a pesar de que se realizaron tratamientos dentales invasivos, en estos pacientes no se describieron casos de ONM.

En los últimos años, algunos bisfosfonatos, tales como el pamidronato o el alendronato, se han usado cada vez más en pacientes pediátricos para el tratamiento de trastornos asociados con la osteoporosis, las hipercalcemias resistentes o las calcificaciones heterotópicas. Tal y como hemos mencionado anteriormente, el uso de estos fármacos antirresortivos ha demostrado ser seguro en pacientes pediátricos, pero se recomienda un seguimiento estricto y vigilancia a largo plazo. Sin embargo, se requieren mayores investigaciones sobre estos grupos de pacientes. En nuestro estudio (182), no se incluyó ningún paciente que fuese menor de edad. Sin embargo, Vahtsevanos *y cols.* (46) determinaron que después de ajustar los posibles factores de confusión, la edad no estaba relacionada con la ONM.

En concordancia con estos estudios mencionados anteriormente en nuestra investigación, la edad media de nuestros pacientes fue de $68,22 \pm 12,19$ años; con un rango de edades comprendido entre 32 y 89 años.

3. Tipo de enfermedad y fármacos

Las neoplasias primarias malignas más frecuentes son las de mama, pulmón, próstata y Mieloma Múltiple (36). El cáncer de mama es la neoplasia más frecuente en mujeres y es la principal causa de muerte por cáncer en Europa. Alrededor de un 80% de enfermas que fallecen por una neoplasia mamaria tienen diseminación ósea, y éste es el lugar más frecuente de recurrencia de la enfermedad tras un tratamiento primario por un cáncer de mama (162). El tratamiento de las metástasis del cáncer de mama tiene como objetivo primordial el conseguir una mejoría de los síntomas y de su calidad de vida. La terapéutica sistémica con quimioterapia o bien con hormonoterapia puede conseguir este objetivo, aunque la incorporación de los bisfosfonatos, en los últimos años, ha permitido poder asumir este objetivo con una mayor seguridad (161).

Si bien las pacientes con carcinoma de mama, obtuvieron un rápido beneficio clínico con los bisfosfonatos de primera generación, no ocurrió lo mismo en los pacientes con cáncer de próstata (183).

En los primeros estudios realizados con bisfosfonatos tales como el etidronato, el clodronato o el pamidronato no se obtuvieron diferencias significativas frente al placebo en pacientes que tenían un cáncer de próstata metastásico. Por ello, fracasaron en el manejo y control de la sintomatología de estos pacientes. En el año 2005 se publicó un ensayo randomizado en el que el ácido zoledrónico consiguió una reducción significativa en la incidencia de eventos óseos en un 36% frente al placebo. Además, este fármaco conseguía retrasar una media de 5 meses la aparición del primer evento óseo, mientras que a largo plazo se conseguía una reducción del dolor óseo (183).

Basándose en estos estudios se comenzó a emplear el Zoledronato en el manejo de las metástasis óseas de cáncer de próstata hormonorefractario. Sin embargo, mediante la administración de este fármaco no se lograba reducir el dolor óseo, por lo que su empleo está mayormente justificado ante el diagnóstico de metástasis óseas asintomáticas (184).

Tras los resultados obtenidos en pacientes con cáncer de mama y de próstata, se comenzó a evaluar la administración del Zoledronato en pacientes con cáncer de pulmón y metástasis óseas. En el año 2003, el *"Zoledronic Acid Lung Cancer and Other Tumours Study Group"* realizaron un estudio randomizado en 773 pacientes que presentaban metástasis óseas de las cuales 227 eran cáncer de pulmón, con ello se demostró una reducción de hasta un 31% de los eventos óseos (185).

Es muy frecuente y de mal pronóstico cuando se produce una diseminación ósea del carcinoma renal con una afectación ganglionar. Se ha demostrado que el ácido zoledrónico

reduce la posible aparición del primer evento óseo una media de aproximadamente 13 meses. Además de una reducción en la incidencia de estos eventos de un 41% (185).

Por todo ello, en aquellos pacientes que presentan un buen estado general y una expectativa de vida aceptable, se recomienda el uso de este fármaco intravenoso, el ácido zoledrónico. No solo ante la aparición de estos tumores comentados anteriormente, sino también en el de tiroides, vejiga y en otros 16 tumores sólidos (172).

El Mieloma Múltiple (MM) es una neoplasia maligna hematológica derivada de células linfoides B en el último estadio madurativo (células plasmáticas) que, desde el punto de vista clínico, se caracteriza por la triada de anemia, lesiones óseas e insuficiencia renal (38). Mientras que desde el punto de vista biológico se caracteriza por la presencia de un componente monoclonal sérico, urinario, o de ambos, e infiltración plasmocitaria medular. Este mecanismo de generación de la lesión ósea constituye la base para utilizar bisfosfonatos que inhiben la resorción ósea, y con ello, ayudan a reequilibrar el metabolismo óseo, impidiendo que se desarrollen más eventos óseos en el paciente (56,79).

No se obtuvieron beneficios, en lo referente a la sintomatología, en los estudios realizados con etidronato e ibandronato. Sin embargo, se detectó una reducción de hasta un 50% en el desarrollo de lesiones líticas y una reducción bastante significativa en la aparición de hipercalciuria, hipercalcemia; así como una disminución significativa en el dolor óseo que sufren estos pacientes. En estudios posteriores, el pamidronato intravenoso consiguió una reducción de hasta un 41% en el número de eventos óseos y en el control del dolor (186). Rosen *y cols.* (184) compararon la eficacia del Zoledronato frente al pamidronato en pacientes con cáncer de mama y Mieloma Múltiple; y comprobaron que el ácido zoledrónico presentaba mayores beneficios en cuanto a la morbilidad esquelética, pero no se hallaron diferencias significativas entre ambos fármacos (187).

En nuestro estudio, la mayoría de los pacientes tomaban ácido zoledrónico (72,1%), mientras que el 27,9% restante tomaba bisfosfonatos orales; tales como: Alendronato (18%), Ibandronato (6,6%), Risedronato (3,3%).

La enfermedad más prevalente en nuestra investigación, fue el carcinoma de mama (30,1%), también destacar el número elevado de casos con Mieloma Múltiple (26,20%). Sin embargo, obtuvimos un menor número de pacientes con cáncer de próstata (12%), cáncer de pulmón (2,2%) y cáncer renal (2,2%). No debemos olvidar, la presencia de 1 paciente con un linfoma folicular, 1 caso de adenocarcinoma de colon y 47 pacientes con osteoporosis (25,2%), todas ellas mujeres.

4. Tiempo de administración del fármaco

Asimismo, la duración del tratamiento con los bisfosfonatos, tanto orales como intravenosos, sigue siendo uno de los factores más favorecedores de la ONM. Múltiples estudios (36,37,78,92) afirman que periodos de tratamientos más largos se asociaron a un mayor riesgo de desarrollo de ONM.

En el caso de pacientes con cáncer expuestos a Zoledronato o denosumab, la incidencia de ONM en un estudio realizado por Saad *y cols.* (43) en una muestra de 5.723 pacientes, fue la siguiente: 0,5% ó 0,6% en el primer año, 0,9% ó 1,1% a los 2 años, y 1,1% ó 1,3% a los 3 años. En el estudio publicado por Kos *y cols.* (176) el tiempo medio que los pacientes tomaban bisfosfonatos y que habían desarrollado lesiones de osteonecrosis era mayor, 34 meses frente a aquellos que no habían desarrollado lesiones, siendo un total de 28 meses en este último caso.

Tal y como hemos mencionado anteriormente, múltiples estudios confirman que largos periodos con bisfosfonatos están asociados con un mayor riesgo de desarrollar lesiones de osteonecrosis. Según Bamias *y cols.* (173) la duración media de terapia con bisfosfonatos antes de la aparición de lesiones era de 35 meses, mientras que aquellos pacientes que no habían desarrollado lesiones tan solo recibieron un máximo de 15 meses de tratamiento. Según Vahtsevanos *y cols.* (46) era poco probable la aparición de osteonecrosis con menos de seis meses de tratamiento o 12 meses según Zervas *y cols.* (38) que en su estudio de 303 pacientes con Mieloma Múltiple observaron un tiempo medio de exposición ósea de 24 meses, con un rango comprendido entre 4 y 120 meses.

Del mismo modo, en pacientes que han recibido bisfosfonatos orales para el tratamiento de la osteoporosis, la prevalencia de ONM aumenta proporcionalmente a medida que se incrementa el tiempo de su administración, desde casi el 0% al inicio, a un 0,21% después de 4 años tomando estos fármacos antirresortivos (53).

En nuestro estudio, la duración media de toma de fármacos para los pacientes con osteonecrosis de los maxilares fue de $25,42 \pm 19,27$ meses, aproximadamente dos años, para los fármacos intravenosos; y $85,36 \pm 54,97$ meses, aproximadamente siete años y medio, para los bisfosfonatos orales. Los expertos aconsejan no tomar estos fármacos más de un tiempo determinado para evitar la aparición de estas complicaciones. En nuestros casos se superó el tiempo máximo aconsejado por los especialistas.

5. Tipo de administración del fármaco: intravenoso u oral

El riesgo de osteonecrosis de los maxilares en pacientes que toman bisfosfonatos orales es 100 veces menor que los que toman bisfosfonatos intravenosos por procesos oncológicos (36,53), ya que estos últimos pacientes están expuestos a una mayor inhibición de los osteoclastos.

La incidencia de ONM en pacientes oncológicos tratados con bisfosfonatos intravenosos está comprendida entre 0 a 90 por cada 100.000 pacientes/año (41,178), mientras que la incidencia de lesiones de osteonecrosis en pacientes que han recibido bisfosfonatos orales está entre 1,04 a 69 por cada 100.000pacientes/año (62,188).

Zavras y Zhu (68), tras su estudio observaron que aquellos pacientes que habían recibido bisfosfonatos intravenosos tenían cuatro veces más riesgo de desarrollar lesiones ante una cirugía menor que los pacientes que habían recibido bisfosfonatos orales, ya que estos últimos en su estudio no tuvieron ninguna complicación tras las cirugías menores. Pazianas y cols. (69) obtuvieron resultados muy similares a los de Zavras y Zhu (68).

Según Ruggiero y cols. (36), la prevalencia de ONM aumenta desde un 0% hasta un 0,21% después de haber recibido cuatro años o más de terapia con bisfosfonatos orales, siendo 21 casos por cada 10.000 pacientes.

Por lo tanto, según la literatura el riesgo de desarrollo de lesiones de ONM es significativamente mayor en los pacientes oncológicos que reciben tratamientos intravenosos que en aquellos que toman bisfosfonatos orales. Asimismo, el riesgo de desarrollo de una ONM en pacientes con cáncer expuestos a Zoledronato es de 50 a 100 veces superior que en pacientes con oncológicos que son tratados con placebo (36).

Coincidimos con los estudios anteriores en que la prevalencia de la ONM es mayor en pacientes oncológicos, ya que en nuestra investigación el 72,7% de los pacientes recibieron tratamientos con bisfosfonatos intravenosos frente a un 27,3% que fueron tratados por vía oral.

6. Factores predisponentes: Corticoides, Diabetes y Antiangiogénicos

Según diversos autores (78,47), los corticosteroides que son hormonas esteroideas que se usan como fármacos antiinflamatorios e inmunosupresores, se encuentran asociados a un incremento en el riesgo de ONM. Para poder ser considerado un posible factor de riesgo, el paciente debería haberlo tomado durante un periodo mínimo de 1 mes en el año previo al diagnóstico de las lesiones o dos meses los cinco años anteriores al diagnóstico de la ONM. En nuestro estudio, tan solo pudimos obtener los datos de 166 pacientes, compro-

bando que un 9,3% de ellos tomaban asociadamente a los bisfosfonatos corticosteroides, mientras que el 90,7% no los tomaban.

La gran mayoría de los pacientes que reciben glucocorticoides suelen combinarlos con otros agentes quimioterapéuticos, tales como los inhibidores de la aromataasa, en el cáncer de mama o la talidomida en el caso del Mieloma Múltiple; solos o en combinación con inmunosupresores y antiangiogénicos (78).

Los bisfosfonatos presentan ciertas propiedades antiangiogénicas, ya que disminuyen el flujo sanguíneo en el hueso y el factor de crecimiento endotelial vascular, pudiendo contribuir al desarrollo de lesiones óseas en la mandíbula. También se han descrito casos de ONM en pacientes con cáncer en tratamiento con antiangiogénicos, tales como el sunitinib y el bevacizumab (37). No pudimos medir el efecto de estos fármacos en nuestra serie, ya que no pudimos obtener estos datos de forma precisa en los pacientes y por ello decidimos no incluir este apartado.

Otras situaciones sistémicas que favorecen el desarrollo de osteonecrosis son la anemia, con cifras de hemoglobina menores de 10 g/dL y la diabetes con valores de glucemia superiores a 120 mg/dl (47). En nuestro estudio, solo en 11 pacientes comprobamos que había anemia y 14 tenían diabetes. Ante la escasez de datos decidimos no reflejar estos hallazgos en los resultados para una mayor fiabilidad pues entendemos que posiblemente algunos pacientes más hubiesen tenido anemia y diabetes pero no estaban, estos datos, suficientemente registrados.

Hace unos años el consumo de tabaco se consideraba un riesgo para el desarrollo de la ONM; sin embargo tras estudios más recientes, realizados por diversos autores (36,37,47,51), el uso del tabaco no se halló relacionado con la aparición de la ONM. Por ello, en nuestro estudio no se analizó el hábito tabáquico de nuestros pacientes.

7. Factores Locales predisponentes al desarrollo de ONM

Dentro de los factores locales, la cirugía dentoalveolar es considerada como el factor desencadenante de mayor riesgo para desarrollar una ONM. Diversos estudios (36,37) han descrito que en pacientes con ONM, la extracción de un diente es el precipitante más frecuente, ya que al 52-61% de los pacientes se les había realizado una extracción previa. Estos dientes tenían habitualmente una enfermedad periodontal o periapical.

Asimismo, en un estudio de casos-controles (51) de pacientes con cáncer tratados con Zoledronato, el riesgo ante una extracción dental aumentaba en un 16% frente a los pacientes controles.

En un estudio de cohortes longitudinal de una muestra de pacientes con cáncer que tomaban bisfosfonatos intravenosos, predominantemente Zoledronato, la extracción dental se asoció con un riesgo 33 veces mayor de desarrollar una posible osteonecrosis (46). O un incremento de 40 veces el riesgo de desarrollar una ONM tras una cirugía dental, según *Kos y cols.* (92).

A nivel de bisfosfonatos orales, según un estudio prospectivo con 194 pacientes que tomaban estos fármacos y a los que se les hizo al menos una extracción dental, tan solo un paciente desarrolló ONM, siendo la estimación del riesgo del 0,5% (81).

La osteonecrosis de los maxilares debido a bisfosfonatos orales tras la colocación de implantes es una complicación rara pero posible y real. Aunque debemos matizar que es menos frecuente, más predecible y menos severa que la osteonecrosis producida por fármacos intravenosos ya que además la ONM asociada a BF orales responde mejor al tratamiento.

En el caso de pacientes expuestos a bisfosfonatos orales, la mejor estimación actual de riesgo de osteonecrosis de los maxilares es la publicada por *Kunchur y cols.* (81) que en un estudio prospectivo de 194 pacientes que estaban recibiendo bisfosfonatos, se les realizó una extracción dental de al menos un diente y tan solo un paciente de los 194 desarrolló una osteonecrosis de los maxilares, estableciendo por tanto un riesgo, después de una extracción, del 0,5%.

La estimación de riesgo de desarrollar una osteonecrosis de los maxilares en pacientes sometidos a terapia antirresortiva intravenosa, tras extracciones dentales, es superior a la de los bisfosfonatos orales, estableciéndose un rango entre 1,6 y 14,8%. La mejor estimación es la publicada por *Mozzati y cols.* (188) en un estudio de cohortes prospectivo en 176 pacientes con cáncer y en tratamiento con Zoledronato, que tras realizarles una extracción dental tan sólo 5 desarrollaron una osteonecrosis, lo que supone un 1,6%.

En un estudio publicado por *Grant y cols.* (189) tras la colocación de 468 implantes en 115 mujeres que habían recibido terapia antirresortiva oral, no se observó ninguna evidencia clínica ni radiográfica de osteonecrosis. Aunque otros autores (36,188), aconsejan su colocación preferiblemente durante los tres primeros años tras comenzar el tratamiento. Según nuestros conocimientos, no existen estudios acerca del riesgo de colocación de implantes en pacientes con bisfosfonatos intravenosos.

Basándonos en la literatura actual la mayoría de los estudios (163,190,192) con mayores niveles de evidencia, informan de que no existe una contraindicación absoluta de colocación de implantes en pacientes con antecedentes de bisfosfonatos tanto orales como intravenosos, aunque sí que existen diversas publicaciones que muestran la aparición de

lesiones óseas mandibulares en pacientes con Zoledronato, tal y como hemos mencionado anteriormente. Bajo nuestro de punto de vista, consideramos que no sería recomendable la colocación de implantes en pacientes en tratamiento con bisfosfonatos intravenosos.

El uso de prótesis dentales también se ha asociado con un mayor riesgo de ONM. En un estudio realizado por Vahntsevanos *y cols.* (46) en una muestra de 1.621 pacientes con cáncer tratados con Zoledronato intravenoso, ibandronato, o pamidronato se comprobó que los pacientes portadores de prótesis tuvieron un riesgo dos veces superior de desarrollar ONM. En nuestra investigación encontramos diecisiete casos asociados a uso de prótesis dentales.

Según la última publicación de Ruggiero *y cols.* (36), se desconoce el riesgo que tienen los pacientes que han estado expuestos a fármacos antirresortivos de desarrollar ONM, ante intervenciones quirúrgicas tales como la colocación de un implante o intervenciones conservadoras como la endodoncia o bien tratamientos periodontales. Debido a la ausencia de datos al respecto, los autores anteriores consideraron que el riesgo tras la colocación de un implante, una endodoncia o un procedimiento periodontal en el que se requiera la exposición y manipulación ósea es comparable al de una extracción dental.

También han sido publicados casos de aparición de lesiones de ONM de forma espontánea, sin ningún antecedente de traumatismo ni extracciones previas. Suelen darse en áreas desdentadas o en zonas de exostosis óseas en pacientes oncológicos. Con el tiempo, cuando el hueso se vuelve necrótico pueden producirse fístulas intraorales o extraorales asociadas a una supuración de material purulento (109).

Coincidimos, en nuestro estudio, con los datos publicados en la literatura científica, ya que la distribución de factores favorecedores de ONM fue la siguiente: extracción dental (69,4%), prótesis (9,2%), implantes (4,9%); y aparición de lesión de forma espontánea un (3,8%). Por lo tanto, se confirma que la extracción dental fue el factor desencadenante más prevalente, ya que 127 de 183 presentaban antecedentes de extracción previa.

MANIFESTACIONES CLÍNICAS DE LA OSTEONECROSIS POR BISFOSFONATOS

Según la presencia de hallazgos clínicos como son la presencia de inflamación, dolor u otras complicaciones, tales como fracturas patológicas o fístulas extraorales; Ruggiero y la AAOMS (36) establecieron un sistema de clasificación en diferentes estadios. Basándose en un sistema de algoritmos terapéuticos, según el estadio en el que se encuentre el paciente, establecieron unas guías terapéuticas que ya hemos descrito en el apartado de introducción de esta tesis doctoral.

1. Localización de la osteonecrosis de los maxilares

A nivel internacional, existe un claro consenso en cuanto a la localización de las lesiones, siendo más frecuentes en la mandíbula (73%) que en el maxilar (22.5%), pero también hay ocasiones en que puede aparecer ambos (4,5%) (175). Sobre todo en zonas desdentadas y donde existen prominencias óseas; tales como exostosis o torus.

Sin embargo, la predilección de la osteonecrosis a nivel mandibular también podría estar justificada por la mayor vascularización que existe en el maxilar superior respecto a la mandíbula, hecho que en la realidad se ajusta a lo observado pues se hallan más en mandíbula. Por el contrario, la falta de reparación de las microlesiones fisiológicas, las intensas fuerzas de masticación o la excesiva demanda de remodelación ósea debida a la infección o tras una extracción dental también predisponen a la ONM. En este sentido, la exposición del alveolo dentario a un ambiente contaminado, puede contribuir al desarrollo de las lesiones óseas (2,6,14,24).

El recambio óseo alveolar que se produce en la mandíbula es 10 veces superior al de los huesos largos como son la tibia o el fémur. Esta es la explicación más probable para la exclusiva predilección de la ONM por los maxilares. Asimismo, la tasa de recambio alveolar en la cresta alveolar es el doble que la que se produce en el canal mandibular, y tres o cinco veces superior que en la cortical inferior mandibular. Todo esto explica, por qué la ONM suele comenzar en el hueso alveolar (26).

Es evidente que la fuerza producida sobre el hueso alveolar por la masticación o por el traumatismo de la prótesis, ejerce mayores tensiones o cargas en la zona molar y por ello se crea un recambio óseo más activo. Por tanto se produce una mayor vulnerabilidad a estos fármacos que actúan directamente sobre los osteoclastos durante un periodo prolongado (36).

En nuestro estudio, un 74,3% de los pacientes tenían localizadas las lesiones en la mandíbula, mientras que un 16,4% las tenían en el maxilar superior. Asimismo, tan solo diecisiete pacientes de los 183 presentaban lesiones en los dos maxilares, suponiendo un

9,3% del total de nuestra muestra. Coincidimos en gran medida con lo presentado por otros autores (175).

2. Dolor

Las áreas de hueso expuesto y necrótico como son las lesiones de osteonecrosis por bisfosfonatos, pueden llegar a permanecer durante largos periodos de tiempo completamente asintomáticas, desde semanas a meses hasta incluso varios años; sobre todo en los estadios iniciales (193).

La existencia de dolor en estos pacientes se encuentra correlacionada con la evidencia clínica de infección alrededor de la zona necrótica e inflamación en los tejidos circundantes, ya que un hueso no vital que no se encuentra inervado no puede producir dolor. Pero debido a la presencia de infecciones secundarias se desencadena una respuesta inflamatoria produciendo mediadores del dolor.

Es frecuente la aparición de síntomas y signos tales como el dolor, la movilidad dental, la hinchazón de la mucosa oral, el eritema, la ulceración o incluso la parestesia de una rama trigeminal, pudiendo aparecer estos síntomas y signos, incluso antes de que se produzca una clínica detectable (194,195).

En un estudio realizado por Marx *y cols.* (20) en 97 pacientes con ONM que fueron seguidos durante un año o más, nueve de ellos (9,9%) tuvieron episodios intermitentes de dolor que requirieron un ajuste de las pautas antibióticas e irrigaciones diarias en clínica con clorhexidina al 0,12%. Sin embargo, los 82 pacientes restantes (90,1%) permanecieron sin dolor ni ninguna otra sintomatología durante este periodo.

En nuestro estudio, un 35,5% de los pacientes no presentaban dolor, correspondiendo principalmente a enfermos que se encontraban en estadio 1. En contraposición, el 64,5 % restante referían dolor, normalmente debido a un brote infeccioso.

3. Inflamación e infección

El área maxilofacial es un sistema complejo compuesto por dientes, mucosa oral, tejidos periodontales, lengua, glándulas salivales, músculos y hueso alveolar. Todos estos tejidos interactúan para poder llevar a cabo sus funciones, tales como la masticación o el habla. Tanto el maxilar como la mandíbula son los únicos huesos del organismo que están cubiertos por una fina mucosa que se encuentra en estrecha relación con el ambiente externo, donde es muy habitual la presencia de infecciones bacterianas y fúngicas (196), por ello la exposición del hueso durante la cirugía dentoalveolar actúa como una vía de entrada directa para la invasión bacteriana (197).

La secuencia de eventos que conducen al desarrollo de una osteonecrosis mandibular no está clara, pero la presencia de inflamación e infección ha sido considerada como uno de los factores desencadenantes más importantes en la patogenia de estas lesiones, ya que su sola presencia ya se considera suficiente para el desarrollo de una osteonecrosis (196, 198,199). Aunque actualmente, se desconoce si la necrosis precede o sigue a la infección (37).

Según diversos estudios (36,45,49,200), ciertos factores de riesgo, tanto locales como sistémicos, han sido implicados en la génesis de estas lesiones. En este sentido, la presencia previa de patología dental o infección bacteriana, producida por una enfermedad periodontal o periapical representan importantes factores de riesgo. Y aunque su fisiopatología es muy compleja y muchos factores podrían influir en su prevalencia y severidad, estas son dos de las enfermedades infecciosas más comunes en el organismo humano.

Consecuentemente, la inflamación del hueso alveolar debida a la patología dental aumenta el recambio óseo en esa zona, incluso las bacterias podrían inducir la producción de RANKL con las consecuente activación de los osteoclastos, lo que conllevaría a una mayor acumulación de bisfosfonatos en la zona. De hecho, el aumento de la captación de este fármaco antirresortivo por el tecnecio-99m, indica un aumento del recambio óseo, en presencia de la enfermedad periodontal o periapical (61, 67, 80, 201,202).

Se ha demostrado, en diversos estudios (37,88), que determinadas bacterias estimulan la resorción y otras inhiben la formación ósea, contribuyendo de este modo a la necrosis ósea. Los mediadores de la osteolisis más conocidos son los lipopolisacáridos surgidos a partir de bacterias gram-negativas, que probablemente actúan estimulando la producción de mediadores químicos de la inflamación, como son las citoquinas locales.

Se producen principalmente unos agregados de bacterias y leucocitos polimorfonucleares que comúnmente se hallan en los tejidos de estas lesiones óseas, así como la presencia de microfilms bacterianos que estimulan la reabsorción ósea (89).

Sin embargo, hay otros tipos de bacterias que pueden tener efectos similares sobre el tejido óseo a través de diferentes mecanismos. Por ejemplo, las proteínas de la *Porphyromonas gingivalis* regulan directamente la producción de factor nuclear ligando kappa- β y la osteoprotegerina en las células del ligamento periodontal humano y en los fibroblastos gingivales; aumentando significativamente la estimulación de la osteoclastogénesis. Asimismo, se ha demostrado que bajas concentraciones de Zoledronato producen un aumento de la toxicidad en los tejidos blandos, a través de una inducción de la apoptosis y una disminución de la proliferación celular tras la exposición a los bisfosfonatos (203).

La activación de ciertas citoquinas inflamatorias produce un aumento en la expresión del RANKL por parte de diferentes tipos de células en el tejido periodontal, lo que se traduce

en una mayor destrucción del tejido, así como una notable disminución de la angiogénesis, y la eliminación del efecto antirresortivo en ese tejido óseo (198).

En nuestro estudio, el 33,9% de los pacientes presentan inflamación, mientras que un 66,1% no la tenían. No hemos analizado, en nuestra investigación, el ambiente bacteriano existente en nuestros pacientes ni la relación que los microorganismos pudiesen tener con dicha inflamación.

4. Supuración

Los efectos inhibidores de los bisfosfonatos sobre la proliferación y la viabilidad de los queratinocitos orales (204) inducen a la apoptosis de las células epiteliales, pudiendo ejercer un efecto antiangiogénico potente y por todo ello, llegando a aumentar el riesgo de infección debido a la afectación de la integridad de la mucosa oral y consiguientemente la supuración a partir desde el interior del área necrótica hacia el exterior de la mucosa.

Asimismo, la activación de las células T gamma/delta ($\gamma\delta$) estimulan la presencia de ciertas citoquinas proinflamatorias, pero el agotamiento de estas células puede poner en peligro la respuesta inmune ante la infección (70).

No suele realizarse una biopsia en estos pacientes con ONM, a no ser que se quiera descartar la presencia de una posible metástasis ósea, debido a los posibles problemas que posteriormente pueden producirse en la cicatrización. En los huesos desbridados quirúrgicamente suele detectarse, sobre todo, la presencia de *Actinomyces*, *Streptococcus spp*, *Fusobacterium*, *Eikenella*, *Prevotella* y *Moraxella*, que son microorganismos que típicamente se hallan en las infecciones dentales (205). La presencia de múltiples bacterias llevó a Kos y cols. (92) a evaluar la posibilidad de la existencia de una compleja biopelícula sobre el hueso expuesto. Tras diversos estudios llegaron a la conclusión de que un aumento de la adhesión bacteriana a la hidroxiapatita ósea, promovía la colonización bacteriana en la superficie del hueso, creando unas condiciones favorables para el desarrollo de una infección crónica, favoreciendo la posible aparición de ONM.

Los bisfosfonatos que contienen nitrógeno suelen activarse por protonación, que es la adición de un protón (H^+) en ambientes ácidos. Consecuentemente, debido a los cambios en el tejido óseo y en su pH es más común la aparición de infecciones (196).

Según nuestra investigación, el 48,6% de los pacientes presentaban en el momento de la exploración presencia de salida de material purulento. Mientras que el 51,4% no tenían supuración. Debemos tener en cuenta que tan sólo se consideró la toma de datos en el mismo día que se le realizó la extracción de sangre, y que en otros periodos los pacientes sí que podían haber referido presencia de inflamación, infección y supuración.

5. Fístula intraoral o extraoral

Las fístulas intraorales y extraorales pueden aparecer cuando la mandíbula o el maxilar se vuelve necrótico como consecuencia de una infección (109). Así por ejemplo, la aparición de una sinusitis maxilar crónica secundaria a una osteonecrosis, con o sin fístula oro-antral puede ser la manifestación inicial en algunos enfermos (206). Aunque estos datos corresponden a estadios más avanzados y con pronósticos más desfavorables.

Del estudio publicado por Marx *y cols.* (20), un 17,6 % de los pacientes presentaba una fístula cutánea extraoral o incluso hueso expuesto a través de la piel. En nuestro estudio, el 35,5 % de los pacientes presentaba una fístula intraoral, frente al 64,5% que no la tenían. Sin embargo, en nuestra serie tan solo 14 pacientes de los 183 que comprendían el estudio tenían una fístula extraoral, mientras que el 92,3% no mostraban ninguna manifestación extraoral de la ONM.

6. Estadiaje de la ONM

Se han realizado diversas modificaciones en el sistema de estadiaje de las lesiones basándose en los síntomas y signos que presentan los pacientes con ONM. En el año 2009, se incluyó el estadio 0, para incorporar a los pacientes con síntomas inespecíficos, tales como dolor, formación de un trayecto fistuloso, formación de abscesos o incluso otras alteraciones clínicas y radiológicas poco definidas (195).

Hasta un 50% de los pacientes en estadio 0, que presentan cualquiera de los síntomas descritos anteriormente, se describe que pueden progresar a un estadio 1, 2, o incluso 3. Por lo tanto, la etapa 0 parece ser una categoría válida para detectar los pacientes con enfermedad prodrómica, que es la variante no expuesta, según los autores anteriores (195). Posteriormente en el año 2014 se actualizó una modificación de dicha clasificación que a su vez hemos detallado en la introducción de esta tesis doctoral (36).

La presencia de exposición ósea es un criterio fundamental a la hora de realizar el estadiaje de los pacientes, de nuestros 183 pacientes el 78,1% sí que la presentaban, mientras que tan solo el 21,9% no la tenían. Cuando consideramos los estadios, hallamos un 4,4% en estadio 0, un 26,8% estaban en un estadio 1, el 46,4% un estadio 2, mientras que un 22,4% tenían estadio 3. Como vemos, el mayor porcentaje lo hallamos en un estadio intermedio, que era el 2.

DIAGNÓSTICO

Los pacientes que han sido tratados o están siendo tratados con bisfosfonatos presentan una afectación de su actividad osteoclástica. La interferencia en la homeostasis ósea normal producida por los aminobisfosfonatos puede producir constantes microlesiones, afectando a la integridad mecánica del hueso y a menudo presentando infecciones óseas (105,207). La exposición ósea favorece la colonización bacteriana de la superficie del hueso, por lo tanto estamos ante unas condiciones favorables para el desarrollo de una infección crónica y resistente a cualquier tipo de terapia antibiótica.

El diagnóstico de la osteonecrosis de los maxilares es principalmente clínico, pero los hallazgos radiográficos proporcionan información adicional para poder establecer el diagnóstico final y el estadio de la enfermedad; sobre todo cuando las lesiones corresponden a un estadio más avanzado (20,32,36).

Los estudios radiológicos también delimitan la extensión de los cambios óseos, el tamaño, así como la localización de las zonas con secuestros óseos. También son de utilidad para valorar la proximidad al nervio dentario inferior, la presencia de fracturas patológicas y la posible afectación de los senos paranasales mediante comunicaciones orosinusales (167).

1. Radiografías panorámicas y convencionales

La radiografía panorámica se utiliza de forma rutinaria para el estudio de los tejidos duros del área maxilofacial, ya que es una técnica de fácil acceso e interpretación. En comparación con la tomografía computarizada presenta una exposición a la radiación y un coste substancialmente más bajo. Sin embargo, la TC presenta mayor sensibilidad para detectar los cambios radiográficos de las lesiones de ONM, y sobre todo para observar y definir zonas de secuestros óseos, así como para la delimitación de las áreas radiolúcidas (116).

Según Bedogni *y cols.* (208) las radiografías convencionales como son las ortopantomografías o las periapicales resultan insuficientes para la detección de las áreas de ONM y su extensión.

En nuestros pacientes se tomó, en la primera visita, una ortopantomografía que nos sirvió de guía para establecer inicialmente el estadio y extensión, si bien en todos los casos posteriormente solicitamos una tomografía computarizada.

2. Tomografía computarizada

Los hallazgos radiológicos típicos de la ONM en la tomografía computarizada incluyen una alteración trabecular con cambios en el contenido mineral óseo, manifestado en forma de una esclerosis ósea, pudiendo acabar desarrollando secuestros óseos; así como fenómenos de erosión del hueso cortical y formación de nuevo hueso perióstico (116).

Existía una falta de concordancia entre la clínica y la ortopantomografía al considerar la extensión real de la ONM basándonos en los estadios de Ruggiero y la AAOMS (36), ya que al hacer posteriormente las TCs se comprobó la existencia de una sobreestimación o subestimación, y por lo tanto ello podría conducir a una terapéutica inadecuada.

Diversos grupos de investigación (209), han propuesto la clasificación de los estadios de ONM tan solo mediante los signos radiológicos, por ejemplo, esclerosis, alveolos de extracción persistentes. Sin embargo, Ruggiero *y cols.* (36) no aceptaron dicha propuesta ya que con ello se podría sobrestimar la frecuencia real de ONM, incluyendo falsos positivos. Por lo tanto, el diagnóstico debe ser esencialmente clínico, si bien los hallazgos radiográficos pueden aportar información adicional muy útil para poder establecer el diagnóstico final y el estadiaje de la lesión (210).

Según hemos comprobado, existen pocas publicaciones en la literatura científica que hayan realizado estudios radiográficos en pacientes con ONM, y muy limitados los que comparan con grupos controles. Podemos encontrar seis estudios de casos-controles que se centraron exclusivamente en los cambios radiológicos encontrados.

Raje *y cols.* (207) fueron los primeros en demostrar que la homeostasis se ve afectada en pacientes con Mieloma Múltiple y lesiones de osteonecrosis, evidenciándose una disminución de la formación y de la resorción ósea. Asimismo, Rocha *y cols.* (211) insisten en la importancia de los cambios radiográficos, tales como zonas escleróticas, desorganización de la trabeculación medular, esclerosis de los márgenes alveolares y de la lámina dura, incluso cuando los pacientes se encuentran asintomáticos, por ello destacan la importancia de las radiografías para la detención temprana de las lesiones.

Del mismo modo, en un estudio reciente realizado por Bagan *y cols.* (54), se midió el grado de esclerosis en las tomografías computarizadas de 43 pacientes con diferentes estadios de ONM y se relacionó con los síntomas y hallazgos clínicos, comparándolo con un grupo de controles sanos. Se encontraron diferencias significativas entre los diferentes estadios de ONM, hallando el mayor grado de esclerosis en los pacientes con estadio 3. También se encontraron diferencias en el grado de esclerosis, según el sexo, el tipo de bisfosfonato y las características clínicas, pero no de forma significativa.

En un estudio de casos y controles publicado por Gallego *y cols.* (212) analizaron el espesor de la mucosa del seno maxilar en 32 pacientes con ONM y 32 sujetos sanos mediante el uso de la TC. Querían determinar si el espesor de la membrana de Schneider o membrana sinusal, que es una fina capa de células de un grosor entre 0.3 y 0.8 mm, que se encuentra situada revistiendo el interior del seno maxilar en contacto con el periostio, estaba relacionado con el mayor o menor riesgo de desarrollo de la osteonecrosis de los maxilares. Comprobaron una mayor afectación de la mucosa del seno en los pacientes con ONM que en los controles, pero no se relacionaba ni con la dosis ni con la vía de administración de los bisfosfonatos. Consideraron que las altas concentraciones de bisfosfonatos en el hueso producen una toxicidad directa en la mucosa que lo recubre como primer evento de la exposición ósea y necrosis (110).

Igualmente destacamos diversos estudios de cohortes, como los de O'Ryan *y cols.* (106) que mediante la gammagrafía ósea mostraron la captación de marcadores positivos antes del desarrollo de lesiones de osteonecrosis en el 66% de los pacientes. Sin embargo, Rugani *y cols.* (213) concluyeron su estudio afirmando que los signos radiológicos no son suficientes para confirmar la existencia de lesiones, sino que es obligatorio tener la presencia de determinados signos clínicos.

Por último, podemos encontrar en la literatura científica la existencia de siete estudios transversales con amplias series de casos, pero que en ninguno de ellos aparecen pacientes controles con quien poder comparar los datos obtenidos (106,110,116,117,167, 207,214).

En la tabla 6 de la introducción, se resumen las principales características de los estudios mencionados anteriormente. Igualmente en la tabla 36 del apartado de resultados, página 105, mostramos nuestros hallazgos radiográficos más significativos.

2.1. Osteolisis

Los hallazgos más comunes en la tomografía computarizada son principalmente las áreas de osteolisis con destrucción de la cortical ósea, ya sea mediante una lesión única y localizada, o múltiples lesiones líticas en forma de sacabocados (211). En nuestro estudio, el 90% de los pacientes con osteonecrosis de los maxilares sí que presentaron osteolisis frente al 10% que no la tenían.

Asimismo, también se describen signos como la erosión cortical, las zonas de esclerosis ósea, la formación de hueso perióstico, la persistencia de lámina dura tras la extracción dental y en ocasiones zonas de secuestro óseo, así como formación de una fístula que evita una completa cicatrización del alveolo. Por lo general, todos estos cambios radiográficos, se extienden más allá de las áreas que se observan clínicamente (215).

En un estudio radiográfico realizado por Elad *y cols.* (216) en 110 pacientes con ONM, en la mayoría de los enfermos se observó que había una afectación de la médula ósea con unas áreas de lisis que a su vez se combinaban con zonas de esclerosis en 16 de 29 lesiones óseas y en tres áreas se combinaban las zonas de erosión con las de esclerosis.

2.2. Esclerosis

La esclerosis ósea es una de las alteraciones radiográficas más importantes en pacientes con osteonecrosis, pero no existen muchos estudios en la literatura que realicen una medición cuantitativa de la densidad ósea y del grado de esclerosis (105).

En el primer trabajo publicado por Takaishi *y cols.* (210) en un estudio de casos y controles (n=6) realizaron la medición de la densidad mineral ósea (DMO) en una radiografía dental y panorámica con una cuña de aluminio milimetrada, para luego analizarlo mediante un sistema informático. Obtuvieron valores significativamente mayores de DMO alrededor de las zonas de osteonecrosis en comparación con los controles sanos. Considerándolo por tanto como un factor de riesgo local de la osteonecrosis.

El siguiente estudio fue publicado por Hamada *y cols.* (217), quienes cuantificaron el grado de esclerosis ósea en unas mediciones realizadas en tomografías computarizadas de 20 pacientes comparándolas posteriormente con un grupo control sano. Querían hallar si existían diferencias de radiodensidad en el hueso esponjoso y en la cortical de los TC_s de los pacientes con ONM por bisfosfonatos para poder detectar los estadios precoces de la enfermedad.

En el anterior estudio de Hamada *y cols.* (217) se consideraron 4 grupos de estudio: área de ONM en estadio 0, área de ONM en estadios 1-3, y áreas sin ONM en pacientes que no habían recibido bisfosfonatos. Para la medición de las distintas áreas se configuraron regiones de interés ROI de 3x3mm en zona medular y de 1x3mm en la cortical, y también se midió la anchura de la cortical, tanto bucal como lingual. Para ello, se realizaron cortes axiales en 30 puntos diferentes, 15 en el hueso alveolar y 15 en el cuerpo mandibular.

