

TOXICOLOGÍA PRECLÍNICA DE BISFOSFONATOS

NÉLIDA MONDELO¹, VIRGINIA A. PELUFFO¹, MARIANO D. PARMA¹, GUSTAVO R. COINTRY²,
RICARDO F. CAPOZZA², JOSÉ L. FERRETTI^{2,3}, ENRIQUE PICCINNI¹, ESTEBAN MONTUORI ^{1†}

¹ Departamento de Farmacología Experimental, Gador SA, Buenos Aires; ² Centro de Estudios del Metabolismo Fosfocalcico-Rosario; ³ Instituto de Investigaciones Metabólicas, Buenos Aires

Resumen Los bisfosfonatos regulan el recambio óseo por inhibición de la reabsorción ósea osteoclástica. Sus características farmacodinámicas y farmacocinéticas les confieren un particular perfil fármaco-toxicológico, determinado en gran parte por su alto grado de especificidad: escasa o nula distribución en tejidos blandos, fuerte afinidad por tejidos calcificados. Los estudios de toxicología preclínica, cuyo objetivo principal es localizar el o los órganos blanco de toxicidad y estimar el margen de seguridad de un "candidato a agente terapéutico" en animales de experimentación, permiten extraer conclusiones generales que, en el caso de los bisfosfonatos, se avalan con resultados propios y obtenidos en la literatura. Se consideran distintos integrantes de este grupo farmacológico*: Alendronato, Clodronato, Etidronato, Olpadronato, Pamidronato. En general, deben administrarse dosis muy altas de bisfosfonatos para la observación, en grado e incidencia variable, de efectos tóxicos extraesqueléticos: reacción local, hipocalcemia- y sus consecuencias sobre el sistema cardiovascular y la posibilidad de tetania-, afectación de las estructuras dentarias y disfunción renal. La mayoría de estos efectos pueden atribuirse a la escasa solubilidad en fluidos biológicos, a la formación de complejos con el ión calcio, a su potente efecto inhibitorio de la reabsorción ósea endógena o inducida y a su principal vía de excreción. Otros efectos tóxicos (oculares, pulmonares, hepáticos), pueden relacionarse con excesivas dosis reiteradas. Si se considera la cantidad total de Olpadronato administrada a distintas especies animales en estudios toxicológicos y en modelos experimentales farmacodinámicos (osteopenias por privación estrogénica o inmovilización, hipercalcemia inducida por retinoides), se puede estimar un margen de seguridad de 200 - 300:1 entre las dosis "tóxicas" y "farmacológicas". Si las dosis tóxicas en animales se relacionan con las máximas propuestas para humanos, la relación asciende a 300 - 1000:1 dependiendo de la patología y la vía de administración consideradas. Con respecto a su efecto óseo, los datos experimentales con los nuevos bisfosfonatos sugieren un marcado alejamiento entre dosis activas farmacológicamente y aquellas que producen defectos en la mineralización ósea. La exagerada inhibición del remodelamiento óseo, producto del empleo de altas dosis en animales normales, es la natural consecuencia del efecto farmacológico de este tipo de compuestos. Se deduce, entonces, que el potencial tóxico óseo de un bisfosfonato no debería evaluarse en animales normales sino en situaciones particulares con elevado recambio óseo, adecuando las dosis de manera de regular la magnitud de la inhibición de la remodelación ósea para normalizarla sin suprimirla del todo. Potencia, márgenes de seguridad, dosis y esquemas de administración adecuados deben considerarse como elementos clave para el óptimo aprovechamiento del potencial terapéutico de estos compuestos.

† fallecido el 10 de octubre de 1995

Abreviaturas

- *Alendronato: 4-amino-1-hidroxibutiliden-1, 1-bisfosfonato monosódico.
- Clodronato: diclorometilen bisfosfonato monosódico.
- Etidronato: 1-hidroxietiliden-1, 1-bisfosfonato disódico.
- Olpadronato (Gador INN): 3-(N, N dimetilamino)-1-hidroxipro-piliden-1, 1-bisfosfonato monosódico (IG 8801, dimetil APD)
- Pamidronato: 3-amino-1-hidroxibutiliden-1, 1-bisfosfonato disódico

Introducción

Los bisfosfonatos constituyen una familia de compuestos que, como tal, comparten algunas características farmacodinámicas y farmacocinéticas. Es bien reconocido que regulan el recambio óseo por inhibición de la reabsorción ósea osteoclástica, que presentan baja biodisponibilidad oral y que desaparecen rápidamente del plasma para acumularse, en parte, en tejidos óseos (20- 60%) excretándose el resto por vía renal (40-80 %). Su alto grado de especificidad, determinado por la escasa o nula distribución en tejidos blandos y su fuerte afinidad por tejidos calcificados (Fig. 1) donde permanecen durante un prolongado período de tiempo, les confieren un particular perfil fármaco-toxicológico¹.

