



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

**LA EXPRESION DE MOLECULAS DE ADHESION INTERCELULAR
(ICAM-1) EN LAS CELULAS DE RESORCION DEL HUESO ALVEOLAR
DE RATAS SOMETIDAS A ESTRES MECANICO ORTODONCICO
TRATADAS CON DICLOFENACO Y NIMESULIDE**

**TESIS DE LICENCIATURA PARA OBTENER EL TITULO DE
CIRUJANO DENTISTA**

PRESENTA

Ana Lilia García Hernández

DIRECTOR DE TESIS

M. C. Elsa A. Calleja Quevedo



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

DEDICATORIA

A mis papas y mis hermanos.

Gracias por su apoyo y amor incondicional, por su comprensión infinita.

AGRADECIMIENTOS A:

Gustavo Raygoza Rodríguez, por todo su apoyo, tiempo y paciencia.

M-C. Elsa Calleja Quevedo, por sus enseñanzas y críticas enriquecedoras.

Mtro. José Francisco Gómez Clavel, por mostrarme el camino de la investigación.

Dra. Leticia Verdín Terán, por su ayuda en el laboratorio.

Mtra. Irma Rivera Montoya, por su apoyo técnico.

Mtro. Agustín Ruiz Carrera, por su ayuda en computo.

Prof Agustín Vargas, por su ayuda estadística.

A todos los que hicieron posible la realización de esta tesis.

INDICE

1. RESUMEN.....;Error! Marcador no definido.
2. ABSTRACT.....;Error! Marcador no definido.
3. INTRODUCCION.....;Error! Marcador no definido.
4. OBJETIVOS.....;Error! Marcador no definido.
5. JUSTIFICACION;Error! Marcador no definido.
6. MARCO TEORICO;Error! Marcador no definido.
 - 6.1 Histología del movimiento ortodóncico..... ;Error! Marcador no definido.
 - 6.2 Tejido óseo ;Error! Marcador no definido.
 - 6.3 Origen de osteoclastos y osteoblastos..... ;Error! Marcador no definido.
 - 6.4 Osteoblastos..... ;Error! Marcador no definido.
 - 6.5 Osteoclastos ;Error! Marcador no definido.
 - 6.6 Regulación de la remodelación..... ;Error! Marcador no definido.
 - 6.7 Mecanismos que disparan la remodelación ortodóncica. ;Error! Marcador no definido.
 - 6.8 La transmigración endotelial y la migración de las células mononucleares al sitio de resorción ;Error! Marcador no definido.
 - 6.9 Papel de las prostaglandinas en la resorción ósea ;Error! Marcador no definido.
 - 6.10 Los antiinflamatorios no esteroideos (AINEs). ;Error! Marcador no definido.
 - 6.11 Los AINEs Diclofenaco y Nimesulide..... ;Error! Marcador no definido.
 - 6.12 Moléculas de adhesión celular..... ;Error! Marcador no definido.
 - 6.13 Moléculas de adhesión en osteoclasto..... ;Error! Marcador no definido.
7. HIPOTESIS.....;Error! Marcador no definido.

8. METODOLOGIA DE LA INVESTIGACION.....;Error! Marcador no definido.
9. MATERIAL Y METODOS;Error! Marcador no definido.
10. VARIABLES;Error! Marcador no definido.
11. CONSIDERACIONES ÉTICAS;Error! Marcador no definido.
12. RESULTADOS;Error! Marcador no definido.
- 13.DISCUSION;Error! Marcador no definido.
14. CONCLUSIONES;Error! Marcador no definido.
15. BIBLIOGRAFIA.....;Error! Marcador no definido.

1. RESUMEN

El estrés mecánico ortodóncico induce la resorción en el hueso alveolar. Se cree que el proceso se dispara cuando el estrés mecánico y el daño vascular causados por la presión inducen la síntesis de prostaglandinas (PGs).

Se sabe que los AINES diclofenaco y nimesulide son potentes inhibidores de las PGs y que inhiben la población de las células encargadas de la resorción, los osteoclastos, en el hueso alveolar sometido a estrés mecánico ortodóncico.

Los primeros osteoclastos que se diferencian y se activan derivan de preosteoclastos que ya estaban presentes en el hueso alveolar, y seguidamente se diferencian los que viajan en sangre en forma de precursores mononucleares. Las moléculas de adhesión ICAM-1 son importantes en el proceso de trans migración vascular y la migración hasta el hueso de los preosteoclastos.

Debido a la importancia que pudieran tener el conocimiento acerca de la expresión de ICAM-1 en los osteoclastos en el diseño futuro de fármacos, y la importancia que tienen los AINES durante el tratamiento ortodóncico, enfermedad periodontal, osteoporosis y osteoartritis, quisimos determinar si la inhibición de ICAM-1 por el diclofenaco que también inhibe PGs influye en la población de osteoclastos y preosteoclastos, comparándola con la población de animales tratados con nimesulide, que inhibe las PGs sin inhibir ICAM-1. Para lograrlo diseñamos un experimento en el que se cuantificó la población de preosteoclastos y osteoclastos que se marcaron con la técnica histoquímica para evidenciar fosfatasa alcalina resistente a tartrato (TRAP), selectiva para estas células. Al mismo tiempo se cuantificó la expresión de ICAM-1 usando una técnica inmunohistoquímica indirecta con peroxidasa de rábano. El experimento se realizó utilizando 50 ratas wistar macho de 250 gr +/-25 gr de peso que se dividieron en 4 grupos: 15 ratas a las que se les colocó un aparato ortodóncico según la técnica descrita por Igarachi tratadas con diclofenaco, y que en grupos de 5 fueron sacrificadas a las 24, 48 y a las 72 hrs., 15 ratas a las que se les colocó el aparato ortodóncico según la técnica descrita por Igarachi tratadas con nimesulide, y que en grupos de 5 fueron sacrificadas a las 24, 48 y a las 72 hrs., 15 ratas a las que sólo se les colocó el aparato ortodóncico según la técnica descrita por Igarachi, y que también en grupos de 5 fueron sacrificadas a las 24, 48 y a las 72 hrs., y 5 ratas a las que no se les dio ningún tratamiento.

La observación histológica se enfocó al septum interradicular de las raíces vestibulares de los primeros molares, con el propósito de valorar el grado de reabsorción ósea se contaron los osteoclastos en un área de 400 por 800 micras en cada cinco cortes de intervalo.