Los resultados de Hamada *y cols.* (217) mostraron que no existían diferencias en los parámetros óseos, radiodensidad del hueso esponjoso ni en la cortical. Tampoco los había en la anchura de la cortical entre los pacientes que recibieron BF vía oral o vía intravenosa, ni tampoco influyó el tiempo que habían recibido los bisfosfonatos (>3 años, <3 años). La radiodensidad en el hueso esponjoso fue diferente en las áreas con ONM frente a las zonas en las que no la desarrollaron y al grupo control, pero no se pudieron observar diferencias significativas entre el estadio 0 (hueso no expuesto) y los estadios 1-3 (hueso expuesto).

La diferencia de la radiodensidad está relacionada con factores locales, como pueden ser la presencia de diversos agentes infecciosos de origen dental. Hallaron diferencias

significativas en los valores de radiodensidad del hueso esponjoso entre el estadio 0 y el estadio 1-3 en comparación con el grupo control sano. Sin embargo, no encontraron diferencias significativas entre los pacientes que se encontraban en un estadio 0 y los del estadio 1-3.

La osteoesclerosis o aumento de la densidad ósea generalmente expresa un foco inflamatorio crónico de larga evolución, como es la osteomielitis crónica; o áreas con un aporte vascular deficiente.

Esta diferencia de la densidad ósea en el hueso trabecular incluso en el mismo paciente entre el área con ONM y el área sin ONM, les condujo a Hamada *y cols.* (217) a la hipótesis de que los factores de riesgo locales, tales como es un foco inflamatorio dental, expresado como absceso periodontal, periodontitis apical, enfermedad periodontal, favorecen un mayor riesgo de aparición de lesiones que los factores generales como son la vía o el tiempo de administración del fármaco.

Por lo tanto, según el estudio mencionado anteriormente publicado por Hamada *y cols.* (217), no se encontraron diferencias en el grado de esclerosis ósea entre el estadio 0 y el resto de estadios. Sin embargo, en el estudio publicado por Bagan *y cols.* (54) se midió el grado de esclerosis en cada una de los estadios, encontrando que había diferencias en cuanto a la medida de esclerosis ósea, ya que esta aumentaba en función del estadio clínico del paciente. Asimismo, encontraron una correlación entre el grado de esclerosis y la longitud de las zonas de lisis mandibular ($p=0,01$).

La esclerosis ósea y los cambios en la densidad del hueso alveolar, acompañados de un engrosamiento de la lámina dura pueden indicar un mayor riesgo de desarrollo de lesiones tras la extracción dental, por lo que es una de las alteraciones radiográficas más importantes a tener en cuenta.

En nuestro estudio, en el 83,3% de los pacientes se podían observar signos de esclerosis del canal mandibular, frente al 16,7% que no la presentaban.

Asimismo, Bedogni *y cols.* (218) realizaron un estudio cuyo objetivo fue analizar el grado de concordancia entre los estadios de la ONM propuestos por Ruggiero y la AAOMS (36), en base a la clínica y radiografías dentales panorámicas, con los datos obtenidos de la TC para valorar la extensión ósea, ya fuese focal o difusa.

El estudio multicéntrico de Bedogni *y cols.* (218) fue realizado en 799 pacientes con diagnóstico de ONM (Estadio 0, 1, 2,3). En los hallazgos de las TC_s, se trazaron unas ventanas óseas mediante un corte axial y coronal para determinar la extensión real de la osteonecrosis en las TC_s. Se midió la extensión de los cambios escleróticos, y se evaluó la

perdida de contraste entre el hueso endosteal y la medular al compararla con el hueso sano. Se diferenció, según los cambios en la esclerosis ósea, entre una afectación ósea focal, traducida en una esclerosis en hueso alveolar, o una afectación ósea difusa mediante una esclerosis que se extendía desde el hueso alveolar hasta la basal.

Según Bedogni *y cols.* (218) la valoración mediante la tomografía computarizada es necesaria en los estadios de Ruggiero y la AAOMS (36) ya que la clínica no es indicativa de la extensión real y de la severidad de las lesiones de osteonecrosis. En este sentido, los autores anteriores señalan que existía una afectación ósea difusa que fue observada en todos los estadios de la ONM, y que la clasificación en el estadio 0 no es un sinónimo de un estadio inicial de osteonecrosis de los maxilares por no tener hueso expuesto, ya que esta necrosis puede ser extensa y severa, aunque no se haya manifestado clínicamente. Asimismo, la afectación ósea focal puede estar asociada a un hueso expuesto, dolor y supuración, lo que significa que las situaciones clínicas con sintomatología importante, a veces no están correlacionadas con una mayor extensión radiográfica.

En nuestro estudio, al comparar los niveles de densidad ósea de los tres grupos, en las tomografías computarizadas, se obtuvieron diferencias significativas ($p < 0,001$) entre el grupo 1, que eran los pacientes con osteonecrosis de los maxilares y los otros dos grupos, controles sanos y lado contralateral sano de enfermos con ONM. No encontramos diferencias significativas entre los pacientes sanos y el lado contralateral sano de los pacientes con ONM ($p = 1,000$).

Al estudiar los niveles de densidad ósea en nuestra serie, los treinta pacientes del Grupo 1, tenían una media de 155,43 píxeles, en el Grupo 2 de treinta pacientes sanos hallamos una media de 87,77 píxeles, por último en los treinta casos del Grupo 3, en los que se analizaron zonas sanas de pacientes con ONM, se observó una media de 91,02 píxeles. Constatándose, por tanto la mayor densidad ósea en los pacientes con lesiones de osteonecrosis, y la menor en pacientes sanos así como en las zonas contralaterales de la ONM.

2.3. Fractura mandibular

Uno de los problemas más severos que pueden presentarse en pacientes con osteonecrosis de los maxilares son las fracturas patológicas mandibulares, aunque suelen ocurrir en etapas más avanzadas de la enfermedad (estadio 3), debido a los cambios estructurales y a la gran pérdida de hueso; así como a la falta de estabilidad primaria producida por el desbridamiento de las zonas necróticas (36,176).

En nuestra investigación, en los 30 pacientes estudiados no hallamos ningún caso de fracturas patológicas mandibulares. Sin embargo si consideramos la totalidad de la mues-

tra que eran 183 pacientes, de los 155 casos que presentaban lesiones de osteonecrosis a nivel mandibular, tan sólo ocho (5,16%) tuvieron una fractura de la basal mandibular. Estos pacientes ya requieren un tratamiento quirúrgico con anestesia general.

El tratamiento quirúrgico sólo debe plantearse ante casos sintomáticos en los que ha fracasado el tratamiento conservador o bien en estadios avanzados como es el caso del estadio 3 en los que se precisan amplias resecciones óseas. Abu_id y cols. (219) recomiendan la resección quirúrgica radical hasta encontrar un hueso vital. Sin embargo, debemos tener en cuenta que las resecciones marginales podrían dar lugar a una fractura patológica mandibular debido al escaso espesor resultante en el borde inferior mandibular.

El objetivo final de las resecciones es mediante una cirugía con un espesor de colgajo total retirar todo el tejido necrótico hasta unos márgenes quirúrgicos sanos, con un hueso viable macroscópicamente de buen aspecto y que tenga un correcto sangrado. Los bordes afilados deben ser suavizados y el cierre de tejidos blandos debe realizarse de forma que no exista tensión en los puntos de sutura (220).

Una fractura mandibular puede requerir resección del segmento comprometido y reconstrucción con injerto libre o microvascularizado, estabilizándolo con placas de osteosíntesis o de reconstrucción mandibular (220).

2.4. Engrosamiento de la cortical mandibular

Se ha observado, en investigaciones con animales, una inhibición del remodelamiento cortical mandibular tras el tratamiento con bisfosfonatos, y mediante técnicas histomorfométricas se ha mostrado un aumento en el espesor cortical en estos pacientes, por lo tanto su estudio mandibular podría ser útil en la detección de los cambios óseos (191).

En un estudio de casos y controles publicado por Torres y cols. (113) se midieron los cambios en la cortical ósea de 12 pacientes con osteonecrosis de los maxilares y se compararon con 66 controles. Los cambios se cuantificaron en la cortical mandibular debajo del agujero mentoniano mediante 3 mediciones. Se observaron alteraciones en la cortical mandibular en los pacientes con osteonecrosis de los maxilares.

Los bisfosfonatos muestran una acción sobre la cortical ósea permitiendo el crecimiento perióstico pero reduciendo la tasa de remodelado en el borde endocortical que es uno de los centros de acción de los bisfosfonatos (2).

En nuestra investigación, se observó un engrosamiento de la cortical mandibular en todos los pacientes con osteonecrosis de los maxilares (100%).

2.5. Pérdida de la delimitación entre la cortical y la medular mandibular

Según Arce *y cols.* (111) la correlación clínica de la osteonecrosis de los maxilares con los hallazgos de la TC muestra que la esclerosis focal está presente en estadios tempranos mediante la presencia de un hueso desorganizado, un patrón trabecular y una mala diferenciación cortico-medular. Mientras que en los estadios avanzados son típicas las reacciones periósticas y los secuestros óseos.

En un estudio realizado por Hutchinson *y cols.* (105) en 30 pacientes con ONM comparándolo con las TC_s de 14 pacientes controles sanos observaron un aumento del espesor de las corticales mandibulares, la lamina dura y de las paredes del conducto mandibular. También destacan una importante pérdida de la interfase cortico-medular en la mayoría de los pacientes. Según los autores (105) esta esclerosis condiciona que el hueso sea frágil con poca vascularización, susceptible a infecciones y osteomielitis.

Del mismo modo, según Bisdas *y cols.* (221) tras el estudio de las tomografías computarizadas, las principales características radiográficas halladas fueron las mencionadas anteriormente por Arce *y cols.* (111), incluyendo la interrupción del hueso cortical mediante una osteoesclerosis mixta junto con una zona de osteolisis.

En nuestro estudio radiográfico, en el 20% de los pacientes no era posible la separación franca o evidente entre la cortical y la medula mandibular, estando como solapadas y sin límites o interfase entre ellas, mientras que 24 casos (80%) sí que presentaban esta separación entre la cortical y la medular mandibular.

2.6. Secuestros óseos

La tomografía computarizada es una herramienta muy útil para la identificación de los márgenes de la ONM y la presencia de secuestros óseos; así como sus dimensiones y la proximidad a estructuras anatómicas importantes (54).

Las características principales de la osteonecrosis en las TC_s son los secuestros, la osteolisis, la periostitis reactiva, y la sinusitis; aunque no se han observado tan frecuentemente, ya que son más característicos de estadios avanzados de osteonecrosis.

Sin embargo, estudios recientes (222-225) informan de que el desbridamiento quirúrgico, si hay un secuestro que está separado del hueso basal de la mandíbula, así como el cierre primario son la clave para el tratamiento de la ONM, ya que tras sus estudios han observado que beneficia la erradicación de hueso necrótico en comparación con el tratamiento conservador.

En nuestro estudio, de los 30 pacientes analizados el 60% presentaban secuestros óseos, mientras que el 40% no los mostraban. Aunque debemos destacar que aquellos que lo presentaban se encontraban en estadios superiores y avanzados.

3. Tomografía por emisión de positrones (PET), Resonancia Magnética (RM) y Tomografía computarizada de haz cónico (CBCT)

También se han descrito otras técnicas de imagen como son tomografía por emisión de positrones-tomografía computarizada (CT-PET), la resonancia magnética (RM) o la tomografía computarizada de haz cónico (117,207,214).

El radiotrazador que más se utiliza en la PET es la ^{18}F -FDG (fluoruro desoxiglucosa) que es capaz de detectar cambios inflamatorios debido a que las células inflamatorias absorben glucosa. Asimismo, el trazador ^{18}F -NaF (F-fluoruro sódico) puede reflejar el metabolismo óseo existente y la presencia o ausencia de actividad osteoblástica en el hueso.

En un estudio de PET/TC con ambos trazadores y realizado en 48 ratas divididas en cuatro grupos según la administración: AZ+ DX (grupo1), AZ (grupo 2), DX (grupo 3), placebo (grupo4), tras 4 semanas después de realizarles una extracción dental mostraron un aumento de la absorción en los grupos 1 y 2 del F-FDG y una disminución en la adsorción del F-NaF en el lugar de la extracción en los grupos 1,2 y 3. Concluyeron que el ^{18}F -FDG el PET/TC puede mostrar una imagen más apropiada para el diagnóstico de la ONM y el ^{18}F -NaF PET/TC puede ser un indicador del riesgo de ONM antes de aparecer los signos clínicos. También cabe destacar que el diagnóstico mediante ^{18}F -FDG PET/TC puede ser útil para la diferenciación de la ONM de una osteolisis tumoral metastásica o la que puede producirse en pacientes con Mieloma Múltiple (226).

Según Kämmerer *y cols.* (227) la tomografía computarizada de haz cónico (CBTC) es superior a la ortopantomografía a la hora de determinar los cambios óseos de la ONM.

Estudios actuales (54,116,207) muestran que la ortopantomografía es una herramienta insuficiente a la hora de mostrar estos cambios óseos, sobre todo en los estadios iniciales de la ONM, siendo posible detectarlos con la CBTC. Se trataría de alteraciones estructurales iniciales como son la osteoesclerosis, el secuestro óseo, las alteraciones de la cortical y de la trabeculación ósea.

Asimismo, Barragan *y cols.* (228) estudiaron la utilidad del CBCT en el diagnóstico de las lesiones tanto preclínicas como clínicas de la ONM, mostrando la evolución natural de estas lesiones. Hallaron formación de áreas necróticas dentro del hueso trabecular en una mandíbula esclerosada. El "involucrum" que ellos describen como representando al hueso necrótico que se rodea de una circunferencia resortiva que aumenta en el tiempo, ya que

probablemente corresponde a células óseas en un intento de eliminar el hueso necrótico. Este “involucrum” puede crecer y seguir la vía de menor resistencia, como son las zonas linguales o áreas edéntulas, dando lugar a la exposición del secuestro óseo.

Coincidiendo con los autores anteriores, Guggenberger *y cols.* (229) destacan la baja irradiación del CBCT con respecto a la TC. Se basan, estos autores, en el análisis de parámetros como son el espesor del periostio, la esclerosis, las radiolucencias o la necrosis. Aunque lo más importante es que se pueden detectar cambios en la densidad ósea y estos pueden ser cuantificados calculando los valores de densidad ósea en ciertas áreas o volúmenes. Estos cambios pueden medirse en regiones 2D de interés (ROI) o en volúmenes de 3D de interés (VOI).

Tras su estudio, Guggenberger *y cols.* (229) concluyeron que la CBCT es muy útil para el diagnóstico y cuantificación de la ONM, destacando la adecuada valoración del grado de esclerosis ósea de los maxilares.

En nuestros pacientes no consideramos el realizar dichas técnicas ya que nos basamos en las ortopantomografías y en las tomografías computarizadas.

ESTADIOS DE LA OSTEONECROSIS POR BISFOSFONATOS

Recientemente Schiodt *y cols.* (209) propusieron una modificación de la clasificación de la ONM, incluyendo solo tres estadios: 1,2 y 3. Pero añadieron tres categorías más según la existencia o no de hueso expuesto. Esta clasificación eliminaría por tanto el estadio 0. Nosotros coincidimos, en base a lo visto en nuestros casos, con la propuesta de dichos autores.

Hutchinson *y cols.* (105) en su estudio investigaron si en el estadio 0 de ONM de 30 pacientes en tratamiento con bisfosfonatos, sin hueso expuesto pero con síntomas y signos eran sugestivos de ser un estadio 0. Se observaron alteraciones en las TC_s que ayudaban al diagnóstico. También se compararon con las características de las TC_s en 14 controles sin tratamiento con bisfosfonatos.

En los resultados de Hutchinson *y cols.* (105) se comprobó que diez de estos pacientes mostraron evidencias de esclerosis local o difusa en las áreas con sintomatología, la mayoría se extendían a áreas más allá de la zona de necrosis. La densidad de la esclerosis también variaba desde algodonosa a compacta, acompañada de una confluencia en la densidad de la cortical y en el hueso medular subyacente. En los casos de esclerosis difusa se apreció un engrosamiento de la cortical lingual y bucal, un resalte del conducto dentario, un aumento del espesor y esclerosis de la lámina dura, radiolucencias periradiculares, rotura de corticales, ausencia de osificación tras una extracción y persistencia de los alveolos vacíos.

Estos hallazgos de las TC_s en los pacientes con sospecha de estadio 0 fueron también observados en los casos en estadios 1-3. Por lo tanto, si que se observaron alteraciones en las TC_s de los pacientes en estadio 0, semejantes a las observadas cuando existía hueso expuesto (estadios 1-3).

DETERMINACIÓN PLASMÁTICA DE LOS NIVELES SÉRICOS DE RANKL Y OPG

Los bisfosfonatos interfieren con los procesos de remodelación ósea que son controlados por mediadores tales como RANKL, RANK y OPG. El descubrimiento del receptor activador del factor nuclear kappa β (RANK), el ligando RANK (RANKL) y la osteoprotegerina (OPG) mediante el sistema (RANK/RANKL/OPG) ha sido uno de los avances más importantes en la biología del hueso en la última década (11,36,230).

1. Ligando del receptor de activación nuclear Kappa β (RANKL)

El RANKL es un polipéptido de 317 aminoácidos, que pertenece a la superfamilia del factor de necrosis de tumoral (TNF). Es segregado por los fibroblastos, osteoblastos, así como por los linfocitos T activados (231).

Los bisfosfonatos son potentes inhibidores de los receptores RANKL. Estos fármacos afectan la expresión del RANKL que es un factor de diferenciación osteoblástico, siendo el responsable de inducir la reabsorción ósea por parte de los osteoclastos al unirse a su receptor RANK (Receptor Activador de NF- κ B), que se halla expresado en la membrana de dicho osteoclasto. Al impedir la interacción RANKL/RANK, se inhibe la formación, la función y la supervivencia de los osteoclastos, lo que a su vez provoca una disminución de la resorción ósea. Por eso, la disminución de los niveles de RANKL es importante en la terapéutica de procesos en los que hay fenómenos de reabsorción ósea (14).

Según el estudio publicado por Takayuki *y cols.* (232), el Zoledronato inhibe el receptor activador del factor nuclear kappa-B inducido por el ligando de diferenciación de los osteoclastos, a través de la supresión de la expresión del factor nuclear de c1 activado de células T y la anhidrasa carbónica 2. Por lo tanto, mediante este estudio se confirmó que el Zoledronato produce una clara disminución en los valores del RANKL.

Del mismo modo, en un estudio de Çankaya *y cols.* (231) de casos-controles en animales, se analizaron los cambios en los niveles del RANKL y de la OPG tras la aplicación mantenida de Zoledronato, y si estos hallazgos podían estar relacionados con la osteonecrosis de los maxilares. Observaron una disminución de los valores del RANKL en la mandíbula de los ratones en comparación con los controles, debido a una falta de la actividad osteoclástica que junto a la inhibición del mecanismo del RANKL podrían ser factores predisponentes para el desarrollo de la osteonecrosis de los maxilares. Estos datos fueron coincidentes con los del estudio publicado por Martini *y cols.* (233) en pacientes con enfermedad de Paget, donde analizaron los niveles plasmáticos de OPG y RANKL, antes y después del tratamiento con bisfosfonatos intravenosos. Tras 30 días de administración de fármacos intravenosos, observaron un ligero descenso en los niveles de RANKL.

Asimismo, en un artículo publicado por Kwak *ycols.* (234) informaron que el risedronato, que es un bisfosfonato oral, inhibe significativamente el RANKL y el Factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (M-CSF) mediante la diferenciación de los osteoclastos. Los autores anteriores explicaban que los efectos del risedronato en la diferenciación de osteoclastos pueden estar relacionados con una disminución en la expresión de RANKL o un aumento en la expresión de la osteoprotegerina sobre los osteoblastos.

Coincidiendo con las publicaciones mencionadas anteriormente, en nuestro estudio también hallamos diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,009$) entre los niveles del RANKL, con una media de 0,085 pmol/l en el grupo de pacientes con ONM, que son valores más bajos que los obtenidos en los grupos de pacientes que han tomado bisfosfonatos y no han desarrollado lesiones; cuyo valor es 0,118 pmol/l y en los controles sanos, cuya media es 0,101 pmol/l. Sin embargo, no hallamos diferencias significativas entre estos dos últimos grupos ($p > 0,216$).

Si analizamos la media de los niveles de RANKL en los pacientes con ONM que tomaban el fármaco debido a su osteoporosis esta fue de 0,084 pmol/l \pm 0,044, siendo inferior a la media de RANKL en los pacientes que tomaban el fármaco por motivos oncológicos y que fue de 0,083 \pm 0,030 pmol/l, siendo la $p > 0,05$. Debemos tener en cuenta que a pesar de que los bisfosfonatos intravenosos presentan una mayor potencia que los orales, los que tienen osteoporosis y han desarrollado lesiones, estuvieron tomando estos fármacos durante un largo periodo de tiempo, muy superior al del grupo oncológico.

Por motivos técnicos, tuvimos que desechar cuatro muestras de plasma del grupo de pacientes con ONM porque se encontraban contaminadas o en mal estado.

2. Osteoprotegerina (OPG)

Los efectos del RANKL se encuentran inhibidos por la osteoprotegerina (OPG) que es una proteína circulante, perteneciente a la superfamilia de los receptores de TNF, también segregada por los fibroblastos gingivales y las células del ligamento periodontal (87).

Cuando la OPG actúa como un receptor mediante el secuestro del RANKL, se inhibe la unión del RANKL al RANK, impidiendo el correcto desarrollo de los osteoclastos, afectando a la osteoclastogénesis (14).

En numerosos estudios efectuados en modelos animales a los que se les administraron bisfosfonatos (235,236) se ha demostrado que no sólo se produce el bloqueo del RANKL mediante una inhibición de la osteoclastogénesis y de la reabsorción ósea, sino que también el BF juega un papel importante en la desregulación del sistema RANK/RANKL/OPG. Ello es constatado en la fisiopatología de los múltiples trastornos en la remodelación ósea, tales

como la osteoporosis, la artritis reumatoide, la hipercalcemia maligna o las enfermedades óseas metastásicas.

Según los estudios publicados por Viereck *y cols.* (237) el pamidronato oral y el Zoledronato aumentan de manera significativa los niveles de OPG en el suero de los pacientes con osteoporosis. Del mismo modo, en una publicación de Çankaya *y cols.* (231) se estudió el mecanismo de acción de los bisfosfonatos en diferentes localizaciones óseas, mediante la técnica de ELISA. Obtuvieron un incremento de los niveles de OPG tanto en la mandíbula como en la tibia de los ratones, siendo mayores los niveles obtenidos en el maxilar, con una marcada inhibición osteoclástica. Sin embargo, mientras que en la tibia observaron un incremento de los niveles de RANKL, lo que indica un efecto compensatorio, resultado de una fisiología ósea normal. Por el contrario, existían niveles más bajos de RANKL en la mandíbula, lo que sugiere un mecanismo distinto de acción en los dos tejidos. Mossetti *y cols.* (238) en un estudio realizado en 42 pacientes con enfermedad de Paget, y tras la toma durante 120 días de risedronato, comprobaron también un incremento significativo en los niveles de OPG.

En un informe publicado por Martini *y cols.* (233) en pacientes con enfermedad de Paget a los que se les administraron bisfosfonatos por vía intravenosa, donde se analizaron los niveles de OPG y de RANKL antes y después del tratamiento, se detectó que los niveles de OPG aumentaban respecto a la línea base de tratamiento, alcanzando unas diferencias significativas mayores a los 3 y 6 meses de tratamiento.

Sin embargo, los mencionados autores Martini *y cols.* (233) hallaron que los niveles de RANKL disminuyeron de forma poco significativa a los 30 días de comenzar el tratamiento, lo que sugiere una falta de activación de los osteoclastos. Después, se mantuvieron estables a lo largo del periodo estudio, por lo que se obtuvieron datos menos significativos.

Pan *y cols.* (239) estudiaron el efecto que producía el ácido zoledrónico en la expresión del OPG y del RANKL en células similares a los osteoblastos procedentes de hueso humano. Hallaron que el fármaco no afectó, de manera significativa, a la expresión del gen OPG, pero sí que se produjo un aumento en la secreción de la proteína OPG y en contraposición una reducción en la expresión de la proteína transmembrana del RANKL.

Del mismo modo, Koch *y cols.* (240), estudiaron los efectos de Zoledronato, el ibandronato y el clodronato, según tres dosis diferentes, sobre la expresión del gen del RANKL y del OPG *in vitro*. Tras el estudio, observaron un incremento de los niveles de OPG de un modo significativo, tan solo en las dosis más altas de Zoledronato. En referencia al RANKL éste disminuyó en aquellos casos en los que se les administraron dosis menores de fármacos, sin embargo se produjo un aumento del RANKL en el grupo de pacientes con mayores dosis de Zoledronato.

En nuestro estudio hallamos diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,01$) entre los tres grupos que componían el estudio. Coincidiendo con los trabajos mencionados anteriormente, los mayores niveles de OPG los encontramos en el grupo de osteonecrosis de los maxilares, cuyo valor fue de 0,327 pmol/l, frente a los grupos de pacientes que habían tomado bisfosfonatos y no habían desarrollado lesiones; cuyo valor fue 0,028 pmol/l y los controles sanos, cuya media fue 0,269 pmol/l. No encontramos ninguna justificación a que los controles sanos tuviesen valores superiores a los del grupo de BF sin ONM.

Si analizamos la media de los niveles de OPG en los pacientes con ONM que tomaban el fármaco debido a su osteoporosis esta fue de $0,339 \pm 0,483$ pmol/l, siendo inferior a la media de OPG en los pacientes que toman el fármaco por motivos oncológicos es de $0,329 \pm 0,328$ pmol/l, si bien estas diferencias no fueron significativas ($p > 0,05$).

En la literatura científica no hemos encontrado publicaciones que analicen la asociación y posibles relaciones entre la exposición ósea en la ONM y otras variables como la edad, sexo, tipo de administración, localización de la ONM, factores locales y niveles plasmáticos de RANKL y de OPG. En nuestro estudio no hallamos dichas asociaciones o relaciones entre las anteriores variables, si bien si que observamos menores niveles de RANKL en el grupo de ONM que en el grupo control, y mayores niveles de OPG en el grupo con lesiones de ONM que en el grupo sano, tal y como hemos mencionado anteriormente y que coincide con lo esperable en pacientes que toman bisfosfonatos.

Por último, destacar que coincidiendo con la literatura científica (231,233,235,237, 239,240) se han encontrado correlaciones significativas entre los valores de OPG y RANKL ($p = 0,023$), comprobando que por cada aumento de un pmol/l de OPG el valor de RANKL disminuye 0,05.

FUTURAS LÍNEAS DE INVESTIGACIÓN

Han pasado más de diez años desde que se publicaron los primeros casos de ONM. La etiopatogenia de la osteonecrosis de los maxilares es a día de hoy en gran parte desconocida, a pesar de los hallazgos descritos en su fisiopatología o de los mecanismos implicados en ella. Por ello, el Instituto Nacional de Salud en Estados Unidos está financiando, en la actualidad, múltiples estudios para la investigación acerca de la fisiopatología de la osteonecrosis (241), aunque debería existir un mayor apoyo por parte de las agencias gubernamentales, compañías farmacéuticas y fundaciones, para ampliar los conocimientos.

De estos estudios saldrán nuevos e interesantes datos acerca del análisis de la hemostasis del hueso alveolar y la respuesta de este ante las terapias antirresortivas. Así como el conocimiento acerca del verdadero papel de los nuevos fármacos antiangiogénicos y su efecto sobre la curación de las lesiones óseas mandibulares.

Igualmente destacaremos la importancia del desarrollo de herramientas de evaluación del riesgo de aparición de lesiones de osteonecrosis, tal y como hemos visto anteriormente, para el establecimiento de un diagnóstico precoz.

Son múltiples los estudios en animales y en vitro para validar propuestas, tanto de prevención como de tratamiento, principalmente en animales como ratones, ratas, cerdos y perros. La mayoría de ellos son sometidos a extracciones dentales (197, 242, 243, 244,245) mientras que en otros se estimula la enfermedad periodontal y periapical para inducir lesiones parecidas a la osteonecrosis de los maxilares (196,198,199,200). Gracias a estos estudios se ha logrado un mejor conocimiento de los diversos aspectos clínicos, radiográficos e histológicos de la ONM.

No todos los pacientes con co-morbilidades y manejos médicos similares desarrollan osteonecrosis de la mandíbula; por lo tanto, la farmacogenómica puede influir en el riesgo de desarrollar osteonecrosis de los maxilares (36).

Se ha sugerido que la presencia de polimorfismos tales como la farnesil pirofosfato sintasa (76) o los genes del citocromo P450 y el CYP2C8, que es una enzima perteneciente al grupo del citocromo P450, que se halla involucrado en el metabolismo de los fármacos (77), pueden predisponer, en algunos individuos, a desarrollar futuras lesiones de osteonecrosis de los maxilares. Asimismo, Sarasquete *y cols.* (246) realizaron un estudio genómico para la identificación de polimorfismos de nucleótido único (SNP) asociados con el desarrollo de lesiones de ONM en pacientes con Mieloma Múltiple. Hallaron que la presencia del alelo T del SNP rs 1934951 en el gen CYP2C8, aumentaba el riesgo de desarrollar lesiones de osteonecrosis en pacientes con Mieloma Múltiple que habían sido tratadas con quimioterapia y trasplante de células madre en 12,5 veces.

Desde la publicación de Sarasqueta *ycols.* (246), se han publicado diversos estudios que describen polimorfismos de nucleótido único (SNP) que se encuentran asociados con el desarrollo de la osteonecrosis (247,248). La mayor parte de estos SNP estaban localizados dentro de las regiones del gen asociado con el recambio óseo, la formación de colágeno, o ciertas enfermedades metabólicas de los huesos.

Katz *ycols.* (247) presentaron una tasa de aparición de lesiones del 57% cuando los SNP estaban presentes en cinco genes que son los responsables de recambio óseo. En un amplio estudio del genoma, Nicoletti *ycols.* (248) informaron que los pacientes con un SNP en el gen RBMS3, se encontraban asociados con alteraciones en la densidad ósea y en la formación de colágeno; presentando 5,8 veces más riesgo de desarrollar osteonecrosis de los maxilares.

En una publicación acerca de los polimorfismos relacionados con la actividad del difosfato de farnesilo sintasa, que es una enzima específicamente inhibida por los bisfosfonatos, se estableció una correlación positiva entre la condición de portador y la osteonecrosis de los maxilares (76).

A escala del genoma se han realizado estudios de asociación de casos y controles en pacientes oncológicos, pero es un área que debe someterse a una exploración más profunda, ya que existen pocos estudios, y entre ellos hay múltiples contradicciones (247,248). Por lo tanto, y como conclusión se precisan más investigaciones analizando los aspectos genéticos en estos pacientes con ONM.

CONCLUSIONES

Tras el estudio clínico y radiográfico, así como tras la determinación plasmática de los niveles del RANKL y de OPG, en pacientes con osteonecrosis de los maxilares por bisfosfonatos comparándolos con controles, llegamos a las siguientes conclusiones:

1. La Osteonecrosis de los maxilares se observó más frecuentemente tras extracciones dentales, siendo la localización más importante la mandíbula. El estadio más prevalente fue el 2 y la exposición ósea predominó en el conjunto de la muestra sobre los pacientes sin exposición de hueso necrótico.
2. Tras el estudio radiográfico, en las tomografías computarizadas, las áreas con osteonecrosis de los maxilares presentaron los mayores niveles de densidad ósea y los menores valores se dieron en los pacientes sanos del grupo control, así como en las áreas contralaterales a la osteonecrosis.
3. Los niveles plasmáticos de RANKL, en pacientes con osteonecrosis de los maxilares, fueron significativamente inferiores a los valores obtenidos en el grupo control. Por el contrario, se observó un incremento en los valores plasmáticos de OPG en los pacientes con osteonecrosis en comparación con los controles sanos. Por cada incremento de 1 pmol/l de OPG, el valor de RANKL disminuía 0,05 pmol/l.
4. En el grupo de pacientes con osteonecrosis por bisfosfonatos se halló una asociación entre el modo de administración del fármaco y la presencia de una exposición ósea; existiendo más tendencia a la exposición del hueso necrótico en los pacientes que recibieron bisfosfonatos intravenosos que en los orales.
5. Por contra, no se encontró ningún tipo de asociación estadísticamente significativa, entre el modo de administración del fármaco y datos clínicos como la localización, el dolor, la presencia de fístulas intra o extraorales o con el estadio. Del mismo modo, la media de los niveles plasmáticos de RANKL y OPG tampoco mostraron diferencias significativas entre las dos formas de administración del bisfosfonato.
6. Ninguna de las siguientes variables analizadas: edad, sexo, tipo de administración, localización de la ONM, factores locales, densidad ósea en las TC_s y los niveles plasmáticos de RANKL y OPG, influyeron en la mayor o menor tendencia a desarrollar áreas de exposición de hueso necrótico.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Aapro MS. Management of bisphosphonates treatment in clinical practice. *Seminars in Oncol.* 2007;34:28-34.
2. Fleisch H. Bisphosphonates: mechanisms of action. *Endocr Rev.* 1998;19:80-100.
3. Lee MV, Fong EM, Singer FR, Guenette RS. Bisphosphonate treatment inhibits the growth of prostate cancer cells. *Cancer.* 2001;61:2602-8.
4. Boissier S, Ferreras M, Peyruchaud O, Magnetto S, Ebetino FH, Colombel M. Bisphosphonates inhibit breast and prostate carcinoma cell invasion, an early event in the formation of bone metastases. *Cancer Res.* 2000;60:2949-54.
5. Cyer B, Bauer DC. Oral bisphosphonates and upper gastrointestinal tract problems: what is the evidence?. *Mayo Clin Proc.* 2002;77:1031-43.
6. Fernandez-Tresguerres-Hernandez-Gil I, Alobera-Gracia MA, Del-Canto-Pingarron M, Blanco-Jerez L. Physiological bases of bone regeneration II. The remodeling process. *Med Oral Patol Oral CirBucal.* 2006;11:E151-7.
7. Prieto S. Control del metabolismo del calcio, fósforo y magnesio. En: Tresguerres JAF, ed. *Fisiología Humana*, 2ª ed. Madrid: McGraw-Hill-Interamericana; 1999. p.979-93.
8. Compston JE. Sex steroids and bone. *Physiol Rev.* 2001;81:419-47.
9. Lind M, Deleuran B, Thestrup-Pedersen K, Soballe K, Eriksen EF, Bunger C. Chemotaxis of human osteoblasts. Effects of osteotropic growth factors. *APMIS.* 1995;103:140-6.
10. Canalis E, McCarthy TL, Centrella M. The role of growth factors in skeletal remodeling. *Endocrinol Metab Clin North Am.* 1989;18:903-18.
11. Raisz LG. Bone cell biology: New approaches and unanswered questions. *J Bone Miner Res.* 1993;8:457-65.
12. Harvey S, Hull KL. Growth hormone: A paracrine growth factor?. *Endocrine.* 1998;7:267-79.
13. Hill PA, Reynolds JJ, Meikle MC. Osteoblasts mediate insulin-like growth factor-I and -II stimulation of osteoclasts formation and function. *Endocrinology.* 1995;136:124-31.
14. González J, Olmos JM. Fisiopatología de la osteoporosis y mecanismo de acción de la PTH. *Rev Osteoporos Metab Miner.* 2010;2:5-17.
15. Simonet WS, Lacey DL, Dunstan CR, Kelley M, Chang MS, Luethy R, et al. Osteoprotegerin: a novel secret protein involved in the regulation of bone density. *Cell.* 1997;89:309-19.
16. Doblare M, Garcia J.M. On the modeling bone tissue fracture and healing of the bone tissue. *Acta Científica Venezolana.* 2003;54:58-75.
17. Misch C. E. *Implantología Contemporánea*, 3ª ed. Barcelona, España: Elsevier; 2009. p.71-90.
18. Marx RE, Stern DS. Biopsy principles and techniques. *Oral and Maxillofacial Pathology: A rationale for diagnosis and treatment.* Quintessence; 2002:36-38.
19. Escobar López EA, López López J, Marques Soares MS, Chimenos Küstner E. Osteonecrosis de los maxilares asociada a bisfosfonatos: revisión sistemática. *Av. Odontoestomatol.* 2007;23:91-101.
20. Marx RE. Pamidronate (Aredia) and Zoledronate (Zometa) induced avascular necrosis of the jaws: a growing epidemic. *J Oral Maxillofac Surg.* 2003;61:1115-8.
21. Bagan JV, Jimenez Y, Diaz JM, Murillo J, Sanchis JM, Poveda R. Osteonecrosis of the jaws in intravenous bisphosphonate use: proposal for a modification of the clinical classification. *Oral Oncol.* 2009;45:645-6.
22. Giribone J, Catagnetto. Bisphosphonate related Osteonecrosis of the jaws: what the dentist must know today's: guidelines and protocols. *Odontoestomatología.* 2013;15:45-58.
23. Falk MJ, Heeger S, Lynch KA, Decaro KR, Bohach D, Gibson Ks. Intravenous bisphosphonate therapy in children with osteogenesis imperfecta. *Pediatrics.* 2003;111: 573-8.
24. Ruggiero SL, Mehrotra B, Rosenberg TJ, Engroff SL. Osteonecrosis of the jaws associated with the use of bisphosphonates: a review of 63 cases. *J Oral Maxillofac Surg.* 2004; 62:527-34.

25. Bagan JV, Murillo J, Jimenez Y, Poveda R, Milian MA, Sanchis JM. Avascular jaw osteonecrosis in association with cancer chemotherapy: series of 10 cases. *J Oral Pathol Med.* 2005;34:120–3.
26. Marx RE, Sawatari Y, Fortin M, Broumand V. Bisphosphonate-induced exposed bone (osteonecrosis/osteopetrosis) of the jaws: risk factors, recognition, prevention, and treatment. *J Oral Maxillofac Surg.* 2005;63:1567-75.
27. Sambrook P, Olver I, Goss A. Bisphosphonates and osteonecrosis of the jaw. *Aust Fam Physician.* 2006;35:801-3.
28. American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons position paper on bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws. Advisory Task Force on Bisphosphonate-Related Osteonecrosis of the Jaws, American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons. *J Oral Maxillofac Surg.* 2007;65:369-76.
29. Khosla S, Burr D, Cauley J, Dempster DW, Ebeling PR, Felsenberg D, et al. American Society for Bone and Mineral Research. Bisphosphonate-associated osteonecrosis of the jaw: report of a task force of the American Society for Bone and Mineral Research. *J Bone Miner Res.* 2007;22:1479-91.
30. Bedogni A, Fusco V, Agrillo A, Campisi G. Learning from experience. Proposal of a refined definition and staging system for bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw (BRONJ). *Oral Dis.* 2012;18:621-3.
31. Colella G, Campisi G, Fusco V. American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons position paper: Bisphosphonate-Related Osteonecrosis of the Jaws-2009 update: the need to refine the BRONJ definition. *J Oral Maxillofac Surg.* 2009;67:2698-9.
32. Junquera L, Gallego L. Nonexposed bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws: another clinical variant?. *J Oral Maxillofac Surg.* 2008;66:1516-7.
33. Mawardi H, Treister N, Richardson P, Anderson K, Munshi N, Faiella RA, et al. Sinus tracts—an early sign of bisphosphonate-associated osteonecrosis of the jaws?. *J Oral Maxillofac Surg.* 2009;67:593-601.
34. Patel S, Choyee S, Uyanne J, Nguyen AL, Lee P, Sedghizadeh PP, et al. Non-exposed bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw: a critical assessment of current definition, staging, and treatment guidelines. *Oral Dis.* 2012;18:625-32.
35. Ruggiero SL. Emerging concepts in the management and treatment of osteonecrosis of the jaw. *Oral Maxillofac Surg Clin North Am.* 2013;25:11-20.
36. Ruggiero SL, Dodson TB, Fantasia J, Goodday R, Aghaloo T, Mehrotra B. American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons. American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons position paper on medication-related osteonecrosis of the jaw--2014 update. *J Oral Maxillofac Surg.* 2014;72:1938-56.
37. Khan AA, Morrison A, Hanley DA, Felsenberg D, McCauley LK, O’Ryan F, et al. Diagnosis and management of osteonecrosis of the jaw: a systematic review and international consensus. *J Bone Miner Res.* 2015;30:3-23.
38. Zervas K, Verrou E, Teleioudis Z. Incidence, risk factors and management of osteonecrosis of the jaw in patients with multiple myeloma: a single-centre experience in 303 patients. *Br J Haematol.* 2006;134:620–3.
39. Cartsos VM, Zhu S, Zavras AI. Bisphosphonate use and the risk of adverse jaw outcomes: a medical claims study of 714,217 people. *J Am Dent Assoc.* 2008;139:23–30.
40. Raisz LG. Bone cell biology: New approaches and unanswered questions. *J Bone Miner Res.* 1993;8:457-65.
41. Powell D, Bowler C, Roberts T. Incidence of serious side effects with intravenous bisphosphonate: a clinical audit. *QJM.* 2012;105:965–71.
42. Tennis P, Rothman KJ, Bohn RL. Incidence of osteonecrosis of the jaw among users of bisphosphonates with selected cancers or osteoporosis. *Pharmacoevidemiol Drug Saf.* 2012;21:810–7.
43. Smith MR, Saad F, Coleman R. Denosumab and bonemetastasis-free survival in men with castration-resistant prostate-cancer: results of a phase 3, randomised, placebo-controlled trial. *Lancet.* 2012;379:39–46.
44. Troeltzsch M, Woodlock T, Krieglstein S, Steiner T, Messlinger K, Troeltzsch M. Physiology and pharmacology of nonbisphosphonate drugs implicated in osteonecrosis of the jaw. *J Can Dent Assoc.* 2012;78:c85.
45. Stumpe MR, Chandra RK, Yunus F. Incidence and risk factors of bisphosphonate associated osteonecrosis of the jaws. *Head Neck.* 2009;31:202-6.