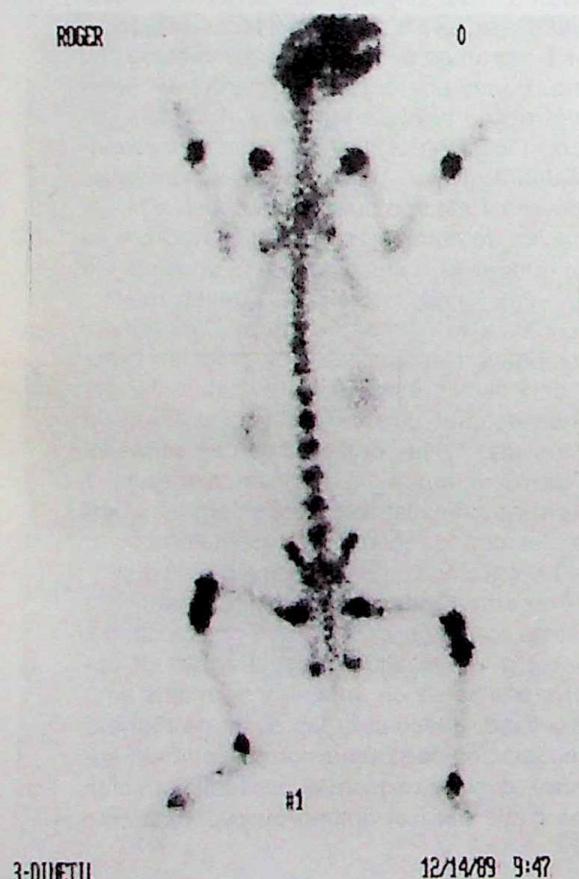


Fig. 1.- La figura refleja la distribución de ^{99m}Tc-Olpadronato a las 24 horas de su administración intravenosa en conejos. Nótese la marcada captación ósea - mayor en regiones predominantemente trabeculares-, el esbozo renal indicativo de su principal vía de excreción y la ausencia de captación por tejidos extraesqueléticos.

En este capítulo se describirán y discutirán los efectos tóxicos que los bisfosfonatos pueden producir en animales de experimentación y para ello se tomará en consideración el camino que recorren desde la vía de entrada al organismo hasta su excreción final.

Los estudios toxicológicos en animales de experimentación son requeridos para satisfacer las preocupaciones de fabricantes y autoridades regulatorias acerca de la inocuidad de un nuevo agente terapéutico. A diferencia de los ensayos clínicos, donde es deseable una mínima o nula incidencia de efectos adversos, en los ensayos preclínicos, la detección de manifestaciones tóxicas no debería resultar un hecho alarmante. De acuerdo a lineamientos locales e internacionales, al menos una de las 3 dosis administradas en animales, en estos estudios, debe permitir localizar el o los órganos blancos de toxicidad del producto y estimar el perfil toxicológico del mismo. De esta manera, se intenta disminuir las posibilidades de que el investigador responsable del monitoreo de fases tempranas de la investigación clínica resulte sorprendido por la aparición de efectos tóxicos severos o inesperados².

Se considerará especialmente la toxicología preclínica de Olpadronato, un nuevo aminobisfosfonato en desarrollo³, y se efectuarán comentarios generales sobre los otros bisfosfonatos más relevantes desde el punto de vista histórico y/o clínico: Alendronato, Clodronato, Etidronato, Pamidronato.

Efectos tóxicos relacionados con el sitio de administración

La administración parenteral de estos compuestos se ha asociado con fenómenos de toxicidad local⁴. En este sentido, Olpadronato resultó inocuo cuando se lo administró en altas dosis únicas (aproximadamente 100 mg/kg i.v.) en ratas y ratones. En cambio, el sitio de inyección fue severamente afectado cuando dosis elevadas se aplicaron en el mismo lugar (vena lateral de la cola, en ratas) en forma diaria y reiterada (³ 10.0 mg/kg/día, durante 4 semanas). El cuadro histológico de la región afectada, que incluyó fenómenos de trombosis asociados a una dermatitis necrótica, no se reprodujo con dosis 5 veces menores, en idénticas condiciones experimentales.