Se hizo el análisis estadístico de los resultados, prueba de ANOVA y prueba de Tukey.

Se encontró que: En el grupo al que no se le dio ningún tratamiento prácticamente no se encontraron osteoclastos y la diferencia respecto a los demás grupos fue altamente significativa. Los grupos tratados con diclofenaco y nimesulide disminuyeron significativamente la población de osteoclastos, pero no hubo diferencia significativa entre ellos. En los grupos testigos tratados sólo con estrés mecánico, la población de osteoclastos fue significativamente menor a las 24 hrs. que el mismo grupo a las 48 y 72 hrs. En el grupo tratado con nimesulide a las 24 hrs. la población es significativamente menor que el mismo grupo a las 48 y 72 hrs. En el grupo tratado con diclofenaco a las 24 hrs. la población es significativamente menor que el mismo grupo a las 48 y 72 hrs. En el grupo tratado con diclofenaco hubo una disminución significativa en la expresión de ICAM-1 y en el tratado con nimesulide no.

2. ABSTRACT

The mechanical orthodontical stress induces the resorption in the alveolar bone. It is believed that the process wakes up when the mechanical stress and the vascular damage caused by the pressure induce the synthesis of the prostaglandins (PGs).

It is known that the diclofenac and nimesulid NSAIDs are potent inhibitors of the PGs and also inhibit the population of resorption cells, the osteoclast, in the alveolar bone that suffer mechanical orthodontic stress.

The first osteoclast that are differentiated and activated derive from preosteoclast that were already present in the alveolar bone, and that travel in the blood as mononuclear precursors. The adhesion of ICAM-1 molecules are important in the process of vascular transmigration, and the migration until the bone of the preosteoclast.

Due to the importance that the knowledge about the ICAM-1 could have in the osteoclast for the future design of drugs, and the importance that the NSAIDs have during the orthodontical treatment, periodontal disease, osteoporosis and osteoarthritis. We wanted to determine if the inhibition of ICAM-1 by the diclofenac that also inhibits PGs influences in the osteoclast and preosteoclast population and we compare it with the population of animals treated by nimesulid, that inhibit the PGs without inhibiting ICAM-1. To accomplish this, we designed an experiment in which the preosteoclast and osteoclast population was quantified, these were marked with the histochemical technique used to make alkaline fosfats resistant to tartrate (TRAP), selective to these cells.

At the same time the expression of the ICAM-1 was quantified using an immunohistochemical indirect technique with radish peroxidasa. The experiment was realized using 50 wistar male rats of 250gr+/25gr of weight and were divided in four groups: 15 rats which were treated with orthodontic stress according to the technique described by Igarachi and treated with diclofenac, 5 of them were sacrificed after 24 hours, 5 after 48 hours and 5 after 72 hours. 15 rats were treated with orthodontic stress according to the technique described by Igarachi and treated with nimesulid, 5 of them were sacrificed after 24 hours, 5 after 48 hours and 5 after 72 hours. 15 rats which were only treated with orthodontic stress according to the technique described by Igarachi, 5 of them were sacrificed after 24 hours, 5 after 48 hours and 5 after 72 hours. 5 rats didn't receive any kind of treatment.

The histological observation was focused to the interradicular septum of the vestibular roots of the first molars, with the purpose of valuating the degree of bone resorption in an area of 400 by 800 micras each interval of five cuts in the selected molars.

An analysis of statistical results was made, ANOVA test and Tukey test.

It was found that in the groups of rats treated with diclofenac and nimesulid, the population of osteoclast was significantly diminished. There is a significant difference of all the groups in relation to the witness group, the one that received no treatment. The ICAM-1 expression was significantly inhibited by diclofenac. The witness group treated only with mechanical stress at 24 hours is significantly smaller than the witness group with mechanical stress at 48 and 72 hours. In the same way the experimental group treated with nimesulid at 24 hours is significantly smaller than the experimental ones with nimesulid at 48 and 72 hours.

3. INTRODUCCION

El osteoclasto es una célula especializada que tiene como función la resorción ósea. Tiene un papel central en el crecimiento y modelado de los huesos durante el desarrollo y el mantenimiento de la masa ósea durante toda la vida. El remodelado óseo se caracteriza por el balance entre los procesos de resorción y aposición, los cuales son regulados por una gran variedad de factores sistémicos y locales (Zaidi y col, 1993). Al contrario, en la modelación, resorción y aposición son actividades independientes (Genneser,2001).

Los sistemas clínicos ortodóncicos que hoy se emplean utilizan fuerzas biomecánicas para inducir el remodelado óseo y el movimiento dentario deseado. Este estrés mecánico induce un proceso semejante al de la inflamación.

A través de la remodelación, los huesos son capaces de adaptar su estructura a largo plazo, en respuesta a la fuerza que tengan que soportar. Esta conducta adaptativa implica que la síntesis y la erosión de la matriz de algún modo debe ser influenciada por el estrés mecánico local, pero el mecanismo involucrado es desconocido (Alberts 2002).

Los osteoclastos son esenciales para el movimiento dentario y se requiere de uno a tres días para que aparezcan, después de la activación inicial de la aparatología ortodóncica (King y col, 1991). La aparición de osteoclastos es el resultado de una serie de eventos que resultan en el reclutamiento y mantenimiento de los mismos en los sitios de presión: la división de células progenitoras en la médula ósea, la transmigración endotelial, la quimiotaxis de los preosteoclastos, el reconocimiento del sitio que van a remodelar, su adhesión a la superficie ósea y la fusión de varios preosteoclastos en una célula funcional multinucleada (osteoclasto activo). En la mayoría de estos procesos son importantes las moléculas de adhesión celular. La diferenciación y la fusión final de los preosteoclastos a osteoclastos es estimulada por varias moléculas como el factor estimulante de las colonias de macrófagos, las proteínas RANKL y la osteoprotegerina, la IL6, la IL11 y TNF α secretadas por los osteoblastos. También es necesario el contacto directo célula a célula entre las células progenitoras y los osteoblastos. Los reconocimientos y adherencias selectivos son mediados por moléculas de adhesión celular. El remodelado óseo es controlado por el balance entre los procesos de formación y reabsorción, los cuales son regulados por una amplia variedad de factores sistémicos como la hormona paratiroidea, la calcitonina, la 1,25 dihidroxicolecalciferol(1,25 (OH) $_2$ D $_3$). También tienen influencia la hormona tiroidea, los esteroides sexuales, los glucocorticoides, la insulina y la hormona del crecimiento.