46. Vahtsevanos K, Kyrgidis A, Verrou E. Longitudinal cohort study of risk factors in cancer patients of bisphosphonate related osteonecrosis of the jaw. *J Clin Oncol.* 2009;27:5356-62.
47. Tsao C, Darby I, Ebeling PR. Oral health risk factors for bisphosphonate-associated jaw osteonecrosis. *J Oral Maxillofac Surg.* 2013;71:1360-6.
48. Aguiar BD, Bohn SU, Cabrera Suarez MA, Aguiar MJ. Assessment of renal toxicity and osteonecrosis of the jaws in patients receiving zoledronic acid for bone metastasis. *Ann Oncol.* 2007;18:556-60.
49. Barasch A, Cunha-Cruz J, Curro FA. Risk factors for osteonecrosis of the jaws: a case-control study from the CONDOR dental PBRN. *J Dent Res.* 2011;90:439-44.
50. Hoff AO, Toth BB, Altundag K. Frequency and risk factors associated with osteonecrosis of the jaw in cancer patients treated with intravenous bisphosphonates. *J Bone Miner Res.* 2008;23:826-36.
51. Kyrgidis A, Vahtsevanos K, Koloutsos G, et al. Bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws: a case-control study of risk factors in breast cancer patients. *J Clin Oncol.* 2008;26:4634-8.
52. Allen MR, Pandya B, Ruggiero SL. Lack of correlation between duration of osteonecrosis of the jaw and sequestra tissue morphology: what it tells us about the condition and what it means for future studies. *J Oral Maxillofac Surg.* 2010;68:2730-4.
53. United States Food and Drug Administration: Background document for meeting of advisory committee for reproductive health drugs and drug safety and risk management advisory committee. September 9, 2011. Available at: <http://www.fda.gov/downloads/AdvisoryCommittees/CommitteesMeetingMaterials/drugs/DrugSafetyandRiskManagementAdvisoryCommittee/ucm270958.pdf>. Accessed February 10, 2014.
54. Bagan JV, Cibrian RM, Lopez J, Leopoldo-Rodado M, Carbonell E, Bagán L. Sclerosis in bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws and its correlation with the clinical stages: study of 43 cases. *Br Oral Maxillofac Surg.* 2015;53:257-62.
55. Thumbigere-Math V, Tu L, Huckabay S. A retrospective study evaluating frequency and risk factors of osteonecrosis of the jaw in 576 cancer patients receiving intravenous bisphosphonates. *AmClin Oncol.* 2012;35:386-92.
56. Jadu F, Lee L, Pharoah M, Reece D, Wang L. A retrospective study assessing the incidence, risk factors and comorbidities of pamidronate-related necrosis of the jaws in multiple myeloma patients. *Ann Oncol.* 2007;18:2015-9.
57. Grbic JT, Landesberg R, Lin SQ. Incidence of osteonecrosis of the jaw in women with postmenopausal osteoporosis in the health outcomes and reduced incidence with zoledronic acid once yearly pivotal fracture trial. *J Am Dent Assoc.* 2008;139:32-40.
58. Grbic JT, Black DM, Lyles KW. The incidence of osteonecrosis of the jaw in patients receiving 5 milligrams of zoledronic acid: data from the health outcomes and reduced incidence with zoledronic acid once yearly clinical trials program. *J Am Dent Assoc.* 2010;141:1365-70.
59. Sedghizadeh PP, Stanley K, Caligiuri M, Hofkes S, Lowry B, Shuler CF. Oral bisphosphonate use and the prevalence of osteonecrosis of the jaw: an institutional inquiry. *J Am Dent Assoc.* 2009;140:61-6.
60. Felsenberg D. Osteonecrosis of the jaw—a potential adverse effect of bisphosphonate treatment. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab.* 2006;2:662-3.
61. Lo JC, O’Ryan FS, Gordon NP. Prevalence of osteonecrosis of the jaw in patients with oral bisphosphonate exposure. *J OralMaxillofac Surg.* 2010;68:243-53.
62. Khan AA, Rios LP, Sandor GK. Bisphosphonate-associated osteonecrosis of the jaw in Ontario: a survey of oral and maxillofacial surgeons. *J Rheumatol.* 2011;38:1396-402.
63. Etmnan M, Aminzadeh K, Matthew IR, Brophy JM. Use of oral bisphosphonates and the risk of aseptic osteonecrosis: a nested case-control study. *J Rheumatol.* 2008;35:691-5.
64. Ulmner M, Jarnbring F, Torring O. Osteonecrosis of the jaw in Sweden associated with the oral use of bisphosphonate. *J OralMaxillofac Surg.* 2014;72:76-82.
65. Lyles KW, Colon-Emeric CS, Magaziner JS. Zoledronic acid and clinical fractures and mortality after hip fracture. *N Engl J Med.* 2007;357:1799-809.

66. Papapoulos S, Chapurlat R, Libanati C. Five years of denosumab exposure in women with postmenopausal osteoporosis: results from the first two years of the FREEDOM extension. *J Bone Miner Res.* 2012;27:694–701.
67. Mavrokokki T, Cheng A, Stein B, Goss A. Nature and frequency of bisphosphonate-associated osteonecrosis of the jaws in Australia. *J Oral Maxillofac Surg.* 2007;65:415–23.
68. Zavras AI, Zhu S. Bisphosphonates are associated with increased risk for jaw surgery in medical claims data: is it osteonecrosis?. *J Oral Maxillofac Surg.* 2006;64:917–23.
69. Pazianas M, Blumentals WA, Miller PD. Lack of association between oral bisphosphonates and osteonecrosis using jaw surgery as a surrogate marker. *Osteoporos Int.* 2008;19:773–9.
70. Fournier P, Boissier S, Filleul S. Bisphosphonates inhibit angiogenesis in vitro and testosterone-stimulated vascular regrowth in the ventral prostate in castrated rats. *Cancer Res.* 2002;62:6538–44.
71. Vincenzi B, Santini D, Dicuonzo G. Zoledronic acid-related angiogenesis modifications and survival in advanced breast cancer patients. *J Interferon Cytokine Res.* 2005;25:144–51.
72. Brunello A, Saia G, Bedogni A, Scaglione D, Basso U. Worsening of osteonecrosis of the jaw during treatment with sunitinib in a patient with metastatic renal cell carcinoma. *Bone.* 2009;44:173–5.
73. Guarneri V, Miles D, Robert N. Bevacizumab and osteonecrosis of the jaw: incidence and association with bisphosphonate therapy in three large prospective trials in advanced breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* 2010;122:181–8.
74. Reid IR, Bolland MJ, Grey AB. Is bisphosphonate-associated osteonecrosis of the jaw caused by soft tissue toxicity?. *Bone.* 2007;41:318.
75. Lin JH: Bisphosphonates: A review of their pharmacokinetic properties. *Bone.* 1996; 18:75.
76. Marini F, Tonelli P, Cavalli L. Pharmacogenetics of bisphosphonate-associated osteonecrosis of the jaw. *Front Biosci. Elite Ed.* 2011;3:364–70.
77. English BC, Baum CE, Adelberg DE. A SNP in CYP2C8 is not associated with the development of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw in men with castrate-resistant prostate cancer. *Ther Clin Risk Manag.* 2010;6:579–83.
78. Saad F, Brown JE, Van Poznak C. Incidence, risk factors, and outcomes of osteonecrosis of the jaw: Integrated analysis from three blinded active-controlled phase III trials in cancer patients with bone metastases. *Ann Oncol.* 2012;23:1341–7.
79. Boonyapakorn T, Schirmer I, Reichart PA. Bisphosphonate-induced osteonecrosis of the jaws: Prospective study of 80 patients with multiple myeloma and other malignancies. *Oral Oncol.* 2008;44:857.
80. Ficarra G, Beninati F, Rubino I. Osteonecrosis of the jaws in periodontal patients with a history of bisphosphonates treatment. *J Clin Periodontol.* 2005;32:1123.
81. Kunchur R, Need A, Hughes T. Clinical investigation of C-terminal cross-linking telopeptide test in prevention and management of bisphosphonate-associated osteonecrosis of the jaws. *J Oral Maxillofac Surg.* 2009;67:1167–73.
82. Froelich K, Radeloff A, Kohler C. Bisphosphonate-induced osteonecrosis of the external ear canal: a retrospective study. *Eur Arch Otorhinolaryngol.* 2011;268:1219–25.
83. Sieber P, Lardelli P, Kraenzlin CA, Kraenzlin ME, Meier C. Intravenous bisphosphonates for postmenopausal osteoporosis: safety profiles of zoledronic acid and ibandronate in clinical practice. *Clin Drug Investig.* 2013;33:117–22.
84. Migliorati CA, Saunders D, Conlon MS, Ingstad HK, Vaagen P, Palazzolo MJ. Assessing the association between bisphosphonate exposure and delayed mucosal healing after tooth extraction. *J Am Dent Assoc.* 2013;144:406–14.
85. Rogers MJ, Gordon S, Benford HL, Coxon FP, Luckman SP, Monkonen J, et al. Cellular and molecular mechanisms of action of bisphosphonates. *Cancer.* 2000;86:2961–78.
86. Yin G, Bai Y, Luo E. Angiogenic suppression of osteoclasts may play a role in developing bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw. *Med Hypotheses.* 2011;76:347–9.
87. Allen M. Bisphosphonates and Osteonecrosis of the Jaw: Moving from the bedside to the Bench. *Cells tissues Organs.* 2009;189:289–94.

88. Sedghizadeh PP, Kumar SK, Gorur A, Schaudinn C, Shuler CF, Costerton JW. Microbial biofilms in osteomyelitis of the jaw and osteonecrosis of the jaw secondary to bisphosphonate therapy. *J Am Dent Assoc.* 2009;140:1259–65.
89. Lesclous P, Abi NS, Carrel JP, Baroukh B, Lombardi T, Willi JP, et al. Bisphosphonate-associated osteonecrosis of the jaw: a key role of inflammation?. *Bone.* 2009;45:843-52.
90. Nair SP, Meghji S, Wilson M, Reddi K, White P, Henderson B. Bacterially induced bone destruction: mechanisms and misconceptions. *Infect Immun.* 1996;64:2371–80.
91. Hansen T, Kunkel M, Weber A. Osteonecrosis of the jaws in patients treated with bisphosphonates—Histomorphologic analysis in comparison with infected osteoradionecrosis. *J Oral Pathol Med.* 2006;35:155.
92. Kos M, Junka A, Smutnicka D. Pamidronate enhances bacterial adhesion to bone hydroxyapatite. Another puzzle in the pathology of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw?. *J Oral Maxillofac Surg.* 2013;71:1010.
93. McLean RR. Proinflammatory cytokines and osteoporosis. *Curr Osteoporos Rep.* 2009; 7:134-9.
94. Fernández I, Alobera MA, Del Canto M, Blanco L. Physiological bases of bone regeneration I. Histology and physiology of bone tissue. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* 2006;11:47-51.
95. Carrillo de Albornoz Sainz A, García Kass A, Bascones Martínez A. Papel de la IL-6 y TNF- α en la enfermedad periodontal. *Av Periodon Implantol.* 2006;18:83-9.
96. Stewart, R. Marsden, P. Biologic control of the tumor necrosis factor and interleukin-1 signaling cascade. *Am J Dis.* 1995;25:954–66.
97. Tsurushima H, Kokuryo S, Sakaguchi O, Tanaka J, Tominaga K. Bacterial promotion of bisphosphonate-induced osteonecrosis in Wistar rats. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2013;42:1481-7.
98. Delmas PD. The use of bisphosphonates in the treatment of osteoporosis. *Curr Opin Rheumatol.* 2005;17:462.
99. Bagán JV. Osteonecrosis de los maxilares por bisfosfonatos. Valencia: Medicina Oral, S.L.; 2008. p.33-40.
100. Mikán F, Oliveros WD. Osteoclastogénesis y enfermedades óseas osteoclastogenesis and bone diseases. *Rev.fac.med.* 2007;15:2.
101. Tiranathanagul S, Yongchaitrakul T, Pattamapun K, Pavasant P. Actinobacillus actinomycetemcomitans lipopolysaccharide activates matrix metalloproteinase-2 and increases receptor activator of nuclear factor kappaB ligand expression in human periodontal ligament cells. *J Periodontol.* 2004;75:1647-54.
102. Black DM, Reid IR, Boonen S. The effect of 3 versus 6 years of zoledronic acid treatment of osteoporosis: A randomized extension to the HORIZON-Pivotal Fracture Trial (PFT). *J Bone Miner Res.* 2012;27:243-54.
103. Brown JJ, Ramalingam L, Zacharin MR. Bisphosphonate-associated osteonecrosis of the jaw: Does it occur in children?. *Clin Endocrinol.* 2008;68:863-7.
104. Dixon RB, Tricker ND, Garetto LP. Bone turnover in elderly canine mandible and tibia. *J Dent Res.* 1997;76:336-9.
105. Hutchinson M, O’Ryan F, Chavez V. Radiographic findings in bisphosphonate-treated patients with stage 0 disease in the absence of bone exposure. *J Oral Maxillofac Surg.* 2010;68:2232–40.
106. O’Ryan FS, Khoury S, Liao W. Intravenous bisphosphonate related osteonecrosis of the jaw: bone scintigraphy as an early indicator. *J Oral Maxillofac Surg.* 2009;67:1363–72.
107. Swei Y. Radiographic findings of bisphosphonate-related osteomyelitis of the jaw: investigation of the diagnostic points by comparison with radiation osteomyelitis, suppurative osteomyelitis, and diffuse sclerosing osteomyelitis. *Oral Radiol.* 2013;29:121–34.
108. White S, Pharoah M. The evolution and application of dental maxillofacial imaging modalities. *Dent Clin North Am.* 2008;52:689-705.
109. Phal PM, Myall RW, Assael LA, Weissman JL. Imaging findings of bisphosphonate-associated osteonecrosis of the jaws. *AJNR Am J Neuroradiol.* 2007;28:1139–45.
110. Treister NS, Friedland B, Woo SB. Use of cone-beam computerized tomography for evaluation of bisphosphonate-associated osteonecrosis of the jaws. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2010;109:753–64.

111. Arce K, Assael LA, Weissman JL, Markiewicz MR. Imaging findings in bisphosphonate-related osteonecrosis of jaws. *J Oral Maxillofac Surg.* 2009;67:75–84.
112. Dore F, Filippi L, Biasotto M, Chiandussi S, Cavalli F, Di LR. Bone scintigraphy and SPECT/CT of bisphosphonate-induced osteonecrosis of the jaw. *J Nucl Med.* 2009;50:30–5.
113. Torres SR, Chen CS, Leroux BG, Lee PP, Hollender LG, Schubert MM. Fractal dimension evaluation of cone beam computed tomography in patients with bisphosphonate-associated osteonecrosis. *Dentomaxillofac Radiol.* 2011;40:501–5.
114. Bagán Sebastián JV. *Medicina y Patología Bucal.* Valencia: Medicina Oral S.L.; 2013. p.433.
115. Tetradis S, Anstey P, Graff-Radford S. Cone beam computed tomography in the diagnosis of dental disease. *J Calif Dent Assoc.* 2010;38:27–32.
116. Bianchi SD, Scoletta M, Cassione FB, Migliaretti G, Mozzati M. Computerized tomographic findings in bisphosphonate-associated osteonecrosis of the jaw in patients with cancer. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2007;104:249–58.
117. Stockmann P, Hinkmann FM, Lell MM. Panoramic radiograph, computed tomography or magnetic resonance imaging. Which imaging technique should be preferred in bisphosphonate-associated osteonecrosis of the jaw?. A prospective clinical study. *Clin Oral Investig.* 2010;14:311–7.
118. Chiandussi S, Biasotto M, Dore F, Cavalli F, Cova MA, Di Lenarda R. Clinical and diagnostic imaging of bisphosphonate-associated osteonecrosis of the jaws. *Dentomaxillofac Radiol.* 2006;35:236–43.
119. Van den Wyngaert T, Huizing MT, Fossion E, Vermorcken JB. Prognostic value of bone scintigraphy in cancer patients with osteonecrosis of the jaw. *Clin Nucl Med.* 2011;36:17–20.
120. Wilde F, Steinhoff K, Frerich B. Positron-emission tomography imaging in the diagnosis of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2009;107:412–9.
121. Tyndall DA, Price JB, Tetradis S, Ganz SD, Hildebolt C, Scarfe WC. Position statement of the American Academy of Oral and Maxillofacial Radiology on selection criteria for the use of radiology in dental implantology with emphasis on cone beam computed tomography. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol.* 2012;113:817–26.
122. Ruggiero SL, Fantasia J, Carlson E. Bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw: background and guidelines for diagnosis, staging and management. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2006;102:433–41.
123. McMahon RE, Bouquot JE, Glueck CJ, Griep JA, Adams WR, Spolnik KJ. Staging bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw should include early stages of disease. *J Oral Maxillofac Surg.* 2007;65:1899–900.
124. Yoneda T, Hagino H, Sugimoto T, Ohta H, Takahashi S, Soen S. Bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw: position paper from the Allied Task Force Committee of Japanese Society for Bone and Mineral Research, Japan Osteoporosis Society, Japanese Society of Periodontology, Japanese Society for Oral and Maxillofacial Radiology, and Japanese Society of Oral and Maxillofacial Surgeons. *J Bone Miner Metab.* 2010;28:365–83.
125. Bagan JV, Hens-Aumente E, Leopoldo-Rodado M, Poveda-Roda R, Bagan L. Bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws: study of the staging system in a series of clinical cases. *Oral Oncol.* 2012;48:753–7.
126. Bagan J, Peydró A, Calvo J, Leopoldo M, Jiménez Y, Bagan L. Medication-related osteonecrosis of the jaw associated with bisphosphonates and denosumab in osteoporosis. *Oral Dis.* 2016 Jan 28. doi: 10.1111/odi.12447
127. Yamashita J, McCauley LK. Antiresorptives and osteonecrosis of the jaw. *J Evid Based Dent Pract.* 2012;12:233.
128. Malden N, Lopes V. An epidemiological study of alendronate-related osteonecrosis of the jaws. A case series from the south-east of Scotland with attention given to case definition and prevalence. *J Bone Miner Metab.* 2012;30:171–82.
129. Taylor T, Bryant C, Popat S. A study of 225 patients on bisphosphonates presenting to the bisphosphonate clinic at King's College Hospital. *Br Dent J.* 2013;214:E18.
130. Malden N, Lopes V. An epidemiological study of alendronate-related osteonecrosis of the jaws. A case series from the south-east of Scotland with attention given to case definition and prevalence. *J Bone Miner Metab.* 2012;30:171–82.
131. Vandone AM, Donadio M, Mozzati M. Impact of dental care in the prevention of bisphosphonate-associated osteonecrosis of the jaw: A single-center clinical experience. *Ann Oncol.* 2012;23:193.

132. Bonacina R, Mariani U, Villa F. Preventive strategies and clinical implications for bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw: A review of 282 patients. *J Can Dent Assoc.* 2011;77:b147.
133. Hellstein JW, Adler RA, Edwards B. Managing the care of patients receiving antiresorptive therapy for prevention and treatment of osteoporosis: Executive summary of recommendations from the American Dental Association Council on Scientific Affairs. *J Am Dent Assoc.* 2011;142:1243.
134. Damm DD, Jones DM. Bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws: A potential alternative to drug holidays. *Gen Dent.* 2013;61:33.
135. Silverman L, Adachi J, Dennison E. Bisphosphonate drug holidays: we reap what we sow. *Osteoporosis International : A Journal Established as Result of Cooperation between the European Foundation for Osteoporosis and the National Osteoporosis Foundation of the USA.* 2016;27:849-52.
136. Ferlito S, Puzzo S, Liardo C. Preventive protocol for tooth extractions in patients treated with zoledronate: a case series. *J Oral Maxillofac Surg.* 2011;69:e1-4.
137. Kunchur R, Goss AN. The oral health status of patients on oral bisphosphonates for osteoporosis. *Aust Dent J.* 2008;53:354-7.
138. Francini F, Pascucci A, Francini E. Osteonecrosis of the jaw in patients with cancer who received zoledronic acid and bevacizumab. *J Am Dent Assoc.* 2011;142:506-13.
139. Khan AA, Sandor GK, Dore E. Bisphosphonate associated osteonecrosis of the jaw. *J Rheumatol.* 2009;36:478-90.
140. Khan AA, Sandor GK, Dore E. Canadian consensus practice guidelines for bisphosphonate associated osteonecrosis of the jaw. *J Rheumatol.* 2008;35:1391-7.
141. Ortega C, Montemurro F, Faggiuolo R. Osteonecrosis of the jaw in prostate cancer patients with bone metastases treated with zoledronate: a retrospective analysis. *Acta Oncol.* 2007;46:664-8.
142. Moretti F, Pelliccioni GA, Montebugnoli L, Marchetti C. A prospective clinical trial for assessing the efficacy of a minimally invasive protocol in patients with bisphosphonate-associated osteonecrosis of the jaws. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2011;112:777-82.
143. Bashutski JD, Eber RM, Kinney JS. Teriparatide and osseous regeneration in the oral cavity. *N Engl J Med.* 2010;363:2396-405.
144. Iwamoto J, Yago K, Sato Y, Matsumoto H. Teriparatide therapy for bisphosphonate-associated osteonecrosis of the jaw in an elderly Japanese woman with severe osteoporosis. *Clin Drug Investig.* 2012;32:547-53.
145. Ripamonti CI, Cislaghi E, Mariani L, Maniezzo M. Efficacy and safety of medical ozone (O₃) delivered in oil suspension applications for the treatment of osteonecrosis of the jaw in patients with bone metastases treated with bisphosphonates: preliminary results of a phase I-II study. *Oral Oncol.* 2011;47:185-90.
146. Cella L, Oppici A, Arbasì M. Autologous bone marrow stem cell intralesional transplantation repairing bisphosphonate related osteonecrosis of the jaw. *Head Face Med.* 2011;7:16.
147. Epstein MS, Wicknick FW, Epstein JB, Berenson JR, Gorsky M. Management of bisphosphonate-associated osteonecrosis: pentoxifylline and tocopherol in addition to antimicrobial therapy. An initial case series. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2010;110:593-6.
148. Ziebart T, Koch F, Klein MO. Geranylgeraniol - a new potential therapeutic approach to bisphosphonate associated osteonecrosis of the jaw. *Oral Oncol.* 2011;47:195-201.
149. Vescovi P, Manfredi M, Merigo E. Surgical approach with Er:YAG laser on osteonecrosis of the jaws (ONJ) in patients under bisphosphonate therapy (BPT). *Lasers Med Sci.* 2010;25:101-13.
150. Vescovi P, Merigo E, Meleti M, Manfredi M, Guidotti R, Nammour S. Bisphosphonates-related osteonecrosis of the jaws: a concise review of the literature and a report of a single-centre experience with 151 patients. *J Oral Pathol Med.* 2012;41:214-21.
151. Fatema CN, Sato J, Yamazaki Y, Hata H, Hattori N, Shiga T. FDG-PET may predict the effectiveness of hyperbaric oxygen

- therapy in a patient with bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw: report of a case. *Odontology*. 2015;103:105-8.
152. Wilde F, Heufelder M, Winter K. The role of surgical therapy in the management of intravenous bisphosphonates-related osteonecrosis of the jaw. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2011;111:153–63.
153. Atalay B, Yalcin S, Emes Y. Bisphosphonate-related osteonecrosis: laser-assisted surgical treatment or conventional surgery?. *Lasers Med Sci*. 2011;26:815–23.
154. Martins MA, Martins MD, Lascala CA. Association of laser phototherapy with PRP improves healing of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws in cancer patients: a preliminary study. *Oral Oncol*. 2012;48:79–84.
155. Mozzati M, Gallesio G, Arata V, Pol R, Scoletta M. Platelet-rich therapies in the treatment of intravenous bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw: a report of 32 cases. *Oral Oncol*. 2012;48:469–74.
156. Hoefert S, Eufinger H. Relevance of a prolonged preoperative antibiotic regime in the treatment of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw. *J Oral Maxillofac Surg*. 2011;69:362–80.
157. Freiburger JJ, Padilla-Burgos R, McGraw T. What is the role of hyperbaric oxygen in the management of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw: a randomized controlled trial of hyperbaric oxygen as an adjunct to surgery and antibiotics. *J Oral Maxillofac Surg*. 2012;70:1573–83.
158. Seth R, FutranND, AlamDS. Outcomes of vascularized bone graft reconstruction of the mandible in bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws. *Laryngoscope*. 2010; 120:2165.
159. Engroff SL, Kim DD: Treating bisphosphonate osteonecrosis of the jaws: Is there a role for resection and vascularized reconstruction?. *J Oral Maxillofac Surg*. 2007;65:2374.
160. Hortobagyi GN, Theriault RL, Lipton A. Long-term prevention of skeletal complications of metastatic breast cancer with pamidronate. Protocol 19 Aredia Breast Cancer Study Group. *J Clin Oncol*. 1998;16:2038.
161. Hillner BE, Ingle JN, Chlebowski RT. American Society of Clinical Oncology 2003 update on the role of bisphosphonates and bone health issues in women with breast cancer. *J Clin Oncol*. 2003;21:4042.
162. Letocha AD, Cintas HL, Troendle JF. Controlled trial of pamidronate in children with types III and IV osteogenesis imperfecta confirms vertebral gains but not short-term functional improvement. *J Bone Miner Res*. 2005;20:977.
163. Landesberg R, Woo V, Cremers S. Potential pathophysiological mechanisms in osteonecrosis of the jaw. *Ann N Y Acad Sci*. 2011;1218:62.
164. Bagan J, Sheth CC, Soria JM, Margaix M, Bagan L. Bisphosphonates-related osteo-necrosis of the jaws: a preliminary study of salivary interleukins. *J Oral Pathol Med*. 2013;42:405-8.
165. Bagan J, Sáez GT, Tormos MC, Hens E, Terol MJ, Bagan L y cols. Interleukin-6 concentration changes in plasma and saliva in bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws. *Oral Dis*. 2014;20:446-52.
166. Mozzati M, Martinasso G, Maggiora M, Scoletta M, Zambelli M, Carossa S. Oral mucosa produces cytokines and factors influencing osteoclast activity and endothelial cell proliferation, in patients with osteonecrosis of jaw after treatment with zoledronic acid. *Clin Oral Investig*. 2013;17:1259-66.
167. Treister N, Sheehy N, Bae EH. Dental panoramic radiographic evaluation in bisphosphonate-associated osteonecrosis of the jaws. *Oral Dis*. 2009;15:88–92.
168. <http://imagej.nih.gov/ij>
169. Bagan L, Sáez GT, Tormos MC, Labaig-Rueda C, Murillo-Cortes J, Bagan JV. Salivary and serum interleukin-6 levels in proliferative verrucous leukoplakia. *Clin Oral Investig*. 2015 Aug 9. [Epub ahead of print]
170. Pavlakis N, Schmidt R, Stockler M. Bisphosphonates for breast cancer. *Cochrane Database Syst Rev*. 2005;3:CD003474.
171. Aapro M, Abrahamsson PA, Body JJ. Guidance on the use of bisphosphonates in solid tumours: recommendations of an international expert panel. *Ann Oncol*. 2008;19:420–32.
172. Bamias A, Kastiris E, Bamia C. Osteonecrosis of the jaw in cancer after treatment with bisphosphonates: Incidence and risk factors. *J Clin Oncol*. 2005;23:8580-7.

173. Yamazaki T, Yamori M, Ishizaki T. Increased incidence of osteonecrosis of the jaw after tooth extraction in patients treated with bisphosphonates: A cohort study. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2012;41:1397.
174. Felsenberg D, Hoffmeister B. Necrosis of the jaw after highdose bisphosphonate therapy. *Dtsch Arztebl.* 2006;103:3078-84
175. Kos M. Incidence and risk predictors for osteonecrosis of the jaw in cancer patients treated with intravenous bisphosphonates. *Arch Med Sci.* 2015;11:319-24.
176. Fizazi K, Carducci M, Smith M. Denosumab versus zoledronic acid for treatment of bone metastases in men with castration-resistant prostate cancer: A randomised, doubleblind study. *Lancet.* 2011;377:813.
177. Stopeck AT, Lipton A, Body JJ. Denosumab compared with zoledronic acid for the treatment of bone metastases in patients with advanced breast cancer: a randomized, double-blind study. *J Clin Oncol.* 2010;28:5132-9.
178. Hirshberg A, Leibovich P, Buchner A. Metastatic tumors to the jawbones: Analysis of 390 cases. *J Oral Pathol Med.* 1994;23:337.
179. Melo MD, Obeid G. Osteonecrosis of the jaws in patients with a history of receiving bisphosphonate therapy: strategies for prevention and early recognition. *J Am Dent Assoc* 2005;136:1675-81.
180. Badros A, Weikel D, Salama A, Goloubeva O, Schneider A, Rapoport A. Osteonecrosis of the Jaw in Multiple Myeloma Patients: Clinical Features and Risk Factors. *Journal of Clinical Oncology.* 2006;24:945-52.
181. Baroncelli GI, Bertelloni S. The use of bisphosphonates in pediatrics. *Horm. Res. Paediatr.* 2014;82:290–302.
182. Saad F, Gleason DM, Murray R. Long-term efficacy of zoledronic acid for the prevention of skeletal complications in patients with metastatic hormone-refractory prostate cancer. *J Natl Cancer Inst.* 2004;96:879.
183. Saad F, Gleason DM, Murray R. A randomized, placebocontrolled trial of zoledronic acid in patients with hormonerefractory metastatic prostate carcinoma. *J Natl Cancer Inst.* 2002;94:1458.
184. Rosen L, Gordon D, Tchekmedyan S, Yanagihara R, Hirsh V, Krzakowski M. Zoledronic acid versus placebo in the treatment of skeletal metastases in patients with lung cancer and other solid tumors: a phase III, double-blind, randomized trial-the Zoledronic Acid Lung Cancer and Other Solid Tumors Study Group. *J Clin Oncol.* 2003;15:3150-7.
185. Berenson JR, Lichtenstein A, Porter L. Long-term pamidronato treatment of advanced multiple myeloma patients reduces skeletal events. *Myeloma Aredia Study Group.* *J Clin Oncol.* 1998;16:593.
186. Lacy M, Dispenzieri A, Gertz MA, Greipp PR, Gollbach KL, Hayman SR. Mayo clinic consensus statement for the use of bisphosphonates in multiple myeloma. *Mayo Clin Proc.* 2006;8:1047-53.
187. Vestergaard P, Schwartz K, Rejnmark L, Mosekilde L, Pinholt EM. Oral bisphosphonate use increases the risk for inflammatory jaw disease: a cohort study. *J Oral Maxillofac Surg.* 2012;70:821–9.
188. Mozzati M, Arata V, Gallesio G. Tooth extraction in patients on zoledronic acid therapy. *Oral Oncol.* 2012;48:817.
189. Grant BT, Amenedo C, Freeman K, Kraut RA. Outcomes of placing dental implants in patients taking oral bisphosphonates: a review of 115 cases. *J Oral Maxillofac Surg.* 2008;66:223-30.
190. Physicians' Desk Reference. 57th ed. Montvale, NJ: Medical Economics; 2003.
191. Allen MR, Burr DB. The pathogenesis of bisphosphonaterelated osteonecrosis of the jaw: So many hypotheses, so few data. *J Oral Maxillofac Surg.* 2009;67:61.
192. Tsao C, Darby I, Ebeling PR. Oral health risk factors for bisphosphonate-associated jaw osteonecrosis. *J Oral Maxillofac Surg.* 2013;71:1360.
193. Allen MR, Ruggiero SL. Higher bone matrix density exists in only a subset of patients with bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw. *J Oral Maxillofac Surg.* 2009;67:1373–7.
194. Sharma D, Ivanovski S, Slevin M. Bisphosphonate-related osteonecrosis of jaw (BRONJ): diagnostic criteria and possible pathogenic mechanisms of an unexpected anti-angiogenic side effect. *Vasc Cell.* 2013;5:1–5.
195. Fedele S, Porter SR, D'Aiuto F. Nonexposed variant of bisphosphonate-associated osteonecrosis of the jaw: a case series. *Am J Med.* 2010;123:1060–4.

196. Aghaloo TL, Kang B, Sung EC. Periodontal disease and bisphosphonates induce osteonecrosis of the jaws in the rat. *J Bone Miner Res.* 2011;26:1871.
197. Lopez-Jornet P, Camacho-Alonso F, Martinez-Canovas A. Perioperative antibiotic regimen in rats treated with pamidronate plus dexamethasone and subjected to dental extraction: A study of the changes in the jaws. *J Oral Maxillofac Surg.* 2011;69:2488.
198. Aguirre JI, Akhter MP, Kimmel DB. Oncologic doses of zoledronic acid induce osteonecrosis of the jaw-like lesions in rice rats (*Oryzomys palustris*) with periodontitis. *J Bone Miner Res.* 2012;27:2130.
199. Gotcher JE, Jee WS. The progress of the periodontal syndrome in the rice rat. I. Morphometric and autoradiographic studies. *J Periodontal Res.* 1981;16:275.
200. Kang B, Cheong S, Chaichanasakul T. Periapical disease and bisphosphonates induce osteonecrosis of the jaws in mice. *J Bone Miner Res.* 2013;28:1631.
201. Walter C, Laux C, Sagheb K. Radiologic bone loss in patients with bisphosphonate-associated osteonecrosis of the jaws: a case-control study. *Clin Oral Investig.* 2014;18:385-90.
202. Ripamonti CI, Maniezzo M, Campa T, Fagnoni E, Brunelli C, Saibene G. Decreased occurrence of osteonecrosis of the jaw after implementation of dental preventive measures in solid tumour patients with bone metastases treated with bisphosphonates. The experience of the National Cancer Institute of Milan. *Ann Oncol.* 2009;20:137-45.
203. Han X, Lin X, Yu X, Lin J, Kawai T, LaRosa KB, et al. Porphyromonas gingivalis infection-associated periodontal bone resorption is dependent on receptor activator of NF- κ B ligand. *Infect Immun.* 2013;81:1502-9.
204. Hikita H, Miyazawa K, Tabuchi M, Kimura M, Goto S. Bisphosphonate administration prior to tooth extraction delays initial healing of the extraction socket in rats. *J Bone Miner Metab.* 2009;27:663-72.
205. Franco-Preto E, Pacheco M, Moreno A, Messa O, Gnecco J. Bisphosphonate-induced osteonecrosis of the jaws: clinical, imaging, and histopathology findings. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol.* 2014;118:408-17.
206. Maurer P, Sandulescu T, Kriwalsky MS. Bisphosphonate-related osteonecrosis of the maxilla and sinusitis maxillaris. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2011;40:285-91.
207. Raje N, Woo SB, Hande K, et al. Clinical, radiographic, and biochemical characterization of multiple myeloma patients with osteonecrosis of the jaw. *Clin Cancer Res.* 2008;14:2387-95.
208. Bedogni A, Fedele S, Bedogni G, Scoletta M, Favia G, Colella G. Staging of osteonecrosis of the jaw requires computed tomography for accurate definition of the extent of bony disease. *The British Journal of Oral & Maxillofacial Surgery.* 2014;52:603-8.
209. Schiodt M, Reibel J, Oturai P. Comparison of nonexposed and exposed bisphosphonate-induced osteonecrosis of the jaws: A retrospective analysis from the Copenhagen cohort and a proposal for an updated classification system. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol.* 2014;117:204-13.
210. Takaishi Y, Ikeo T, Nakajima M. A pilot case-control study on the alveolar bone density measurement in risk assessment for bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw. *Osteoporos Int.* 2010;21:815-25.
211. Rocha GC, Jaguar GC, Moreira CR. Radiographic evaluation of maxillofacial region in oncology patients treated with bisphosphonates. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol.* 2012;114:S19-25.
212. Gallego L, Junquera L, Pelaz A, García-Consuegra L, Alvarez-Arenal A, Costilla S. Sinus Mucosal Thickening in Bisphosphonate-Related Osteonecrosis of the Jaws: A Case-Control Study. *Orl.* 2014;76:199-206.
213. Rugani P, Luschin G, Jakse N. Prevalence of bisphosphonate-associated osteonecrosis of the jaw after intravenous zoledronate infusions in patients with early breast cancer. *Clin Oral Investig.* 2014;18:401-7.
214. Popovic KS, Kocar M. Imaging findings in bisphosphonate-induced osteonecrosis of the jaws. *Radiol Oncol.* 2010;44:215-9.
215. Fleisher KE, Welch G, Kottal S. Predicting risk for bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws: CTX versus radiographic markers. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2010;110:509-16.

216. Elad S, Gomori MJ, Ben-Ami N, Friedlander-Barenboim S, Regev E, Lazarovici TS. Bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw: clinical correlations with computerized tomography presentation. *Clin Oral Investig*. 2010;14:43-50.
217. Hamada H, Matsuo A, Koizumi T. A simple evaluation method for early detection of bisphosphonate-related. *J Cranio-maxillofac Surg*. 2014;42:924-9.
218. Bedogni A, Fedele S, Bedogni G, Scoletta M, Favia G, Colella G. Staging of osteonecrosis of the jaw requires computed tomography for accurate definition of the extent of bony disease. *The British Journal of Oral & Maxillofacial Surgery*. 2014;52:603-8.
219. Abu-Id MH, Warnke PH, Gottschalk J. "Bis-phossy jaws"— High and low risk factors for bisphosphonate-induced osteonecrosis of the jaws. *J Craniomaxillofac Surg*. 2008;36:95.
220. Saad F, Lipton A, Cook R, Chen YM, Smith M, Coleman R. Pathologic fractures correlate with reduced survival in patients with malignant bone disease. *Cancer*. 2007;110:1860-7.
221. Bisdas S, Chambron Pinho N, Smolarz A. Bisphosphonate induced osteonecrosis of the jaws: CT and MRI spectrum of findings in 32 patients. *Clin Radiol*. 2008;63:71.
222. Holzinger D, Seemann R, Klug C, Ewers R, Millesi G, Baumann A. Long-term success of surgery in bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws (BRONJs). *Oral Oncol*. 2013 49:66-70.
223. Graziani F, Vescovi P, Campisi G, Favia G, Gabriele M, Gaeta G. Resective surgical approach shows a high performance in the management of advanced cases of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws: a retrospective survey of 347 cases. *J Oral Maxillofac*. 2012;70:2501-7.
224. Jang-Ha, Lee M-KK, Kim S-G, Park Y-W, Park S-W, Park Y-J. Surgical management of bisphosphonate related osteonecrosis of the jaw using pedicled buccal fat pad flap. *J Korean Assoc Maxillofac Plast Reconstr Surg*. 2013;35:174.
225. Ho Kyung Lee MHS, Pang KM, Song SI, Lee JK. Comparative study on surgical and conservative management of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw (BRONJ) in disease stage 2. *J Korean Assoc Maxillofac Plast Reconstr Surg*. 2013;35:302-9.
226. Kim Y. et al., 2016. Utility of (18)F-fluorodeoxy glucose and (18)F-sodium fluoride positron emission tomography/computed tomography in the diagnosis of medication-related osteonecrosis of the jaw: A preclinical study in a rat model. *Journal of cranio-maxillo-facial surgery: official publication of the European Association for Cranio-Maxillo-Facial Surgery*.
227. Kämmerer PW, Thiem D, Eisenbeiß C, Dau M, Schulze RK, Al-Nawas B. Surgical evaluation of panoramic radiography and cone beam computed tomography for therapy planning of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol*. 2016;121:419-24.
228. Barragan-Adjemian. Bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw: Model and diagnosis with cone beam computerized tomography. *Cells Tissues Organs*. 2008;189:284-8.
229. Guggenberger R. Cone beam computed tomography for diagnosis of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw: evaluation of quantitative and qualitative image parameters. *Skeletal radiology*. 2014;43:1669-78.
230. Lacey DL, Boyle WJ, Simonet WS. Bench to bedside: Elucidation of the OPG-RANK-RANKL pathway and the development of denosumab. *Nat Rev Drug Discov*. 2012;11:401.
231. Çankaya M, Cizmeci F, Kadioglu M, Muci E, Dayisoğlu E, Balaban F. The effects of chronic zoledronate usage on the jaw and long bones evaluated using RANKL and osteoprotegerin levels in an animal model. *J. Oral Maxillofac Surg*. 2013;42:1134-9.
232. Takayuki N, Kouji O, Kazumi K, Yoko I, Takako N, Masaaki T. Zoledronate inhibits receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand-induced osteoclast differentiation via suppression of expression of nuclear factor of activated T-cell c1 and carbonic anhydrase 2. *Arch Oral Biol*. 2015;60:557-65.
233. Martini G, Gennari L, Merlotti D, Salvadori S, Franci MB, Campagna S, et al. Serum OPG and RANKL levels before and after intravenous bisphosphonate treatment in Paget's disease of bone. *Bone*. 2007;40:457-63.
234. Kwak HB, Kim JY, Kim KJ, Choi MK, Kim JJ, Kim KM, et al. Risedronate directly inhibits osteoclast differentiation and inflammatory bone loss. *Biol Pharm Bul*. 2009;32:1193-8.