Alendronato también produjo severo dolor y necrosis tisular en el sitio de inyección cuando ratas y perros fueron administrados por vías subcutánea e intramuscular⁴.

Con la administración oral de Olpadronato en agua de bebida, no se detectaron signos de agresión a la cavidad bucal de ratas y ratones luego de una muy prolongada administración de altas dosis del compuesto (hasta 60 mg/kg/día durante 18-24 meses). En conejos, soluciones concentradas de Olpadronato colocadas directamente en las fauces, de manera de asegurar la ingesta oral del bisfosfonato, produjeron dermatitis necrótica en comisuras labiales con dosis altas, diarias y repetidas (30 mg/kg/día, durante 6 meses). Al suspender el tratamiento, se observó una paulatina recuperación de las lesiones. Este fenómeno no se observó con dosis 4 veces menores administradas durante el mismo período.

Efectos tóxicos relacionados con el tracto gastrointestinal

En algunos pacientes (aproximadamente 22 % en el caso de Pamidronato), ocurren manifestaciones de toxicidad gastrointestinal con la administración de bisfosfonatos^{5,6}. En consecuencia, es natural la búsqueda, en animales de experimentación, de indicios de este tipo de toxicidad, considerando el trayecto que recorre la droga luego de su administración oral y hasta el principal lugar de absorción y, además, que una fracción sumamente importante de la misma (90-99 %), es eliminada por vía rectal sin absorberse.

Con altas dosis de Olpadronato, agresivas para otros sistemas, no se evidenciaron efectos tóxicos en esófago, estómago, intestino delgado y grueso en distintas especies animales: ratas (200 mg/kg/día durante 6 meses; 40-45 mg/kg/día durante 2 años); ratones (90 mg/kg/día durante 3 meses) y conejos (30 mg/kg/día, durante 6 meses).

En perros tratados con dosis farmacológicas de Alendronato (1 mg/kg/día durante 3 años, empleando sonda gástrica), no se detectaron cambios histológicos indicativos de toxicidad gastrointestinal⁷.

Efectos tóxicos relacionados con la vía de excreción

La principal vía de excreción de los bisfosfonatos es la renal. En ratas, aproximadamente un 43 % de la dosis intravenosa de Olpadronato marcado con ¹⁴C se elimina en las primeras 24 horas luego de la administración y un 4 % durante las próximas 72 horas. Su comportamiento es, en este aspecto, similar al de otros bisfosfonatos^{1,4}. En consecuencia, el riñón es un órgano expuesto a una importante fracción del producto.

Con Olpadronato, en experimentos crónicos en ratas con altas (40-45 mg/kg/día, 2 años) o muy altas (200 mg/kg/día, 6 meses) dosis orales, no se detectó daño histológico renal que pueda atribuirse. En conejos, una dosis oral de 30 mg/kg/día por vía oral produjo una marcada incidencia de glomerulitis entre los animales tratados durante 6 meses. Por vía intravenosa, la rápida inyección de una dosis igual o mayor a 10.0 mg/kg/día, durante 4 semanas, produjo necrosis tubular en 2 de 40 ratas tratadas. En ninguna de las 2 especies se detectaron lesiones histológicas renales en grupos de animales que permanecieron un período adicional sin tratamiento, ni en grupos administrados con la mitad (conejos) o un cuarto (ratas) de las dosis mencionadas, sugiriendo la relación del efecto con la dosis y la naturaleza reversible del mismo.

Dosis altas únicas de Pamidronato (30-40 mg/kg i.p.) produjeron, en ratas y ratones, necrosis celular focal con obstrucción tubular en áreas corticales del riñón pocos días después de la administración⁸.

Con bajas dosis farmacológicas, perros tratados durante 3 años con Alendronato por vía oral (1 mg/kg/día) no presentaron evidencias bioquímicas ni histológicas de disfunción renal⁷.

Efectos tóxicos atribuibles a la exacerbación del efecto farmacológico deseado

Calcemia

Se han descripto ocasionales signos de hipocalcemia en humanos con altas dosis de

bisfosfonatos tales como las requeridas en el tratamiento de la enfermedad de Paget e hipercalcemias malignas⁹.