La resorción comienza cuando los osteoclastos se adosan a las superficies óseas y secretan sustancias que degradan la matriz ósea, después de lo cual los osteoclastos desaparecen probablemente por apoptosis

(Clifford 2004). La fase de síntesis comienza cuando los osteoblastos convergen en la zona erosionada, rellenándola con matriz nueva recién elaborada mediante la síntesis de colágena y otras proteínas. El calcio, el fósforo y otros minerales se depositan alrededor de la colágena para formar hidroxiapatita que forma la parte dura del hueso y representa el 90% de su masa.

En el estudio *in vivo* de preosteoclastos y osteoclastos se han usado la multinuclearidad, la reacción positiva a la fosfatasa ácida resistente a tartrato (TRAP) y la presencia de los receptores a calcitonina como marcadores selectivos para identificar a estas células.

Los antiinflamatorios no esteroideos (AINEs) inhiben la biosíntesis de prostaglandinas (PG) y la expresión de algunas moléculas importantes en la respuesta inflamatoria. El diclofenaco es un AINE derivado del ácido heteroaril acético. Es un potente inhibidor de las síntesis de PGs que median el proceso inflamatorio. Díaz González y col (1995) reportaron que inhibe la expresión de moléculas de adhesión en leucocitos. El nimesulide es un AINE del grupo de las sulfonamidas que inhibe débilmente la síntesis de PGs mediadoras de la inflamación y no se ha reportado que tenga acción inhibitoria en la expresión de las moléculas de adhesión en los leucocitos.

Los preosteoclastos presentan en su superficie moléculas de adhesión como la molécula de adhesión intercelular tipo 1 (ICAM-1), por lo que los AINEs pueden influir en la formación de los osteoclastos. Márquez y Gómez Clavel (2002), Domínguez y Gómez Clavel (2003) probaron que los AINEs diclofenaco y nimesulide disminuyen significativamente la población de osteoclastos en el hueso alveolar de los molares sometidos a estrés mecánico ortodóncico. Aunque se piensa que esta inhibición se debe principalmente al efecto inhibitorio de estos fármacos sobre la síntesis de PGs no se sabe si en este fenómeno influye la inhibición que estos puedan causar de las ICAM-1 necesarias para la fusión de los preosteoclastos.

En este trabajo queremos evidenciar y comparar la presencia de las moléculas de adhesión ICAM-1 usando una técnica de inmunohistoquímica indirecta con peroxidasa de rábano en los osteoclastos de cortes de maxilar superior de ratas, las que se sometieron a una presión mecánica en el primer molar, según la técnica descrita por Igarashi, y que fueron tratadas algunas con diclofenaco y otras con nimesulide a dosis medias.

4. OBJETIVOS

1. Cuantificar el número de osteoclastos marcados por la técnica histoquímica para detectar TRAP en el tabique interradicular del primer molar superior en cortes de maxilar de ratas que se sometieron a una presión mecánica, según la técnica descrita por Igarashi, y que fueron tratadas un grupo con diclofenaco y otro grupo con nimesulide, a dosis medias.
2. Cuantificar el número de osteoclastos marcados por la técnica histoquímica para detectar TRAP en el tabique interradicular del primer molar superior en cortes de maxilar de ratas tanto a los que se sometieron a una presión mecánica, según la técnica descrita por Igarashi, y que no fueron tratadas con ningún medicamento como a las ratas que no fueron sometidas a ningún tratamiento.
3. Comparar la población de osteoclastos de los dos grupos experimentales y los testigos sometidos a presión mecánica, según la técnica descrita por Igarashi, con los testigos a los que no les aplicó ningún tratamiento y entre sí.
4. Cuantificar la presencia de ICAM-1 en las células de la zona del ligamento parodontal del primer molar superior en cortes de maxilar superior de ratas, que se sometieron a una presión mecánica en el primer molar, según la técnica descrita por Igarashi, y que fueron tratadas: un grupo con diclofenaco y otro grupo con nimesulide, a dosis medias
5. Comparar la presencia de ICAM-1 en las células de la zona del ligamento parodontal del primer molar superior en cortes de maxilar superior de ratas, de los animales experimentales, con los testigos que se sometieron a la misma presión mecánica sin que se les administrara medicamento, y entre sí.

5. JUSTIFICACION

Durante el movimiento ortodóncico es necesario que se formen osteoclastos para iniciar el remodelado óseo, por lo que el conocimiento acerca de la actividad de ICAM-1 en los osteoclastos es importante para que en un futuro puedan diseñarse fármacos que faciliten la resorción ósea y acorten la duración del tratamiento ortodóncico. Cuando se retira la aparatología ortodóncica esperamos la maduración o mineralización del hueso alveolar y ya no la formación de osteoclastos que pudieran participar en un nuevo remodelado óseo que lleve a movimientos dentarios no deseados, por lo que los AINEs que inhiben la formación de osteoclastos, podrían ser utilizados en el inicio de la fase de retención para disminuir las recidivas y no deben ser utilizados como analgésicos en la fase activa ortodóncica.

En algunos casos durante el tratamiento ortodóncico o como secuela del mismo, se presenta resorción radicular, que en ocasiones llega a ser tan severa que el resultado del tratamiento se puede ver comprometido, dando un mal pronóstico para la mayor permanencia posible de los dientes. Los AINEs podrían utilizarse para tratar estos casos. El conocimiento generado puede ser utilizado en otros modelos que estudien patologías de importancia epidemiológica, en las que la reabsorción ósea es relevante, como la osteoporosis y la osteoartritis

6. MARCO TEORICO

6.1 Histología del movimiento ortodóncico

La reacción tisular relacionada con la ortodoncia, implica cambios histológicos observados en el ligamento periodontal y en el hueso alveolar, alrededor de los dientes en movimiento.

Las primeras observaciones histológicas del movimiento dentario fueron realizadas en 1942 por Albin Openheim, quien describió las reacciones en el periodonto al aplicar una fuerza: la resorción ósea realizada por osteoclastos en el lado de presión, y aposición por osteoblastos en el lado de tensión.

Reitan en 1960 describió el fenómeno de hialinización en las zonas de presión, con la desaparición fibrilar y el cese de toda actividad celular a nivel del periodonto, caracterizado por una degeneración picnótica de los núcleos de las células del tejido conectivo.