235. Wada T, Nakashima T, Hiroshi N, Penninger JM. RANKL/RANK signaling in osteoclastogenesis and bone disease. *Trends Mol Med.* 2006;12:17–25.
236. Fili S, Karalaki M, Schaller B. Therapeutic implications of osteoprotegerin. *Cancer Cell Int.* 2009;9:26.
237. Viereck V, Emons G, Lauck V, Frosch KH, Blaschke S, Grundker C. Bisphosphonates pamidronate and zoledronic acid stimulate osteoprotegerin production by primary human osteoblasts. *Biochem Biophys Res Com-mun.* 2002;291:680–6.
238. Mossetti G, Rendina D, De Filippo G, Viceconti R, Di Domenico G, Cioffi M. Interleukin-6 and osteoprotegerin systems in Paget's disease of bone: relationship to risedronate treatment. *Bone.* 2005;36:549–54.
239. Pan B, Farrugia AN, To LB, Findlay DM, Green J, Lynch K. The nitrogen-containing bisphosphonate, zoledronic acid, influences RANKL expression in human osteoblast-like cells by activating TNF-alpha converting enzyme (TACE). *J Bone Miner Res.* 2004;19:147–54.
240. Koch FP, Merkel C, Ziebart T, Smeets R, Walter C, Al-Nawas B. Influence of bisphosphonates on the osteoblast RANKL and OPG gene expression in vitro. *Clin Oral Investig.* 2012;16:79–86.
241. United States National Institutes of Health: Funding opportunities and notices search results. Available at: http://grants.nih.gov/grants/guide/search_results.htm?text_curr=osteonecrosis&scope=parfa&year=active&sort=&Search.x=10&Search.y=8.
242. Sonis ST, Watkins BA, Lyng GD, Lerman MA, Anderson KC. Bony changes in the jaws of rats treated with zoledronic acid and dexamethasone before dental extractions mimic bisphosphonate-related osteonecrosis in cancer patients. *Oral Oncol.* 2009;45:164–72.
243. Abtahi J, Agholme F, Sandberg O, Aspenberg P. Bisphosphonate-induced osteonecrosis of the jaw in a rat model arises first after the bone has become exposed. No primary necrosis in unexposed bone. *J Oral Pathol Med.* 2012;41:494–9.
244. Ali-Erdem M, Burak-Cankaya A, Cemil-Isler S. Extraction socket healing in rats treated with bisphosphonate: animal model for bisphosphonate related osteonecrosis of jaws in multiple myeloma patients. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* 2011;16:e879–83.
245. Allen MR, Chu TM, Ruggiero SL. Absence of exposed bone following dental extraction in beagle dogs treated with 9 months of high-dose zoledronic acid combined with dexamethasone. *J Oral Maxillofac Surg.* 2013;71:1017–26.
246. Sarasquete ME, Garcia-Sanz R, Marin L. Bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw is associated with polymorphisms of the cytochrome P450 CYP2C8 in multiple myeloma: a genome-wide single nucleotide polymorphism analysis. *Blood.* 2008;112:2709–12.
247. Katz J, Gong Y, Salmasinia D. Genetic polymorphisms and other risk factors associated with bisphosphonate induced osteonecrosis of the jaw. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2011;40:605.
248. Nicoletti P, Carstos VM, Palaska PK. Genomewide pharmacogenetic of bisphosphonate-induced osteonecrosis of the jaw: The role of RBMS3. *Oncologist.* 2012;17:279.

**Artículos publicados, sobre el tema de la tesis y en los que la doctoranda
Leticia Bagán Debón es coautora de los mismos**

**Artículos todos ellos publicados en revistas incluidas en SCI - JCR
y en los últimos 5 años:**

**5 de ellos en el “primer tercio” de su categoría
2 en el “segundo tercio” de su categoría**

- 1: Bagan JV, Hens-Aumente E, Leopoldo-Rodado M, Poveda-Roda R, Bagan L. Bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws: study of the staging system in a series of clinical cases. *Oral Oncol.* 2012 Aug;48(8):753-7. doi: 10.1016/j.oraloncology.2012.02.009. Epub 2012 Mar 7. PubMed PMID: 22401869.
- 2: Bagan J, Sheth CC, Soria JM, Margaix M, Bagan L. Bisphosphonates-related osteonecrosis of the jaws: a preliminary study of salivary interleukins. *J Oral Pathol Med.* 2013 May;42(5):405-8. doi: 10.1111/jop.12021. Epub 2012 Nov 15. PubMed PMID: 23157469.
- 3: Bagan J, Sáez GT, Tormos MC, Hens E, Terol MJ, Bagan L, Díaz-Fernández JM, Lluch A, Camps C. Interleukin-6 concentration changes in plasma and saliva in bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws. *Oral Dis.* 2014 Jul;20(5):446-52. doi: 10.1111/odi.12150. Epub 2013 Jul 10. PubMed PMID: 23837828.
- 4: Bagan J, Sáez GT, Tormos MC, Gavalda-Esteve C, Bagan L, Leopoldo-Rodado M, Calvo J, Camps C. Oxidative stress in bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws. *J Oral Pathol Med.* 2014 May;43(5):371-7. doi: 10.1111/jop.12151. Epub 2014 Jan 23. PubMed PMID: 24450511.
- 5: Bagan JV, Cibrian RM, Lopez J, Leopoldo-Rodado M, Carbonell E, Bagán L, Utrilla J, Scully C. Sclerosis in bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws and its correlation with the clinical stages: study of 43 cases. *Br J Oral Maxillofac Surg.* 2015 Mar;53(3):257-62. doi: 10.1016/j.bjoms.2014.12.004. Epub 2015 Jan 2. PubMed PMID: 25560326.
- 6: Bagan JV, Bagan L, Poveda R, Scully C. Mitoxantrone as a contributing factor in medication-related osteonecrosis of the jaws. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2016 Mar;45(3):377-9. doi: 10.1016/j.ijom.2015.09.025. Epub 2015 Oct 27. PubMed PMID: 26516027.
- 7: Bagan J, Peydró A, Calvo J, Leopoldo M, Jiménez Y, Bagan L. Medication-related osteonecrosis of the jaw associated with bisphosphonates and denosumab in osteoporosis. *Oral Dis.* 2016 Jan 28. doi: 10.1111/odi.12447. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 26818808.



Bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws: Study of the staging system in a series of clinical cases

Jose V. Bagan^{a,*}, Elena Hens-Aument^b, Manuel Leopoldo-Rodado^b, Rafael Poveda-Roda^c, Leticia Bagan^d

^a Oral Medicine, Service of Stomatology and Maxillofacial Surgery, Valencia University, University General Hospital, Valencia, Spain

^b Oral and Maxillofacial Surgery, University General Hospital, Valencia, Spain

^c Stomatology, University General Hospital, Valencia, Spain

^d Oral Medicine, Valencia University, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 3 December 2011

Received in revised form 5 February 2012

Accepted 7 February 2012

Available online 7 March 2012

Keywords:

BRONJ
Bisphosphonate
Dental
Jawbone

SUMMARY

Objective: The aim of this study was to validate the classification of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws (BRONJ) published in 2009¹⁷ in a series of cases.

Material and methods: This retrospective clinical study included a series of 102 cases (81% of intravenous BRONJ (iBRONJ, group 1) and 24 cases (19%) of oral BRONJ (oBRONJ, group 2). We recorded all patients' symptoms and clinical findings and classified each patient into a BRONJ stage (0–3; stage 0 = non-exposed BRONJ).

Results: Most BRONJ cases ($n = 120$, 95.2%) could be classified according to the proposed stages. Exposed necrotic areas of bone were more prevalent in group 1 than in group 2 ($p < 0.05$). In contrast, we observed more BRONJ cases without areas of exposed bone in group 2 ($n = 12$, 50%) than in group 1 ($n = 14$, 13.7%; $p < 0.05$). We could not assign six cases to any of the proposed stages. These cases had no areas of exposed necrotic bone, but had mandibular fractures, extra-oral fistula or affected maxillary sinuses.

Conclusions: In our series, iBRONJ cases showed more advanced stages of BRONJ than did oBRONJ cases. We found few cases that could not be classified into any proposed stage because they had findings associated with stages 0 and 3 but lacked exposed necrotic bone.

© 2012 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Introduction

The first reported series of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws (BRONJ), comprising 36 patients with malignant diseases who had received intravenous bisphosphonate treatment, was published in 2003 by March.¹ Many case series have since been published.^{2–8} The highest risk of BRONJ occurs after intravenous bisphosphonate (iBRONJ) administration,^{9–13} although several series have described possible BRONJ after oral bisphosphonate (oBRONJ) treatment for osteoporosis.^{7,14–16}

One of the most important issues is the development of a staging system for the classification of patients with BRONJ to aid in the selection of an appropriate treatment. The establishment of globally accepted criteria for the management of patients is advisable, and these criteria should be related to the stage of osteonecrosis in the jaws.

In 2006, Ruggiero et al.⁴ proposed guidelines for the diagnosis, staging, and management of BRONJ. These guidelines were used widely until 2009, when Ruggiero et al. and the American

Association of Oral and Maxillofacial Surgeons^{17,18} published their position on BRONJ with an update of the previous classification (Table 1).

Since the introduction of this new staging system, numerous clinical studies have been conducted. To the best of our knowledge, however, no study has compared the use of the staging system to classify patients with iBRONJ and oBRONJ. Furthermore, any staging system should incorporate all possible situations in a given disease, allowing the classification of any case into one of the proposed stages.

The purposes of our study were to analyze differences in the staging of patients with iBRONJ and oBRONJ in our case series, and to determine whether all of our cases could be assigned to a stage included in the most recent BRONJ classification.¹⁷

Material and methods

We examined 126 patients with BRONJ who presented between 2003 and 2010 in the Department of Stomatology and Maxillofacial Surgery, General Hospital, Valencia, Spain. The inclusion criterion for this study was the fulfillment of the clinical and radiographic signs described in the literature as characteristic of BRONJ.^{19,20}

* Corresponding author. Address: Service of Stomatology and Maxillofacial Surgery, University General Hospital, Avda/Tres Cruces s/n, 46014 Valencia, Spain.

E-mail address: bagan@uv.es (J.V. Bagan).

Table 1
Staging and treatment strategies for BRONJ (Ruggiero et al., 2009¹⁷).

At risk category: No apparent necrotic bone in patients who have been treated with either oral or IV bisphosphonates
Stage 0: No clinical evidence of necrotic bone, but non-specific clinical findings and symptoms
Stage 1: Exposed and necrotic bone in patients who are asymptomatic and have no evidence of infection
Stage 2: Exposed and necrotic bone associated with infection as evidenced by pain and erythema in the region of the exposed bone with or without purulent drainage
Stage 3: Exposed and necrotic bone in patients with pain, infection and one or more of the following: exposed and necrotic bone extending beyond the region of alveolar bone (i.e. inferior border and ramus in the mandible, maxillary sinus and zygoma in the maxilla) resulting in pathologic fracture, extra-oral fistula, oral antral/oral nasal communication, or osteolysis extending to the inferior border of the mandible of sinus floor

The Ethical Committee of Valencia University, Spain, approved the study.

Most of our patients ($n = 102$, 81%; group 1) had received intravenous treatment with zoledronic acid for a metastatic malignant disease, and the remaining patients ($n = 24$, 19%; group 2) had been treated with oral bisphosphonates for osteoporosis (Table 2). All patients were examined initially by the same group of clinicians with significant experience of BRONJ. The clinical data were recorded for each patient only after total agreement among all examiners was achieved. Apart from the clinical examination, each patient also underwent orthopantomography and computed tomography (CT) to establish the final diagnosis of BRONJ.

We recorded the presence of the nonspecific signs described by Ruggiero et al.¹⁷ as stage 0, or the following signs corresponding to stages 1–3: exposed and necrotic bone, pain, evidence of infection, pathological fracture, extraoral fistula, oral–antral/oral–nasal communication, and osteolysis extending to the inferior border of the mandible or sinus floor. Based on these findings, we tried to assign each patient to one of the four stages described by Ruggiero et al.¹⁷ (Table 1).

Table 2
Characteristics of patients with intravenous and oral BRONJ.

	Group 1 (102 cases)	Group 2 (24 cases)	
Age (Mean age ± standard deviation)	64.14 ± 11.52	73.62 ± 7.76	$t = -3.82, p < 0.01$
Gender			
Males	50 (49%)	0	$\chi^2 = 19.50, p < 0.01$
Females	52 (51%)	24 (100%)	
Disease	Breast cancer: 41 cases (40.2%) Lung cancer: 2 cases (2%) Multiple Myeloma: 43 cases (42.1%) Prostate cancer: 14 cases (13.7%) Renal cancer: 2 cases (2%)	Osteoporosis: 24 cases	
Drug	Zoledronic acid 102 cases (100%)	Alendronate: 19 cases (79.2%) Ibandronate: 4 cases (16.6%) Risidronate: 1 cases (4.2%)	
Location of the BRONJ			
Mandible	70 cases (68.7%)	23 cases (95.8%)	$\chi^2 = 7.58, p < 0.05$
Upper jaw	18 cases (17.6%)	1 cases (4.2%)	
Both upper jaw and mandible	14 cases (13.7%)	-	
Local etiological factor			
Dental Extractions	65 cases (63.7%)	19 cases (79.2%)	$\chi^2 = 2.52, p > 0.05$
Implants	4 cases (4%)	0	
Prosthesis	8 cases (7.8%)	1 case (4.2%)	
Unknown	25 cases (24.5%)	4 cases (16.6%)	
Clinical and radiographic signs			
Pain	81 cases (79.4%)	18 cases (75%)	$\chi^2 = 2.25, p > 0.05$
Infection	79 cases (77.45%)	17 cases (70.83%)	
Exposed bone necrosis	88 cases (86.3%)	12 cases (50%)	$\chi^2 = 0.76, p > 0.05$
Fracture	5 cases (4.9%)	2 cases (8.3%)	$\chi^2 = 15.61, p < 0.05$
Extraoral fistula	8 cases (7.8%)	4 cases (16.6%)	$\chi^2 = 0.43, p > 0.05$
Oro-antral o nasal communication	13 cases (12.7%)	1 case (4.2%)	$\chi^2 = 1.75, p > 0.05$

Table 3
Staging of patients with intravenous and oral BRONJ.

		Stages according to Ruggiero et al. ¹⁷					Total
		0	1	2	3	Unclassified	
Group 1	Count	13	16	52	20	1	102
	%	12.7%	15.7%	51.0%	19.6%	1.0%	100.0%
Group 2	Count	7	6	5	1	5	24
	%	29.2%	25%	20.8%	4.2%	20.8%	100.0%
Total	Count	20	22	57	21	6	126
	%	15.9%	17.5%	45.2%	16.7%	4.8%	100.0%

($\chi^2 = 16.88, p < 0.01$).

Although the aim of this study was to determine whether any given case could be assigned to one of the four stages, we also calculated the means and standard deviations of the quantitative values. We used Student's *t*-test to compare the means of quantitative values between the iBRONJ and oBRONJ groups, and the chi-squared test to analyze associations or independence among qualitative values. We considered differences to be statistically significant when $p < 0.05$.

Results

BRONJ was predominantly located in the mandible in both groups, although this location was more prevalent in group 2. Dental extraction was the most common predisposing dental factor for BRONJ in both groups (Table 2).

We found a higher prevalence of exposed necrotic bone in group 1 ($n = 88$, 86.3%) than in group 2 ($n = 12$, 50%; $p < 0.05$). In contrast, we observed more BRONJ cases that lacked areas of exposed bone in group 2 ($n = 12$, 50%) than in group 1 ($n = 14$, 13.7%; $p < 0.05$). Comparison of all other clinical findings between groups is shown in Table 2.

We found significant differences in staging between groups ($\chi^2 = 16.88, p < 0.01$). The oBRONJ group contained a higher percentage of stage 0 cases than did the iBRONJ group. We found 29

Table 4Patients who could not be classified according to the staging system of Ruggiero et al.¹⁷.

Case	Age	Gender	Diseases	Drug	Location ONJ	Local Etiology	Exposed and necrotic bone	Pain	Infection	Oral fistula	Extra-oral fistula	Pathologic fracture	Osteolysis extending to the inferior border of the mandible	Osteolysis extending to the sinus floor
1	78	Male	Multiple Myeloma	Zoledronic acid	Mandible	Prosthesis	No	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	No
2	83	Female	Osteoporosis	Alendronate	Mandible	Extraction	No	Yes	Yes	Yes	No	Yes	Yes	No
3	79	Female	Osteoporosis	Alendronate	Upper jaw	Extraction	No	Yes	Yes	Yes	No	No	No	Yes
4	80	Female	Osteoporosis	Alendronate	Mandible	Unknown	No	Yes	Yes	Yes	Yes	No	No	No
5	67	Female	Osteoporosis	Alendronate	Mandible	Extraction	No	Yes	Yes	Yes	Yes	No	No	No
6	75	Female	Osteoporosis	Alendronate	Mandible	Extraction	No	Yes	Yes	Yes	Yes	No	Yes	No

(28.4%) early-stage (0 or 1) cases in the iBRONJ group and 13 (54.2%) such cases in the oBRONJ group. We found 72 (70.6%) advanced-stage (2 or 3) cases in group 1 and 6 (25%) such cases in group 2 (Table 3).

The most significant finding was that we could not assign six cases to any of the described and published stages. These cases had no areas of exposed necrotic bone (stage 0), but had mandibular fractures, extra-oral fistula or affected maxillary sinuses (stage 3; Table 4). One of these six cases had iBRONJ and the rest had oBRONJ (Figs. 1 and 2).

Discussion

The number of reported BRONJ cases is increasing and many articles have addressed their management.^{21–24} Hellstein et al.²⁵ stated that the benefit provided by antiresorptive therapy outweighs the low risk of developing osteonecrosis of the jaw.

BRONJ is now a well-recognized entity that is readily diagnosed on the basis of evident symptoms. In most cases, the exposure of necrotic bone is the main (but not the only) clinical

finding^{11,26–30}; this condition is readily recognized and diagnosed by a clinician.

Patients with BRONJ are classified into a disease stage based on the presence of necrotic bone, associated pain and inflammation, and/or the involvement of the inferior margin of the mandible or the maxillary sinus (Table 1).

The first objective of our study was to compare the staging of iBRONJ and oBRONJ cases. Interestingly, we found more advanced cases in the iBRONJ group than in the oBRONJ group (Table 3).

In a significant and well-conducted study, Fedele et al.⁶ found the non-exposed variant of osteonecrosis in 96/332 cases of BRONJ; this variant is equivalent to stage 0 of the most recent classification.¹⁷ The absence of necrotic bone exposure has been reported primarily in patients with early-stage BRONJ,^{29,31} who present with pain, fistulae, or nonspecific inflammatory signs. Bone exposure may occur weeks or months after initial diagnosis in these patients. All of these symptoms correspond to the non-exposed variant of osteonecrosis. In summary, and following Fedele et al.⁶ the clinical features of non-exposed osteonecrosis of the jaws include persistent jawbone pain, bone enlargement, gingival

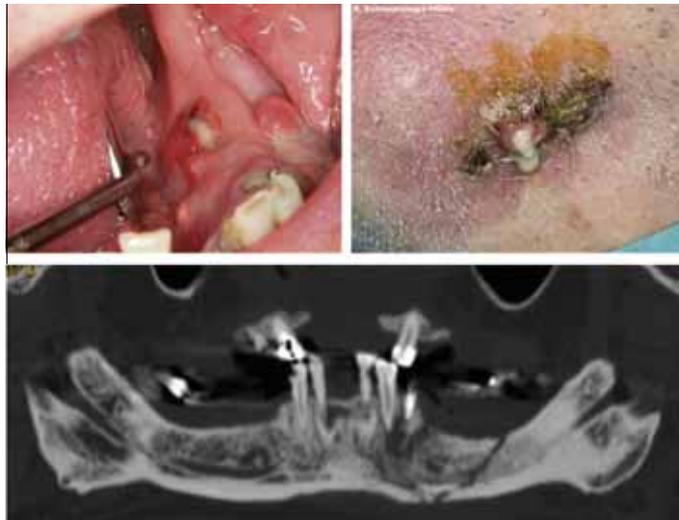


Figure 1 Patient with intravenous BRONJ characterized by several sinus tracts and suppuration in the left mandible, but no necrotic bone exposure. The patient also had a cutaneous fistula, osteolysis extending to the inferior mandibular border, and mandibular fracture.

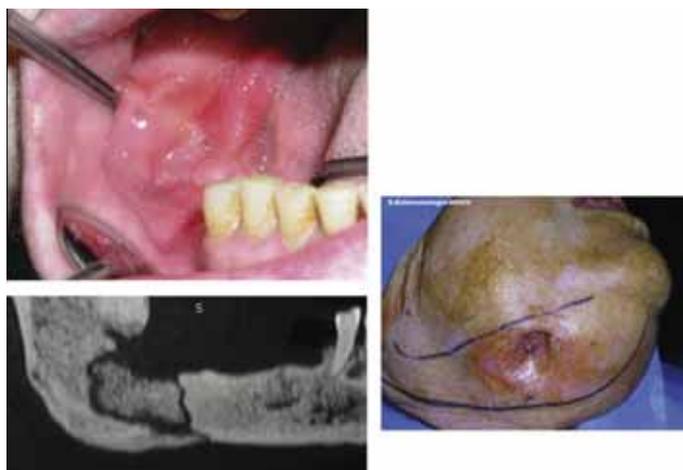


Figure 2 Patient with oral BRONJ characterized by a single sinus tract and suppuration on the right retromolar mandible, but no necrotic bone exposure. The patient also had a cutaneous fistula and mandibular fracture.

swelling, and/or sinus tract in the absence of relevant dental disease.

Fedele et al.⁶ found that 18.8% of BRONJ cases developed due to alendronate treatment only, 40.6% were caused by zoledronic acid, and 12.5% were caused by pamidronate treatment. Pain was the most frequent (91.6%) symptom they observed, followed by sinus tract formation (51%), bone enlargement (36.4%), and gingival enlargement (17.7%). Only 53.1% of their cases progressed to include exposed necrotic bone at 0.5–14 months after diagnosis.

We found 20 out of 126 cases (16%) while Fedele et al.⁶ described 96 out of 332 cases (29%) in the stage 0 respectively. We cannot explain why these differences occur. Our patients were all seen in the same department, and another possible explanation as Fedele et al. stated⁶ is that in time a nonexposed bone necrosis may develop a clear exposure of the bone.

Most (95.2%) of our cases could be classified according to the proposed stages.¹⁷ Six (4.8%) cases (iBRONJ, $n = 1$; oBRONJ, $n = 5$) could not be staged because initial examinations revealed symptoms fulfilling the criteria of both stages 0 and 3. These patients had no exposed necrotic bone, but had mandibular fractures and/or skin fistulae (Figs. 1 and 2). None of these patients had been treated previously for BRONJ, so they had no prior history of disease stages 1–3 with subsequent healing of exposed bony necrosis.

We agree with the inclusion of most symptoms in the above description of non-exposed BRONJ,⁶ but the aim of our article was to identify any other significant clinical finding that would prevent the classification of such cases as stage 0 BRONJ. These patients may have pain, sinus tract formation, bone enlargement, and/or gingival enlargement, but they may also have other clinical findings included in stage 3 of the recent classification.¹⁷ The presence of a cutaneous fistula associated with the involvement of the inferior mandibular margin, with or without pathological fracture, prevented us from classifying these cases as stage 0; however, they could also not be classified as stage 3 because no exposed necrotic bone was present.

Any classification should include all clinical possibilities to render studies comparable. We believe that the current classification system¹⁷ is very good, but our sole purpose in this study was to point out that we could not classify a few of our cases using the proposed stages.

We suggest modifying stage 3 slightly in the following manner.

Exposed and necrotic bone or an oral fistula without exposed bone in patients with pain, infection, and one or more of the following: exposed necrotic bone extending beyond the alveolus (mandibular inferior border/ramus or maxillary sinus/zygoma), pathologic fracture, extraoral fistula, oral–antral/oral–nasal communication, or osteolysis extending to the inferior mandibular border or sinus floor.

Conflict of interest statement

None declared.

References

- Marx RE. Pamidronate (Aredia) and zoledronate (Zometa) induced avascular necrosis of the jaws: a growing epidemic. *J Oral Maxillofac Surg* 2003;**61**(9):1115–7.
- Bagan JV, Murillo J, Jimenez Y, Poveda R, Milian MA, Sanchis JM, et al. Avascular jaw osteonecrosis in association with cancer chemotherapy: series of 10 cases. *J Oral Pathol Med* 2005;**34**(2):120–3.
- Bagan JV, Jimenez Y, Murillo J, Hernandez S, Poveda R, Sanchis JM, et al. Jaw osteonecrosis associated with bisphosphonates: multiple exposed areas and its relationship to teeth extractions. Study of 20 cases. *Oral Oncol* 2006;**42**(3):327–9.
- Ruggiero SL, Fantasia J, Carlson E. Bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw: background and guidelines for diagnosis, staging and management. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2006;**102**(4):433–41 Epub 2006 Jul 31.
- Boonyapakorn T, Schirmer I, Reichart PA, Sturm I, Massenkeil G. Bisphosphonate-induced osteonecrosis of the jaws: prospective study of 80 patients with multiple myeloma and other malignancies. *Oral Oncol* 2008;**44**(9):857–69.
- Fedele S, Porter SR, D'Aiuto F, Aljohani S, Vescovi P, Manfredi M, et al. Nonexposed variant of bisphosphonate-associated osteonecrosis of the jaw: a case series. *Am J Med* 2010 Nov;**123**(11):1060–4.
- Otto S, Abu-Id MH, Fedele S, Warnke PH, Becker ST, Kolk A, et al. Osteoporosis and bisphosphonates-related osteonecrosis of the jaw: not just a sporadic coincidence—a multi-centre study. *J Craniomaxillofac Surg* 2011 Jun;**39**(4):272–7.
- Vescovi P, Manfredi M, Merigo E, Guidotti R, Meleti M, Pedrazzi G, Fornaini C, Bonanini M, Ferri T, Nammour S. Early Surgical Laser-Assisted Management of Bisphosphonate-Related Osteonecrosis of the Jaws (BRONJ): a Retrospective Analysis of 101 Treated Sites with Long-Term Follow-Up. *Photomed Laser Surg* 2011 Epub ahead of print.
- Baillargeon J, Kuo YF, Lin YL, Wilkinson GS, Goodwin JS. Osteonecrosis of the jaw in older osteoporosis patients treated with intravenous bisphosphonates. *Ann Pharmacother* 2011;**45**(10):1199–206.

10. Ngamphaiboon N, Frustino JL, Kossoff EB, Sullivan MA, O'Connor TL. Osteonecrosis of the jaw: dental outcomes in metastatic breast cancer patients treated with bisphosphonates with/without bevacizumab. *Clin Breast Cancer* 2011 Aug; **11**(4):252–7.
11. Nicolatou-Galitis O, Papadopoulou E, Sarri T, Boziari P, Karayianni A, Kyrtsionis MC, et al. Osteonecrosis of the jaw in oncology patients treated with bisphosphonates: prospective experience of a dental oncology referral center. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2011; **112**(2):195–202.
12. Francini F, Pascucci A, Francini E, Miano ST, Bargagli G, Ruggiero G, et al. Osteonecrosis of the jaw in patients with cancer who received zoledronic acid and bevacizumab. *J Am Dent Assoc*. 2011; **142**(5):506–13.
13. Henry DH, Costa L, Goldwasser F, Hirsh V, Hungria V, Prausova J, et al. Randomized, double-blind study of denosumab versus zoledronic acid in the treatment of bone metastases in patients with advanced cancer (excluding breast and prostate cancer) or multiple myeloma. *J Clin Oncol* 2011; **29**(9):1125–32.
14. Manfredi M, Merigo E, Guidotti R, Meleti M, Vescovi P. Bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws: a case series of 25 patients affected by osteoporosis. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2011; **40**(3):277–84.
15. Solomon DH, Rekedal L, Cadarette SM. Osteoporosis treatments and adverse events. *Curr Opin Rheumatol* 2009; **21**(4):363–8.
16. Yoneda T, Hagino H, Sugimoto T, Ohta H, Takahashi S, Soen S, et al. Bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw: position paper from the Allied Task Force Committee of Japanese Society for Bone and Mineral Research, Japan Osteoporosis Society, Japanese Society of Periodontology, Japanese Society for Oral and Maxillofacial Radiology, and Japanese Society of Oral and Maxillofacial Surgeons. *J Bone Miner Metab* 2010; **28**(4):365–83.
17. Ruggiero SL, Dodson TB, Assael LA, Landesberg R, Marx RE, Mehrotra B, American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons. American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons position paper on bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws–2009 update. *J Oral Maxillofac Surg* 2009; **67**(5 Suppl):2–12.
18. Ruggiero SL, Dodson TB, Assael LA, Landesberg R, Marx RE. Task force on bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws, American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons. American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons position paper on bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw – 2009 update. *Aust Endod J* 2009; **35**(3):119–30.
19. Ruggiero S, Gralow J, Marx RE, Hoff AO, Schubert MM, Huryn JM, et al. Practical guidelines for the prevention, diagnosis, and treatment of osteonecrosis of the jaw in patients with cancer. *J Oncol Pract* 2006; **2**(1):7–14.
20. Almazroo SA, Woo SB. Bisphosphonate and nonbisphosphonate-associated osteonecrosis of the jaw: a review. *J Am Dent Assoc* 2009; **140**(7):864–75.
21. Sacco R, Sacco G, Accocella A, Sale S, Sacco N, Baldoni E. A systematic review of microsurgical reconstruction of the jaws using vascularized fibula flap technique in patients with bisphosphonate-related osteonecrosis. *J Appl Oral Sci* 2011; **19**(4):293–300.
22. Vescovi P, Campisi G, Fusco V, Mergoni G, Manfredi M, Merigo E, et al. Surgery-triggered and non surgery-triggered bisphosphonate-related Osteonecrosis of the Jaws (BRONJ): A retrospective analysis of 567 cases in an Italian multicenter study. *Oral Oncol* 2011; **17**(3):191–4.
23. Kyrgidis A, Koloutsos G, Vahtsevanos K. Treatment protocols of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws. *Head Neck* 2009; **31**(8):1112–3 author reply 1113–4.
24. Ruggiero SL, Mehrotra B. Bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw: diagnosis, prevention, and management. *Annu Rev Med*. 2009; **60**:85–96.
25. Hellstein JW, Adler RA, Edwards B, Jacobsen PL, Kalmar JR, Koka S, et al. American Dental Association Council on Scientific Affairs Expert Panel on Antiresorptive Agents. Managing the care of patients receiving antiresorptive therapy for prevention and treatment of osteoporosis: executive summary of recommendations from the American Dental Association Council on Scientific Affairs. *J Am Dent Assoc* 2011; **142**(11):1243–51.
26. Colella G, Campisi G, Fusco V. American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons position paper: Bisphosphonate-Related Osteonecrosis of the Jaws–2009 update: the need to refine the BRONJ definition. *J Oral Maxillofac Surg* 2009; **67**(12):2698–9.
27. Assael LA. Oral bisphosphonates as a cause of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws: clinical findings, assessment of risks, and preventive strategies. *J Oral Maxillofac Surg* 2009; **67**(5 Suppl):35–43.
28. Lazarovici TS, Yahalom R, Taicher S, Elad S, Hardan I, Yarom N. Bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws: a single-center study of 101 patients. *J Oral Maxillofac Surg* 2009; **67**(4):850–5.
29. Junquera L, Gallego L. Nonexposed bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws: another clinical variant? *J Oral Maxillofac Surg* 2008; **66**(7):1516–7.
30. McMahon RE, Bouquot JE, Glueck CJ, Griep JA, Adams WR, Spolnik KJ, et al. Staging bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw should include early stages of disease. *J Oral Maxillofac Surg* 2007; **65**(9):1899–900.
31. Mawardi H, Treister N, Richardson P, Anderson K, Munshi N, Faiella RA, et al. Sinus tracts—an early sign of bisphosphonate-associated osteonecrosis of the jaws? *J Oral Maxillofac Surg* 2009; **67**(3):593–601.



Bisphosphonates-related osteonecrosis of the jaws: a preliminary study of salivary interleukins

Jose Bagan¹, Chirag C. Sheth², Jose M. Soria², Maria Margaix³, Leticia Bagan³

¹Oral Medicine, Stomatology and Maxillofacial Surgery, Valencia University, University General Hospital, Valencia, Spain; ²Department of Biomedical Sciences, Faculty of Health Sciences, CEU University Cardenal Herrera, Valencia, Spain; ³Oral Medicine, Valencia University, Valencia, Spain

OBJECTIVE: The aim of this preliminary study was to analyze the possible alterations in some salivary interleukins, usually associated with the inflammatory processes.

MATERIAL AND METHODS: The study comprised three groups: group 1, with 26 cases with bisphosphonates-related osteonecrosis of the jaws (BRONJ). Group 2, with 29 patients who had received iBF but without BRONJ. Group 3, with 26 control patients not treated with BF and without oral lesions.

We collected unstimulated whole saliva in all groups. A semiquantitative study was performed based on a cytokine array panel. We used the proteome profiler array for the study. We analyzed: Interleukin 1 alpha (IL-1 α), interleukin-1 receptor antagonist (IL-1RA), and interleukin 1 beta (IL-1 β).

RESULTS: We found higher salivary values for all the cytokines studied in group 1 than in group 2 and 3. IL-1 β showed the major differences compared with control group. ($P < 0.05$)

CONCLUSIONS: This preliminary study confirms that there are alterations in these interleukins in patients with BRONJ. These results give support to further additional salivary studies on these biomarkers by quantitative measures.

J Oral Pathol Med (2013) 42: 405–408

Keywords: bisphosphonates; BRONJ; salivary interleukins

Introduction

In 2003, Marx (1) described a new and severe adverse effect after treatment with intravenous bisphosphonates (iBF) for

malignant diseases. It was first reported in patients suffering of multiple myeloma and metastatic breast cancer. It was also described with oral bisphosphonates (oBF) for osteoporosis some years later (2–4).

There were jaw bone exposed necrosis and infection's symptoms, frequently. It was coined as bisphosphonates-related osteonecrosis of the jaws (BRONJ).

The clinical characteristics and diagnosis have been extensively reported in the literature (5–9). Treatment with high potency (nitrogenated) intravenous bisphosphonates, such as zoledronic acid and pamidronate, and dental extractions are important predisposing risk factors (10,11).

Interleukins have been reported to be implicated and altered in many chronic inflammatory oral processes. In oral potentially malignant disorders (12), cancer (13), lichen planus (14), burning mouth syndrome (15), periodontitis (16), chronic kidney disease (17), Sjögren's syndrome (18), stress condition (19), fibromyalgia syndrome (20), and exercise (21).

In BRONJ, there are significant inflammatory processes with pain, suppuration, and swelling (5). In such situations, it is understandable that mediators of the inflammation in saliva would be altered. However, until now, the role of the interleukins in these BRONJ patients has not been addressed yet. Therefore, the aim of our study was to perform a preliminary analysis in saliva, in a group of BRONJ patients, exploring a panel of several chemokines.

Material and methods

The study comprised three groups of patients. Group 1, consisted of 26 cases with BRONJ. Group 2, 29 patients who had received iBF but who had not developed osteonecrosis of the jaws (BRONJ). Group 3, with 26 control patients who had not been treated with BF and had no oral lesions.

All patients were seen in the Service of Stomatology and Maxillofacial Surgery, University General Hospital, Valencia. The Ethical Committee of the University General Hospital, Valencia approved the study.

The main age of the patients was 62.96 \pm 11.31 (group 1), 59.38 \pm 9.51% (group 2), and 63 \pm 6.11% (group 3),

Correspondence: Prof. Jose V. Bagan, Service of Stomatology and Maxillofacial Surgery, University General Hospital, Avda/ Tres Cruces s/n, 46014 Valencia, Spain. Tel: +34 961972127, Fax: +34 961972127, E-mail: bagan@uv.es

Accepted for publication September 24, 2012

406

and there were not statistically significant differences among them ($F = 1.41$, $P > 0.05$). Regarding gender, there were not differences among groups, neither.

The diagnosis of patients in group 1 was establishing following the defined criteria of BRONJ (22). In groups 1 and 2, all patients have received iBF (zoledronic acid) for their malignancy, and the clinical characteristics of the lesions in group 1 have been described in Table 1.

Saliva collection

We collected unstimulated whole expectorated saliva from each subject according to a modified version of the method described by Navazesh (23), in the three groups. We placed collected samples on ice immediately and put them into aliquots before freezing them at -80°C . To characterize the range of human cytokines implicated in the presence of oral lesions in our test subjects, we utilized a cytokine array panel of interleukins involved in the immune response.

Our study was focused on the following: Interleukin 1 alpha (IL-1 α), interleukin-1 receptor antagonist (IL-1RA), and interleukin 1 beta (IL-1 β). We performed a semi-quantitative analysis. We used the proteome profiler array (Human Cytokine Array Panel A, Cat#ARY005; R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) for the study.

Prior to saliva analysis, all samples were thawed to room temperature. Twenty-five microlitre aliquots from each of the 26 Group, 1 donor (with oral lesions) was pooled. Twenty-five microlitre aliquots from each of the 29 Group, 2 donors (with no oral lesions) were pooled. Fifty microlitre aliquots from each of the 26 Group, 3 donors (control) were pooled. The total volume of each of the pooled sample sets was 750 μl . Simultaneous analysis of 36 cytokines was carried out using the Proteome Profiler Array (Human Cytokine Array Panel A, Cat#ARY005; R&D Systems) according to manufacturer's instructions.

Table 1 Characteristics of group 1

Age (mean \pm SD)	62.96 \pm 11.31
Gender	Males: 16 (61.5%), Females: 10 (38.5%)
Primary malignant tumor	Cases and %
Breast	7 (26.9%)
Lungs	1 (3.8%)
Prostate	5 (19.2%)
Renal	1 (3.8%)
Location of the BRONJ	
Mandible	20 (76.9%)
Upper jaw	4 (15.4%)
Mandible and upper jaw	2 (7.7%)
Etiology of the BRONJ	
Extractions	14 (53.8%)
Implants	1 (3.8%)
Prosthesis	5 (19.2%)
Unknown	6 (23.1%)
Treatment on bisphosphonates (months)	30.22 \pm 18.5
Type of bisphosphonate used	Zoledronic acid

Briefly, the profiler membranes were blocked for 1 h in blocking buffer. The blocking buffer was aspirated, followed by the addition of the pooled samples (diluted to 1.5 ml in Array Buffer 5) to individual membranes, in the presence of Cytokine Array Panel A Detection Antibody Cocktail. The samples were incubated overnight at 4°C on a rocking platform and washed according to manufacturer's instructions. Following a series of three washes, membranes were incubated with Streptavidin-conjugated with horseradish peroxidase at room temperature for 30 min on a rocking platform. The membranes were washed a further three times and developed using ECL Western blotting reagents (Cat# RPN2109; GE Amersham, Madrid, Spain) according to manufacturer's instructions.