En animales, dosis únicas muy elevadas de Olpadronato (>2000 mg/kg p.o. en ratas; ≥ 75 mg/kg i.v. en ratas y ratones) pueden producir signos clínicos asociados a hipocalcemia: convulsiones, disminución de la frecuencia respiratoria, signos de asfixia, pérdida transitoria del tono abdominal y de miembros posteriores, disminución de la actividad motriz. La severidad de las manifestaciones tóxicas, que pueden provocar la muerte del animal, varía dramáticamente en relación a la velocidad de infusión intravenosa. La toxicidad aguda intravenosa de Etidronato en perros fue similar, con alteraciones electrocardiográficas compatibles con hipocalcemia y una marcada dependencia de las concentraciones sanguíneas de la droga¹⁰.

Se detectó hipocalcemia marcada en un 50 % de ratas tratadas con 200 mg/kg/día de Olpadronato por vía oral a los 2-3 meses del inicio de la administración. En cambio, en ratas tratadas con 10 mg/kg/día por vía i.v., al cabo de 4 semanas no se detectaron valores de calcio sérico total ni iónico significativamente inferiores al grupo control correspondiente. En conejos, una dosis de 30 mg/kg/día p.o. durante 6 meses no afectó los niveles de calcio sérico.

En perros, se observó una leve y transitoria disminución de la calcemia con Alendronato en las semanas 39 y 64, pero no en las semanas 103 y 154 en un experimento de 3 años de duración con dosis orales de 1 mg/kg/día⁷.

Hueso

Es conocido que los efectos adversos sobre la mineralización ósea (osteomalacia) o la disminución exagerada del recambio óseo, pueden afectar la integridad biomecánica del esqueleto.

A partir de las primeras evidencias experimentales y clínicas de que dosis farmacológicas de Etidronato interferían con la normal mineralización ósea se sospechó que ésto pudiera ocurrir también con otros bisfosfonatos^{11,12}. Sin embargo, Schenk y col. demostraron, en 1973, diferencias entre Etidronato y Clodronato. Mientras que dosis de Etidronato de 35-110 mg/kg/día s.c. durante 10 días, impedían la mineralización del cartílago de crecimiento y la del osteoide en metáfisis y

diáisis de tibia en ratas jóvenes, dosis similares de Clodronato (un bisfosfonato 10 veces más activo), no inhibían la mineralización, observándose un marcado impedimento de la remodelación ósea metáfisisaria, con persistencia de columnas de cartílago calcificado. Debido a la inhibición de la reabsorción ósea en la superficie perióstica de las metáfisis, éstas adquirieron un aspecto de clava¹¹.

En ratas, ratones y conejos, con dosis de Olpadronato muy alejadas de las que demostraron ser activas en modelos farmacodinámicos^{3,13,14} no se detectaron evidencias radiológicas, densitométricas, tomográficas o histológicas que indiquen defectos en la mineralización ósea.

En fémures de ratas normales adultas o prepúberes, dosis muy elevadas de Olpadronato (hasta 200 mg/kg/día ó 90 mg/kg/día p.o., durante 6 y 3 meses respectivamente) produjeron un marcado incremento en la densidad ósea radiológica y/o evaluada por densitometría fotónica dual con un claro predominio en la región distal del hueso. Los valores densitométricos registrados resultaron hasta un 70 % superiores a los de animales controles. Estos efectos no se acompañaron de deterioro de la densidad mineral ósea ni de la resistencia femoral a la fractura de la región diafisisaria, predominantemente compacta. Por el contrario, los ensayos de flexión de 3 puntos demostraron un efecto biomecánico positivo en ambos sexos en las ratas prepúberes y en los machos adultos^{15,16}.

En las ratas prepúberes, Olpadronato produjo un engrosamiento metáfisisario "en clava" similar al descripto anteriormente para Clodronato, con imágenes radiológicas y tomográficas (tomografía computada cuantitativa periférica) sólidas, sin signos de cavidad ni porosidad. Histológicamente, el material metáfisisario presentó pequeños poros, inobservables tomográficamente, constituidos por haces de esponjiosa primaria con porciones de cartílago calcificado, cuya reabsorción resultó fuertemente inhibida¹⁷.

En conejos adultos normales que recibieron altas dosis de Olpadronato durante 6 meses (30 mg/kg/día p.o.) se detectaron 2 episodios fracturarios (región de la mediodiafisis femoral y metatarso) en machos y no en hembras sobre un total de 22 animales tratados. Con niveles inferiores de dosis (15.0-7.5 mg/kg/día p.o.) administradas durante el mismo período de tiempo, no se detectaron episodios similares. En todos los ani-

males se pudo detectar un marcado incremento del espesor trabecular a nivel del esternón y una correlación positiva significativa entre las dosis administradas y la densidad mineral ósea registrada , sin evidencias histológicas de osteomalacia.