Sandsted (1904) observó que existen diferencias en la reactividad vascular del ligamento periodontal ante las fuerzas ligeras o intensas aplicadas sobre los dientes. Burstone (1961) propuso que las fuerzas ortodóncicas no deberían ocluir la corriente circulatoria para conseguir los máximos efectos biológicos. Este rango de fuerza está entre 20 y 26g.

Proffitt (1993) explicó que al aplicar una presión prolongada sobre un diente, éste se moviliza al remodelarse el hueso que lo rodea. También consideró que la respuesta ósea es mediada por el ligamento periodontal.

6.2 Tejido óseo

Este tejido está formado por células especializadas (células osteoprogenitoras, osteocitos, osteoblastos y osteoclastos) y material intracelular calcificado o matriz ósea. La parte orgánica de la matriz está constituida en un 95% por colágena tipo I y una pequeña cantidad de proteoglicanos y glucoproteínas de adhesión, la parte inorgánica representa cerca del 50% del peso de la matriz ósea. Los iones más abundantes son fosfato y calcio. También hay bicarbonato, magnesio, potasio, sodio y citratos en pequeñas cantidades.

Los osteocitos se sitúan en cavidades o lagunas en el interior de la matriz. Los osteoblastos sintetizan la parte orgánica de la matriz y los osteoclastos son células gigantes móviles y plurinucleadas que reabsorben el tejido óseo participando en el proceso de remodelación de los huesos.

Como la matriz está mineralizada no hay difusión de sustancias por lo que la nutrición de este tejido depende de un sistema de canales vasculares y otro sistema de canalículos existentes en la matriz.

Este tejido constituye la mayor parte del esqueleto. Sirve de soporte a las partes blandas y protege órganos vitales. Aloja y protege la médula ósea (MO). Proporciona apoyo a los músculos esqueléticos, transformando sus contracciones en movimientos útiles y constituye un sistema de palancas que amplía las fuerzas generadas en la contracción muscular.

Actúa como depósito de calcio, fosfatos y otros iones que se almacena y se liberan en el tejido en forma controlada, contribuyendo al mantenimiento de la homeostasis de los líquidos orgánicos.

El osteoclasto es la célula especializada que tiene como función la resorción ósea. Juega un papel central en el crecimiento y modelado de los huesos durante el desarrollo y mediante la remodelación en el mantenimiento normal de la masa ósea durante toda la vida. Participa en la fisiopatología de algunas enfermedades como la osteoporosis, la enfermedad de Paget, la artritis y la enfermedad periodontal. El remodelado óseo es controlado por el balance entre los procesos de formación y resorción, los cuales son regulados por una amplia variedad de factores sistémicos y locales.

Las unidades básicas multicelulares de remodelación ósea (BRU) (Parfitt 1996), están esparcidas en número de tres o cuatro millones de sitios en el esqueleto (Clifford 2004). En ellos hay una actividad acoplada de los osteoclastos y osteoblastos. Al contrario, en la modelación, resorción y aposición son actividades independientes (Genner, 2001).

El camino de la remodelación ocurre siempre con la misma secuencia: aparecen los osteoclastos y por un período de 2 semanas, construyen un túnel en el hueso cortical o una laguna en el trabecular y finalmente desaparecen, se cree que por apoptosis (Clifford 2004). Luego los osteoclastos son reemplazados por osteoblastos, que rellenan las cavidades de resorción durante 3 ó 4 meses para crear una unidad estructural de hueso (Riggs 1986).

6.3 Origen de osteoclastos y osteoblastos

Ambas células provienen de células progenitoras de la médula ósea. Los osteoblastos se originan de las células estromales. Estas células madre mesenquimáticas pluripotenciales que dan origen a las células osteoprogenitoras se denominan CFU-F y también dan origen a fibroblastos, condroblastos, adipocitos,

células musculares y células endoteliales. Algunos autores sugieren que los osteoblastos pueden diferenciarse también a partir de los fibroblastos (Alberts y col 2002). Los precursores en la médula ósea de los osteoclastos son las células madre de los granulocitos y los macrófagos, denominados CFU-GM. Las células precursoras viajan en la sangre como monocitos y llegan a los sitios de resorción en forma de macrófagos (Alberts y col 2002 y Clifford 2004). En el periostio y en el endostio se pueden encontrar como **preosteoclastos** que son células mononucleadas que contienen numerosas mitocondrias, un Golgi bien desarrollado y muchos gránulos densos igual que los osteoclastos. Los más diferenciados dan positivo a la reacción de la fosfatasa ácida resistente a ácido tartárico (Marks y Popoff, 1998).

6.4 Osteoblastos.

Los osteoblastos se organizan como una capa epitelial de células cúbicas en las zonas con formación de hueso, sobre el hueso recién formado. En las zonas de síntesis de matriz ósea emiten prolongaciones delgadas que mantiene contacto con las de las células adyacentes por uniones tipo nexo. El núcleo de estas células suele polarizarse hacia el lado opuesto del hueso recién formado. Su citoplasma es muy basófilo y al microscopio electrónico (ME) se observa un retículo endoplásmico rugoso (RER) y un aparato de Golgi notablemente desarrollados. Los métodos histoquímicos han demostrado que contienen en su citoplasma gran cantidad de fosfatasa alcalina, que se cree que es importante en al proceso de mineralización de la matriz orgánica que esta célula sintetiza.

6.5 Osteoclastos

Los osteoclastos activos son células gigantes multinucleadas de tamaño y forma muy variable, con un diámetro máximo de unas 100 μm . Por lo general contienen de 5 a 10 núcleos pero puede haber hasta 50 en una célula. Su citoplasma en los osteoclastos jóvenes es algo basófilo, en los más viejos es acidófilo. Contiene varios complejos de Golgi, numerosas mitocondrias y es rico en vacuolas, muchas de las cuales son lisosomas primarios ya que dan positiva las reacciones para la fosfatasa ácida. Tienen dos especializaciones de membrana visibles al microscopio electrónico de transmisión: el borde de cepillo y la zona clara, con vacuolas prominentes cercanas a la región del borde de cepillo. El grado de desarrollo y el tamaño del borde en cepillo se relaciona directamente con la actividad de resorción.

Los osteoclastos tienen capacidad para secretar las enzimas lisosomales, lo que se evidencia mediante el microscopio electrónico por la presencia de fosfatasa ácida fuera de la célula, entre el borde fruncido y el hueso. (Palokangas y col, 1994).