The chemiluminescent membrane images were captured by digital camera, using an exposure time of 60 s. Densitometry analysis of the resulting digital images was carried out using free-to-download image software (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>). Densitometry data were exported to Microsoft Excel for preparation of graphs and statistical analysis. Two independent hybridizations were carried out for the control group 3, while three each were carried out for groups 1 and 2 (Fig. 1).

For the statistical analysis, we obtained the mean and the standard deviation for each interleukin in every group and then to compare the means of the groups, we performed an ANOVA study. We considered statistically significant values if $P < 0.05$.

Results

We found higher salivary values for all the interleukins studied in the group with osteonecrosis of the jaws (group 1) than in patients treated with iBF but without BRONJ (group 2) and that in the control group (group 3) also. There were significant differences among groups with analyzing them by the ANOVA analysis. IL-1 β showed the major differences compared with control group. ($P < 0.05$) Table 2.

Patients treated with iBF but not having BRONJ (group 2) showed highest values than the controls (group 3) in case of IL-1 α ($P < 0.05$) also.

Discussion

Bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws is a well-known adverse effect derived of treatment with bisphosphonates. The higher incidence with iBF and the recent description that this iBF BRONJ have more severe stages than oBF (9) made us to select a group with iBF for this study.

Although we actually know that with the use of iBF, there is an inhibition of osteoclast development from monocytes, an increased osteoclast apoptosis, a prevention of osteoclast development, and recruitment from bone marrow precursors (24), there is a lack of knowledge of other possible implicated pathogenic factors in BRONJ. In most of the cases, there is an inflammatory lesion of the bone tissue frequently associated with infection (9).

Some interleukins have been described to play a role on the inflammatory processes. This was the reason why we

A preliminary study of salivary interleukins

Bagán et al.

407

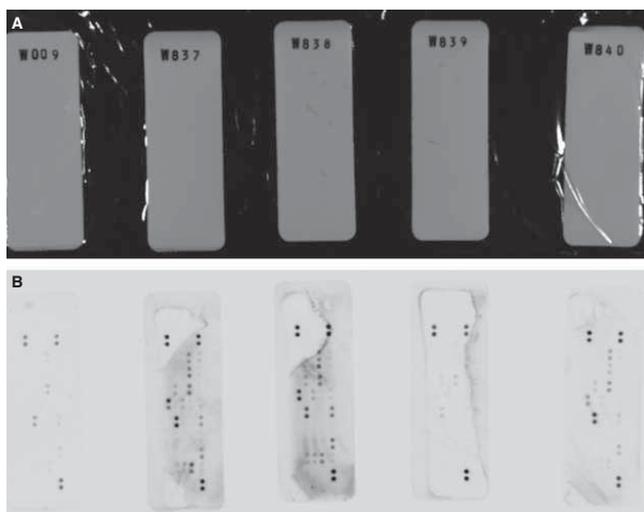


Figure 1 Hybridizations carried out for each group.

Table 2 Mean values of each group

	Group 1	Group 2 (mean \pm SD)	Group 3	F statistic and P-value
IL-1 α	18.59 \pm 4.65	5.02 \pm 2.95	0.85 \pm 0.52	F=6.54, P<0.05
IL-1 β	24.26 \pm 5.97	2.23 \pm 1.37	1 \pm 0	F=13.67, P<0.05
IL-1RA	31.43 \pm 3.33	10.82 \pm 2.18	6.70 \pm 1.27	F=36.36, P<0.05

Significant differences among the three groups in the three IL (IL-1 α , IL-1 β , and IL-1RA).

Significant differences between group 2 and 3 in IL-1 α .

tried to analyze the possible alterations of some salivary biomarkers in patients with BRONJ, because it has not described until now.

The proteome profiler array (Human Cytokine Array Panel A, Cat#ARY005; R&D Systems) has been greatly employed in studies for the quantification of cytokine and chemokine levels in human cell culture supernatants (25–29), sera from patients with gastric cancer (30), in tissue homogenates of murine models of cancer immunotherapy (31) and necrosis. The above evidences justify our use in this study.

We decided to select IL-1 α , IL-1 β because they are implicated in the process of alveolar bone loss and in the inflammatory processes similar that account in the area of osteonecrosis.

Interleukin 1 alpha is constitutively expressed by keratinocytes in the epidermis under physiological conditions, and it can be altered in periodontitis and oral cancer (32). Interleukin 1 beta is an important mediator of the inflammatory response produced by macrophages being related to apoptosis, and it has been implicated for susceptibility to

alveolar bone loss, and it has been described altered in periodontitis (33,34) and significantly decreased in chronic kidney disease (17).

In all cases, the level of IL was higher in the group with BRONJ than in the group of iBF patients but without BRONJ (group 2), and even greater than in the control group, with statistically significant differences.

The results of this preliminary study confirm us that there are alterations in these interleukins in patients with BRONJ. However, we should recognize that it is a semi-quantitative analysis. Our findings give support to further additional salivary studies on these biomarkers by quantitative measures, in order to validate if they are or not important tools in patients on bisphosphonate treatment.

References

- Marx RE. Pamidronate (Aredia) and zoledronate (Zometa) induced avascular necrosis of the jaws: a growing epidemic. *J Oral Maxillofac Surg* 2003; **61**: 1115–7.
- Otto S, Abu-Id MH, Fedele S, et al. Osteoporosis and bisphosphonates-related osteonecrosis of the jaw: not just a sporadic coincidence—a multi-centre study. *J Craniomaxillofac Surg* 2011; **39**: 272–7.
- Assael LA. Oral bisphosphonates as a cause of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws: clinical findings, assessment of risks, and preventive strategies. *J Oral Maxillofac Surg* 2009; **67**(Suppl.): 35–43.
- Manfredi M, Merigo E, Guidotti R, Meleti M, Vescovi P. Bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws: a case series of 25 patients affected by osteoporosis. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2011; **40**: 277–84.
- Ruggiero SL, Dodson TB, Assael LA, Landesberg R, Marx RE, Mehrotra B, American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons. American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons position paper on bisphosphonate-related

- osteonecrosis of the jaws—2009 update. *J Oral Maxillofac Surg* 2009; **67**(Suppl.): 2–12.
6. Ruggiero SL. Bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw: an overview. *Ann NY Acad Sci* 2011; **1218**: 38–46.
 7. Vescovi P, Campisi G, Fusco V, et al. Surgery-triggered and non surgery-triggered bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws (BRONJ): a retrospective analysis of 567 cases in an Italian multicenter study. *Oral Oncol* 2011; **47**: 191–4.
 8. Bagan JV, Murillo J, Jimenez Y, et al. Avascular jaw osteonecrosis in association with cancer chemotherapy: series of 10 cases. *J Oral Pathol Med* 2005; **34**: 120–3.
 9. Bagan JV, Hens-Aumente E, Leopoldo-Rodado M, Poveda-Roda R, Bagan L. Bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws: study of the staging system in a series of clinical cases. *Oral Oncol* 2012; **48**: 753–7.
 10. Boonyapakorn T, Schirmer I, Reichart PA, Sturm I, Massenkeil G. Bisphosphonate-induced osteonecrosis of the jaws: prospective study of 80 patients with multiple myeloma and other malignancies. *Oral Oncol* 2008; **44**: 857–69.
 11. Bagan JV, Jimenez Y, Murillo J, et al. Jaw osteonecrosis associated with bisphosphonates: multiple exposed areas and its relationship to teeth extractions. Study of 20 cases. *Oral Oncol* 2006; **42**: 327–9.
 12. Brailo V, Vucicevic-Boras V, Lukac J, et al. Salivary and serum interleukin 1 beta, interleukin 6 and tumor necrosis factor alpha in patients with leukoplakia and oral cancer. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 2012; **17**: e10–5.
 13. Schapher M, Wandler O, Gröschl M. Salivary cytokines in cell proliferation and cancer. *Clin Chim Acta* 2011; **412**: 1740.
 14. Zhang Y, Liu W, Zhang S, et al. Salivary and serum interleukin-18 in patients with oral lichen planus: a study in an ethnic Chinese population. *Inflammation* 2012; **35**: 399–404.
 15. Suh KI, Kim YK, Kho HS. Salivary levels of IL-1beta, IL-6, IL-8, and TNF-alpha in patients with burning mouth syndrome. *Arch Oral Biol* 2009; **54**: 797–802.
 16. Napimoga MH, Nunes LH, Maciel AA, et al. Possible involvement of IL-21 and IL-10 on salivary IgA levels in chronic periodontitis subjects. *Scand J Immunol* 2011; **74**: 596.
 17. Thorman R, Lundahl J, Yucel-Lindberg T, Hylander B. Inflammatory cytokines in saliva: early signs of metabolic disorders in chronic kidney disease. A controlled cross-sectional study. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2010; **110**: 597–604.
 18. Nguyen CQ, Yin H, Lee BH, Chiorini JA, Peck AB. IL17: potential therapeutic target in Sjögren's syndrome using adenovirus-mediated gene transfer. *Lab Invest* 2011; **91**: 54–6.
 19. Guéant-Rodriguez RM, Juillière Y, Battaglia-Hsu SF, et al. Association of IL1B polymorphism with left ventricular systolic dysfunction: a relation with the release of interleukin-1β in stress condition. *Pharmacogenet Genomics* 2011; **21**: 579–86.
 20. Geiss A, Rohleder N, Anton F. Evidence for an association between an enhanced reactivity of interleukin-6 levels and reduced glucocorticoid sensitivity in patients with fibromyalgia. *Psychoneuroendocrinology* 2012; **37**: 671–84.
 21. Ives SJ, Blegen M, Coughlin MA, Redmond J, Matthews T, Paolone V. Salivary estradiol, interleukin-6 production, and the relationship to substrate metabolism during exercise in females. *Eur J Appl Physiol* 2011; **111**: 1649–55.
 22. Ruggiero SL, Dodson TB, Assael LA, Landesberg R, Marx RE, Mehrotra B. Task force on bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws, american association of oral and maxillofacial surgeons. American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons position paper on bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw – 2009 update. *Aust Endod J* 2009; **35**: 119–30.
 23. Navazesh M. Methods for collecting saliva. *Ann NY Acad Sci* 1993; **694**: 72–7.
 24. Bagan J, Scully C, Sabater V, Jimenez Y. Osteonecrosis of the jaws in patients treated with intravenous bisphosphonates (BRONJ): a concise update. *Oral Oncol* 2009; **45**: 551–4.
 25. Moutzouris JP, Che W, Ramsay EE, et al. Proteasomal inhibition upregulates the endogenous MAPK deactivator MKP-1 in human airway smooth muscle: mechanism of action and effect on cytokine secretion. *Biochim Biophys Acta* 2010; **1803**: 416–23.
 26. Feld M, Shpacovitch VM, Ehrhardt C, et al. Agonists of proteinase-activated receptor-2 enhance IFN-gamma-inducible effects on human monocytes: role in influenza A infection. *J Immunol* 2008; **180**: 6903–10.
 27. Sheth CC, Hall R, Lewis L, et al. Glycosylation status of the *C. albicans* cell wall affects the efficiency of neutrophil phagocytosis and killing but not cytokine signaling. *Med Mycol* 2011; **49**: 513–24.
 28. Huang MC, Patel K, Taub DD, Longo DL, Goetzl EJ. Human CD4+ 8-T cells are a distinctive immunoregulatory subset. *FASEB J* 2010; **24**: 2558–66.
 29. Schade AE, Schieven GL, Townsend R, et al. Dasatinib, a small-molecule protein tyrosine kinase inhibitor, inhibits T-cell activation and proliferation. *Blood* 2008; **111**: 1366–77.
 30. Mohri Y, Mohri T, Wei W, et al. Identification of macrophage migration inhibitory factor and human neutrophil peptides 1-3 as potential biomarkers for gastric cancer. *Br J Cancer* 2009; **101**: 295–302.
 31. Bos R, Sherman LA. CD4+ T-cell help in the tumor milieu is required for recruitment and cytolytic function of CD8+ T lymphocytes. *Cancer Res* 2010; **70**: 8368–77.
 32. SahebJamee M, Eslami M, Atarbashimoghadam F, Sarafnejad A. Salivary concentration of TNFalpha, IL1 alpha, IL6, and IL8 in oral squamous cell carcinoma. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 2008; **13**: E292–5.
 33. Kaushik R, Yeltiwar RK, Pushpanshu K. Salivary interleukin-1β levels in patients with chronic periodontitis before and after periodontal phase I therapy and healthy controls: a case-control study. *J Periodontol* 2011; **82**: 1353–9.
 34. Hasegawa-Nakamura K, Tateishi F, Nakamura T, et al. The possible mechanism of preterm birth associated with periodontopathic *Porphyromonas gingivalis*. *J Periodontol Res* 2011; **46**: 497–504.

Conflict of interest

None declared.

ORIGINAL ARTICLE

Interleukin-6 concentration changes in plasma and saliva in bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws

J Bagan¹, GT Sáez², MC Tormos³, E Hens⁴, MJ Terol⁵, L Bagan⁶, JM Diaz-Fernández⁴, A Lluch⁷, C Camps⁸¹Oral Medicine, Head Service of Stomatology and Maxillofacial Surgery, University of Valencia, University General Hospital;²Biochemistry and Molecular Biology, Department of Biochemistry, School of Medicine, University of Valencia, CIBERobn, Servicio de Análisis Clínicos-CDBI, HGUV; ³Department of Biochemistry and Molecular Biology, School of Medicine, University of Valencia, CIBERobn; ⁴Oral and Maxillofacial Surgery, University General Hospital; ⁵Hematology, Service of Oncohematology, University Clinic Hospital; ⁶Oral Medicine, University of Valencia; ⁷Oncology, Head Service of Oncohematology, University Clinic Hospital;⁸Oncology, Head Service of Oncology, University General Hospital, Valencia, Spain

AIM: To determine the plasma and saliva levels of IL-6 in patients with bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws (BRONJ) and to investigate whether there is a correlation between more advanced stages of BRONJ and levels of IL-6.

MATERIAL AND METHODS: We studied three groups: group 1 consisted of 30 patients with BRONJ due to intravenous bisphosphonates (ivBP), group 2 consisted of 25 patients treated with ivBP but without BRONJ, and group 3 consisted of 15 healthy controls. In each case, we assayed plasma and saliva IL-6 samples using an ELISA test.

RESULTS: Significantly, higher IL-6 values were found in both saliva and plasma in group 1 vs groups 2 and 3 ($P < 0.01$). Group 1 showed no differences in plasma or saliva IL-6 according to patient gender ($P > 0.05$), type of tumor, BRONJ location, etiology of BRONJ, or disease stage ($P > 0.05$). We found higher plasma and saliva IL-6 values in the more advanced stages of BRONJ, although the differences were not statistically significant.

CONCLUSIONS: Plasma and saliva IL-6 values were higher in our patients with BRONJ than in controls and therefore might be a useful tool for monitoring the severity of BRONJ.

Oral Diseases (2013) doi:10.1111/odi.12150

Keywords: bisphosphonates; osteonecrosis of the jaws; interleukin-6

Introduction

In 2003, Marx described the first documented cases of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws (BRONJ). Since then, many authors have published case series and case reports (Junquera *et al.*, 2009; Fedele *et al.*, 2010; Vescovi *et al.*, 2011; Bagan *et al.*, 2012; Margaix-Muñoz *et al.*, 2013) and have proposed protocols to standardize the diagnosis and treatment (Kyrgidis *et al.*, 2009; Ruggiero *et al.*, 2009). Although BRONJ is characterized by inhibition of osteoclast function, particularly in the jaw bones, many issues remain to be clarified to understand the exact pathogenic mechanism underlying BRONJ (O’Ryan and Lo, 2012; Otto *et al.*, 2012).

Interleukins are proteins that play important roles in the immune system. In this context, interleukin-6 (IL-6) has a well-known pro-inflammatory role in chronic inflammatory diseases. IL-6 is produced by macrophages, neutrophils, keratinocytes, endothelial cells, and fibroblasts (Matsuki *et al.*, 1992). In addition to its inflammatory action, IL-6 plays a role in autoimmune diseases and malignancies (Moreau *et al.*, 2000; Park *et al.*, 2007; Packard and Libby, 2008; and Nishimoto, 2010).

BRONJ involves inflammation of the affected oral tissues, in most cases accompanied by infection. This, in turn, can generate pain, suppuration, and swelling of the surrounding soft tissues (Marx *et al.*, 2005).

In a recent study, we found changes in interleukin levels in saliva in patients with BRONJ, interleukin-1 alpha (IL-1 α), interleukin-1 receptor antagonist (IL-1RA), and interleukin-1 beta (IL-1 β) (Bagan *et al.*, 2013). However, to our knowledge, IL-6 levels in saliva and plasma have not been investigated previously in patients with BRONJ. Thus, given that IL-6 alterations may be expected in the inflammatory process observed in BRONJ, we decided to compare the levels of IL-6 in patients with BRONJ vs those recorded in patients likewise treated with bisphosphonates but without BRONJ, and in control subjects. We

Correspondence: Jose Bagan, Oral Medicine Department, Stomatology and Maxillofacial Service, University General Hospital, Avda/Tres Cruces s/n, 46014 Valencia, Spain. Tel/Fax: 34 961972127, E-mail: bagan@uv.es

Received 20 March 2013; revised 26 May 2013; accepted 27 May 2013

2

also investigated whether there was any correlation between the advanced stages of BRONJ and the number of exposed necrotic bone areas with levels of IL-6.

Materials and methods

The study involved three groups of patients. Group 1 consisted of 30 patients with BRONJ, all treated with intravenous bisphosphonates (ivBP). Group 2 consisted of 25 patients treated with ivBP but without BRONJ. All patients in groups 1 and 2 had been treated with ivBP (zoledronic acid) due to malignant disease. Group 3 consisted of 15 healthy controls matched by age to groups 1 and 2, with no significant differences among them. The mean (\pm s.d.) patient ages in groups 1, 2, and 3 were 66.1 ± 10.7 , 61.2 ± 10.7 , and 61.7 ± 10.9 years, respectively. There were 15 males and 15 females in group 1. In each case, we recorded the dental status based on the DMF index (Svaton and Helöe, 1975), plaque index (Silness and Løe, 1964), number of caries, number of decayed teeth, and number of fillings at baseline. The general dental characteristics of the study groups are shown in Table 1. There were no significant differences between groups 1 and 2 regarding the type of malignant disease (Table 2), corticosteroid treatment, chemotherapy, hormone therapy, or other drugs ($P > 0.05$).

The diagnosis of BRONJ was based on the criteria of Ruggiero *et al* (2009). We considered four stages at the time of patient inclusion; however, we finally reclassified the patients and reduced the stages to two to differentiate more inflammatory cases (stage 3) from the initial or early stages of the disease (stages 0–2).

The study was approved by the Ethics Committee of the University General Hospital of Valencia (Spain). The experiments were undertaken with the understanding and written consent of each subject and according to ethical principles, including the World Medical Association Declaration of Helsinki.

Plasma (with the addition of EDTA) and saliva samples were collected from all patients in each of the groups; however, we finally used 30 saliva and 26 plasma samples in group 1. Regarding saliva, we collected unstimulated whole saliva following the protocol of Navazesh (1993). Contamination of saliva samples with blood can also be a

concern. We recommended the following: Participants should not brush their teeth within 45 min prior to sample collection, saliva samples visibly contaminated with blood should be discarded and recollected. Blood and saliva samples were collected in the second visit, 1 week after the first appointment. We collected only one serum and saliva sample.

Blood was obtained from a peripheral vein in the arm. The plasma and saliva samples were pooled, aliquoted into microcentrifuge tubes, centrifuged (10 min, 3000 g), and stored at -80°C until analysis.

IL-6 in samples was assayed using a commercial ELISA kit (Quantikine Human IL-6, R&D Systems, Inc. Minneapolis, MN, USA). Briefly, saliva and plasma samples were loaded on IL-6-specific monoclonal antibody precoated microplates. Standards and samples are bound by immobilized antibody. After washing to remove unbound substances, an enzyme-linked polyclonal antibody specific for IL-6 was added to the wells. After a second wash with wash buffer, the substrate solution was added and incubated for 30 min, protected from light. Reactions were stopped with an appropriate substrate. The optical density of the developed color in each well was measured at 450 nm. IL-6 levels are reported as means \pm s.d., expressed in pg ml^{-1} (Sharma *et al*, 2011).

Analysis of variance was used for the comparison of means in blood and saliva among the three groups. We used the Levene's test and the Shapiro–Wilk test to assess the null hypothesis that the groups come from populations with the same variance. The Student's *t*-test was used for the comparison of groups 1 and 2. The relationship between IL-6 in saliva and plasma was analyzed based on the correlation coefficient.

We also performed a binomial logistic regression analysis considering as dependent variable the presence or absence of BRONJ in the 55 cases treated with BP. As independent variables (covariates), we considered the time on BP, age, serum IL-6, saliva IL-6, and the dental indexes: DMF index, plaque index, number of caries, number of decayed teeth, and number of fillings. The covariates were entered into the analysis using the forward method. We obtained estimates of the coefficients and of the odds ratio with 95% confidence intervals (95% CI). We also obtained the R^2 of Nagelkerke and used the

Table 1 Dental characteristics in the three groups

	Group 1 (30 cases)	Group 2 (25 cases)	Group 3 (15 cases)	Kruskal–Wallis test and statistical significance
DMF (mean \pm s.d.)	16.2 \pm 8.1	13.1 \pm 8.5	14.1 \pm 6.2	K-W = 2.76 $P > 0.05$
Plaque index (mean \pm s.d.)	1.5 \pm 0.9	4.7 \pm 16.0	1.04 \pm 0.7	K-W = 3.69 $P > 0.05$
Missing teeth (mean \pm s.d.)	10.7 \pm 8.3	7.1 \pm 6.8	9.7 \pm 6.6	K-W = 4.08 $P > 0.05$
Number of caries (mean \pm s.d.)	1.9 \pm 2.0	2.8 \pm 4.8	1.06 \pm 1.6	K-W = 2.58 $P > 0.05$
Number of fillings (mean \pm s.d.)	3.5 \pm 3.1	3.2 \pm 3.5	3.5 \pm 2.6	K-W = 0.53 $P > 0.05$

DMF, Number of decay, missing, and fillings; K-W, Kruskal–Wallis test.

Table 2 Malignant tumors in groups 1 and 2

Group	TUMOR						Total
	Multiple						
	Breast	myeloma	Prostate	Lungs	Kidney	Sarcoma	
1	10	13	5	1	1	0	30
	33.3%	43.3%	16.7%	3.3%	3.3%	0.0%	100.0%
2	14	8	1	1	0	1	25
	56.0%	32.0%	4.0%	4.0%	0.0%	4.0%	100.0%
Total	24	21	6	2	1	1	55

Chi-cuadrado de Pearson = 6.120; $P > 0.05$.

Group 1: BRONJ.

Group 2: Patients treated with BP but without BRONJ.

Hosmer–Lemeshow test to evaluate the goodness of fit. Statistical significance was accepted for $P < 0.05$.

Results

Significantly higher IL-6 values were seen in both saliva and plasma in group 1 vs groups 2 and 3 ($P < 0.01$). The mean IL-6 values, in turn, were higher in group 2 than in group 3 (Table 3). On comparing only groups 1 and 2, the values followed a normal distribution with mean serum IL-6 values of 94.13 ± 36.62 pg ml⁻¹ in group 1 and 70.26 ± 28.20 pg ml⁻¹ in group 2 ($t = 2.53$ $P < 0.05$). The mean saliva IL-6 values were 271.13 ± 95.07 pg ml⁻¹ in group 1 and 202.42 ± 91.57 pg ml⁻¹ in group 2 ($t = 2.71$ $P < 0.05$).

Group 1 showed no difference in plasma or saliva IL-6 according to patient gender ($P > 0.05$), type of tumor, BRONJ location, etiology of BRONJ, or disease stage ($P > 0.05$; Table 4). However, there was a clear tendency toward higher IL-6 values in both plasma and saliva in the more advanced stages of BRONJ, although the difference was not significant. A mandibular location of BRONJ yielded the highest IL-6 values, although again the difference was not significant.

Table 3 Plasma and saliva IL-6 values in the three groups

Groups	Cases	Mean values (pg ml ⁻¹)	Standard deviation	Kruskal–Wallis test and statistical significance
Serum IL-6				
1	26	94.13	36.62	K-W = 32.9 $P < 0.01$
2	23	70.26	28.20	
3	12	22.48	3.78	
Total	61	71.04	39.45	
Saliva IL-6				
1	30	271.13	95.07	K-W = 38.6 $P < 0.01$
2	25	202.42	91.57	
3	15	24.10	10.89	
Total	70	193.66	125.01	

K-W, Kruskal–Wallis test.

Group 1: BRONJ.

Group 2: Patients treated with BP but without BRONJ.

Group 3: Control groups.

Plasma and saliva IL-6 in BRONJ

J Bagan *et al*

3

A statistically significant correlation was found between IL-6 in saliva and plasma in both groups of patients treated with BP ($R = 0.299$, $P < 0.05$).

The mean number of bone exposures per patient was 1.34 ± 0.81 . A non-significant correlation was identified between the number of BRONJ bone exposure areas in the oral cavity and plasma and saliva IL-6 values ($P > 0.05$).

No statistically significant differences were observed among serum and saliva IL-6 in the different locations of cancer metastasis ($P > 0.05$).

In the binomial logistic regression, we found that the duration of bisphosphonate therapy was a significant prognostic factor to develop BRONJ ($P = 0.01$) with an OR = 1.063. This means that every month on bisphosphonate therapy, the risk of BRONJ increases 6.3%. The second variable include in the equation of the logistic regression was saliva IL-6 ($P = 0.01$) and OR = 1.01. The final model has $R^2 = 0.337$, which means that the variables in the equation are valid. The sensibility is 72.4%, and specificity is 72% (Table 5).

Furthermore, in the logistic regression analysis, and as shown in Table 5, the dental variables did not influence the presence of BRONJ (Wald test lacking statistical significance, $P > 0.05$).

Discussion

The pathogenic mechanism underlying bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws (BRONJ) has been widely addressed in the literature (Bagan *et al*, 2009a). The inhibition of osteoclast function—and consequently of normal bone turnover—has been proposed as the major cause of bone necrosis (Cetiner *et al*, 2009; Favia *et al*, 2009). However, others have described endothelial alterations (Arduino *et al*, 2011). According to some investigators, the disease has a certain genetic component, manifesting as genetic polymorphisms in patients with multiple myeloma (Sarasquete *et al*, 2009). However, other studies have failed to confirm these findings (Such *et al*, 2011), and the role of any genetic factor remains unclear.

There is a clinical similarity between BRONJ and osteoradionecrosis (ORN). We compared the clinical and radiological characteristics and complications in 53 cases of BRONJ vs 20 cases of ORN. The severity of the complications, such as jaw fractures and skin fistulas, was greater in ORN (Bagan *et al*, 2009b).

Osteoblasts produced some molecules of significance in bone, such as receptor activator of nuclear factor κ B ligand (RANKL), osteoprotegerin (OPG) (a RANKL antagonist), and interleukin (IL)-6. These are important regulators of bone remodeling (Tipton *et al*, 2011). BP cause significant alteration of the RANKL/OPG system, increasing the production of OPG and decreasing RANKL. These molecules produced by osteoblasts are essential for osteoclast activation (Guiliani *et al*, 1998; Viereck *et al*, 2002). Activation of RANK is also crucial for osteoclast function (Epstein *et al*, 2012). This lack of remodeling can eventually cause bone to become acellular and necrotic, eventually leading to the clinical development of BRONJ (Tipton *et al*, 2011).

Plasma and saliva IL-6 in BRONJ

J. Bagan *et al.*

5

Table 5 (a) Binomial logistic regression output (enter method). (b) Variables in the equation and estimated equation for the model

	P-value (Wald test)	OR	Inferior limit IC95%	Superior limit IC95%				
(a)								
Serum IL-6	0.025*	1.025	1.003	1.047				
Saliva IL-6	0.015*	1.008	1.002	1.015				
Age	0.103	1.044	0.991	1.098				
DMF	0.181	1.046	0.979	1.116				
PI	0.902	0.967	0.565	1.656				
Number of missing teeth	0.088	1.067	0.991	1.149				
Number of decay teeth	0.350	0.923	0.779	1.093				
Number of fillings	0.746	1.027	0.873	1.208				
Time on BP	0.017*	1.059	1.010	1.111				
I.C. 95.0% for Exp(B)								
	B	E.T.	Wald	Gl	Significance	Exp(B)	Lower	Upper
Saliva IL-6	0.010	0.004	6.598	1	0.010	1.010	1.002	1.018
Time on BP	0.061	0.026	5.595	1	0.018	1.063	1.011	1.118
Constant	-3.499	1.191	8.631	1	0.003	0.030		

(b)

$$\frac{p}{1-p} = 0.030 \times 1.063^{\text{durationBP}} \times 1.010^{\text{salivaIL-6}}$$

BP, Bisphosphonates (months); PI, Periodontal index; DMF, Decay, missing, filling teeth.

* $P < 0.05$.

Bold values indicates statistical significance.

In defining our two bisphosphonate treatment groups, we tried to avoid differences between them that might influence the results. In this sense, there were no differences in the mean duration of bisphosphonate treatment, the type of malignant disease, or the drugs that the patients had received in groups 1 and 2. The only known difference between them at the baseline was the presence of BRONJ.

The higher levels of IL-6 could be explained by the mechanism described above in response to infection of the bone and also according to Mozzati *et al* (2013) as a consequence of HMG-CoA reductase reduction after BP use.

Reliable laboratory tests for monitoring patients with BRONJ have not been described to date. Treatment is only based on symptoms and X-ray findings, according to the stage of BRONJ (Ruggiero *et al*, 2009). However, it would be useful to identify laboratory tests which, together with the clinical and X-ray findings, could help us to monitor these patients, or at least to identify the more severe stages of bone necrosis. This has not been described to date.

We have attempted to determine whether the more advanced stages of BRONJ according to the classification of Ruggiero *et al* (2009) are correlated with increased levels of IL-6. In this sense, and according to our findings, an interesting finding was that the more advanced stages of BRONJ were associated with higher IL-6 levels in both plasma and saliva (Table 4). However, because of the small number of cases studied, statistical significance was not reached. As was suggested in the Introduction, these results could explain the existence of higher IL-6 levels in cases with more intense inflammation, such as more advanced stage of BRONJ.

In a recent article, Mozzati *et al* (2013) suggested the importance of evaluating the production of IL-6, RANKL,

osteoprotegerin, and VEGF during BP treatment, to monitor the onset of osteonecrosis of the jaw.

In concordance with Mozzati *et al* (2013), our results suggest that IL-6 levels in saliva could represent a useful tool for monitoring inflammatory changes in these patients. In our series, the more severe stages were associated with a tendency to present higher saliva IL-6, and those patients with higher saliva IL-6 levels showed OR = 1.01 referred to the development of BRONJ, according to our estimated equation for the model. After binomial logistic regression, the duration of BP therapy was found as a significant prognostic factor for developing BRONJ in our patients, with OR = 1.063.

In summary, plasma and saliva IL-6 values were higher in our patients with BRONJ than in the controls and therefore might be a useful tool for monitoring disease severity. In any case, IL-6 should be used as a contributing diagnostic marker and not as a stand-alone predictive parameter.

Studies involving more cases are required to confirm these preliminary findings.

Acknowledgement

We would like to thank Manuel Vicente Pedro Bolumar for the statistical analysis, and the nurses Luisa Seco and Eva de la Iglesia Jordán for obtaining blood samples.

Author contributions

J. Bagan designed and wrote the article. G. Saez, M.C. Tormos performed the biochemical analysis. E. Hens, J.M. Diaz Fernandez obtained the samples from the patients. A. Lluch, M.J. Terol and C. Camps selected and submitted the patients. L. Bagan performed the bibliographic analysis and revised the article.

Conflict of interest

The authors declare that there is no conflict of interest.

References

- Arduino PG, Menegatti E, Scoletta M *et al* (2011). Vascular endothelial growth factor genetic polymorphisms and haplotypes in female patients with bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws. *J Oral Pathol Med* **40**: 510–515.
- Bagan J, Scully C, Sabater V, Jimenez Y (2009a). Osteonecrosis of the jaws in patients treated with intravenous bisphosphonates (BRONJ): a concise update. *Oral Oncol* **45**: 551–554.
- Bagan JV, Jiménez Y, Hernández S *et al* (2009b). Osteonecrosis of the jaws by intravenous bisphosphonates and osteoradionecrosis: a comparative study. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* **14**: e616–e619.
- Bagan JV, Hens-Aumente E, Leopoldo-Rodado M, Poveda-Roda R, Bagan L (2012). Bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws: study of the staging system in a series of clinical cases. *Oral Oncol* **48**: 753–757.
- Bagan J, Sheth CC, Soria JM, Margaix M, Bagan L (2013). Bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws: a preliminary study of salivary interleukins. *J Oral Pathol Med* **42**: 405–408.
- Belibasakis GN, Johansson A, Wang Y *et al* (2005). Cytokine responses of human gingival fibroblasts to *Actinobacillus actinomycetemcomitans* cytolithal distending toxin. *Cytokine* **30**: 56–63.
- Cetiner S, Sucak GT, Kahraman SA *et al* (2009). Osteonecrosis of the jaw in patients with multiple myeloma treated with zoledronic acid. *J Bone Miner Metab* **27**: 435–443.
- Epstein MS, Ephros HD, Epstein JB (2012). Review of current literature and implications of RANKL inhibitors for oral health care providers. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol* [Epub ahead of print]. PMID: 22901640.
- Favia G, Pilolli GP, Maiorano E (2009). Histologic and histomorphometric features of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws: an analysis of 31 cases with confocal laser scanning microscopy. *Bone* **45**: 406–413.
- Fedele S, Porter SR, D' Aiuto F *et al* (2010). Nonexposed variant of bisphosphonate-associated osteonecrosis of the jaw: a case series. *Am J Med* **123**: 1060–1064.
- Guiliani N, Pedrazzoni M, Passeri G, Girasole G (1998). Bisphosphonates inhibit IL-6 production of human osteoblast-like cells. *Scand J Rheumatol* **27**: 38–41.
- Hansen T, Kunkel M, Springer E *et al* (2007). Actinomycosis of the jaws—histopathological study of 45 patients shows significant involvement in bisphosphonate-associated osteonecrosis and infected osteoradionecrosis. *Virchows Arch* **451**: 1009–1017.
- Junqueira L, Gallego L, Pelaz A, Olay S (2009). Oral bisphosphonate-associated osteonecrosis in rheumatoid arthritis. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* **14**: E292–E294.
- Kos M, Brusco D, Kuebler J, Engelke W (2010). Clinical comparison of patients with osteonecrosis of the jaws, with and without a history of bisphosphonates administration. *Int J Oral Maxillofac Surg* **39**: 1097–1102.
- Kyrgidis A, Koloutsos G, Vahtsevanos K (2009). Treatment protocols of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws. *Head Neck* **31**: 1112–1113.
- Margaix-Muñoz M, Bagan J, Poveda-Roda R (2013). Intravenous bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws: influence of coadjuvant antineoplastic treatment and study of buccodental condition. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* **18**: e194–e200.
- Marx RE (2003). Pamidronate (Aredia) and zoledronate (Zometa) induced avascular necrosis of the jaws: a growing epidemic. *J Oral Maxillofac Surg* **61**: 1115–1117.
- Marx RE, Sawatari Y, Fortin M, Broumand V (2005). Bisphosphonate-induced exposed bone (osteonecrosis/osteopetrosis) of the jaws: risk factors, recognition, prevention, and treatment. *J Oral Maxillofac Surg* **63**: 1567–1575.
- Matsuki Y, Yamamoto T, Hara K (1992). Detection of inflammatory cytokine messenger RNA (mRNA)-expressing cells in human inflamed gingiva by combined in situ hybridization and immunohistochemistry. *Immunology* **76**: 42–47.
- Matsushima K, Ohbayashi E, Takeuchi H, Hosoya S, Abiko Y, Yamazaki M (1998). Stimulation of interleukin-6 production in human dental pulp cells by peptidoglycans from *Lactobacillus casei*. *J Endod* **24**: 252–255.
- Moreau P, Harousseau JL, Wijdenes J, Morineau N, Milpied N, Bataille R (2000). A combination of anti-interleukin 6 murine monoclonal antibody with dexamethasone and high-dose melphalan induces high complete response rates in advanced multiple myeloma. *Br J Haematol* **109**: 661–664.
- Mozzati M, Martinasso G, Maggiora M *et al* (2013). Oral mucosa produces cytokines and factors influencing osteoclast activity and endothelial cell proliferation, in patients with osteonecrosis of jaw after treatment with zoledronic acid. *Clin Oral Invest* **17**: 1259–1266.
- Navazesh M (1993). Methods for collecting saliva. *Ann N Y Acad Sci* **694**: 72–77.
- Nibali L, Fedele S, D' Aiuto F, Donos N (2012). Interleukin-6 in oral diseases: a review. *Oral Dis* **18**: 236–243.
- Nishimoto N (2010). Interleukin-6 as a therapeutic target in candidate inflammatory diseases. *Clin Pharmacol Ther* **87**: 483–487.
- O'Ryan FS, Lo JC (2012). Bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw in patients with oral bisphosphonate exposure: clinical course and outcomes. *J Oral Maxillofac Surg* **70**: 1844–1853.
- Otto S, Schreyer C, Hafner S *et al* (2012). Bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws - characteristics, risk factors, clinical features, localization and impact on oncological treatment. *J Craniomaxillofac Surg* **40**: 303–309.
- Packard RR, Libby P (2008). Inflammation in atherosclerosis: from vascular biology to biomarker discovery and risk prediction. *Clin Chem* **54**: 24–38.
- Park MC, Lee SW, Choi ST, Park YB, Lee SK (2007). Plasma leptin levels correlate with interleukin-6 levels and disease activity in patients with ankylosing spondylitis. *Scand J Rheumatol* **36**: 101–106.
- Pazianas M (2011). Osteonecrosis of the jaw and the role of macrophages. *J Natl Cancer Inst* **103**: 232–240.
- Reid IR, Cornish J (2011). Epidemiology and pathogenesis of osteonecrosis of the jaw. *Nat Rev Rheumatol* **8**: 90–96.
- Playfair JHL, Chain BM (2013). *Immunology at a Glance*, 9th edn. Oxford: Wiley-Blackwell.
- Ruggiero SL, Dodson TB, Assael LA, Landesberg R, Marx RE, Mehrotra B; Task Force on Bisphosphonate-Related Osteonecrosis of the Jaws, American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons (2009). American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons position paper on bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw - 2009 update. *Aust Endod J* **35**: 119–130.
- Sarasquete ME, González M, San Miguel JF, García-Sanz R (2009). Bisphosphonate-related osteonecrosis: genetic and acquired risk factors. *Oral Dis* **15**: 382–387.
- Sharma M, Bairy I, Pai K *et al* (2011). Salivary IL-6 levels in oral leukoplakia with dysplasia and its clinical relevance to tobacco habits and periodontitis. *Clin Oral Invest* **15**: 705–714.

- Silness J, Løe H (1964). Periodontal disease in pregnancy. II. Correlation between oral hygiene and periodontal condition. *Acta Odontol Scand* **22**: 121–135.
- Such E, Cervera J, Terpos E *et al* (2011). CYP2C8 gene polymorphism and bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw in patients with multiple myeloma. *Haematologica* **96**: 1557–1559.
- Svatun B, Heløe LA (1975). Dental status and treatment needs among institutionalized mentally subnormal persons in Norway. *Community Dent Oral Epidemiol* **3**: 208–213.
- Tipton DA, Seshul BA, Dabbous MKh (2011). Effect of bisphosphonates on human gingival fibroblast production of mediators of osteoclastogenesis: RANKL, osteoprotegerin and interleukin-6. *J Periodontal Res* **46**: 39–47.
- Troeltzsch M, Woodlock T, Kriegelstein S, Steiner T, Messlinger K, Troeltzsch M (2012). Physiology and pharmacology of nonbisphosphonate drugs implicated in osteonecrosis of the jaw. *J Can Dent Assoc* **78**: c85.
- Vescovi P, Campisi G, Fusco V *et al* (2011). Surgery-triggered and non surgery-triggered Bisphosphonate-related Osteonecrosis of the Jaws (BRONJ): a retrospective analysis of 567 cases in an Italian multicenter study. *Oral Oncol* **47**: 191–194.
- Viereck V, Emons G, Lauck V (2002). Bisphosphonates pamidronate and zoledronic acid stimulated osteoprotegerin production by primary human osteoblasts. *Biochem Biophys Res Commun* **291**: 680–686.