Las tibias de ratas que recibieron Olpadronato desde el destete y durante 2 años (40-45 mg/kg/día p.o.) no presentaron defectos histológicos en relación a la mineralización ósea. En cambio, pudo observarse hipertrofia cortical y un marcado incremento del espesor trabecular óseo a nivel del esternón.

En ratones hembras, dosis muy elevadas de Olpadronato (90 mg/kg/día p.o. durante 3 meses) mejoraron la resistencia de la diáfisis femoral a la fractura¹⁸.

Alendronato (hasta 3.75 mg/kg/día p.o.) administrado durante 2 años en un modelo de ratas normales, no afectó negativamente las propiedades morfológicas del hueso cortical y trabecular, con evidencias de inhibición de la reabsorción ósea durante el crecimiento continuo del hueso de esta especie. Mejoró la calidad biomecánica ósea reflejada en el aumento de la resistencia a la fractura asociada a un aumento de la fracción de área del hueso¹⁹.

En perros, con dosis farmacológicas de Alendronato (1 mg/kg/día p.o. durante 3 años) no se detectaron efectos adversos óseos incluyendo osteomalacia, fracturas espontáneas ni alteraciones de la resistencia femoral y vertebral⁷. En vértebras de cerdos en miniatura que recibieron igual dosis durante 1 año, tampoco se detectaron defectos en la mineralización ósea. En cambio, mejoró su calidad biomecánica, lo cual se atribuyó principalmente a un aumento en la masa ósea trabecular sin deterioro de las propiedades materiales del hueso²⁰.

Pamidronato demostró poseer, en ratas en crecimiento, un comportamiento bifásico. Con dosis de hasta 0.45 mg/kg/día i.p durante 23 días, incrementó la resistencia de la diáfisis femoral a la fractura, mientras que, en iguales condiciones, dosis superiores (desde 1.4 hasta 45 mg/kg/día) no afectaron o empeoraron este comportamiento, con una clara relación dosis -respuesta²¹. En perros tratados con dosis entre 2.5 y 25 mg/kg/día p.o. durante 1 año, aumentó el grado de mineralización (cantidad de mineral óseo por unidad de volumen de matriz orgánica ósea) y el

volumen y espesor trabeculares . En un grupo de perros igualmente tratados, que permaneció 1 año adicional sin tratamiento, se mantuvo la ganancia de volumen trabecular, así como el espesor y la conectividad trabeculares^{22,23}.

Otros efectos tóxicos

Se han descripto casos de toxicidad hepática y de afectación de la normal estructura dentaria en animales de experimentación, con altas dosis de bisfosfonatos^{1,24}. Olpadronato alteró el normal desarrollo de incisivos en ratas con dosis de 200 mg/kg/día p.o. por 6 meses pero no lo afectó con dosis 5 veces menores. Algunos conejos con 30 mg/kg/día p.o. por 6 meses sufrieron daño hepático, pulmonar, congestión episcleral y/o conjuntivitis. Ninguno de estos hallazgos tuvo lugar, sin embargo, si se los mantuvo durante otros 2 meses sin tratamiento o si se los trató con dosis 4 veces menores .

En ratas, la rápida inyección intravenosa de Olpadronato, produjo disminución de la presión arterial y aumento de la frecuencia cardíaca en forma transitoria (entre los 30 segundos y los 10 minutos posteriores a la inyección) con dosis de 50 mg/kg. Este hecho podría guardar relación con la hipocalcemia inmediata a la inyección en bolo de altas dosis de Olpadronato. Dosis de 2.5 mg/kg/día i.v durante 4 semanas en ratas y de 15 mg/kg/día orales durante 6 meses en conejos , no produjeron alteraciones electrocardiográficas.

Conclusiones

Es posible que el lector no familiarizado con estudios de toxicología preclínica, resulte sorprendido frente al detalle de las manifestaciones tóxicas de un "candidato a agente terapéutico". El análisis de las mismas, sin embargo, permite comprenderlas en función de las propiedades físicoquímicas, farmacológicas y/o farmacocinéticas del agente así como observar que la posibilidad de detectarlas o no depende de la utilización de dosis suficientemente altas, de lo que surge la necesidad de establecer el margen de seguridad del compuesto.