Las enzimas lisosomales se vacían por exocitosis a un espacio cerrado o subosteoclástico sellado en la periferia por una zona anular donde la membrana plasmática de la célula está unida a la matriz ósea mediante moléculas de adhesión.

El líquido extracelular del espacio osteoclástico tiene un pH aproximado de 4, debido a la presencia en el plasmalema del borde fruncido de una ATPasa que bombea protones hacia el espacio osteoclástico. Esto activa las enzimas lisosomales que degradan la matriz ósea orgánica mientras que el líquido ácido disuelve el mineral óseo. En el citoplasma cercano al borde fruncido hay anhidrasa carbónica tipo II que cataliza la formación de ácido carbónico a partir de anhídrido carbónico y agua (David y col, 2001), lo que libera a los protones por la disociación del ácido carbónico. Los osteoclastos fagocitan a los osteocitos, el colágeno y el mineral (Genesser, 2001).

Los reconocimientos y adherencias selectivos son mediados por moléculas de adhesión (parte de la familia de las caderinas y las moléculas de adhesión celular de la superfamilia de las inmunoglobulinas).

Existen diferentes criterios para identificar a los osteoclastos, los más utilizados son: la multinuclearidad, la positividad a fosfatasa ácida resistente a tartrato (TRAP) y la presencia de receptores a calcitonina.

La multinuclearidad es el criterio más discutido, en especial cuando se pretende identificar a estas células en cultivo de médula ósea. Las células multinucleadas que se forman en los cultivos de médula ósea por la fusión de fagocitos mononucleares no son capaces de formar zonas de reabsorción en el hueso (Ali, Boyde y Jones, 1984), y por lo tanto, no pueden ser consideradas como osteoclastos. Sin embargo, estas células pueden reabsorber hueso en polvo (Burger y col, 1984). Además, estas células gigantes multinucleares poseen moléculas que son reconocidas por anticuerpos que reconocen moléculas de superficie de macrófagos y no son positivas para anticuerpos contra osteoclastos, por lo que la multinuclearidad no es un buen criterio para reconocer estas células en cultivo. Sin embargo, en cortes de tejido, sigue siendo uno de los principales criterios para identificarlas.

La reacción del TRAP no es exclusiva de los osteoclastos, ya que también los macrófagos poseen esta enzima y la pueden expresar tanto *in vitro* como *in vivo* (Efstratiadis y Moss, 1985; Snipes y col, 1986), sin embargo, es utilizada como criterio de diferenciación en la mayor parte de los trabajos que se han publicado en los últimos años (Tsay y col, 1999; Yamashiro y col, 2000).

6.6 Regulación de la remodelación.

Los osteoblastos regulan localmente la resorción ya que elaboran 3 señales moleculares: dos que promueven el desarrollo de los osteoclastos y una que los suprime.

Inicialmente, los osteoblastos secretan **el factor estimulante de las colonias de macrófagos**, que se une a un receptor de las células mononucleares y las induce a multiplicarse. Otra molécula secretada por los osteoblastos, el péptido **RANKL**, también llamado TRANCE, ODF y OPGL, se une a otro receptor de los macrófagos y los induce a diferenciarse en osteoclastos. La otra proteína sintetizada por los osteoblastos es la **osteoprotegerina (OPG)** que al unirse al receptor de RANKL bloquea la formación de osteoclastos (Teitelbaum 2000). Otras moléculas importantes durante la resorción producidas por los osteoblastos son: la IL1, IL6 y la IL11 (Gemmell y col 2000).

La **IL1** sintetizada por macrófagos, células endoteliales y fibroblastos (además de linfocitos β y células epiteliales) actúa sobre las células endoteliales favoreciendo la unión de los leucocitos (entre ellos de los monocitos), al endotelio, con lo que favorece el reclutamiento de los precursores de los osteoclastos. Induce la desmineralización ósea y tiene una acción sinérgica con el TNF α para estimular la resorción ósea. La IL-6 estimula la fusión de los preosteoclastos para formar osteoclastos e inhibe la síntesis de matriz ósea.

Los osteoblastos también sintetizan sustancias que favorecen la osteogénesis. **El factor de crecimiento similar a la insulina (IGF-1)** estimula a las células a diferenciarse en osteoblastos (Ducy y col 2000). **Las prostaglandinas**, sobre todo PGE₂ estimula la producción de IGF-1 por los osteoblastos.

Los osteoblastos también producen **factor de crecimiento y transformación beta (TGF- β)** que atrae por quimiotaxis a las células osteoprogenitoras, estimula la maduración de los osteoblastos y favorece la síntesis de matriz ósea al mismo tiempo que inhibe la actividad de los osteoclastos (Geneser 2001). Las células estromales no sólo originan a las células osteoprogenitoras durante toda la vida fetal y durante el crecimiento, sino también durante la remodelación. El reclutamiento de las células osteoprogenitoras es estimulado por las proteínas remodeladoras óseas producidas por las células estromales. Las proteínas morfogenéticas óseas (BMP) también estimulan la diferenciación de los osteoblastos (Ducy y col 2000).

Existen más moléculas menos estudiadas que se cree que tienen acción local en el proceso de remodelación: el factor transformante de fibroblastos y el derivado de plaquetas, las prostaglandinas, los reactantes de oxígeno, las endotelinas y los leucotrienos (Zaidi y col 1993). Se ha establecido que la función de los

osteoclastos es modulada localmente por cambios en la concentración de Ca^{++} proveniente de la disolución de la hidroxiapatita. También el óxido nítrico producido localmente por las células endoteliales inhibe fuertemente la remineralización ósea estimulando directamente la actividad osteoclástica (Alam y col. 1992).

La producción de los factores locales es controlada por factores sistémicos como la hormona paratiroidea (PTH), la calcitonina, el $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ (que regulan la calcemia) y los esteroides sexuales. Otros factores sistémicos también influyen en el proceso: la hormona tiroidea, los glucocorticoides, la insulina y la hormona del crecimiento. Los esteroides sexuales, tanto la testosterona como los estrógenos estimulan la osteogénesis. Los osteoblastos tienen receptores para ambos esteroides, pero los estrógenos han sido más estudiados.

Los estrógenos se unen a los osteoblastos y los inducen a sintetizar osteoprotegerina con lo que quedan bloqueados los receptores de RANKL y se suprime la formación de osteoclastos (Ducy y col 2000). Además los estrógenos prolongan la vida de los osteoblastos y se ha sugerido que promueven la apoptosis de los osteoclastos (Clifford 2004).