Oxidative stress in bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws

Jose Bagan^{1,2}, Guillermo T. Sáez³, M. Carmen Tormos⁴, Carmen Gavalda-Esteve⁵, Leticia Bagan⁵, Manuel Leopoldo-Rodado², Javier Calvo⁶, Carlos Camps^{7,8}

¹Department of Oral Medicine, Valencia University, Valencia, Spain; ²Service of Stomatology and Maxillofacial Surgery, University General Hospital, Valencia, Spain; ³Department of Biochemistry, CIBERobn, Servicio de análisis clínicos-CDBI, HGUV, School of Medicine, University of Valencia, Valencia, Spain; ⁴Department of Biochemistry and Molecular Biology, CIBERobn, School of Medicine, University of Valencia, Valencia, Spain; ⁵Department of Oral Medicine, University of Valencia, Valencia, Spain; ⁶Head Service of Rheumatology, University General Hospital, Valencia, Spain; ⁷Department of Medicine, Valencia University, Valencia, Spain; ⁸Head Service of Oncology, University General Hospital, Valencia, Spain

OBJECTIVES: To analyze whether oxidative stress (OS) changes are present in patients with bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw (BRONJ) versus controls. **MATERIALS AND METHODS:** Oxidative stress was analyzed in serum and unstimulated saliva of three groups: Group 1 consisted of 24 patients who had been treated with intravenous bisphosphonates (ivBPs) and developed BRONJ, group 2 consisted of 20 patients who had received ivBPs and did not develop BRONJ, and group 3 comprised 17 control subjects. Reduced glutathione (GSH), malondialdehyde (MDA), oxidized glutathione (GSSG), and 8-oxo-7,8-dihydro-2-deoxyguanosine (8-oxo-dG) levels, as well as the GSSG/GSH ratio, were measured.

RESULTS: Mean serum and saliva levels of MDA, GSSG, and 8-oxo-dG and the GSSG/GSH ratio were significantly higher in patients with BRONJ than in controls. We found no significant difference in OS according to BRONJ stage, sex, or location in the jaws. Logistic regression analysis revealed that the GSSG/GSH ratio was a significant factor predicting the development of BRONJ ($P = 0.01$). **CONCLUSIONS:** Oxidative stress was detected in patients with BRONJ, and the GSSG/GSH ratio was the most significant OS variable found; it was a significant factor predicting the development of BRONJ.

J Oral Pathol Med (2014) 43: 371–377

Keywords: 8-oxo-dG; bisphosphonate-related osteonecrosis; GSH; GSSG; MDA; oxidative stress

Correspondence: Jose Bagan, MD, DDS, PhD, FDSRCSed, Department of Oral Medicine, Stomatology and Maxillofacial Service, University General Hospital, Valencia University, Avda/ Tres Cruces s/n, 46014 Valencia, Spain. Tel: +34 96 1972127, Fax: +34 96 1972127, E-mail: bagan@uv.es

Accepted for publication December 3, 2013

Introduction

The first case reports describing bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw (BRONJ) were published more than 10 years ago (1). No reliable biological marker has been described that allows prediction of the likelihood of BRONJ development in patients who are taking bisphosphonates (BPs).

Many case series and research articles have addressed this topic, but most reported information concerns the clinical aspects and management of BRONJ (2–7).

The inhibition of osteoclast function is generally accepted to occur in osteonecrosis of the jaw after BP treatment. Consequently, bone turnover and resorption capacity are altered (8,9). The length of intravenous bisphosphonate (ivBP) administration (in hours) and the total dose of zoledronic acid (ZA) are the most significant predictive factors for the development of BRONJ (10). Other significant factors are the simultaneous use of prednisone and dental procedures, mainly oral surgery and dental extraction (11–13).

Some authors have described frequent bacterial (mainly *Actinomyces*) infection of the exposed bone in BRONJ (14–16). Clinical evidence suggests that *Actinomyces* play a key role in the pathogenesis of BRONJ (17). Recently, Anav-Lev et al. (18) stated that *Actinomyces* infection is a common factor in BRONJ; indeed, they found *Actinomyces* colonization in 100% of their cases.

Antibiotic administration to control infection is among the most frequently recommended therapeutic interventions for BRONJ (19). However, infections frequently recur after treatment, which may cause interleukin (IL) release, as we recently presented in a case series (20,21). We found increased levels of IL-1 α , IL-1 receptor antagonist, IL-1 β , and IL-6, suggesting that persistent bacterial infection of the exposed necrotic bone occurs in BRONJ. Recently, Grant and Hung (22) analyzed the concepts of persistent bacterial infection, antibiotic tolerance, and the oxidative stress (OS) response.

Oxidative stress is an imbalance between the amount of reactive oxygen species (ROS) within a cell and the cell's ability to remove these reactive peroxides and free radicals. ROS target unsaturated phospholipids, proteins, carbohydrates, and nucleic acids (DNA or RNA) and thus can compromise cell structure and viability (23).

Oxidative stress has been reported in patients with cancer, mainly in advanced cases with metastasis (24). BP treatment can also produce OS (25) and, of course, continued local inflammation – with or without an associated infective process (26–29) – can produce ROS. However, to our knowledge, no report has addressed OS changes in patients with BRONJ.

Thus, the aims of our study were twofold. First, we analyzed whether serum and saliva OS differed between patients with BRONJ who had received ivBPs and controls. Second, we investigated whether any OS-related factor analyzed was significantly associated with the presence of BRONJ in patients treated with ivBPs.

Materials and methods

The Ethics Committee of the University of Valencia (Spain) approved this study. The experiments were undertaken with the understanding and written consent of all subjects and according to ethical principles, including the World Medical Association Declaration of Helsinki.

We studied three groups of patients: Group 1 consisted of 24 patients with BRONJ who had received ivBPs, group 2 comprised 20 patients who had received ivBPs but did not develop BRONJ, and group 3 consisted of 17 age-matched control subjects.

We selected only patients with breast cancer ($n = 23$) or multiple myeloma ($n = 22$) for inclusion in groups 1 and 2. All of these subjects had been treated with ivZA (4-mg doses every 4 weeks).

We analyzed in the three groups the number of decayed, missing, and filled teeth index (30), plaque index (31), or numbers of caries, decayed teeth, and fillings at baseline. The measurement of the state of oral hygiene by Silness-Löe plaque index is based on recording both soft debris and mineralized deposits. Each of the four surfaces of the teeth (buccal, lingual, mesial, and distal) is given a score from 0 to 3. The scores from the four areas of the tooth are added and divided by four to give the plaque index for the tooth.

We followed the criteria proposed by Ruggiero et al. (32) to establish the diagnosis of BRONJ. We collected serum and unstimulated whole saliva samples from all patients in the three groups. Blood was obtained from a peripheral vein in the arm. We collected unstimulated whole saliva following the protocol of Navazesh et al. (33). To avoid blood contamination of the saliva, participants were asked not to brush their teeth within 45 min prior to sample collection; saliva samples visibly contaminated with blood were discarded and recollected. Blood and saliva samples were collected at a second visit, 1 week after the first appointment. We collected only one serum and one saliva sample from each patient. Plasma and saliva were pooled, aliquoted into microcentrifuge tubes, centrifuged (10 min

for serum and 15 min for saliva, 3000 g), and stored at -80°C until analysis.

Analyses of oxidative stress-related parameters

We measured serum and unstimulated saliva levels of oxidized and reduced glutathione (GSSG and GSH), malondialdehyde (MDA), and 8-oxo-7,8-dihydro-2-deoxyguanosine (8-oxo-dG) in the three groups (Table 2). GSSG and GSH were analyzed by high-performance liquid chromatography (HPLC) (34). Additionally, we calculated GSSG/GSH ratio. MDA was analyzed by HPLC and spectrophotometric quantification of MDA–thiobarbituric acid at 532 nm (35). DNA damage, assessed by the formation of 8-oxo-dG, was quantified by HPLC/electrochemical detection after complete enzymatic digestion (36).

We calculated the means and standard deviations of MDA, GSH, GSSG, and 8-oxo-dG levels. The Mann–Whitney *U*-test and Kruskal–Wallis test were used to evaluate differences in continuous variables in two or more groups, respectively. The Spearman correlation test was used to identify correlations between quantitative and continuous variables. A logistic regression analysis was performed to identify OS variable(s) that influenced the presence of BRONJ in patients who received ivBPs. We estimated coefficients and odds ratios (ORs) with 95% confidence intervals. We calculated the Nagelkerke R^2 value and performed the Hosmer–Lemeshow test to evaluate the goodness of fit. Finally, a multiple regression analysis was performed to investigate which variables may influence the GSSG/GSH ratio – the latter being a measure of OS in our cases. Statistical significance was set at $P < 0.05$.

Results

No significant difference was observed between the three groups in the decayed, missing, and filled teeth index (Svaton & Helöe, 1975), plaque index (Silness & Löe, 1964), or numbers of caries, decayed teeth, and fillings at baseline (Table 1).

The mean serum and saliva levels of MDA, GSSG, 8-oxo-dG, and the GSSG/GSH ratio were higher in group 1 than in the other groups. In Fig. 1, we can see the differences between groups 1 and 2. In contrast, serum and saliva GSH levels were lower in patients with BRONJ than in controls. We also found that serum and saliva levels of MDA and GSSG and the GSSG/GSH ratio were higher in the group treated with BPs, but without BRONJ than in group 3 ($P < 0.001$; Table 2).

Simultaneous use of corticosteroids ($P < 0.05$) and female patients were more prevalent in group 1 than in group 2 ($P < 0.05$; Table 3).

Levels of OS variables in group 1 did not differ significantly between patients with breast cancer and those with myeloma ($P > 0.05$; Table 4). OS did not differ according to the number of metastases ($P > 0.05$).

No significant difference in OS parameters was observed according to BRONJ stage, defined using the criteria of Ruggiero et al. (32) ($P > 0.05$), or according to sex or location (mandible or maxilla). We found slightly

Oxidative stress in BRONJ

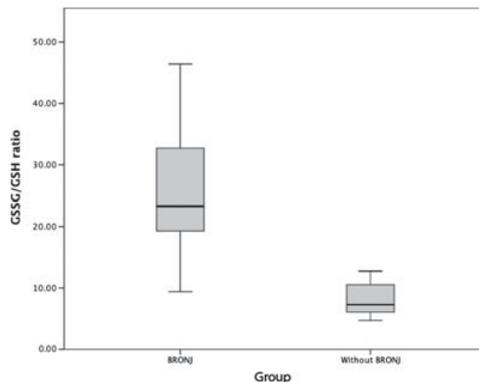
Bagán et al.

373

Table 1 Dental status among the groups

	Group 1 (24 cases)	Group 2 (21 cases)	Group 3 (24 cases)	
Age (mean \pm SD)	65.7 \pm 10.6	61.4 \pm 10.7	61.7 \pm 10.9	K-W = 2.40 P > 0.05
Dental status				
DMF (mean \pm SD)	16.2 \pm 8.4	14.04 \pm 8.9	14.1 \pm 6.2	K-W = 1.26 P > 0.05
Plaque index (mean \pm SD)	1.5 \pm 0.9	1.9 \pm 1.7	1.04 \pm 0.7	K-W = 4.23 P > 0.05
Missing teeth (mean \pm SD)	11.4 \pm 8.4	7.4 \pm 6.8	9.7 \pm 6.6	K-W = 3.40 P > 0.05
Number of caries (mean \pm SD)	2.04 \pm 2.1	3.4 \pm 5.2	1.06 \pm 1.6	K-W = 4.08 P > 0.05
Number of fillings (mean \pm SD)	2.7 \pm 2.7	3.1 \pm 3.7	3.5 \pm 2.6	K-W = 0.53 P > 0.05

DMF, number of decay, missing and fillings; K-W, Kruskal-Wallis test.

**Figure 1** Differences in GSSG/GSH ratio between the groups with and without BRONJ. BRONJ, Bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws.

increased serum and saliva MDA, GSSG, and 8-oxo-dG levels in patients with oral abscesses and suppuration, but this difference was not significant ($P > 0.05$; Table 4).

We found significant correlations between some serum and saliva levels of OS parameters. The duration of ivBP treatment (in months) was longer in group 1 than in group 2 ($P < 0.01$). However, this variable was not correlated with serum or saliva levels of MDA, GSH, GSSG, or 8-oxo-dG ($P > 0.05$).

Logistic regression analysis revealed that the GSSG/GSH ratio was a significant prognostic factor for the development of BRONJ in our cases ($P = 0.01$, OR = 1.91). The Nagelkerke R^2 value of the final model was 0.846, indicating that this variable in the equation was valid. The sensitivity was 90% and specificity was 94.4%.

We also observed that dental variables were not related to the presence of BRONJ (Wald test, $P > 0.05$).

In the multiple regression analysis, the GSSG/GSH ratio was significantly influenced by the presence of BRONJ. This was the most significant factor in the model, with $R^2 = 0.662$, Snedecor $F = 3.882$, and $P < 0.002$. There were no significant correlations to the duration of BP ($P > 0.05$), the use of corticosteroids ($P > 0.05$), or gender ($P > 0.05$).

Table 2 Main levels of oxidative stress measurement in serum and saliva

Groups	Cases	Mean	Standard deviation	
Serum_MDA (nmol/ml)				
1	22	0.95	0.29	Kruskal-Wallis analysis $\chi^2 = 37.06$ $P < 0.001$
2	19	0.43	0.12	
3	13	0.30	0.20	
Saliva_MDA (nmol/ml)				
1	24	0.51	0.13	Kruskal-Wallis analysis $\chi^2 = 32.11$ $P < 0.001$
2	20	0.39	0.11	
3	17	0.21	0.09	
Serum_GSH (nmol/mg)				
1	22	17.93	6.44	Kruskal-Wallis analysis $\chi^2 = 21.53$ $P < 0.001$
2	19	22.13	1.64	
3	13	27.29	5.04	
Saliva_GSH (nmol/mg)				
1	24	14.15	4.74	Kruskal-Wallis analysis $\chi^2 = 29.08$ $P < 0.001$
2	20	16.93	1.45	
3	17	20.33	1.91	
Serum_GSSG (nmol/mg)				
1	22	4.05	1.26	Kruskal-Wallis analysis $\chi^2 = 36.61$ $P < 0.001$
2	19	1.84	0.55	
3	13	1.28	0.86	
Saliva_GSSG (nmol/mg)				
1	24	0.40	0.10	Kruskal-Wallis analysis $\chi^2 = 32.11$ $P < 0.001$
2	20	0.31	0.09	
3	17	0.16	0.07	
Serum_GSSG/GSH% ratio				
1	22	24.79	9.36	Kruskal-Wallis analysis $\chi^2 = 39.37$ $P < 0.001$
2	19	8.41	2.74	
3	13	5.06	4.38	
Saliva_GSSG/GSH% ratio				
1	24	3.23	1.37	Kruskal-Wallis analysis $\chi^2 = 40.30$ $P < 0.001$
2	20	1.84	0.59	
3	17	0.82	0.33	
Serum_8oxodG (pmol/ml)				
1	22	2.79	1.26	Kruskal-Wallis analysis $\chi^2 = 31.45$ $P < 0.001$
2	19	0.72	0.44	
3	13	1.14	0.67	
Saliva_8oxodG (8-oxo-dG/ 10^6 dG)				
1	24	1.89	0.50	Kruskal-Wallis analysis $\chi^2 = 32.11$ $P < 0.001$
2	20	1.44	0.42	
3	17	0.78	0.34	

GSH and GSSG, oxidized and reduced glutathione; MDA, malondialdehyde; 8-oxo-dG, 8-oxo-7,8-dihydro-2-deoxyguanosine.

Discussion

Bisphosphonates have long been used in patients with osteoporosis, Paget's disease, bone metastases, osteogenesis

	10 (41.7%)	14 (58.3%)	3 (14.3%)	18 (85.7%)	
ids	11 (47.8%)		12 (52.2%)		$\chi^2 = 4.74$ <i>P</i>
nor					
mieloma	10 (41.7%)		13 (56%)		Chi-square o
tastasis in breast cancer	14 (61.9%)		8 (38.1%)		<i>P</i> > 0.05
iones	6 (60%)		4 (40%)		Chi-square o
d internal organs	8 (61.5%)		5 (38.5%)		<i>P</i> > 0.05

RONJ.

atients treated with BP, but without BRONJ.

a, and heterotopic ossification – reducing bone 1, increasing bone mass, and reducing fracture risk. It is also known that the receptor activator of actor kappa-B ligand (RANKL) stimulates bone 1, while osteoprotegerin (OPG) inhibits bone 1 (41,42).

sphonates affect the RANKL/OPG system and its n in osteoblasts/osteoblast-like cells, increasing decreasing RANKL. Consequently, they interfere local production of molecules by osteoblasts that tial for osteoclast activation (39). Zoledronic acid its RANKL expression and migration of osteoclast s during osteoclastogenesis (43). Such reduced over and resorption facilitate the development of fter dental surgery or trauma (44,45).

myces invasion of affected bone has been demon- n patients with BRONJ (14–18,46,47). Such has a prolonged course (15,16) and thus may be d under the concept of persistent bacterial infec- antibiotic tolerance addressed by Grant and Hung ne bacterial pathogens evade the human immune nd persist within the host. Their elimination is and requires prolonged courses of antibiotics; this approach does not ‘resolve’ the infection. ess may occur in patients with BRONJ.

mechanism possibly explaining this persistent is decreased protection against OS (48). OS has orted in several diseases, such as metabolic (49,50), cancer (51–54), and cardiovascular dis- (55,56). ROS and other oxidative modifications of omolecules are parts of this physiopathology, i inflammation-associated processes.

ive stress, defined as an imbalance between oxidant idant mechanisms, causes alterations in enzyme i and inhibition (57,58) and disturbances in cell ion and apoptosis (59). ROS are usually present in tory processes, and the oxygen radical products of

levels in rabbit liver tissue. They found sign- MDA levels and significantly lower GSH le group. Taken together, the evidence describe to hypothesize that OS changes would be fo treated with BPs, especially in those with inf infectious conditions, such as in BRONJ.

We found significantly different serum ar of MDA, GSSG, and 8-oxo-dG in patients than in group 2. The GSSG/GSH ratio was group 1 than in the other groups. In contra were lower in the BRONJ group than in contr These results address our first question: O higher in patients who had received ivBP tre: inflammation and infection in exposed bone than in patients treated with ivBPs who di BRONJ and in controls.

In our multiple regression analysis, the c values measured by the GSSG/GSH ratic influenced by the presence of BRONJ as th icant independent factor. In contrast, th administration, corticosteroid use, and gen: significant influence upon the OS values fou

We also highlight that serum and saliva l GSSG, and 8-oxo-dG were higher in patient and abscesses, although this difference was due to the small number of cases analyzed could be explained by BP treatment and pe: *myces* infection as the result of an adaptive the bacteria to continuous OS in patients wi

According to Imlay (48), the adaptation of may cause persistent infection and non-resp otics. The link between the OS response infection suggests a new approach to mana infection, regardless of the underlying mech

Regarding our second question, and basec of binomial logistic regression analysis, th ratio was the most significant predictive fac

Table 4 Plasma and saliva OS values in the 24 cases of group 1

Mean \pm SD	Gender		Tumor		Oral abscess	
	Male	Female	Breast	MM	No	Yes
Serum MDA (nmol/ml)	1.05 \pm 0.34 U de Mann-Whitney = 42 $P >$ 0.05	0.87 \pm 0.25 U de Mann-Whitney = 42 $P >$ 0.05	0.95 \pm 0.24 U de Mann-Whitney = 51 $P >$ 0.05	0.95 \pm 0.34 U de Mann-Whitney = 51 $P >$ 0.05	0.94 \pm 0.28 U de Mann-Whitney = 39 $P >$ 0.05	0.98 \pm 0.37 U de Mann-Whitney = 39 $P >$ 0.05
Saliva MDA (nmol/ml)	0.53 \pm 0.15 U de Mann-Whitney = 64 $P >$ 0.05	0.49 \pm 0.12 U de Mann-Whitney = 64 $P >$ 0.05	0.54 \pm 0.11 U de Mann-Whitney = 48 $P >$ 0.05	0.49 \pm 0.15 U de Mann-Whitney = 48 $P >$ 0.05	0.50 \pm 0.11 U de Mann-Whitney = 48 $P >$ 0.05	0.52 \pm 0.20 U de Mann-Whitney = 48 $P >$ 0.05
Serum GSH (nmol/mg)	19.56 \pm 7.37 U de Mann-Whitney = 46 $P >$ 0.05	16.81 \pm 5.75 U de Mann-Whitney = 46 $P >$ 0.05	17.68 \pm 5.93 U de Mann-Whitney = 54 $P >$ 0.05	18.11 \pm 7.01 U de Mann-Whitney = 54 $P >$ 0.05	17.34 \pm 6.95 U de Mann-Whitney = 28 $P >$ 0.05	19.96 \pm 4.26 U de Mann-Whitney = 28 $P >$ 0.05
Saliva GSH (nmol/mg)	15.28 \pm 5.06 U de Mann-Whitney = 58 $P >$ 0.05	13.34 \pm 4.52 U de Mann-Whitney = 58 $P >$ 0.05	13.70 \pm 4.33 U de Mann-Whitney = 67 $P >$ 0.05	14.47 \pm 5.15 U de Mann-Whitney = 67 $P >$ 0.05	13.81 \pm 5.22 U de Mann-Whitney = 41 $P >$ 0.05	15.17 \pm 3.04 U de Mann-Whitney = 41 $P >$ 0.05
Serum GSSG (nmol/mg)	4.49 \pm 1.46 U de Mann-Whitney = 42 $P >$ 0.05	3.74 \pm 1.07 U de Mann-Whitney = 42 $P >$ 0.05	4.05 \pm 1.03 U de Mann-Whitney = 51 $P >$ 0.05	4.05 \pm 1.45 U de Mann-Whitney = 51 $P >$ 0.05	4.00 \pm 1.21 U de Mann-Whitney = 39 $P >$ 0.05	4.20 \pm 1.58 U de Mann-Whitney = 39 $P >$ 0.05
Saliva GSSG (nmol/mg)	0.42 \pm 0.12 U de Mann-Whitney = 64 $P >$ 0.05	0.39 \pm 0.10 U de Mann-Whitney = 64 $P >$ 0.05	0.42 \pm 0.08 U de Mann-Whitney = 48 $P >$ 0.05	0.39 \pm 0.12 U de Mann-Whitney = 48 $P >$ 0.05	0.40 \pm 0.09 U de Mann-Whitney = 48 $P >$ 0.05	0.41 \pm 0.16 U de Mann-Whitney = 48 $P >$ 0.05
Serum 8oxodG (pmol/ml)	3.23 \pm 1.46 U de Mann-Whitney = 42 $P >$ 0.05	2.48 \pm 1.07 U de Mann-Whitney = 42 $P >$ 0.05	2.79 \pm 1.03 U de Mann-Whitney = 51 $P >$ 0.05	2.79 \pm 1.45 U de Mann-Whitney = 51 $P >$ 0.05	2.74 \pm 1.21 U de Mann-Whitney = 39 $P >$ 0.05	2.94 \pm 1.58 U de Mann-Whitney = 39 $P >$ 0.05
Saliva 8oxodG (8-oxo-dG/10 ⁶ dG)	1.98 \pm 0.56 U de Mann-Whitney = 64 $P >$ 0.05	1.82 \pm 0.47 U de Mann-Whitney = 64 $P >$ 0.05	1.99 \pm 0.40 U de Mann-Whitney = 48 $P >$ 0.05	1.82 \pm 0.57 U de Mann-Whitney = 48 $P >$ 0.05	1.87 \pm 0.41 U de Mann-Whitney = 48 $P >$ 0.05	1.93 \pm 0.76 U de Mann-Whitney = 48 $P >$ 0.05

OS: Oxidative stress.

Oxidative stress in BRONJ

Bagan et al.

375

most redox-active GSH molecules are reduced and only a minor proportion is present as GSSG; thus, GSH and GSSG are considered to be major cellular redox buffers. An increase in the GSSG/GSH ratio indicates an OS status (67), and the ratio can be used to assess redox status (68).

In summary, plasma and saliva OS levels were higher in patients with BRONJ than in controls and thus may be useful for the monitoring of these patients. However, OS parameters should be used as contributing markers, not as stand-alone predictive parameters. Studies involving more cases are required to confirm these preliminary findings.

References

- Marx RE. Pamidronate (Aredia) and zoledronate (Zometa) induced avascular necrosis of the jaws: a growing epidemic. *J Oral Maxillofac Surg* 2003; **61**: 1115–7.
- Bagan JV, Murillo J, Jimenez Y, et al. Avascular jaw osteonecrosis in association with cancer chemotherapy: series of 10 cases. *J Oral Pathol Med* 2005; **34**: 120–3.
- Francini F, Pascucci A, Francini E, et al. Osteonecrosis of the jaw in patients with cancer who received zoledronic acid and bevacizumab. *J Am Dent Assoc* 2011; **142**: 506–13.
- Vahtsevanos K, Kyrgidis A, Verrou E, et al. Longitudinal cohort study of risk factors in cancer patients of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw. *J Clin Oncol* 2009; **27**: 5356–62.
- Walter C, Al-Nawas B, du Bois A, Buch L, Harter P, Grötz KA. Incidence of bisphosphonate-associated osteonecrosis of the jaws in breast cancer patients. *Cancer* 2009; **115**: 1631–7.
- Vescovi P, Campisi G, Fusco V, et al. Surgery-triggered and non surgery-triggered Bisphosphonate-related Osteonecrosis of the Jaws (BRONJ): a retrospective analysis of 567 cases in an Italian multicenter study. *Oral Oncol* 2011; **47**: 191–4.
- Bagan JV, Hens-Aumente E, Leopoldo-Rodado M, Poveda-Roda R, Bagan L. Bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws: study of the staging system in a series of clinical cases. *Oral Oncol* 2012; **48**: 753–7.
- Johannesen J, Briody J, McQuade M, Little DG, Cowell CT, Munns CF. Systemic effects of zoledronic acid in children with traumatic femoral head avascular necrosis and Legg-Calve-Perthes disease. *Bone* 2009; **45**: 898–902.
- Ruggiero SL. Bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw: an overview. *Ann N Y Acad Sci* 2011; **1218**: 38–46.
- Fehm T, Beck V, Banys M, et al. Bisphosphonate-induced osteonecrosis of the jaw (ONJ): incidence and risk factors in patients with breast cancer and gynecological malignancies. *Gynecol Oncol* 2009; **112**: 605–9.
- Bagan JV, Jimenez Y, Murillo J, et al. Jaw osteonecrosis associated with bisphosphonates: multiple exposed areas and its relationship to teeth extractions. Study of 20 cases. *Oral Oncol* 2006; **42**: 327–9.
- O’Ryan FS, Lo JC. Bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw in patients with oral bisphosphonate exposure: clinical course and outcomes. *J Oral Maxillofac Surg* 2012; **70**: 1844–53.
- Taylor T, Bryant C, Popat S. A study of 225 patients on bisphosphonates presenting to the bisphosphonate clinic at King’s College Hospital. *Br Dent J* 2013; **214**: E18.
- Hansen T, Wagner W, Kirkpatrick CJ, Kunkel M. Infected osteoradionecrosis of the mandible: follow-up study suggests deterioration in outcome for patients with Actinomycetes-positive bone biopsies. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2006; **35**: 1001–4.

Oxidative stress in BRONJ

Bagán et al.

376

15. Hansen T, Kunkel M, Springer E, et al. Actinomycosis of the jaws—histopathological study of 45 patients shows significant involvement in bisphosphonate-associated osteonecrosis and infected osteoradionecrosis. *Virchows Arch* 2007; **451**: 1009–17.
16. Sedghizadeh PP, Kumar SK, Gorur A, Schaudinn C, Shuler CF, Costerton JW. Microbial biofilms in osteomyelitis of the jaw and osteonecrosis of the jaw secondary to bisphosphonate therapy. *J Am Dent Assoc* 2009; **140**: 1259–65.
17. Lee CY, Pien FD, Suzuki JB. Identification and treatment of bisphosphonate-associated actinomycotic osteonecrosis of the jaws. *Implant Dent* 2011; **20**: 331–6.
18. Anavi-Lev K, Anavi Y, Chaushu G, Alon DM, Gal G, Kaplan I. Bisphosphonate related osteonecrosis of the jaws: clinicopathological investigation and histomorphometric analysis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol* 2013; **115**: 660–6.
19. Rogers SN, Hung J, Barber AJ, Lowe D. A survey of consultant members of the British Association of Oral and Maxillofacial Surgeons regarding bisphosphonate-induced osteonecrosis of the jaws. *Br J Oral Maxillofac Surg* 2009; **47**: 598–601.
20. Bagan J, Sheth CC, Soria JM, Margaix M, Bagan L. Bisphosphonates-related osteonecrosis of the jaws: a preliminary study of salivary interleukins. *J Oral Pathol Med* 2013; **42**: 405–8.
21. Bagan J, Sáez GT, Tormos MC, et al. Interleukin-6 concentration changes in plasma and saliva in bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws. *Oral Dis* 2013; doi: 10.1111/odi.12150 [Epub ahead of print].
22. Grant SS, Hung DT. Persistent bacterial infections, antibiotic tolerance, and the oxidative stress response. *Virulence*. 2013; **4**: 273–83.
23. García-Heredia A, Kensicki E, Mohney RP, et al. Paraoxonase-1 deficiency is associated with severe liver steatosis in mice fed a high-fat high-cholesterol diet: a metabolomic approach. *J Proteome Res*. 2013. [Epub ahead of print] PMID: 23448543.
24. Battisti V, Maders LD, Bagatini MD, et al. Oxidative stress and antioxidant status in prostate cancer patients: relation to Gleason score, treatment and bone metastasis. *Biomed Pharmacother* 2011; **65**: 516–24.
25. Koçer G, Naziroğlu M, Celik O, et al. Basic Fibroblast Growth Factor Attenuates Bisphosphonate-Induced Oxidative Injury but Decreases Zinc and Copper Levels in Oral Epithelium of Rat. *Biol Trace Elem Res* 2013; **153**: 251–6.
26. Awodele O, Olayemi SO, Nwite JA, Adeyemo TA. Investigation of the levels of oxidative stress parameters in HIV and HIV-TB co-infected patients. *J Infect Dev Ctries* 2012; **6**: 79–85.
27. Lebreton F, van Schaik W, Sanguinetti M, et al. AsrR is an oxidative stress sensing regulator modulating *Enterococcus faecium* opportunistic traits, antimicrobial resistance, and pathogenicity. *PLoS Pathog* 2012; **8**: e1002834.
28. McDevitt CA, Ogunniyi AD, Valkov E, et al. A molecular mechanism for bacterial susceptibility to zinc. *PLoS Pathog* 2011; **7**: e1002357.
29. Moye-Rowley WS. Transcription factors regulating the response to oxidative stress in yeast. *Antioxid Redox Signal* 2002; **4**: 123–40.
30. Svaton B, Helöe LA. Dental status and treatment needs among institutionalized mentally subnormal persons in Norway. *Community Dent Oral Epidemiol* 1975; **3**: 208–13.
31. Silness J, Loe H. Periodontal disease in pregnancy. II. Correlation between oral hygiene and periodontal condition. *Acta Odontol Scand* 1964; **22**: 121–35.
32. Ruggiero SL, Dodson TB, Assael LA, Landesberg R, Marx RE, Mehrotra B; American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons. American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons position paper on bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws—2009 update. *J Oral Maxillofac Surg* 2009; **67**: 2–12.
33. Navazesh M. Methods for collecting saliva. *Ann N Y Acad Sci* 1993; **694**: 72–7.
34. Navarro J, Obrador E, Pellicer JA, Aseni M, Viña J, Estrela JM. Blood glutathione as an index of radiation-induced oxidative stress in mice and humans. *Free Radic Biol Med* 1997; **22**: 1203–9.
35. Collado R, Oliver I, Tormos C, et al. Early ROS-mediated DNA damage and oxidative stress biomarkers in Monoclonal B Lymphocytosis. *Cancer Lett* 2012; **317**: 144–9.
36. Borrego S, Vazquez A, Dasi F, et al. Oxidative Stress and DNA Damage in Human Gastric Carcinoma: 8-Oxo-7'-8-dihydro-2'-deoxyguanosine (8-oxo-dG) as a Possible Tumor Marker. *Int J Mol Sci* 2013; **14**: 3467–86.
37. Licata AA. Discovery, clinical development, and therapeutic uses of bisphosphonates. *Ann Pharmacother* 2005; **39**: 668–77.
38. Markiewicz MR, Margarone JE 3rd, Campbell JH, Aguirre A. Bisphosphonate-associated osteonecrosis of the jaws: a review of current knowledge. *J Am Dent Assoc* 2005; **136**: 1669–74.
39. Tipton DA, Seshul BA, Dabbous MKh. Effect of bisphosphonates on human gingival fibroblast production of mediators of osteoclastogenesis: RANKL, osteoprotegerin and interleukin-6. *J Periodontol Res* 2011; **46**: 39–47.
40. Xing L, Boyce BF. Regulation of apoptosis in osteoclasts and osteoblastic cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; **328**: 709–20.
41. Lacey DL, Timms E, Tan HL, et al. Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation. *Cell* 1998; **93**: 165–76.
42. Mozzati M, Martinasso G, Maggiora M, et al. Oral mucosa produces cytokines and factors influencing osteoclast activity and endothelial cell proliferation, in patients with osteonecrosis of jaw after treatment with zoledronic acid. *Clin Oral Investig* 2013; **17**: 1259–66.
43. Kimachi K, Kajiya H, Nakayama S, Ikebe T, Okabe K. Zoledronic acid inhibits RANK expression and migration of osteoclast precursors during osteoclastogenesis. *Naunyn Schmiedeberg Arch Pharmacol* 2011; **383**: 297–308.
44. Margaix-Muñoz M, Bagan J, Poveda-Roda R. Intravenous bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws: influence of coadjuvant antineoplastic treatment and study of buccodental condition. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 2013; **18**: e194–200.
45. Bagan JV, Jiménez Y, Hernández S, et al. Osteonecrosis of the jaws by intravenous bisphosphonates and osteoradionecrosis: a comparative study. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 2009; **14**: e616–9.
46. Naik NH, Russo TA. Bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw: the role of actinomycetes. *Clin Infect Dis* 2009; **49**: 1729–32.
47. Sedghizadeh PP, Kumar SK, Gorur A, Schaudinn C, Shuler CF, Costerton JW. Identification of microbial biofilms in osteonecrosis of the jaws secondary to bisphosphonate therapy. *J Oral Maxillofac Surg* 2008; **66**: 767–75.
48. Imlay JA. Cellular defenses against superoxide and hydrogen peroxide. *Annu Rev Biochem* 2008; **77**: 755–76.
49. López-Uriarte P, Nogués R, Saez G, et al. Effect of nut consumption on oxidative stress and the endothelial function in metabolic syndrome. *Clin Nutr* 2010; **29**: 373–80.

Oxidative stress in BRONJ

Bagán et al.

377

50. Mitjavila MT, Fandos M, Salas-Salvadó J, et al. The Mediterranean diet improves the systemic lipid and DNA oxidative damage in metabolic syndrome individuals. A randomized, controlled, trial. *Clin Nutr* 2013; **32**: 172–8.
51. Oliva MR, Ripoll F, Muñiz P, et al. Genetic alterations and oxidative metabolism in sporadic colorectal tumors from a Spanish community. *Mol Carcinog* 1997; **18**: 232–43.
52. Oltra AM, Carbonell F, Tormos C, Iradi A, Sáez GT. Antioxidant enzyme activities and the production of MDA and 8-oxo-dG in chronic lymphocytic leukemia. *Free Radic Biol Med* 2001; **30**: 1286–92.
53. Sanchez M, Torres JV, Tormos C, et al. Impairment of antioxidant enzymes, lipid peroxidation and 8-oxo-2'-deoxyguanosine in advanced epithelial ovarian carcinoma of a Spanish community. *Cancer Lett* 2006; **233**: 28–35.
54. Kryston TB, Georgiev AB, Pissis P, Georgakilas AG. Role of oxidative stress and DNA damage in human carcinogenesis. *Mutat Res* 2011; **711**: 193–201.
55. Redón J, Oliva MR, Tormos C, et al. Antioxidant activities and oxidative stress by products in human hypertension. *Hypertension* 2003; **41**: 1096–101.
56. Chaves FJ, Corella D, Blesa S, et al. Xanthine oxidoreductase polymorphisms: influence in blood pressure and oxidative stress levels. *Pharmacogenet Genomics* 2007; **17**: 589–96.
57. Eksrom G, Ingleman-Sundberg M. Rat liver microsomal NADPH-supported oxidase activity and lipid peroxidation dependent on ethanol inducible cytochrome P-450. *Biochem Pharmacol* 1989; **38**: 1313–9.
58. Parke DV, Sapota A. Chemical toxicity and reactive oxygen species. *Int J Occup Med Environ Health* 1996; **9**: 331–40.
59. Klaunig JE, Kamendulis LM. The role of oxidative stress in carcinogenesis. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2004; **44**: 239–67.
60. Almeida LM, Zanoelo FF, Castro KP, Borissevitch IE, Soares CM, Gonçalves PJ. Cell survival and altered gene expression following photodynamic inactivation of Paracoccidioides brasiliensis. *Photochem Photobiol* 2012; **88**: 992–1000.
61. Karabulut AB, Gül M, Karabulut E, Kiran TR, Ocak SG, Otlu O. Oxidant and antioxidant activity in rabbit livers treated with zoledronic acid. *Transplant Proc* 2010; **42**: 3820–2.
62. Mansego ML, Redon J, Martinez-Hervas S, et al. Different impacts of cardiovascular risk factors on oxidative stress. *Int J Mol Sci* 2011; **12**: 6146–63.
63. Castañer O, Fitó M, López-Sabater MC, et al. The effect of olive oil polyphenols on antibodies against oxidized LDL. A randomized clinical trial. *Clin Nutr* 2011; **30**: 490–3.
64. Moore T, Le A, Niemi AK, et al. A new LC-MS/MS method for the clinical determination of reduced and oxidized glutathione from whole blood. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2013; **929**: 51–5.
65. Rodrigo R, Miranda-Merchak A, Valenzuela Grau R, Bachler JP, Vergara L. Modulation of (Na,K)-ATPase activity by membrane fatty acid composition: therapeutic implications in human hypertension. *Clin Exp Hypertens* 2013. [Epub ahead of print] PMID: 23659494.
66. Alzoubi KH, Khabour OF, Salah HA, Abu Rashid BE. The combined effect of sleep deprivation and Western diet on spatial learning and memory: role of BDNF and oxidative stress. *J Mol Neurosci* 2013; **50**: 124–33.
67. Lüersen K, Stegehake D, Daniel J, et al. The glutathione reductase GSR-1 determines stress tolerance and longevity in *Caenorhabditis elegans*. *PLoS One* 2013; **8**: e60731.
68. Wang J, Jiang Z, Ji J, et al. Gene expression profiling and pathway analysis of hepatotoxicity induced by triptolide in Wistar rats. *Food Chem Toxicol* 2013; **58**: 495–505.

Acknowledgements

We would like to thank Manuel Vicente Pedro Bolumar for the statistical analysis, and the nurses Luisa Seco and Eva de la Iglesia Jordán for obtaining blood samples.

Conflict of interest

The authors declare that there is no conflict of interest.

Available online at www.sciencedirect.com

SciVerse ScienceDirect

British Journal of Oral and Maxillofacial Surgery 53 (2015) 257–262

BRITISH
Journal of
Oral and
Maxillofacial
Surgerywww.bjoms.com

Sclerosis in bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws and its correlation with the clinical stages: study of 43 cases

J.V. Bagan^{a,b,*}, R.M. Cibrian^c, J. Lopez^c, M. Leopoldo-Rodado^d, E. Carbonell^e, L. Bagán^{a,g}, J. Utrilla^a, C. Scully^f

^a Oral Medicine, Valencia University, Spain^b Department of Oral and Maxillofacial Surgery, University General Hospital, Valencia, Spain^c Department of Physiology, Valencia University, Spain^d Oral and Maxillofacial Surgery, University General Hospital, Valencia, Spain^e Stomatology, University General Hospital, Valencia, Spain^f University College London [UCL], UK^g University Cardenal Herrera Valencia, Spain

Accepted 7 December 2014

Available online 2 January 2015

Abstract

We analysed the degree of sclerosis in the different stages of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws (BRONJ) and studied the relation between the grade of sclerosis, the clinical symptoms, and the depth of lucency. We compared 43 patients with mandibular BRONJ with a control group of 40 cases with no bony lesions. The presence of sclerotic bone, cortical irregularities, radiolucency, fragmentation or sequestration, periostitis, and narrowing of the mandibular canal were studied from computed tomographic (CT) scans using the program ImageJ 1.47v (National Institute of Health, Bethesda, USA) to measure the radiolucency, width of the cortices, and degree of sclerosis. Patients with BRONJ had more severe sclerosis than controls ($p < 0.01$). There was also a significant difference among the different stages of BRONJ, with the highest values found in stage III ($p = 0.02$). The degree of sclerosis differed according to sex, type of bisphosphonate, and the clinical characteristics such as pain, or suppuration, but not significantly so ($p > 0.05$). We conclude that the degree of sclerosis increases with the clinical stage of BRONJ, and is correlated with the depth of lucency.