Sólo con dosis muy elevadas los bisfosfonatos producen, en distintas especies animales y en grado e incidencia variable, reacción local seve-

ra en el sitio de inyección, hipocalcemia- con sus consecuencias sobre el sistema cardiovascular y la posibilidad de tetania-, afectación de las estructuras dentarias y disfunción renal. La mayoría de estos efectos pueden atribuirse a su escasa solubilidad en fluidos biológicos, a la formación de complejos con el ión calcio, a su potente efecto inhibitorio de la reabsorción ósea endógena o inducida y a su principal vía de excreción .

Si consideramos la cantidad total de droga administrada por vía oral e intravenosa en estudios toxicológicos y aquellas que demostraron ser efectivas en modelos experimentales farmacodinámicos (osteopenias por depravación estrogénica o inmovilización; hipercalcemia inducidas por retinoides)^{13,14} , podemos estimar, para Olpadronato, una relación aproximada de 200 a 300:1 entre las dosis "tóxicas" y "farmacológicas". La relación entre las dosis tóxicas en animales y las propuestas para humanos, oscila entre 300 a 1000:1 , dependiendo de la patología y la vía considerada.

El efecto óseo de los bisfosfonatos merece una consideración especial. Distintos bisfosfonatos ofrecen distintos márgenes de seguridad entre las dosis inhibitorias de la reabsorción ósea y aquellas que bloquean la mineralización normal. Los nuevos bisfosfonatos desterraron los viejos temores inspirados por el Etidronato , mostrando relaciones de dosis tóxicas a dosis activas de hasta 6000:1 (ej. Alendronato), muy superiores a las descriptas para el primero (1:1)⁷.

Aun preocupa, sin embargo, que dosis excesivas de bisfosfonatos puedan suprimir en forma exagerada la remodelación ósea, con el consiguiente deterioro biomecánico. Sin embargo, el conocimiento adquirido sobre la acción de Olpadronato en ratas muy jóvenes o adultas normales, no reflejó deterioro, sino, por el contrario , un mantenimiento o mejoramiento en la calidad ósea cortical, a pesar de las altas dosis empleadas y de las evidencias de una marcada inhibición de la reabsorción. Los dos casos de fracturas óseas en conejos adultos normales que, durante un prolongado período, recibieron dosis muy altas de Olpadronato, podrían estar relacionados con una extrema supresión del recambio óseo endógeno normal . Este aspecto del potencial tóxico óseo de un bisfosfonato no debería evaluarse en animales normales sino en situaciones particulares con elevado recambio óseo , en las que

éstos puedan desplegar sus verdaderas posibilidades terapéuticas. El adecuado ajuste de las dosis debe permitir regular la magnitud de la inhibición de la remodelación ósea de forma de normalizar el nivel de recambio óseo sin suprimirlo del todo.

En conclusión , se requieren muy altas dosis de bisfosfonatos para la producción de efectos tóxicos en animales de experimentación en tejidos extraesqueléticos. Con los nuevos bisfosfonatos, y dependiendo de las características individuales de cada uno, la actividad bloqueante de la mineralización ósea se puede disociar de la actividad antireabsortiva.

Potencia, márgenes de seguridad, dosis y esquemas de administración adecuados deben considerarse como elementos clave para el óptimo aprovechamiento del potencial terapéutico de estos compuestos.

Nota: Los experimentos con Olpadronato fueron realizados en Gador S.A., como parte del programa de evaluación preclínica cuyos resultados se mantienen rigurosamente archivados.

Olpadronato fue sintetizado en Gador S.A.

Agradecimientos: A Rosario Corso, Carina Di Somma, Hebe Burghi y Elena Castro: por su colaboración incondicional.

A los Dres J.C.Carfagnini, A.Molinolo, N. Sanjuan, M.L. Perez Lloret (histopatología), J.Mangieri (oftalmoscopia), C.Baratti, J.L.Castro, C.Taira (farmacología cardiovascular), C.Acevedo, M.C. García (farmacología del SNC), J.Zanchetta (densitometrías óseas), A. Battimo, A. Pera (radiología), J. Leucowicz (hematología), E.Charreau, O. Pignataro, M. Rubio (farmacocinética), V. Nieselman (bioestadística), P. Oliveri, O. Degrossi, Sra. M. Ortiz (centellografía ósea): por la activa y enriquecedora participación en los ensayos mencionados.

A nuestro querido veterinario.