A la inversa de los estrógenos las dosis continuas de **PTH** inciden en la formación de los osteoclastos uniéndose a los osteoblastos que tienen receptores para la hormona y promoviendo que aumenten la síntesis de RANKL y que disminuya la de osteoprotegerina. Paradójicamente si la administración de PTH es intermitente la hormona provoca la maduración de los precursores de osteoblastos y les prolonga la vida por lo que la PTH se puede usar para inhibir la resorción (Ducy y col 2000). Los picos de PTH activan el factor de crecimiento similar a la insulina (IGF-1).

La **calcitonina** secretada por las células C de la glándula tiroidea tiene efecto antagónico al de la PTH ya que inhibe la resorción ósea. La acción es directa sobre los osteoclastos, que poseen receptores para la hormona. La $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ además de favorecer la absorción de calcio en el intestino, estimula la calcificación del tejido óseo, en parte por aumento de las concentraciones de calcio y fósforo en el líquido extracelular pero también en forma independiente. En altas concentraciones la $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ estimula la resorción ósea. En ambos casos se desconoce el mecanismo de acción. Los osteoclastos carecen de receptores para la $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ a diferencia de las células del linaje de los osteoblastos que sí los poseen, por lo que se cree que su acción sobre la resorción es indirecta.

La hormona del crecimiento actúa indirectamente estimulando la producción de IGF-I (aunque en cultivo de osteoblastos humanos éstos no sintetizan IGF-I en presencia de la hormona de crecimiento, Genneser 2001).

La **hormona tiroidea** favorece la síntesis de la matriz ósea ya que favorece el reclutamiento y la síntesis en los osteoblastos.

| Factores locales | | | |
|--|------------------|-------------------|---------------|
| Osteoclastos | | Osteoblastos | |
| Promueven | Inhiben | Promueven | Inhiben |
| Factor estimulante de las colonias de macrófagos | Osteoprotegerina | IGF-1 | IL6 |
| RANKL | TGF- β | *PGE ₂ | Oxido nítrico |
| IL1 | | TGF- β | |
| IL6 | | BMP | |
| TNF α | | | |

| Factores sistémicos | | | |
|---|-------------|---------------------------|-----------------------|
| Osteoclastos | | Osteoblastos | |
| Promueven | Inhiben | Promueven | Inhiben |
| PTH (dosis continuas) | Estrógenos | Estrógenos | PTH (dosis continuas) |
| 1,25 (OH) ₂ D3 (dosis altas) | Calcitonina | PTH (dosis intermitentes) | |
| | | 1,25 (OH) ₂ D3 | |
| | | H. de crecimiento | |
| | | H. Tiroidea | |

6.7 Mecanismos que disparan la remodelación ortodóncica.

El movimiento producido por la aparatología ortodóncica, se basa en el hecho de que el diente se mueve como resultado de la respuesta de los tejidos periodontales a las fuerzas mecánicas aplicadas. Los sistemas clínicos ortodóncicos que hoy se emplean, utilizan fuerzas biomecánicas para inducir el remodelado óseo y el movimiento dentario deseado. Sin embargo, el mecanismo exacto por el cual estos estímulos mecánicos son transformados en la actividad celular requerida para la remodelación ósea, no es del todo conocido. Como ya mencionamos, Openheim señaló que el hueso se remodela gracias al aumento de osteoclastos activos en las zonas de presión y del aumento de la actividad osteoblástica en la zona de tensión. A pesar de que la histología del proceso de remodelación ha sido estudiada en forma extensiva, los mecanismos bioquímicos que inician o facilitan el movimiento ortodóncico no han sido del todo comprendidos (Sandy y col, 1993). Mostafa y cols., proponen que participan dos vías que se refuerzan en sus efectos, ambos disparados por el estímulo presión-tensión que por una parte al provocar una deformación ósea originan una polarización de la carga eléctrica (respuesta pizoeléctrica) y en consecuencia en las regiones electronegativo ocurre formación de hueso, mientras que en las electropositivas ocurre resorción. Al mismo tiempo el estímulo presión-tensión

El estrés mecánico induce inicialmente un proceso semejante al de la inflamación.

Para Alberts (2002) las células óseas elaboran proteínas señal que quedan atrapadas en la matriz y que son liberadas cuando la matriz es lesionada y propone que es el TGF α el que dispara el proceso de remodelamiento. Los primeros preosteoclastos se diferencian a partir de los preosteoclastos existentes adheridos al hueso.

Los osteoclastos son esenciales para el movimiento dentario y se requiere de uno a tres días para que aparezcan, después de la activación inicial de la aparatología ortodóncica (King y col, 1991). La aparición de osteoclastos es el resultado de una serie de eventos que resultan en el reclutamiento y mantenimiento de los mismos en los sitios de presión. Entre estos eventos se encuentran: la división de células progenitoras multipotenciales en la médula ósea (Cecchini y Fleisch, 1990), la trans migración endotelial, la quimiotaxis de los preosteoclastos (Takeshita y col, 1993), el reconocimiento del sitio que van a remodelar (Mangham y col, 1993), su adhesión a la superficie ósea (Ritter y col, 1992) y la fusión de varios preosteoclastos en una célula funcional multinucleada (Baron y col, 1986). La diferenciación y la fusión final de los preosteoclastos a osteoclastos es estimulada por varias moléculas, entre las cuales tienen especial importancia el factor estimulante de las colonias de macrófagos, la proteína RANKL, la osteoprotegerina, la IL6 y la IL11 y el TNF α secretadas por los osteoblastos. Además de la estimulación por medio de moléculas señal, es necesario el contacto directo célula a célula, entre las células progenitoras de osteoclastos y osteoblastos.

6.8 La trans migración endotelial y la migración de las células mononucleares al sitio de resorción

En el proceso de migración de los monocitos tanto en la reacción inflamatoria como en la migración homeostática, son importantes algunas moléculas de adhesión y citocinas con funciones muy específicas que controlan la activación y el flujo de estas células. Este tráfico se cumple en una cinética de pasos sucesivos que van desde el contacto inicial del monocito con el endotelio, hasta alcanzar la matriz extracelular.

El modelo actual para definir la extravasación de los leucocitos incluye tres pasos y destaca las interacciones que se desarrollan para el tráfico selectivo de los diferentes leucocitos desde los vasos hasta la zona de injuria tisular; una característica clave de estas interacciones es que suceden en forma secuencial y no paralelamente.