© 2014 The British Association of Oral and Maxillofacial Surgeons. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.

Keywords: Osteonecrosis of the jaws; Sclerosis; Radiographic findings

Introduction

In 2003 Marx presented what are to our knowledge the first reported cases of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws (BRONJ) in patients treated with intravenous bisphosphonates.¹ Since then many papers have described

the clinical aspects, the classification established by Ruggiero et al. being the most widely used.²

Initially, three stages of BRONJ were described with exposed bone, but later cases were reported with no exposure³ and included as stage 0.⁴ They were characterised by the presence of pain in the jaw bone (88/96; 92%) and sinus tract (51%), bony enlargement (36%), and gingival swelling (18%). No radiological abnormalities were identified in 28 of these patients (29%).⁴

The typical radiographic findings in BRONJ include trabecular alteration with changes in thickening and mineral

* Corresponding author at: Hospital General Universitario, Avda Tres cruces s/n, 46014 Valencia, Spain. Tel.: +34 963528276; fax: +34 963528276.

E-mail address: bagan@uv.es (J.V. Bagan).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.bjoms.2014.12.004>

0266-4356/© 2014 The British Association of Oral and Maxillofacial Surgeons. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.



Fig. 1. Coronal view in a patient with a large sequestrum as a result of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw with widening (c) and erosion (b) of cortical bone, and deep radiolucency (a).

content, sclerosis, formation of sequestra, erosion of cortical bone, periosteal new bone,^{5–7} lucency, and persistent sockets.⁷ Sclerosis and changes in alveolar bone density are among the most commonly described changes in BRONJ^{7–11} but few studies have measured the degree of sclerosis^{8,12} or made measurements in panoramic studies.⁸ Recently, Hamada et al.¹² reported a controlled study using computed tomography (CT) in 20 patients with BRONJ and compared the degree of sclerosis in stage 0 with that in other stages, but they did not distinguish among stages I, II, and III.¹²

We therefore studied the degree of sclerosis at the different stages of BRONJ and examined the relations between the degree of sclerosis, the clinical characteristics, and other radiographic findings.

Patients and methods

The study was approved by the Ethics Committee of Valencia University and the patients gave their informed consent. We studied 43 cases of mandibular BRONJ with sagittal, axial, and coronal CT views. The diagnosis of osteonecrosis was established according to established criteria and the cases were classified into the four stages reported.^{2,13}

The control group comprised 43 patients with lesions of the jaw bone who had not been treated with any drug, who had had a CT scan for other reasons (mainly cysts in the maxilla), and who had no obvious radiographic alterations to the mandible. There were no significant differences between the groups in age or sex.

CT scans were done using Helicoidal (VCT model, General Electrics, Health Care, Wakesha, Wisconsin, USA). The details of window and levels were the same in every CT. We used the three views of the area of the osteonecrosis to assess the presence of sclerotic bone, cortical irregularities, lucency, fragmentation or formation of sequestra, periostitis, and changes in (or narrowing of) the mandibular canal.^{6,7,14} In addition, we measured the length of the lucency (mm) with a real scale in every coronal view (Fig. 1). Finally, to analyse



Fig. 2. Coronal view to measure the mean grey value of the three selected areas with circles in the Image J programme.

the sclerosis of the bone beneath the area of osteonecrosis, we used the program ImageJ 1.47v of the National Institute of Health, USA,¹⁵ a public domain that is widely known for its reliability and validity.^{16,17}

To analyse the sclerotic area we selected three zones in the coronal CT to obtain three measurements (Fig. 2). We first established a set scale (mm) from measurements on the CT scan, and every selected view of the coronal CT was loaded into ImageJ. These images were converted to grey-scale, 8-bit images. To set measurements we selected the mean (SD) grey value and range.

In the ImageJ program the first step in calibrating the image is to measure the mean grey value of the background and then compare it with the selected areas. The method has been used successfully in the analysis of the texture of various medical digital images, such as CT, dental radiographs, or positron emission tomography (PET) images.^{15,16} This gives us the mean grey value of every area selected.

We used the Mann–Whitney *U* test to compare the means between the two groups and the Kruskal–Wallis test to calculate the differences among several groups. The Levene test and the Shapiro–Wilk test were used to assess the significance of differences between groups that came from populations with the same variance. The relations between the length of the lucency and the degree of sclerosis were analysed using Spearman's correlation coefficient. Finally we used a multiple regression analysis with the degree of sclerosis as the dependent variable and the age, duration on bisphosphonate treatment, the width of the cortex and the length of the lucency as independent variables. Probabilities of less than 0.05 were accepted as significant.

Table 1
Characteristics of 43 patients with bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws. Data are number (%) unless otherwise stated.

Variable	Measurement
Mean (SD) age (years)	75 (10)
Sex	
Male	17 (40)
Female	26 (61)
Mean (SD) time taking bisphosphonates	
Intravenously (cycles)	30 (23)
Orally (months)	58 (47)
Type of bisphosphonate	
Zoledronic acid (intravenous)	30 (70)
Oral bisphosphonates (months)	13 (30)
Disease	
Osteoporosis	12 (28)
Breast cancer	13 (30)
Multiple myeloma	7 (16)
Cancer of the prostate	8 (19)
Cancer of the lung	2 (5)
Cancer of the kidney	1 (2)
Local cause	
Teeth extractions	24 (56)
Implants	2 (5)
Prosthesis	1 (2)
Unknown	13 (30)
Symptoms	
Pain	10 (23)
Intraoral fistula	11 (26)
Extraoral fistula	5 (12)
Abscess	5 (12)
Radiographic findings	
Radiolucency	37 (86)
Osteosclerosis	43 (100)
Sequestrum	23 (54)
Narrowing of mandibular canal	34 (79)
Erosion of cortical bone	16 (37)
Fracture	2 (5)

Results

The characteristics of the 43 patients with BRONJ are shown in [Table 1](#).

The most significant radiographic findings were the sclerotic changes found in all patients around the BRONJ area together with mandibular lucency (in 86%). Other alterations such as narrowing of the mandibular canal, erosions of the cortices, sequestra, and fractures of the jaw are shown in [Table 1](#). There were significant differences between the groups in the quantitative measurement of mandibular sclerosis on CT, which in the BRONJ group was 160.48 (30.92) and in the control group was 92.12 (1.86) ($p < 0.01$).

There were significant differences among the different stages of BRONJ ($p = 0.02$) ([Table 2](#)), where the highest values for sclerosis were found in stage 3. There was also significant correlation between the degree of sclerosis and the length of mandibular lucency (correlation coefficient = 0.68; $p = 0.01$), and between the width of the cortical mandibular

Table 2
Mean (SD) density and grade of sclerosis in the group with bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw (BRONJ).

	Mandibular density	Exact <i>p</i> value
Sex		
Female ($n = 26$)	164.72 (35.45)	0.263
Male ($n = 17$)	153.88 (21.68)	
Route of bisphosphonate		
Intravenous ($n = 30$)	159.46 (25.82)	0.748
Oral ($n = 13$)	162.82 (41.55)	
Pain		
Yes ($n = 33$)	163.54 (32.03)	0.138
No ($n = 9$)	146.16 (23.48)	
Intraoral fistula		
Yes ($n = 31$)	160.43 (30.32)	0.778
No ($n = 11$)	157.33 (33.43)	
Fractured jaw		
Yes ($n = 3$)	187.96 (27.40)	0.111
No ($n = 40$)	158.42 (30.48)	
Stage of BRONJ		
0 ($n = 9$)	144.86 (23.20)	0.024
I ($n = 6$)	137.18 (20.00)	
II ($n = 22$)	138.85 (29.72)	
III ($n = 6$)	160.48 (30.92)	

bone and sclerosis (correlation coefficient = 0.39; $p = 0.05$). However, multiple linear regression showed that the only significant independent variable was the depth of lucency ($p < 0.01$). An increase of one mm in the depth of the lucency gave a 2.7 increase in the degree of sclerosis. The patient's age, time taking bisphosphonates, and the width of the cortices did not differ significantly.

The differences between degree of sclerosis and sex of patient, type of bisphosphonate (and clinical characteristics such as pain and intraoral fistula) differed, but not significantly so. However, there was a tendency to higher degrees of sclerosis in patients with fractured jaws, but there were too few patients for analysis ([Table 2](#)).

Discussion

Patients treated with bisphosphonates have impaired osteoclast function, lack of repair of physiological microdamage, and often infection.^{9,14} The diagnosis of BRONJ is mainly clinical,^{1–3} but radiological findings provide additional information to establish the diagnosis and stage of disease. This is particularly the case in stage III disease. Radiographic studies also delineate the extent of bony changes, the size and site of sequestration, the proximity to the inferior alveolar nerve, pathological fractures, and sinus involvement.⁷

A panoramic radiograph is usually taken for patients with BRONJ. However, CT scans may be superior to panoramic radiographs,⁶ and cone-beam CT helps to improve definition and bony changes, particularly to find and delineate sequestra and extension of the area of lucency.¹⁸ Other techniques

Table 3
Studies analysing the radiographic findings in bisphosphonate osteonecrosis of the jaws.

Author	Ref	Year	Study type	Cases	Imaging type	Main conclusions
Bianchi	(6)	2007	Case series	32	CT vs Panoramic	Dental panoramic radiographs were found to be of limited use in assessing BRONJ in patients for whom CT imaging was subsequently ordered.
Raje	(9)	2008	Case series	11	Panoramic, CT, MRI, FDG-PET	Radiographic and functional imaging confirmed sites of clinically established BRONJ.
Triester	(7)	2009	Case series	39	Panoramic	Focal panoramic radiographic findings of sclerosis and surface irregularity correlate with clinical sites of BRONJ.
O’Ryan	(22)	2009	Cohort	59	CT and Scintigraphy	BRONJ subsequently developed in the areas identified on scintigraphy.
Takaishi	(8)	2010	Case control	6	Panoramic	Method may be useful in detecting a rise of alveolar BMD near the necrotic lesion in subjects with impending risk for BRONJ.
Treister	(18)	2010	Case series	7	CBCT (cone beam computed tomography) vs Panoramic	Focal panoramic radiographic findings of sclerosis and surface irregularity correlate with clinical sites of BRONJ.
Popovic	(19)	2010	Case series	11	CT and MRI	BRONJ presents a variety of imaging findings that help to determine disease extent and track the progression.
Fleisher	(24)	2010	Case series	68	Panoramic and periapical	Periodontal ligament widening may be a more sensitive indicator than CTX testing in predicting risk of BRONJ.
Hutchinson	(14)	2010	Case control	10	CT	Conspicuous osteosclerosis in clinically symptomatic areas characteristic of stage 0 disease.
Stockmann	(20)	2010	Case series	24	Panoramic, CT, MRI	MRI and CT of limited use for preoperative assessment of the extent of BRONJ lesions.
O’Ryan	(10)	2012	Case series	30	CT	Postextraction patients and those with comorbid conditions/exposures showed refractory BRONJ with prolonged healing times.
Rocha	(11)	2012	Case control	30	Panoramic	Facilitates early identification of bone alterations.
Walter	(21)	2014	Case control	129	Panoramic	Prevalence and severity of periodontal disease in BRONJ higher compared to healthy controls.
Hamada	(12)	2014	Case control	20	CT	Significant differences among Stage 0 BRONJ, Stage 1–3 BRONJ, non-BRONJ and control groups in cancellous bone CT radiodensity values, but no significant differences between Stage 0 and Stage 1–3 BRONJ groups.
Rugani	(23)	2014	Cohort	5	CT vs Panoramic	Radiological signs alone are not sufficient to confirm BRONJ; clinical signs are mandatory.

used may include emission CT-PET and magnetic resonance imaging (MRI).^{9,19,20}

There have been few reported radiographic studies in BRONJ to our knowledge, and most have no controls. We found only 5 case-control studies that focused on the radiological changes.^{8,11,12,14,21} There were two cohort studies^{22,23} and 8 cross-sectional studies with series of cases without controls.^{6,7,9,10,18–20,24} (Table 3). We found that the more advanced cases (stage III) had the most bony sclerosis, as reported elsewhere.⁵

Sclerosis is one of the most important alterations in the area of BRONJ,¹⁴ but we know of few authors who have

described quantitative measurement of the bone density and the degree of sclerosis. To the best of our knowledge we could find only two papers, one of which reported six cases and analysed the quantity of sclerosis in dental and panoramic radiographs,⁸ and the second that measured the degree of sclerosis in CT scans of 20 patients compared with a control group of similar size.¹² The first paper⁸ analysed the alveolar bone mineral density (BMD) measured by radiography and standardised by aluminium step wedge pasted on the film and digitised by a computer system. They found that there was significantly higher BMD around areas of osteonecrosis than in control cases. We found similar findings in CT scans,

the sclerosis being significantly greater in the BRONJ group than among controls ($p < 0.01$). The second study¹² used CT and showed that there were significant differences in the CT radiodensity values of cancellous bone among the stage 0 and stages I–III patients who did not have BRONJ and the control groups, but there were no significant differences between the stage 0 and stages I–III groups. We also found, in our larger study, that there was a significant difference between patients with BRONJ and controls in the degree of sclerosis in the area of BRONJ, and we also measured the lucency.

An interesting finding reported by Hamada et al.,¹² was that there were no differences in the degree of sclerosis between Stage 0 and the rest of the stages considering together. This was another difference from our study, where we also distinguished the rest of stages from I to III, and measured the sclerosis at every stage. An interesting finding was that there was a difference, in that the sclerosis increased as the clinical stage increased (Table 2). This could improve the classification from stages I to III.² We also found a significant correlation between sclerosis and the length of the lucency ($p = 0.01$).

As we described above, Hamada et al.,¹² could find no significant differences in the degree of sclerosis when they compared stage 0 and the other stages together. This finding supports the recent proposal by Schiodt et al.,¹³ in which their findings of unexposed, and exposed, osteonecrosis were similar in all important data ($p < 0.05$). Recently, Schiodt et al.,¹³ proposed a modification of the former classification,² including only three stages: I, II, and III, but adding three more categories to include the possibility of being with or without exposed bone. This classification would eliminate stage 0 and could include all the cases that we could not include in our series of 2012.²⁵

We could find no differences between stage 0 and the other stages in regard to sclerosis, nor could we find differences between stages I–III (Table 2). However, this study does add new findings to the described radiographic features in patients with BRONJ.

Conflict of interest

We have no conflict of interest.

Ethics statement/confirmation of patients' permission

This study was approved by the Ethics Committee of Valencia University, Spain, and by the appropriate ethics committee of our hospital. The subjects gave informed consent to the work.

References

- Marx RE. Pamidronate (Aredia) and zoledronate (Zometa) induced avascular necrosis of the jaws: a growing epidemic. *J Oral Maxillofac Surg* 2003;61:1115–7.
- Ruggiero SL, Dodson TB, Assael LA, et al. American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons. American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons position paper on bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws – 2009 update. *J Oral Maxillofac Surg* 2009;67(5 Suppl.):2–12.
- Junquera L, Gallego L. Nonexposed bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws: another clinical variant? *J Oral Maxillofac Surg* 2008;66:1516–7.
- Fedele S, Porter SR, D'Aiuto F, et al. Nonexposed variant of bisphosphonate-associated osteonecrosis of the jaw: a case series. *Am J Med* 2010;123:1060–4.
- Arce K, Assael LA, Weissman JL, et al. Imaging findings in bisphosphonate-associated osteonecrosis of jaws. *J Oral Maxillofac Surg* 2009;67(5 Suppl.):75–84.
- Bianchi SD, Scoletta M, Cassione FB, et al. Computerized tomographic findings in bisphosphonate-associated osteonecrosis of the jaw in patients with cancer. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2007;104:249–58.
- Treister N, Sheehy N, Bae EH, et al. Dental panoramic radiographic evaluation in bisphosphonate-associated osteonecrosis of the jaws. *Oral Dis* 2009;15:88–92.
- Takaishi Y, Ikeo T, Nakajima M, et al. A pilot case–control study on the alveolar bone density measurement in risk assessment for bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw. *Osteoporos Int* 2010;21:815–25.
- Raje N, Woo SB, Hande K, et al. Clinical, radiographic, and biochemical characterization of multiple myeloma patients with osteonecrosis of the jaw. *Clin Cancer Res* 2008;14:2387–95.
- O'Ryan FS, Lo JC. Bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw in patients with oral bisphosphonate exposure: clinical course and outcomes. *J Oral Maxillofac Surg* 2012;70:1844–53.
- Rocha GC, Jaguar GC, Moreira CR, et al. Radiographic evaluation of maxillofacial region in oncology patients treated with bisphosphonates. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol* 2012;114(5 Suppl.):S19–25.
- Hamada H, Matsuo A, Koizumi T, et al. A simple evaluation method for early detection of bisphosphonate-related. *J Craniomaxillofac Surg* 2014;42:924–9.
- Schiodt M, Reibel J, Oturai P, et al. Comparison of nonexposed and exposed bisphosphonate-induced osteonecrosis of the jaws: a retrospective analysis from the Copenhagen cohort and a proposal for an updated classification system. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol* 2014;117:204–13.
- Hutchinson M, O'Ryan F, Chavez V, et al. Radiographic findings in bisphosphonate-treated patients with stage 0 disease in the absence of bone exposure. *J Oral Maxillofac Surg* 2010;68:2232–40.
- <http://imagej.nih.gov/ij>
- Hung SH, Lin CY, Lee JY, et al. Computed tomography image characteristics of metastatic lymph nodes in patients with squamous cell carcinoma of the head and neck. *Auris Nasus Larynx* 2012;39:606–10.
- Abramuk A, Wolf G, Shakirin G, et al. Preliminary assessment of dynamic contrast-enhanced CT implementation in pretreatment FDG-PET/CT for outcome prediction in head and neck tumors. *Acta Radiol* 2010;51:793–9.
- Treister NS, Friedland B, Woo SB. Use of cone-beam computerized tomography for evaluation of bisphosphonate-associated osteonecrosis of the jaws. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2010;109:753–64.
- Popovic KS, Kocar M. Imaging findings in bisphosphonate-induced osteonecrosis of the jaws. *Radiol Oncol* 2010;44:215–9.
- Stockmann P, Hinkmann FM, Lell MM, et al. Panoramic radiograph, computed tomography or magnetic resonance imaging. Which imaging technique should be preferred in bisphosphonate-associated osteonecrosis of the jaw? A prospective clinical study. *Clin Oral Investig* 2010;14:311–7.

21. Walter C, Laux C, Sagheb K. Radiologic bone loss in patients with bisphosphonate-associated osteonecrosis of the jaws: a case-control study. *Clin Oral Investig* 2014;**18**:385–90.
22. O’Ryan FS, Khoury S, Liao W, et al. Intravenous bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw: bone scintigraphy as an early indicator. *J Oral Maxillofac Surg* 2009;**67**:1363–72.
23. Rugani P, Luschin G, Jakse N, et al. Prevalence of bisphosphonate-associated osteonecrosis of the jaw after intravenous zoledronate infusions in patients with early breast cancer. *Clin Oral Investig* 2014;**18**:401–7.
24. Fleisher KE, Welch G, Kottal S, et al. Predicting risk for bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws: CTX versus radiographic markers. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2010;**110**:509–16.
25. Bagan JV, Hens-Aumente E, Leopoldo-Rodado M, et al. Bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws: study of the staging system in a series of clinical cases. *Oral Oncol* 2012;**48**:753–7.

Int. J. Oral Maxillofac. Surg. 2016; 45: 377–379
<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijom.2015.09.025>, available online at <http://www.sciencedirect.com>

International Journal of
**Oral &
 Maxillofacial
 Surgery**

Case Report Clinical Pathology

Mitoxantrone as a contributing factor in medication-related osteonecrosis of the jaws

J. V. Bagan^{1,2}, L. Bagan³,
 R. Poveda², C. Scully⁴

¹Oral Medicine, Valencia University, Valencia, Spain; ²Service of Stomatology and Maxillofacial Surgery, University General Hospital, Valencia, Spain; ³Oral Medicine, Universidad Europea de Valencia, Valencia, Spain; ⁴University College London, London, UK

J.V. Bagan, L. Bagan, R. Poveda, C. Scully: Mitoxantrone as a contributing factor in medication-related osteonecrosis of the jaws. Int. J. Oral Maxillofac. Surg. 2016; 45: 377–379. © 2015 International Association of Oral and Maxillofacial Surgeons. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.

Abstract. Bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw (BRONJ) is usually initiated by dental surgery, but is occasionally exacerbated by other antiresorptive (denosumab) and anti-angiogenic therapies, and in such cases is currently termed medication-related osteonecrosis of the jaws (MRONJ). The case of a 58-year-old female with breast cancer who developed multiple and ultimately fatal metastases despite 3 years of treatment with chemotherapeutic drugs and intravenous bisphosphonates, is presented herein. Her malignant disease worsened and she was started on mitoxantrone. She developed a severe adverse reaction to this drug soon after starting treatment. As well as diarrhoea and vomiting, she had a very aggressive gingival inflammation with multiple ulcerations in both jaws and wide areas of necrotic bone, affecting the attached gingiva, and seemingly unrelated to dental plaque. These ulcerations and the exposed necrotic bone persisted for more than 6 months, until her death. This report describes a case in which severe gingival ulcerations that occurred after mitoxantrone treatment for metastatic breast cancer were a local factor that initiated MRONJ.

Key words: bisphosphonate; mitoxantrone; jaw osteonecrosis.

Accepted for publication 30 September 2015
 Available online 27 October 2015

There are many case reports, case series, and research studies on medication-related osteonecrosis of the jaws (MRONJ), which is often caused by a severe adverse reaction mainly to intravenous bisphosphonates (IVBP)¹; in such cases it is termed bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw (BRONJ).

The main cause is an alteration in osteoclast function. Most cases are initiated by a dental extraction, infection, periodontal disease, or trauma from a prosthesis.² BRONJ of apparently spontaneous origin

has been recorded but is difficult to explain. The pathological process likely starts in the alveolar area and then progresses deeper into the jaws.³ Other antiresorptive (denosumab) and anti-angiogenic therapies have been implicated.⁴

This report describes a patient in whom multiple oral alveolar bone lesions occurred after massive gingival erosions as an adverse reaction to mitoxantrone, an anti-neoplastic agent used to treat some breast cancer and lymphoproliferative disorders.

Case report

A 58-year-old female with an infiltrating ductal carcinoma in her right breast was treated with a radical mastectomy and removal of axillary lymph nodes. Since the resection borders were involved, she was treated with six cycles of doxorubicin plus cyclophosphamide (AC) chemotherapy and loco-regional radiotherapy and tamoxifen. After 13 years free of disease, she developed a pleural metastasis, treated with the aromatase inhibitor letrozole.



Fig. 1. Multiple gingival ulcers and erythema in the lower and upper gingiva at onset.

However, the disease advanced to bones and liver and so she was started on the bisphosphonate zoledronic acid, 4 mg, as a 15-min IV infusion every 3–4 weeks for 24 cycles.

Throughout, she had no oral problems. However, due to progressive worsening of the metastases, she was started on therapy with mitoxantrone (10 mg/m²/day), following which she developed oral mucositis and severe diarrhoea (10–15 episodes per day). Thus, the second cycle of mitoxantrone was cancelled. Multiple ulcers on her lower and upper gingiva were managed with chlorhexidine 0.12% mouthwashes, but persisted and showed extensive areas of exposed bone in both jaws (Fig. 1). The ulcers were painful and close to the mucogingival line, without affecting the dentogingival junction; there was also generalized diffuse gingivitis in the vestibule areas. No other mucosal sites were affected. The ulcerations persisted and the underlying bone became exposed and finally necrotic after 2 months. This patient was then diagnosed with MRONJ.

Dental panoramic radiographs showed no additional features. Biopsy samples of the gingiva in the erythematous areas and in the exposed bone, showed an oral epithelium with spongiosis of the upper layers and some chronic intraepithelial inflammatory cells. A degree of perivas-

cular inflammatory infiltration with numerous erythrocytes was evident in the connective tissue, but these were not evident beneath the epithelium. Direct immunofluorescence (DIF) ruled out mucocutaneous diseases such as lichen planus, pemphigus, or pemphigoid. Histopathological study of the bone revealed areas with bony structures showing wide acellular necrotic sequestra and large, scalloped Haversian canals containing inflammatory cells. All of these findings confirmed the diagnosis of MRONJ.

Basic periodontal treatment to eliminate dental plaque was initiated. The patient was maintained on chlorhexidine 0.12% mouthwashes. After 4 months, there was evident improvement in the gingivitis. However, despite the improvement in periodontal status, the multiple bone exposures increased and were still present at 6 months after their onset (Fig. 2). The patient died from her cancer with the MRONJ lesions still present.

Discussion

Bisphosphonates inhibit the cell migration necessary for bone healing due to the inhibition of prenylation of GTPases, thus inhibiting wound healing. Zoledronic acid delays the healing of tooth extraction socket wounds and inhibits oral epithelial cell migration.⁵

BRONJ is more evident with IVBP, and one of the most significant risk factors is the duration of bisphosphonate therapy. The risk is higher if corticosteroids and anti-angiogenic drugs, such as bevacizumab, are also used.⁶

However, mitoxantrone has not been implicated in MRONJ. Mitoxantrone is a synthetic anthracenedione approved by the US Food and Drug Administration (FDA) for the treatment of adult acute myeloid leukaemia and other malignant diseases; it is also used for prostate, hepatocellular, and breast cancers and in salvage chemotherapy regimens for relapsed or refractory lymphomas.⁷ Mitoxantrone is taken up rapidly by tissues, from which it is released slowly. It has a terminal half-life ranging from 9 h to 9 days. Mitoxantrone in vitro inhibits macrophages, B cells, and T cells. There is impaired antigen presentation, as well as release of interferon gamma (IFN- γ), tumour necrosis factor alpha (TNF- α), and some cytokines.⁸

Most patients on mitoxantrone experience heart problems, nausea and/or vomiting, and leucopenia, with stomatitis, diarrhoea, anorexia, and liver dysfunction (National Library of Medicine, USA: drug record for mitoxantrone, 2014). Stomatitis is a common adverse effect. Thomas et al.⁹ reported grade 3 toxicity (severe mucositis) in 22.6% of their patients.



Fig. 2. Persistent multiple gingival ulcers at 4 months after the images shown in Fig. 1.

The authors' interpretation of the current findings is that the adverse reaction to mitoxantrone with epithelial breakdown provided an entry point for infection to the bone in a patient on IVBP; this is consistent with the 'outside-in' theory of Jonas and Sedghizadeh.¹⁰ This case adds a new factor to be considered in the development of BRONJ/MRONJ to those described previously.²

Funding

No funding.

Competing interests

There is no conflict of interest for any of the authors of this article.

Ethical approval

Not required.

Patient consent

Written patient consent was obtained.

References

1. Marx RE. Pamidronate (Aredia) and zoledronate (Zometa) induced avascular necrosis

of the jaws: a growing epidemic. *J Oral Maxillofac Surg* 2003;**61**:1115–7.

2. Ruggiero SL, Dodson TB, Fantasia J, Goodday R, Aghaloo T, Mehrotra B, et al. American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons position paper on medication-related osteonecrosis of the jaw—2014 update. *J Oral Maxillofac Surg* 2014;**72**:1938–56.
3. Pichardo SE, Richard van Merkesteyn JP. Bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws of dental origin. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol* 2014;**117**:393.
4. Migliorati CA, Covington 3rd JS. New oncology drugs and osteonecrosis of the jaw (ONJ). *J Tenn Dent Assoc* 2009;**89**:36–8.
5. Kobayashi Y, Hiraga T, Ueda A, Wang L, Matsumoto-Nakano M, Hata K, et al. Zoledronic acid delays wound healing of the tooth extraction socket, inhibits oral epithelial cell migration, and promotes proliferation and adhesion to hydroxyapatite of oral bacteria, without causing osteonecrosis of the jaw, in mice. *J Bone Miner Metab* 2010;**28**:165–75.
6. Christodoulou C, Pervena A, Klouvas G, Galani E, Falagas ME, Tsakalos G, et al. Combination of bisphosphonates and antiangiogenic factors induces osteonecrosis of the jaw more frequently than bisphosphonates alone. *Oncology* 2009;**76**:209–11.
7. Boyiadzis MM. *Hematology–oncology therapy*. New York: McGraw Hill; 2007.
8. Vogelgesang A, Rosenberg S, Skrzipek S, Bröker BM, Dressel A. Mitoxantrone treatment in multiple sclerosis induces TH2-type cytokines. *Acta Neurol Scand* 2010;**122**:237–43.
9. Thomas X, Elhamri M, Chelghoum Y, Reman O, Arnaud P, Raffoux E, et al. Intensive chemotherapy with mitoxantrone administered as a single injection in patients with high-risk acute myeloid leukemia: results of the EMA 2000 trial. *Ann Hematol* 2005;**84**:376–82.
10. Jones AC, Sedghizadeh PP. Bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws is caused by dental procedures that violate oral epithelium; this is no longer a mysterious disease. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol* 2014;**117**:392–3.

Address:

Jose Vicente Bagan
University General Hospital
Avda. Tres Cruces s/n
46014 Valencia
Spain
Tel: +34 963528276;
Fax: +34 963528276
E-mail: bagan@uv.es


ORIGINAL ARTICLE
Medication-related osteonecrosis of the jaw associated with bisphosphonates and denosumab in osteoporosis

 J Bagan^{1,2}, A Peydró³, J Calvo⁴, M Leopoldo⁵, Y Jiménez⁶, L Bagan⁷

¹Oral Medicine, University of Valencia, Valencia, Spain; ²Service of Stomatology and Maxillofacial Surgery, University General Hospital, Valencia, Spain; ³Oral Medicine, Valencia University, Valencia, Spain; ⁴Rheumatology, University General Hospital, Valencia, Spain; ⁵Service of Stomatology and Maxillofacial Surgery, University General Hospital, Valencia, Spain; ⁶Oral Medicine, Valencia University, Valencia, Spain; ⁷Oral Medicine, Universidad Europea Valencia, Valencia, Spain

OBJECTIVE: To describe the clinical characteristics and evolution of our series of medication-related osteonecrosis of the jaws (MRONJ) associated with denosumab in osteoporotic patients.

MATERIAL AND METHODS: We present 10 new cases of MRONJ in patients receiving denosumab for osteoporosis. We describe the mean doses of denosumab, previous bisphosphonate intake, and the clinical characteristics associated with the osteonecrosis, such as local contributing factors, symptoms, and evolution after treatment.

RESULTS: The mean number of denosumab doses was 3.4 ± 2.2 . In 90% of patients, there was a prior history of oral bisphosphonate intake, with a mean duration of 46.78 ± 25.11 months. The most common local factor was dental extraction (6 cases; 60%), and most cases had necrotic bone exposure (9/10, 90%). Sclerosis of the bone was the most common radiographic finding. Stage I was the most common ONM stage, found in 80%. 'Cure' after conservative treatments was obtained in 71.4%.

CONCLUSIONS: Most of our cases were in the early stages of MRONJ, and the success rate after conservative treatment was high.

Oral Diseases (2016) doi:10.1111/odi.12447

Keywords: denosumab; osteonecrosis; jaw; osteoporosis

In 2003, Marx described the first clinical series of osteonecrosis of the jaw (ONJ) caused by bisphosphonates (BPs; known as bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw, 'BRONJ') (Marx, 2003). Since then, others have reported series of this severe drug complication (Bagan

et al, 2012; Lerman *et al*, 2013; Vescovi *et al*, 2013; Vidal-Real *et al*, 2015). However, more recently, it has become clear that other drugs, such as denosumab (DE), bevacizumab, and sunitinib, can also cause osteonecrosis of the jaw (Francini *et al*, 2011; Diz *et al*, 2012; Rachner *et al*, 2013; Sivoilella *et al*, 2013; Allegra *et al*, 2014), motivating the name change to 'medication-related osteonecrosis of the jaws' (MRONJ) (Ruggiero *et al*, 2014).

The incidence of MRONJ is greater in patients with cancer (1–15%), whereas in subjects with osteoporosis, the incidence of ONJ is estimated at 0.001–0.01% (Khan *et al*, 2015). MRONJ is more common when BPs are used intravenously (iv) than when they are taken orally, with between 2% and 9% of patients showing MRONJ with iv BP and 1/100 000 patients with oral BP (Khan *et al*, 2015). In cancer patients treated with zoledronic acid, the cumulative incidence of BRONJ ranges from 0.7% to 6.7% (Mauri *et al*, 2009; Coleman *et al*, 2011). When patients with cancer are treated with denosumab, the risk of MRONJ ranges from 0.7% to 1.9% (70–190 cases per 10 000 patients) (Scagliotti *et al*, 2012; Qi *et al*, 2014). However, in patients with cancer, the risk of MRONJ is similar between patients taking zoledronic acid and denosumab in some reports (Henry *et al*, 2011).

The incidence of MRONJ in patients with osteoporosis is lower than that in patients with cancer. The prevalence of MRONJ with long-term oral BP is 0.1% (10 cases per 10 000), and it increases to 0.21% (21 cases per 10 000) among patients with more than 4 years' treatment (Lo *et al*, 2010). Denosumab is administered subcutaneously, 60 mg, every 6 months, and the risk of MRONJ is also low among those receiving it, 0.04% (four cases per 10,000 patients) (Papapoulos *et al*, 2012).

The main mechanism of action of BPs is that they limit the bone remodeling capacity of osteoclasts, resulting in suppressing bone turnover (Pozzi *et al*, 2009). Denosumab inhibits osteoclastogenesis with applications in orthopedics, rheumatology, and oncology (Troeltzsch *et al*, 2012). It is a receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand

Correspondence: Jose Bagan, Oral Medicine Department, Stomatology and Maxillofacial Service, University General Hospital, Avda/ Tres Cruces s/n, 46014 Valencia, Spain. Tel: +34 963528276, Fax: +34 963528276, E-mail: bagan@uv.es
 Received 19 October 2015; revised 5 January 2016; accepted 16 January 2016

2

(RANKL) inhibitor (Ristow *et al*, 2014). After withdrawing the drug, bone turnover returns to normal, the most significant feature of denosumab in comparison with BPs, according to O'Halloran *et al* (2014).

As mentioned above, the number of reported MRONJ in patients with cancer using denosumab is low (Diz *et al*, 2012; Scagliotti *et al*, 2012), and fewer cases of its use in osteoporotic patients have been described (Table 1) (Papapoulos *et al*, 2012; Bone *et al*, 2013; Otto *et al*, 2013; Rachner *et al*, 2013; Neuprez *et al*, 2014; Olate *et al*, 2014; Selvi Sabater *et al*, 2014; Sugimoto *et al*, 2015).

In this report, we described 10 new cases of osteonecrosis of the jaw in patients who have been treated with denosumab for osteoporosis, analyzing the clinical characteristics of the lesions. This is a description of 10 cases of MRONJ, and in nine of ten patients, bisphosphonates were previously administered.

Patients and methods

We present ten new cases of medication-related osteonecrosis of the jaw in patients receiving denosumab for osteoporosis. All provided written informed consent, we followed the Helsinki Declaration ethical guidelines, and the study was approved by the Ethical Committee of Valencia University (Reference H1441967790259). The inclusion criteria were osteoporosis treated with denosumab at doses of 60 mg subcutaneously every 6 months. Exclusion criteria were treatment with anti-angiogenic drugs or chemotherapy for associated cancers. In each case, in addition to age and gender, we recorded the doses of denosumab, and in patients who had been treated before with bisphosphonates, we recorded the drug used and the time in treatment.

To establish the diagnosis of MRONJ, we used the criteria described by Ruggiero *et al* (2014). Regarding osteonecrosis of the jaw, we registered the location on the mandible or upper jaw and local predisposing or contributing factors (dental extractions, implants, prosthesis, or spontaneous). We also asked about the presence of pain and examined for an intraoral fistulas and necrotic bone exposure (Figure 1). We classified each of the eight cases into one of the four stages described by Ruggiero *et al* (2014). In each case, orthopantomography was performed, and in three of the eight cases, a CT scan was also performed (Figure 2). We recorded the presence of osteolysis, sclerosis, and bone sequestra.

In nine of ten cases, conservative treatment, following Ruggiero *et al* (2014), was established. In stage 0, we prescribed a systemic treatment consisting of medication for chronic pain and antibiotics for infection. In stage 1, we used oral antimicrobial rinses, such as chlorhexidine 0.12%. In stage 2, we used oral antimicrobial rinses in combination with antibiotic therapy, usually with doxycycline 100 mg, twice per day for 10 days. As Ruggiero *et al* (2014) stated, regardless of the disease stage, mobile bony sequestra should be removed to facilitate soft tissue healing.

We considered the condition 'cured' if, after treatment, the necrotic bone exposure and signs of infection that define MRONJ were absent (Ruggiero *et al*, 2014).

Table 1 Cases of medication-related osteonecrosis of the jaw when using denosumab for osteoporosis treatment

Author (year)	Cases with MRONJ	Mean age	Gender	Mean doses in the cases described	Previous BF treatment		MRONJ characteristics				
					Drug and number of cases	Months	Local factors	Location	Conservative treatment	Surgical treatment	Healing
Papapoulos <i>et al</i> (2012)	2	74.8	Female	NE	-	-	NE	NE	NE	NE	Yes
Bone <i>et al</i> , 2013;	6	77.1	Female	7.5	-	-	NE	NE	NE	NE	Yes
Rachner <i>et al</i> (2013)	1	75	Female	1	Alendronate	>36	Spontaneous	Mandible	Yes	Yes	Yes
Otto <i>et al</i> (2013)	2	58	Female	NE	Alendronate	<6 months	Extraction	Mandible	Yes	Yes	Yes
Neuprez <i>et al</i> (2014)	1	58	Male	2	-	-	Extraction	Mandible	Yes	Yes	Yes
Olate <i>et al</i> (2014)	1	55	Female	3	Risedronate	-	Extraction	Mandible	Yes	No	No
Selvi Sabater <i>et al</i> (2014)	1	78	Female	2	-	-	Extraction	Mandible	Yes	No	No
Sugimoto <i>et al</i> (2015)	1	70	Female	2	Risedronate; 3 Ibandronate; 4	Mean: 6.7	Extraction; 6 Implants; 1	Mandible; 7 Upper jaw; 3	Yes; 9	Yes; 1 case	Yes
Bagan <i>et al</i>	10	73.7	Female	3.4	Alendronate; 3	Mean: 6.7	Spontaneous; 2 Prosthesis; 1	7 treated cases with follow up (71.4%)	Yes; 5 out of the 7 treated cases with follow up (71.4%)	Yes; 1 case	Yes

NE, not specified; MRONJ, medication-related osteonecrosis of the jaws.



Figure 1 Case 3. Necrotic bone exposure on the lingual aspect of the mandible. Neither intraoral fistulas nor abscesses are observed. This condition corresponds to stage 1

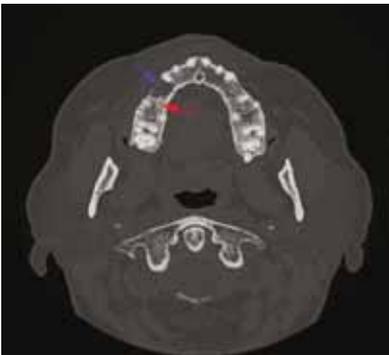


Figure 2 Case 1. Computed tomography scan. Radiographic osteolysis (blue arrow) and sclerosis (red arrow) in an area of osteonecrosis

As this was a series of only 10 cases, our only statistical analysis entailed calculating mean and s.d. for quantitative variables and frequency and percentage for categorical variables.

Table 2 Drugs taken by our ten patients

Case	Age	Gender	Disease	Drug	Doses	Previous bisphosphonate treatment	
						Drug	Months
1	55	F	Osteoporosis	Denosumab	3	—	—
2	59	F	Osteoporosis	Denosumab	2	Ibandronate	52
3	78	F	Osteoporosis	Denosumab	1	Ibandronate	43
4	73	F	Osteoporosis	Denosumab	3	Risedronate	12
5	75	F	Osteoporosis	Denosumab	4	Alendronate	61
6	62	F	Osteoporosis	Denosumab	2	Ibandronate	9
7	90	F	Osteoporosis	Denosumab	6	Alendronate	52
8	77	F	Osteoporosis	Denosumab	1	Risedronate	84
9	86	F	Osteoporosis	Denosumab	8	Ibandronate	36
10	82	F	Osteoporosis	Denosumab	4	Risedronate	12
						Alendronate	60

Denosumab: 60 mg subcutaneously every six months.