Summary

Preclinical toxicology of bisphosphonates

Bisphosphonates regulate bone turnover by inhibiting osteoclastic bone resorption. Due to their pharmacodynamic and pharmacokinetic characteristics, bisphosphonates have a special pharmacotoxicological profile related to their high degree of specificity: low or non-existent distribution in soft tissues and strong affinity for calcified tissues.

Some general conclusions may be drawn from the pre-clinical toxicological studies, whose main aim is to identify the toxicity target organ/s and estimate the safety margins of a "prospective therapeutic agent" in laboratory animals. They are based on our own results and on data from the available literature as regards various bisphosphonates: Alendronate, Clodronate, Etidronate, Olpadronate and Pamidronate.

Generally, very high doses of bisphosphonates are required to produce in different levels and incidence various extra-skeletal toxic side effects: local reaction, hypocalcemia (and its consequences on the cardiovascular system and the possibility of tetany), affection of the dental structures and renal dysfunction. Most of side effects may be related to the low solubility in biological fluids, the formation of calcium complexes, the potent inhibitory effect of endogenous or induced bone resorption as well as to its main excretion pathway. Some other side effects (on the eye, lungs and liver), may be related to repeated excessive high doses.

A safety margin of 200 to 300 : 1 between the "toxic" and "pharmacological" doses may be estimated if the total quantity of Olpadronate given to various animal species in toxicological studies and in pharmacodynamic experimental models (osteopenias due to estrogen deprivation or immobilization and retinoid-induced hypercalcemia) is considered. If the toxic doses in animals are related to the highest doses suggested for human beings, then the ratio increases from 300 to 1000 : 1 depending on the pathology and the route of administration.

As regards their effect on the bone, experimental data with the new bisphosphonates suggest a significant dissociation between pharmacologically active doses and those ones producing defective mineralization. The excessive inhibition of bone remodelling, due to the use of high doses in normal animals, is the natural consequence of the pharmacological effect of this family of compounds. A bisphosphonate's toxic potential effect on bone should not be evaluated in normal animals but in particular situations with a high bone turnover. Furthermore, the doses should be adjusted in order to regulate the magnitude of bone remodelling inhibition so as to take it to a normal level without totally suppressing it.

Potency, safety margins, doses and proper administration schemes, should be considered as key elements for the optimum use of the therapeutic potentiality of these compounds.

Bibliografía

1. Fleisch H. En: *Bisphosphonates in bone disease. From the laboratory to the patient*, The Parthenon Publishing group, London, 1995.
2. Weideman M. Toxicity tests in animals: historical perspectives and new opportunities. *Environ Health Perspect* 1993; 101: 222-5.
3. Roldán EJA , Mondelo N , Piccinni E , Peluffo VA, Montuori E. Olpadronic acid sodium salt. Treatment for Paget's Bone Disease. Treatment for Osteoporosis. *Drugs Fut* 1995; 20: 1123 -7.
4. Lin JH. Bisphosphonates: a review of their pharmacokinetic properties. *Bone* 1996; 18:75-85.
5. Mautalen CA, Casco CA, Gonzalez D, Ghiringhelli GR, Massironi C, Fromm GA, Plantalech L. Side effects of disodium aminohydroxypropylidene diphosphonate (APD) during treatment of bone diseases *BMJ* 1984; 288: 828-9.
6. Spivacow F, Zanchetta JR, Kerzberg E, Frigeri A, Fiasché R, Roldán EJA. Tolerability of oral pamidronate in elderly patients with osteoporosis and other metabolic bone diseases. *Curr Ther Res* 1996; 57: 123-130.
7. Peter CP, Guy J, Shea M, Bagdon W, Kline WF, Hayes W. Long-term safety of the aminobisphosphonate Alendronate in adult dogs. I. General safety and biomechanical properties of bone. *J Pharm Exp Ther* 276: 271-6.
8. Cal JC, Cokshott A, Daley Yates PT. Experimental acute renal failure induced by 3 - amino-1-hydroxypropylidene-1,1-bisphosphonate in rodents. En Bach P.H., *Nephrotoxicity*. Ed. Dekker, New York, 1991; 43-8.
9. Roldán EJA, Kerzberg EM, Castelli G, Pérez Lloret A. Efecto de bajas dosis del pamidronate (APD) oral sobre la calcemia de pacientes osteopénicas u osteoporóticas. *Medicina (Buenos Aires)* 1996; 56: 133-7.
10. Francis M, Slough C. Acute intravenous infusion of disodium dihydrogen (1-hydroxyethylidene) disphosphonate: mechanism of toxicity. *J Pharm Sci* 1984; 73: 1097-1100.
11. Schenk R, Merz WA, Muhlbauer R, Russell RGG, Fleisch H. Effect of ethane-1-hydroxy- 1,1-disphosphonate (EHDP) and dichloromethyl-anedisphosphonate (Cl_2MDP) on the calcification and resorption of cartilage and bone in the tibial epiphysis and metaphysis of rats. *Calcif Tissue Int* 1973; 11: 196-214.
12. Boyce BF, Smith L, Fogelman I, Johnston E, Ralston S, Boyle IT. Focal osteomalacia due to low dose diphosphonate therapy in Paget's disease. *Lancet* 1984, i: 821-4.
13. Mondelo N, Peluffo VA, Zanchetta JR. Preclinical pharmacology of Olpadronate, a new dimethylated aminobisphosphonate (Abstract). *Proc VI World Conference on Clinical pharmacology and Therapeutics*, Buenos Aires, Agosto de 1996.
14. Cointry GR, Mondelo N , Zanchetta JR, Montuori