El evento inicia secuencialmente con la migración, el rodamiento y la adherencia laxa de los leucocitos al endotelio. La interacción inicial es un proceso aleatorio pero se incrementa notablemente en los sitios de lesión por una alteración en el flujo sanguíneo local. La interacción inicial, laxo con el rodamiento se hace a través de moléculas de la familia de las selectinas. El proceso de rodamiento de los fagocitos sirve para poner a estas células en estrecho contacto con el endotelio y para disminuir la velocidad de su paso por las regiones de daño tisular e inflamación. El rodamiento también permite el contacto del fagocito con las sustancias activadoras secretadas por el endotelio y los tejidos subyacentes. Los fagocitos tienen receptores para estos factores activadores (en su mayoría receptores acoplados a la proteína G).

La adhesión firme al endotelio se origina por una unión ligando- receptor, fuerte y estable, entre ICAM-1 e ICAM-2 expresadas en el endotelio activado. Cuando las integrinas de los leucocitos se unen a las ICAM-1 e ICAM-2 expresadas en el endotelio, originan una adhesión firme de los fagocitos y el frenado completo de su movimiento, Las ICAM-1 se expresan en el endotelio luego de su activación, mientras que ICAM-2 es de expresión constitucional.

El paso de los fagocitos a través de los espacios interendoteliales también se lleva a cabo por interacciones entre las integrinas y moléculas de la superfamilia de las inmunoglobulinas. Cuando el monocito alcanza la matriz extracelular, se inicia la quimiotaxis por medio de la interacción de ICAM-1 con las integrinas de la matriz extracelular. La quimiotaxis de los fagocitos es un incremento en la polarización de sus movimientos hacia el sitio de la lesión, regulado por un gradiente de factores quimiotácticos originados en el propio sitio lesionado que interactúan con receptores específicos de membrana que se asocian intercelularmente con una proteína G, que al activarse inicia la transducción de señales activando proteínas de la familia de la fosfatasa.

6.9 Papel de las prostaglandinas en la resorción ósea

Los resultados de los trabajos que estudian a las prostaglandinas (PGs) son contradictorios. En cultivos de osteoblastos las PGs estimulan la formación de nódulos de mineralización *in vitro* (Flanagan y col, 1992). En contraste, las PGs son potentes estimuladores de la resorción ósea en cultivo de órganos (Mundy, 1987), en particular las prostaglandinas E₁, E₂ e I (prostaciclina) debido a que estimulan la formación de osteoclastos. También promueven la formación de células parecidas a osteoclastos en cultivos de médula ósea murina (Akatsu y col, 1989). La interleucina 1 β así como la presión hidrostática intermitente negativa (-30g/cm²) o positiva (+30g/cm²), estimularon la producción de prostaglandinas y de factores estimuladores de la reabsorción ósea en el medio condicionado producido por fibroblastos de ligamento periodontal humano, el cual indujo la formación *in vitro* de osteoclastos, en cultivos de médula ósea. La PGE₂ colocada directamente

a los cultivos de médula ósea indujo la formación de osteoclastos y este efecto no aumentó por la presencia de medio condicionado o la presión hidrostática, de lo que se deduce que el reclutamiento y estimulación de la reabsorción ósea por los osteoclastos puede ser controlada por diferentes factores (Saito y col, 1991).

Stein y col. encontraron que la inyección de PGE en los dientes anteriores de ratas induce la resorción ósea en ausencia de inflamación.

Un método alternativo para demostrar el papel de las PGs en la resorción ósea es el uso de inhibidores de la ciclooxigenasa (antiinflamatorios no esteroideos). Estos trabajos han demostrado la participación de las PGs en el aumento de la actividad de resorción. Chambley y cols. (1983) reportaron, en conejos tratados con indometacina disminución en el número de osteoclastos pero no en el grado de movimiento dental. Iguales resultados se han reportado con el ácido acetil salicílico (Sámon y Legonia 1999). Yamasaki y col. (1980) trabajando con ratas a las que les colocó una pieza de banda elástica entre el primer y segundo molar superior derecho encontraron que la acción de la indometacina era más efectiva si se administraba una hora antes del tratamiento y tenía muy poco efecto supresor en la aparición de osteoclastos, cuando se administraba a las 24 y a las 48 hrs. después del tratamiento.

Estos resultados sugieren que las PGs por sí solas no controlan totalmente el remodelado óseo asociado con el movimiento dental.

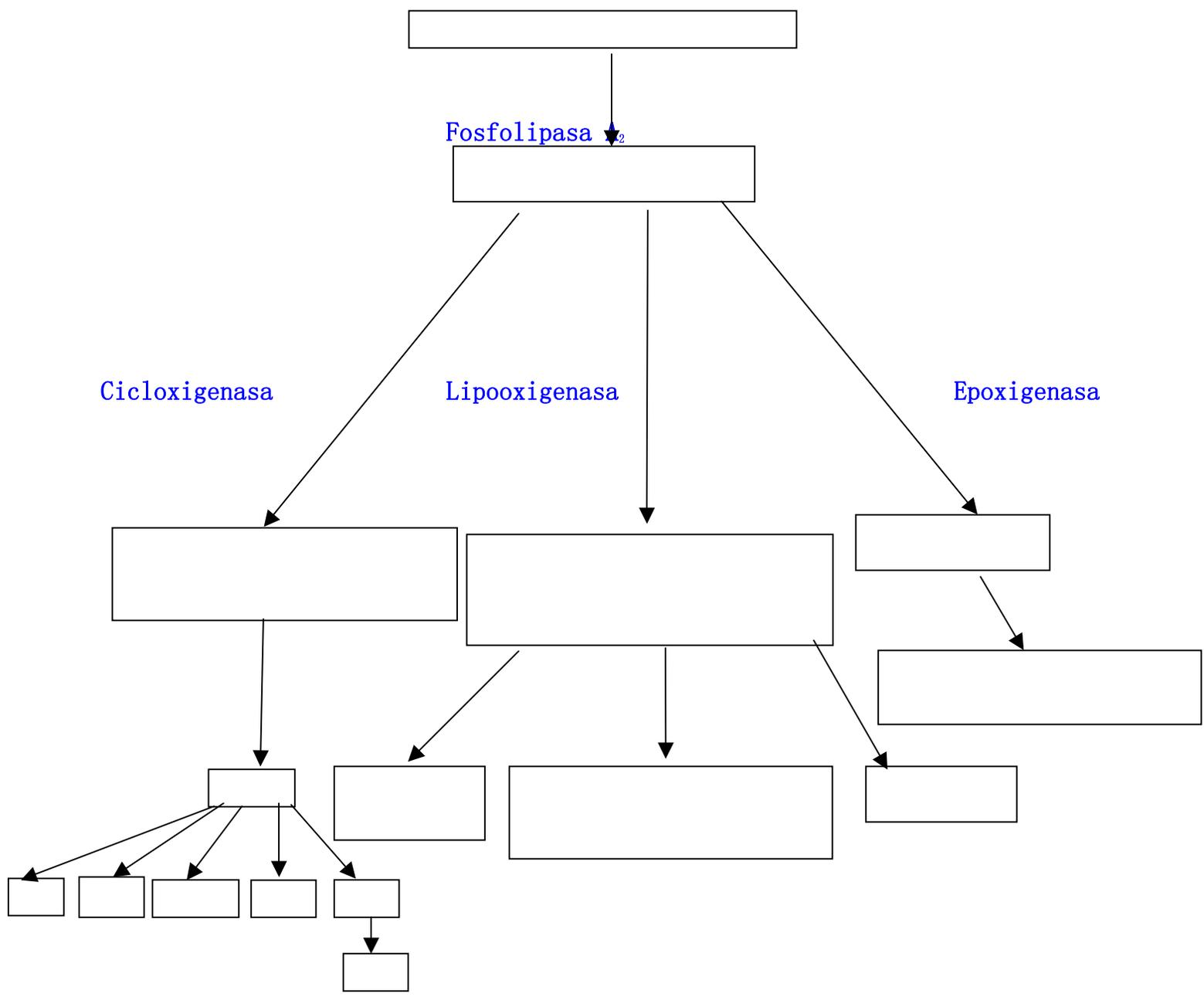
6.10 Los antiinflamatorios no esteroideos (AINEs).