Results

The mean age of our eight patients was 73.7 ± 11.6 years (mean \pm s.d.). All were women, and all had been treated with denosumab (Prolia, subcutaneously, 60 mg, every 6 months). The mean number of denosumab doses was 3.4 ± 2.2 . Nine patients (90%) had also been treated before with oral bisphosphonates, for a mean of 44.7 ± 25.11 months (Table 2). Four had been treated with ibandronate, three with risedronate, and three with alendronate. In seven (70%) cases, the ONJ was located on the mandible, and the most common local factor was dental extraction (six cases, 60%); we only found one case associated with dental implants. In two (20%) cases, there was pain, three (30%) had an intraoral fistula, and necrotic bone exposure was present in nine (90%) cases (Table 3).

Regarding the radiographic changes observed, sclerosis of the bone was present in all cases. We found no sequestra, and osteolysis was present in six (60%) cases.

Stage 1 was the most common ONM stage, occurring in eight (80%) cases, and in all but one case, conservative treatment was employed, leading to healing of the lesion in five (71.4%) of the seven treated cases. One patient did not agree to be treated due to her age and concomitant systemic diseases. In two patients, we could not follow up them.

Discussion

Osteoporosis is the most common bone disease in humans; it is estimated to affect over 200 million people worldwide (Lewiecki, 2011). Osteopenia and osteoporosis represent an important public health problem due to the associated risk for bone fractures (Bridgeman and Pathak, 2011). It was estimated that in 2010, 10.2 million older adults had osteoporosis in the USA, and the overall prevalence of low bone mass was 43.9% (Wright *et al*, 2014). The decrease in estrogen in postmenopausal women increases RANKL, resulting in the enhancement of bone resorption, leading to the deterioration of bone microstructure and progressive bone loss, thereby increasing the risk of fractures (Lewiecki, 2011; Bone *et al*, 2013).

In May and June 2010, the European Commission (EC) (European Medicines Agency, 2015) and the US Food

Medication-related osteonecrosis associated with denosumab
J. Bagan *et al.*

4

Table 3 Clinical and radiographic features in our series of ten cases with MRONJ associated with denosumab

Case	Local factors	Location	Pain	Bone exposure	Intraoral fistula	Radiographic findings			Ruggiero's Stage	Treatment	Cure
						Osteolysis	Sclerosis	Sequestrum			
1	Dental Extraction	Upper jaw	Yes	No	Yes	Yes	Yes	No	2	Conservative and Surgery	Yes
2	Prosthesis	Upper jaw	No	Yes	No	No	Yes	No	1	Conservative	Yes
3	Dental Extraction	Mandible	No	Yes	No	Yes	Yes	No	1	Conservative	Yes
4	Spontaneous	Mandible	No	Yes	No	No	Yes	No	1	Conservative	Yes
5	Dental Extraction	Mandible	Yes	Yes	No	Yes	Yes	No	2	Conservative	No
6	Implant	Mandible	No	Yes	Yes	No	Yes	No	1	Conservative	No
7	Spontaneous	Mandible	No	Yes	Yes	Yes	Yes	No	1	—	—
8	Dental Extraction	Mandible	No	Yes	No	No	Yes	No	1	Conservative	Yes
9	Dental Extraction	Mandible	No	Yes	No	Yes	Yes	No	1	Conservative	—
10	Dental Extraction	Upper jaw	No	Yes	No	Yes	Yes	No	1	Conservative	—

MRONJ, medication-related osteonecrosis of the jaws associated with denosumab.

and Drug Administration (FDA) (Food and Drug Administration, 2010) approved the marketing and clinical use of denosumab for the treatment of postmenopausal osteoporosis under the name Prolia with an administration pattern of 60 mg by subcutaneous injection every 6 months. The goal of treatment with denosumab is to obtain a significant reduction in bone turnover markers (BTMs), increase bone mineral density (BMD), and reduce fractures (Lewiecki, 2011). When comparing denosumab vs alendronate, denosumab resulted in better BMD results and a significantly greater reduction in BTMs (Brown *et al.*, 2009).

Denosumab is a human monoclonal G2 (IgG2) antibody having a mechanism of action different from BPs (Choi, 2015). Denosumab is a competitive antagonist for the receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand (RANKL), which inhibits the differentiation of osteoclasts (Malan *et al.*, 2012). RANKL is present ubiquitously throughout many tissues, including in cells of immune system such as activated T cells and B cells (Cummings *et al.*, 2009).

When RANKL interacts with the receptor activator of nuclear factor (RANK), it triggers the production of osteoclasts. Osteoprotegerin (OPG) originates from osteoblasts and competitively binds to RANKL, inhibiting the formation of osteoclasts. Denosumab, due to its inhibition of RANKL, mimics the effects of OPG (Malan *et al.*, 2012). Denosumab has the advantage of not remaining active for more than 6 months after the last dose, but it has also a disadvantage because if the patient does not receive it on a regular basis, fracture risk may increase (Khan *et al.*, 2015).

ONJ is a rare complication according to reported studies, and the incidence did not differ significantly in cancer patients treated with denosumab or bisphosphonates (Henry *et al.*, 2011). The incidence of MRONJ in studies with denosumab for the treatment of osteoporosis is very low. To date, we have only found 15 reported cases of ONJ in these patients treated with denosumab every 6 months subcutaneously (Papapoulos *et al.*, 2012; Bone *et al.*, 2013; Otto *et al.*, 2013; Rachner *et al.*, 2013; Neuprez *et al.*, 2014; Olate *et al.*, 2014; Selvi Sabater *et al.*, 2014; Sugimoto *et al.*, 2015) (Table 1). However, some

authors suggest that the incidence may increase in the future (Taylor *et al.*, 2010).

In the 15 cases reported in the literature, the mean age was 68.4 ± 4.08 years, similar to our eight cases (Table 1). The mean doses of denosumab were 2.7 ± 0.9 in the 15 prior cases and 2.7 ± 0.6 in our eight.

The drugs approved by the Food and Drug Administration in the United States for the prevention and treatment of osteoporosis are alendronate, ibandronate, risedronate, and zoledronic acid (Maraka and Kennel, 2015). The first three are used via the oral route, and their absorption is very low (about 0.7%) (Creemers *et al.*, 2005). The mechanisms of action of these bisphosphonates involve binding at the bone mineral surface, with the capacity to inhibit bone resorption (Creemers and Papapoulos, 2011; However, bisphosphonates maintain their bone action for years, even after the drug has been withdrawn (Boonen *et al.*, 2012). Bisphosphonate discontinuation is associated with gradual increases in bone turnover markers (BTMs), although after 5 years the levels remain lower than prior to treatment (Black *et al.*, 2006). After the discontinuation of bisphosphonates, the drug action persists for some years with a slower decrease in bone mineral density (BMD) (Boonen *et al.*, 2012). Recently, Thumbigere-Math *et al.* (2015) concluded that the prolonged skeletal half-life of bisphosphonates may suppress bone turnover markers in BRONJ patients for several years after the discontinuation of intravenous bisphosphonate therapy, suggesting an extended effect on bone homeostasis.

Denosumab therapy is associated with BMD increments and reductions in BTM, both of which persist with treatment beyond three years for up to 6 years (Boonen *et al.*, 2012). In contrast to bisphosphonates, there is rapid reversibility with an increase in bone remodeling and a decrease in BMD after suspending denosumab. As a result, bone strength is lower.

The different pharmacokinetics/pharmacodynamics of denosumab and bisphosphonates justify the above-described changes in BTMs and BMD after discontinuation of the drug.

In four of the 15 published cases (26.6%), there was information regarding prior intake of bisphosphonates;

however, of our 10 cases, 9 (90%) had also been treated before with oral bisphosphonates, for a mean of 44.7 ± 25.11 months. This contrast makes it difficult to establish clear and unique implications for denosumab because our patients had been taking BPs for a long time and had stopped taking them for a short time before they started with denosumab. It is likely that their inhibition of bone resorption was still present when the patients started denosumab and osteonecrosis developed.

Thus, we cannot establish which of the drugs was most responsible for MRONJ or whether it was both of them.

According to reports of the previous 15 cases, the most frequent local contributing factor was dental extraction. We also found this in 60% of our cases. However, we also found one case associated with implants and another related to a prosthesis.

In nine of our ten cases, conservative treatment was established, and in 71.4% of the treated and followed cases, we obtained a complete 'cure' of MRONJ using these simple treatments. This is consistent with most of our cases being in the early stages of the American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons (AAOMS) classification; 80% were in stage 1.

In conclusion, due to the small number of reported MRONJ cases associated with denosumab in the treatment for osteoporosis or cancer, there is no conclusive evidence to explain any role of denosumab in MRONJ. More information over a longer duration of denosumab treatment is required.

Author contributions

Jose Bagan and Javier Calvo: designed and wrote the article
Ana Peydro, Leticia Bagan, Yolanda Jimenez and Manuel Leopoldo: collected the data of the patients

References

Allegra A, Oteri G, Alonci A *et al* (2014). Association of osteonecrosis of the jaws and POEMS syndrome in a patient assuming rituximab. *J Craniomaxillofac Surg* **42**: 279–282.

Bagan JV, Hens-Aumente E, Leopoldo-Rodado M, Poveda-Roda R, Bagan L (2012). Bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws: study of the staging system in a series of clinical cases. *Oral Oncol* **48**: 753–757.

Black DM, Schwartz AV, Ensrud KE *et al* (2006). Effects of continuing or stopping alendronate after 5 years of treatment: the Fracture Intervention Trial Long-term Extension (FLEX): a randomized trial. *JAMA* **296**: 2927–2938.

Bone HG, Chapurlat R, Brandi ML *et al* (2013). The effect of three or six years of denosumab exposure in women with postmenopausal osteoporosis: results from the FREEDOM extension. *J Clin Endocrinol Metab* **98**: 4483–4492.

Boonen S, Ferrari S, Miller PD (2012). Postmenopausal osteoporosis treatment with antiresorptives: effects of discontinuation or long-term continuation on bone turnover and fracture risk—a perspective. *J Bone Miner Res* **27**: 963–974.

Bridgeman MB, Pathak R (2011). Denosumab for the reduction of bone loss in postmenopausal osteoporosis: a review. *Clin Ther* **33**: 1547–1559.

Brown JP, Prince RL, Deal C *et al* (2009). Comparison of the effect of denosumab and alendronate on BMD and biochemical markers of bone turnover in postmenopausal women with

low bone mass: a randomized, blinded, phase 3 trial. *J Bone Miner Res* **24**: 153–161.

Choi HJ (2015). New antiresorptive therapies for postmenopausal osteoporosis. *J Menopausal Med* **21**: 1–11.

Coleman R, Woodward E, Brown J *et al* (2011). Safety of zoledronic acid and incidence of osteonecrosis of the jaw (ONJ) during adjuvant therapy in a randomised phase III trial (AZURE: BIG 01-04) for women with stage II/III breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* **127**: 429–438.

Cremers S, Papapoulos S (2011). Pharmacology of bisphosphonates. *Bone* **49**: 42–49.

Cremers SC, Pillai G, Papapoulos SE (2005). Pharmacokinetics/pharmacodynamics of bisphosphonates: use for optimisation of intermittent therapy for osteoporosis. *Clin Pharmacokinet* **44**: 551–570.

Cummings SR, San Martin J, McClung MR *et al* (2009). Denosumab for prevention of fractures in postmenopausal women with osteoporosis. *N Engl J Med* **361**: 756–765.

Diz P, López-Cedrún JL, Arenaz J, Scully C (2012). Denosumab-related osteonecrosis of the jaw. *J Am Dent Assoc* **143**: 981–984.

European Medicines Agency. *Prolia (denosumab)*. European Medicines Agency: London, UK, 2015. [cited by 2015 Mar 19]. Available from: http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/medicines/human/medicines/001120/human_med_001324.jsp&mid=WC0b01ac058001d124.

Food and Drug Administration(2010). *FDA approves new injectable osteoporosis treatment for postmenopausal women*. Food and Drug Administration: Silver Spring, MD. [cited by 2015 Mar 19]. Available from: <http://www.fda.gov/>

Francini F, Pascucci A, Francini E *et al* (2011). Osteonecrosis of the jaw in patients with cancer who received zoledronic acid and bevacizumab. *J Am Dent Assoc* **142**: 506–513.

Henry DH, Costa L, Goldwasser F *et al* (2011). Randomized, double-blind study of denosumab versus zoledronic acid in the treatment of bone metastases in patients with advanced cancer (excluding breast and prostate cancer) or multiple myeloma. *J Clin Oncol* **29**: 1125–1132.

Khan AA, Morrison A, Hanley DA *et al* (2015). Diagnosis and management of osteonecrosis of the jaw: a systematic review and international consensus. *J Bone Miner Res* **30**: 3–23.

Lerman MA, Xie W, Treister NS, Richardson PG, Weller EA, Woo SB (2013). Conservative management of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws: staging and treatment outcomes. *Oral Oncol* **49**: 977–983.

Lewiecki EM (2011). Safety and tolerability of denosumab for the treatment of postmenopausal osteoporosis. *Drug Healthc Patient Saf* **3**: 79–91.

Lo JC, O’Ryan FS, Gordon NP *et al* (2010). Prevalence of osteonecrosis of the jaw in patients with oral bisphosphonate exposure. *J Oral Maxillofac Surg* **68**: 243–253.

Malan J, Ettinger K, Naumann E, Beirne OR (2012). The relationship of denosumab pharmacology and osteonecrosis of the jaws. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol* **114**: 671–676.

Maraka S, Kennel KA (2015). Bisphosphonates for the prevention and treatment of osteoporosis. *BMJ* **351**: h3783.

Marx RE (2003). Pamidronate (Aredia) and zoledronate (Zometa) induced avascular necrosis of the jaws: a growing epidemic. *J Oral Maxillofac Surg* **61**: 1115–1117.

Mauri D, Valachis A, Polyzos IP, Polyzos NP, Kamposioras K, Pesce LL (2009). Osteonecrosis of the jaw and use of bisphosphonates in adjuvant breast cancer treatment: a meta-analysis. *Breast Cancer Res Treat* **116**: 433–439.

Neuprez A, Coste S, Rompen E, Crielard JM, Reginster JY (2014). Osteonecrosis of the jaw in a male osteoporotic patient treated with denosumab. *Osteoporos Int* **25**: 393–395.

Medication-related osteonecrosis associated with denosumab
J Bagan et al

6

- O'Halloran M, Boyd NM, Smith A (2014). Denosumab and osteonecrosis of the jaws—the pharmacology, pathogenesis and a report of two cases. *Aust Dent J* **59**: 516–519.
- Olate S, Uribe F, Martínez F, Almeida A, Unibazo A (2014). Osteonecrosis of the jaw in patient with denosumab therapy. *Int J Clin Exp Med* **7**: 3707–3709.
- Otto S, Baumann S, Ehrenfeld M, Pautke C (2013). Successful surgical management of osteonecrosis of the jaw due to RANK-ligand inhibitor treatment using fluorescence guided bone resection. *J Craniomaxillofac Surg* **41**: 694–698.
- Papapoulos S, Chapurlat R, Libanati C et al (2012). Five years of denosumab exposure in women with postmenopausal osteoporosis: results from the first two years of the FREEDOM extension. *J Bone Miner Res* **27**: 694–701.
- Pozzi S, Vallet S, Mukherjee S et al (2009). High-dose zoledronic acid impacts bone remodeling with effects on osteoblastic lineage and bone mechanical properties. *Clin Cancer Res* **15**: 5829–5839.
- Qi WX, Tang LN, He AN, Yao Y, Shen Z (2014). Risk of osteonecrosis of the jaw in cancer patients receiving denosumab: a meta-analysis of seven randomized controlled trials. *Int J Clin Oncol* **19**: 403–410.
- Rachner TD, Platzbecker U, Felsenberg D, Hofbauer LC (2013). Osteonecrosis of the jaw after osteoporosis therapy with denosumab following long-term bisphosphonate therapy. *Mayo Clin Proc* **88**: 418–419.
- Ristow O, Gemgroß C, Schwaiger M et al (2014). Effect of antiresorptive drugs on bony turnover in the jaw: denosumab compared with bisphosphonates. *Br J Oral Maxillofac Surg* **52**: 308–313.
- Ruggiero SL, Dodson TB, Fantasia J et al (2014). American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons position paper on medication-related osteonecrosis of the jaw—2014 update. *J Oral Maxillofac Surg* **72**: 1938–1956.
- Scagliotti GV, Hirsh V, Siena S et al (2012). Overall survival improvement in patients with lung cancer and bone metastases treated with denosumab versus zoledronic acid: subgroup analysis from a randomized phase 3 study. *J Thorac Oncol* **7**: 1823–1829.
- Selvi Sabater P, Rizo Cerdá AM, Titos Arcos JC, Espuny Miró A (2014). Possible denosumab-induced jaw osteonecrosis in the treatment of osteoporosis. A case report. *Farm Hosp* **38**: 248–249.
- Sivolella S, Lumachi F, Stellini E, Favero L (2013). Denosumab and anti-angiogenic drug-related osteonecrosis of the jaw: an uncommon but potentially severe disease. *Anticancer Res* **33**: 1793–1797.
- Sugimoto T, Matsumoto T, Hosoi T et al (2015). Three-year denosumab treatment in postmenopausal Japanese women and men with osteoporosis: results from a 1-year open-label extension of the Denosumab Fracture Intervention Randomized Placebo Controlled Trial (DIRECT). *Osteoporos Int* **26**: 765–774.
- Taylor KH, Middlefell LS, Mizen KD (2010). Osteonecrosis of the jaws induced by anti-RANK ligand therapy. *Br J Oral Maxillofac Surg* **48**: 221–223.
- Thumbigere-Math V, Michalowicz BS, Hughes PJ et al (2015). Serum markers of bone turnover and angiogenesis in patients with bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw after discontinuation of long-term intravenous bisphosphonate therapy. *J Oral Maxillofac Surg* doi: 10.1016/j.joms.2015.09.028. [Epub ahead of print]
- Troeltzsch M, Woodlock T, Krieglstein S, Steiner T, Messlinger K, Troeltzsch M (2012). Physiology and pharmacology of nonbisphosphonate drugs implicated in osteonecrosis of the jaw. *J Can Dent Assoc* **78**: c78.
- Vescovi P, Meleti M, Merigo E et al (2013). Case series of 589 tooth extractions in patients under bisphosphonates therapy. Proposal of a clinical protocol supported by Nd:YAG low-level laser therapy. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* **18**: e680–e685.
- Vidal-Real C, Pérez-Sayáns M, Suárez-Peñaranda JM, Gándara-Rey JM, García-García A (2015). Osteonecrosis of the jaws in 194 patients who have undergone intravenous bisphosphonate therapy in Spain. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* **20**: e267–e272.
- Wright NC, Looker AC, Saag KG et al (2014). The recent prevalence of osteoporosis and low bone mass in the United States based on bone mineral density at the femoral neck or lumbar spine. *J Bone Miner Res* **29**: 2520–2526.

INDICE ALFABÉTICO

A

Ácido zoledrónico 3
Actinobacillus aggregatibacter 25
Adipocitos 8
Alendronato 4
Alveolitis 31
Angiogénesis 24
Apiceptomía 22
Apoptosis 21
Aredia 11
Articulación temporomandibular 29

B

Bevacizumab 13
Biofilm 24
Bisfosfonatos 6
BRONJ 39

C

Caries 29
Células NK 25
Citoquina 25
Clodronato 3
Concepto de osteonecrosis por bisfosfonatos 11
Condroblastos 8
Conductos de Havers 7
Corticosteroides 21

D

Denosumab 10
Densidad ósea 108
Diagnóstico 32
Dolor 29, 92

E

Edad 83
ELISA 74
Endodoncia 22
Enfermedad de Paget 12
Engrosamiento de la cortical mandibular 103, 165
En riesgo 41
Erosión de la cortical 104
Esclerosis 162
Esclerosis ósea en el canal mandibular 101

Estadio 0 41, 55
Estadio 1 42, 55
Estadio 2 42, 55
Estadio 3 42, 55
Estadio clínico de la ONM 39, 98
Etidronato 3, 148
Etiopatogenia 21
Exposición de un hueso necrótico 29, 97
Extracción dental 22

F

Factor de crecimiento endotelial-vascular (VEGF) 26
Factores de riesgo 16
Factores etiopatogénicos 21
Factores locales predisponentes 90
Fibroblastos 8
Fístula extraoral 96
Fístula intraoral 95
Fístulas 30
Fractura mandibular 101, 164

G

Gammagrafía ósea 36
Gingivitis 29

H

Hidroxiapatita 7
Homeostasis 10
Hueso necrótico 30

I

Ibandronato 3, 148
Implante 22
Inflamación 93
Interleuquina-1 β 25
Interleuquinas 25

L

Ligando del receptor de activación nuclear Kappa β (RANKL) 170
Localización 91

M

Manifestaciones clínicas de la osteonecrosis por bisfosfonatos 28
Marx 28

Microflora oral 21
Mieloma múltiple 148
Mioblastos 8

N

Nombre del bisfosfonato 86

O

Odontalgia 29
ONM 15
OPG 110, 133, 170
Osteoblastos 8
Osteogénesis imperfecta 12, 143
Osteolisis 100, 161
Osteonas 7
Osteonecrosis 11
Osteonecrosis de los maxilares relacionada o debida a fármacos 3, 13
Osteonectina 7
Osteoporosis 12
Osteoprotegerina 26
Osteorradionecrosis 31

P

Pacientes con osteoporosis tratados con bisfosfonatos 16
Pacientes oncológicos tratados con bisfosfonatos 15
Pamidronato 3
Parestesias 31
Patología periapical 29
Pentoxifilina 53
Periodontitis 24, 29
Prevalencia de osteonecrosis 15
Prevalencia e incidencia de osteonecrosis de los maxilares 15
Prevención 48

Q

Quimioterápicos 15

R

Radiografías intraorales 32
Radiografías panorámicas y convencionales 159
Radiolucidez 35
RANKL 110, 130, 170
RANK (Receptor Activador de NF-kB) 170
Recambio óseo

Receptor Activator of Nuclear Factor κ B (RANK) 26
Resonancia Magnética (RM) 167
Resorción ósea 21
Ruggiero 39, 41

S

Secuestros óseos 105, 166
Sexo 84
Sinusitis 29
Sirolimus 13
Sorafenib 13
Sunitinib 13
Supuración 29, 30, 94

T

Tabaco 26
Teripararida 53
Tiempo de administración 88
Tiludronato 3
Tipo de administración del fármaco 87
Tipo de enfermedad 85
TNFR1 25
TNFR2 25
TNF- α 25
Tocoferol 53
Tomografía computarizada 160
Tomografía computarizada de haz cónico (CBCT) 35, 167
Tomografía por emisión de positrones (PET) 167
Tratamiento 52
Tratamiento conservador 52
Tratamiento quirúrgico 54
Turnover óseo 5

Z

Zoledronato 4
Zometa 11

LISTADO DE TABLAS

- Tabla 1.** Clasificación según la estructura química y época de síntesis de los bisfosfonatos. Pag. 4
- Tabla 2.** Células óseas. Pag. 8
- Tabla 3.** Principales indicaciones y características farmacológicas de los bisfosfonatos. Pag. 10
- Tabla 4.** Incidencia de ONM con bisfosfonatos intravenosos. Pag. 17, 18
- Tabla 5.** Incidencia de ONM con bisfosfonatos orales. Pag. 20
- Tabla 6.** Estudio de los hallazgos radiográficos en pacientes con ONM. Pag. 37
- Tabla 7.** Propuestas de modificación de la clasificación de ONM de la AAOMS por McMahon *y cols.* Pag.45
- Tabla 8.** Propuesta de clasificación de ONM de Bedogni *y cols.* y Franco *y cols.* Pag. 46
- Tabla 9.** Propuestas de estadiaje de ONM de Patel *y cols.* (2012) y Schiodt *y cols.* (2014). Pag. 47
- Tabla 10.** En la tabla se registran las pautas determinadas por diversos autores ante la supresión de bisfosfonatos orales. Pag. 51
- Tabla 11.** Opciones de tratamiento odontológico durante la terapia con bisfosfonatos según la vía de administración. Pag. 51
- Tabla 12.** Diseño del estudio estudios realizados en cada grupo. Pag. 68
- Tabla 13.** Edad en años (grupo ONM). Pag. 84
- Tabla 14.** Sexo (grupo ONM). Pag. 84
- Tabla 15.** Tipo de Enfermedad (grupo ONM). Pag. 85
- Tabla 16.** Nombre del Fármaco que toman los pacientes (grupo ONM). Pag. 86
- Tabla 17.** Tipo de administración del fármaco (grupo ONM). Pag. 87
- Tabla 18.** Tiempo de administración del fármaco (grupo ONM). Pag. 88
- Tabla 19.** Factores Locales favorecedores de osteonecrosis (grupo ONM). Pag. 90
- Tabla 20.** Localización (grupo ONM). Pag. 91
- Tabla 21.** Dolor (grupo ONM). Pag. 92
- Tabla 22.** Inflamación (grupo ONM). Pag. 93
- Tabla 23.** Supuración (grupo ONM). Pag. 94
- Tabla 24.** Fístula intraoral (grupo ONM). Pag. 95
- Tabla 25.** Fístula Extraoral (grupo ONM). Pag. 96
- Tabla 26.** Exposición Ósea (grupo ONM). Pag. 97
- Tabla 27.** Estadio (grupo ONM). Pag. 98
- Tabla 28.** Resumen de las variables del grupo con 183 pacientes con ONM. Pag. 99

- Tabla 29.** Frecuencias de la variable Osteolisis (grupo con ONM). Pag. 100
- Tabla 30.** Frecuencias de la variable fractura mandibular (grupo con ONM). Pag. 101
- Tabla 31.** Frecuencias de la variable esclerosis del canal mandibular (grupo con ONM). Pag. 101
- Tabla 32.** Frecuencias de la variable engrosamiento de la cortical mandibular (grupo con ONM). Pag. 103
- Tabla 33.** Frecuencias de la variable mezcla de la cortical y la medular mandibular (grupo con ONM). Pag. 104
- Tabla 34.** Frecuencias de la variable erosión de la cortical (grupo con ONM). Pag. 104
- Tabla 35.** Frecuencias de la variable secuestro óseo (grupo con ONM). Pag. 106
- Tabla 36.** Resumen de los hallazgos radiológicos en los TCs de los 30 casos seleccionados con ONM. Pag. 107
- Tabla 37.** Comparación de los niveles de densidad ósea en los tres grupos. Pag. 108
- Tabla 38.** Estudio de normalidad de los niveles de densidad ósea en los tres grupos. Pag. 109
- Tabla 39.** Prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis comparando la densidad ósea en los tres grupos. Pag. 109
- Tabla 40.** Comparación en los niveles de RANKL entre los tres grupos. Pag. 110
- Tabla 41.** Comparación de los niveles de OPG en los tres grupos. Pag. 113
- Tabla 42.** Prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis comparando el RANKL y el OPG en los tres grupos. Pag. 115
- Tabla 43.** Tabla de contingencia: Administración de fármacos vs Factores Locales. Pag. 117
- Tabla 44.** Prueba de Chi-cuadrado: Administración de fármacos vs Factores Locales. Pag. 118
- Tabla 45.** Tabla de contingencia: Administración de fármacos vs Localización. Pag. 119
- Tabla 46.** Prueba de Chi-cuadrado: Administración de fármacos vs Localización. Pag. 120
- Tabla 47.** Tabla de contingencia: Administración de Fármacos vs Dolor. Pag. 120
- Tabla 48.** Prueba de Chi-cuadrado: Administración de fármacos vs Dolor. Pag. 121
- Tabla 49.** Tabla de contingencia: Administración de fármacos vs inflamación. Pag. 122
- Tabla 50.** Prueba de Chi-cuadrado: Administración de Fármacos vs inflamación. Pag. 123
- Tabla 51.** Tabla de contingencia: Administración de Fármacos vs Supuración. Pag. 123
- Tabla 52.** Prueba de Chi-cuadrado: Administración de Fármacos vs Supuración. Pag.124
- Tabla 53.** Tabla de contingencia: Administración de Fármacos vs Fístula Interna. Pag. 125
- Tabla 54.** Prueba de Chi-cuadrado: Administración de fármacos vs Fístula Interna. Pag. 126
- Tabla 55.** Tabla de contingencia: Administración de Fármacos vs Fístula Extraoral. Pag. 126

- Tabla 56.** Prueba de Chi-cuadrado: Administración de fármacos vs Fístula Externa. Pag. 127
- Tabla 57.** Tabla de contingencia: Administración de Fármacos vs Exposición Ósea. Pag. 128
- Tabla 58.** Prueba de Chi-cuadrado: Administración de Fármacos vs Exposición Ósea. Pag. 129
- Tabla 59.** Tabla de contingencia: Administración de Fármacos vs Estadio. Pag. 129
- Tabla 60.** Prueba de Chi-cuadrado: Administración de Fármacos vs Estadio. Pag. 129
- Tabla 61.** Test de normalidad de la Variable RANKL. Pag. 130
- Tabla 62.** Niveles plasmáticos de RANKL en función del tipo de Administración del Bisfosfonato. Pag. 130
- Tabla 63.** Prueba de muestras independientes RANKL. Pag. 132
- Tabla 64.** Test de normalidad de la variable OPG. Pag. 133
- Tabla 65.** Niveles plasmáticos de OPG en función del tipo de Administración del Bisfosfonato. Pag. 133
- Tabla 66.** Prueba no paramétrica U de Mann-Whitney. Pag. 134
- Tabla 67.** Resumen de la asociación entre la variable forma de administración del bisfosfonato y el resto de variables clínicas; así como con los niveles plasmáticos de RANKL y OPG. Pag. 135
- Tabla 68.** Significación total del modelo. Pag. 136
- Tabla 69.** Incertidumbre del modelo. Pag. 136
- Tabla 70.** Tabla de clasificación de la ecuación estimada. Pag. 137
- Tabla 71.** Variables de la ecuación. Pag. 137
- Tabla 72.** Incertidumbre del modelo-Regresión lineal múltiple. Pag. 138
- Tabla 73.** Incertidumbre del modelo. Pag. 138
- Tabla 74.** Variables de la ecuación. Pag. 139
- Tabla 75.** Incertidumbre del modelo. Pag. 139
- Tabla 76.** Incertidumbre del modelo. Pag. 140
- Tabla 77.** Variables de la ecuación. Pag. 140

LISTADO DE FIGURAS

- Fig. 1.** Estructura química y potencias relativas aproximadas de los bisfosfonatos. Pag. 4
- Fig. 2.** A. Los bisfosfonatos nitrogenados inhiben selectivamente la farnesil pirofosfato sintetasa (FPP) dentro de los osteoclastos. B. La endocitosis del bisfosfonato por parte de los osteoclastos conlleva a la inhibición FPPS y a la apoptosis. Pag. 5
- Fig. 3.** Fisiología de la homeostasis ósea y mecanismos de interacción con otros medicamentos con el recambio óseo. Pag. 6
- Fig. 4.** Acción de los bisfosfonatos sobre el hueso y sus procesos de resorción mediados por los osteoclastos. Pag. 7
- Fig. 5.** Osteonecrosis de los maxilares en los cuatro cuadrantes. Pag. 14
- Fig. 6.** Esclerosis ósea progresiva ante una extracción mandibular en un paciente que desarrolla osteonecrosis por bisfosfonatos. Pag. 23
- Fig. 7a.** Osteonecrosis de los maxilares en estadio inicial. Pag. 30
- Fig. 7b.** Osteonecrosis de los maxilares con supuración y fistula extraoral a través de la piel de la cara. Pag. 30
- Fig. 8.** Zona de osteolisis en la mandíbula. Pag. 33
- Fig. 9.** Imagen de TC (corte sagital) de una evidente zona osteolítica mal definida. Pag. 34
- Fig. 10.** Osteonecrosis de la mandíbula con exposición de hueso necrótico, vertiente lingual. Pag. 43
- Fig. 11.** Osteonecrosis de la mandíbula con exposición de hueso necrótico y supuración. Pag. 43
- Fig. 12.** a. Osteonecrosis con zona de exposición en mandíbula. b. Fistulización cutánea de la imagen anterior. Pag. 44
- Fig. 13.** Imagen de TC con fractura mandibular patológica. Pag. 44
- Fig. 14.** Diagrama explicativo de los estudios realizados en la investigación, tal como también lo detallamos en la Tabla 12. Pag. 69
- Fig. 15.** Diagrama de flujo de la búsqueda bibliográfica en el motor de búsqueda PubMed. Pag. 71
- Fig. 16.** Ejemplo de las mediciones realizadas en el TC para el estudio de la densidad ósea. Pag. 73
- Fig. 17.** Determinación del RANKL. Pag. 75
- Fig. 18.** Espectrofotómetro utilizado para el análisis del RANKL y Osteoprotegerina. Pag. 76
- Fig. 19.** Determinación de la Osteoprotegerina. Pag. 77
- Fig. 20.** Histograma de la variable Edad en años (grupo ONM). Pag. 83
- Fig. 21.** Diagrama de sectores de la variable Sexo (grupo ONM). Pag. 84
- Fig. 22.** Diagrama de sectores de la variable Tipo de Enfermedad (grupo ONM). Pag. 85

- Fig. 23.** Diagrama de sectores de la variable Tipo de Fármaco (grupo ONM). Pag. 86
- Fig. 24.** Diagrama de sectores de la variable Tipo de Administración del Fármaco (grupo ONM). Pag. 87
- Fig. 25.** Histograma de tiempo de administración de los bisfosfonatos intravenosos (grupo ONM). Pag. 88
- Fig. 26.** Histograma de tiempo de administración de los bisfosfonatos orales (grupo ONM). Pag. 89
- Fig. 27.** Diagrama de cajas del tiempo de administración según el tipo de fármaco (grupo ONM). Pag. 89
- Fig. 28.** Diagrama de sectores de Factores Locales favorecedores de osteonecrosis (grupo ONM). Pag. 90
- Fig. 29.** Diagrama de sectores de la variable Localización (grupo ONM). Pag. 91
- Fig. 30.** Diagrama de sectores de la variable Dolor (grupo ONM). Pag. 92
- Fig. 31.** Inflamación en el reborde alveolar mandibular, junto a infección y una parestesia mentoniana en una paciente con ONM. Pag. 93
- Fig. 32.** Supuración mandibular en un paciente del grupo ONM. Pag. 94
- Fig. 33.** Fístula intraoral mandibular con salida de material purulento en un paciente del grupo ONM. Pag. 95
- Fig. 34.** Fístula Extraoral a piel en el paciente de la figura 32 (grupo ONM). Pag. 96
- Fig. 35.** Diagrama de sectores de la variable Exposición Ósea (grupo ONM). Pag. 97
- Fig. 36.** Osteonecrosis maxilar con exposición de hueso necrótico. Pag. 97
- Fig. 37.** Diagrama de sectores de la variable estadio clínico (grupo ONM). Pag. 98
- Fig. 38.** Diagrama de sectores de la variable Osteolisis (grupo con ONM). Pag. 100
- Fig. 39.** Corte axial del TC donde se aprecia la osteolisis mandibular. Pag. 101
- Fig. 40.** Diagrama de sectores de la variable esclerosis del canal mandibular (grupo con ONM). Pag. 102
- Fig. 41.** Notable esclerosis del canal mandibular en la parte derecha. Pag. 102
- Fig. 42.** Engrosamiento de la cortical mandibular, falta de delimitación entre la cortical y medular; así como erosiones de la cortical mandibular. Pag. 103
- Fig. 43.** Diagrama de sectores de la variable mezcla de la cortical y la medular mandibular (grupo con ONM). Pag. 104
- Fig. 44.** Diagrama de sectores de la variable Erosión de la Cortical (grupo con ONM). Pag. 105
- Fig. 45.** Erosión de la cortical mandibular en el TC. Pag.105
- Fig. 46.** Diagrama de sectores de la variable Secuestro Óseo (grupo con ONM). Pag. 106
- Fig. 47.** Secuestro óseo mandibular en el tercer cuadrante. Imagen de TC. Pag. 106

- Fig. 48.** Secuestro óseo mandibular manifestado en la ortopantomografía (a) y tras su eliminación (b). Pag. 107
- Fig. 49.** Diagrama de cajas de los niveles de Densidad Ósea en los tres grupos. Pag. 108
- Fig. 50.** Muestras para la determinación del RANKL. Pag. 110
- Fig. 51.** Histograma de la variable RANKL en pacientes con ONM. Pag. 111
- Fig. 52.** Histograma de la variable RANKL en pacientes que han tomado BF y no han desarrollado ONM. Pag. 111
- Fig. 53.** Histograma de la variable RANKL en pacientes controles sanos. Pag. 112
- Fig. 54.** Diagrama de cajas de la variable RANKL en los diferentes grupos. Pag. 112
- Fig. 55.** Histograma de la variable OPG en pacientes con ONM. Pag. 113
- Fig. 56.** Histograma de la variable OPG en pacientes que han tomado BF y no han desarrollado ONM. Pag. 114
- Fig. 57.** Histograma de la variable OPG en pacientes controles sanos. Pag. 114
- Fig. 58.** Diagrama de cajas de la variable OPG en los diferentes grupos. Pag. 115
- Fig. 59.** Diagrama de barras de la variable factores locales en los diferentes grupos de administración del fármaco. Pag. 118
- Fig. 60.** Gráfico de barras de la variable localización en los diferentes grupos de administración del fármaco. Pag. 119
- Fig. 61.** Gráfico de barras de la variable Dolor en los diferentes grupos de administración del fármaco. Pag. 121
- Fig. 62.** Gráfico de barras de la variable inflamación en los diferentes grupos de Administración del Fármaco. Pag. 122
- Fig 63.** Gráfico de barras de la variable Supuración en los diferentes grupos de administración del fármaco. Pag. 124
- Fig. 64.** Gráfico de barras de la variable fístula intraoral en los diferentes grupos de administración del fármaco. Pag. 125
- Fig 65.** Gráfico de barras de la variable Fístula Extraoral en los diferentes grupos de Administración del Fármaco. Pag. 127
- Fig. 66.** Gráfico de barras de la variable Exposición Ósea en los diferentes grupos de Administración del Fármaco. Pag. 128
- Fig. 67.** Gráfico de cajas de la variable RANKL en los diferentes grupos de Administración del Fármaco. Pag. 131
- Fig 68.** Gráfico de cajas de la variable OPG en los diferentes grupos de administración del Fármaco. Pag. 134

GLOSARIO DE ABREVIATURAS

99mTc-hidroximetileno-difosfonato (HDP) 36
Asociación Americana de Cirujanos Orales y Maxilofaciales (AAOMS) 12
Bisfosfonatos (BF) 3
Colegio Americano de Reumatología (ACR) 12
Densidad mineral ósea (DMO) 162
Factor de crecimiento endotelial-vascular (VEGF) 26
Factor de crecimiento transformante β (TGF- β) 25
Factor de necrosis tumoral α (TNF- α) 25
Factores de crecimiento insulínicos (IGFs) 25
Factor estimulante de las colonias de macrófagos (M-CSF) 9
Fluorodesoxiglucosa marcado con flúor 18 (18FDG) 36
Fosfatasa ácida tartrato resistente (TRAP) 9
Fosfatasa alcalina (ALP) 8
Interleuquina 1 alfa (IL-1 α) 59
Interleuquina-1 β (IL-1 β) 25, 59
Interleuquina-4 (IL-4) 25
Interleuquina-6 (IL-6) 25
Interleuquina-10 (IL-10) 25
Interleuquina-11 (IL-11) 25
Ligando del receptor activador para el factor nuclear κ β (RANKL) 3
Medication-related osteonecrosis of the jaw (MRONJ) 13
Zoledronato 4
Zometa 11
Ortopantomografía (OPM) 32
Osteocalcina (OCN) 7
Osteonecrosis de los maxilares (ONM) 3
Osteoprotegerina (OPG) 9, 26
Proteína relacionada con la hormona paratiroidea (PTHrP) 25
Proteínas morfogénicas óseas (BMP) 25
RANK (Receptor Activator de NF- κ B) 170
Receptor Activator of Nuclear Factor κ B (RANK) 26

Resonancia Magnética (RM) 32, 167

Sialoproteína ósea (BSP) 26

Sociedad americana para la investigación ósea y mineral (ASBMR) 12

Tomografía computarizada de haz cónico (CBCT) 167

Tomografía Computarizada (TC) 32

Tomografía por emisión de positrones (PET) 32, 167

Unidades Formadoras de Colonias de Granulocitos y Macrófagos (CFU-GM) 9