- E, Ferretti JL. Olpadronate restores ovariectomy-affected bone strength. A mechanical, densitometric and tomographic (pQCT) study. *Bone* 1995; 17 (suppl): S 373 - S 8.
15. Ferretti JL, Mondelo N, Capozza RF, Cointry GR, Zanchetta JR, Montuori E. Effects of large doses of Olpadronate (dimethyl-pamidronate) on mineral density, cross-sectional architecture and mechanical properties of rats femurs. *Bone* 1995; 17 (suppl.): 285 S- 93 S.
16. Mondelo N, Montuori E, Peluffo VA, Capozza RF, Cointry GR, Morillo S, Zanchetta JR, Ferretti JL. Sub-chronic effects of high doses of Mildronate (Olpadronate) on femur densitometric (DEXA), tomographic (pQCT) and mechanical properties in young rats (Abstract). *Bone Miner* 1994; 25 (suppl 1): S 61.
17. Ferretti JL, Ma YF, Jerome C, Cointry GR, Capozza RF, Mondelo N, Montuori E, Jee SS. Efectos subcrónicos del Olpadronato (Dimetil-pamidronato, Me₂APD) sobre el fémur de rata in vivo II. Cambios metafisarios tomográficos (Resumen) En: *Actas de la XI Reunión Anual de la Asociación Argentina de Osteología y Metabolismo Mineral*, Buenos Aires, Noviembre de 1994.
18. Cointry GR, Mondelo N, Peluffo V, Montuori E, Zanchetta JR, Ferretti JL. Femur mass, architecture, mineralization and strength as affected by high doses of Olpadronate in mice. A tomographic (pQCT) and biomechanical study (Abstract). *J Bone Miner Res* 1996; 11: (Suppl 1): 337 S.
19. Guy JA , Shea M , Peter CP, Morrissey R, Hayes WC. Continuous Alendronate treatment throughout growth, maturation and aging in the rat results in increases in bone mass and mechanical properties. *Calcif Tissue Int* 1993; 53 : 283-8.
20. Fratzl P, Schreiber S, Roschger P, Lafage M-H , Rodan G , Klaushofer K. Effects of sodium fluoride and Alendronate on the bone mineral in minipigs : a small-angle X-ray scattering and backscattered electron imaging study. *J Bone Miner Res* 1996; 11: 248-53.
21. Ferretti JL, Cointry G, Capozza R, Montuori E, Roldán E, Pérez Lloret A. Biomechanical effects of the full range of useful doses of (3-amino-1-hydroxypropylidene)-1,1- bisphosphonate (APD) on femur diaphyses and cortical bone tissue in rats. *Bone Miner* 1990; 11: 111-22.
22. Grynpas MD, Acito A, Dumitriu M, Mertz BP, Very JM. Changes in bone mineralization, architecture and mechanical properties due to long-term (1 year) administration of APD to dogs. *Osteoporosis Int* 1992; 2: 74-81.
23. Grynpas MD, Kasra M, Dumitriu M, Nespeca R, Very JM, Mertz BP. Recovery from pamidronate (APD): a two-year study in the dog .*Calcif Tissue Int* 1994; 55: 288-94.
24. Weile V, Josephsen K, Fejerskov O. Scanning electron microscopy fo final enamel formation in rat mandibular incisors following single injections of 1-hydroxyethylidene -1,1- bisphosphonate. *Calcif Tissue Int* 1993; 52: 318-24.