Son ácidos orgánicos débiles que inhiben la biosíntesis de las prostaglandinas e inhiben la inflamación. También pueden disminuir la producción de radicales libres y superóxido e interactuar con la adenilciclasa para alterar la concentración celular de AMPc. Algunos de ellos inhiben las moléculas de adhesión celular de neutrófilos y de las células endoteliales. Comprenden cerca de 50 fármacos analgésicos, antipiréticos y antiinflamatorios no esteroideos que se clasifican según su composición química (ver cuadro). La aspirina, el ibuprofeno y la indometacina son el estándar común, contra el cual se comparan otros AINEs (Katzung 1999).

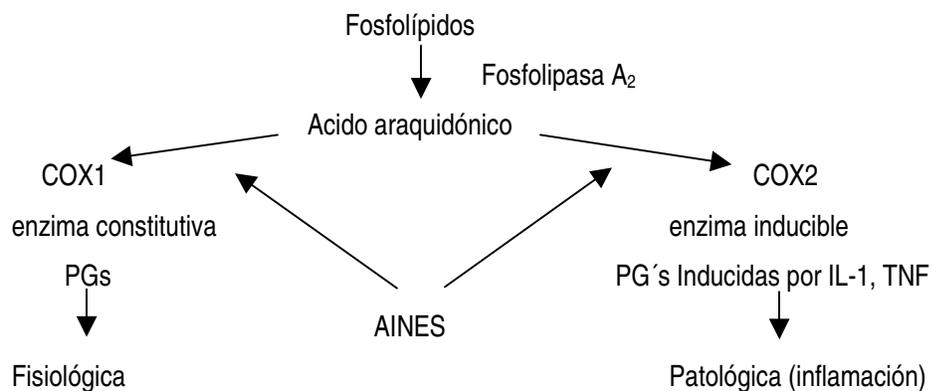
Clasificación química de analgésicos, antipiréticos y antiinflamatorios no esteroidales

| Grupo | Fármacos |
|---|---|
| Derivados del ácido salicílico | Aspirina, salicilato sódico, trisalicilato colina magnesio, sasalato, diflunisal, ácido salicilsalicílico, olsalacina |
| Derivados del paraminofenol | Acetaminofén |
| Derivados del ácido pirano- carboxílico | Etodolaco |
| Derivados del ácido flufenámico | Etofenamato |
| Derivados del ácido aril- alcanóicos | Ácido tiaprofénico |
| Indol y ácidos indenacéticos | Indomatacina, sulindac |
| Ácidos heteroaril acéticos | Tolmetin, diclofenaco, ketorolaco, sulindaco |
| Ácidos arilpropionícos | Ibuprofeno, naproxeno, flurbiprofeno, ketoprofeno, fenoprofeno, oxaprozin, loxoprofeno |
| Ácidos antranílicos Fenamatos | Ácido mefenámico, ácido meclofenámico |
| Ácidos enólicos | Oxicams, (piroxicam, tenoxicam), pirazolidonas (fenibutazona, oxifentarazona) meloxicam |
| Alcanonas | Nabumetona |
| Furaronas con sustitución de dialil | Rofecoxib |
| Pirazoles con sustitución de dialil | Celecoxib |
| Ácidos indolacéticos | Etodolac |
| Sulfonanilidas | Nimesulide |

Cuando una célula es lesionada, por ejemplo por un estímulo físico como puede ser la fuerza ortodóncica, se activa la enzima fosfolipasa A que transforma los fosfolípidos de membrana en ácido araquidónico, que a su vez es metabolizado por una serie de enzimas que en conjunto se denominan "vía de la ciclooxigenasa", que da como resultado endoperóxidos cíclicos que pueden ser transformados en tromboxano o en prostaglandinas (ver cuadro)



En 1971 Vane utilizó ácido araquidónico marcado radioactivamente para demostrar que la aspirina y otros AINEs bloqueaban la síntesis de prostaglandinas y tromboxanos al inhibir la ciclooxigenasa, proponiendo que los efectos antipiréticos, analgésicos, anticoagulantes y antiinflamatorios de los AINEs se debían a su capacidad de bloquear la ciclooxigenasa. Sin embargo, la acción antiinflamatoria no podía ser explicada completamente sólo con base en la inhibición de la síntesis de las PGs ya que el salicilato de sodio que tiene acción antiinflamatoria no inhibe la síntesis de PG y las dosis antiálgicas y anticoagulantes de la aspirina son mucho más bajas que las dosis antiinflamatorias de este fármaco. Actualmente se sabe que existen dos formas de la ciclooxigenasa, lo que permitió interpretar estas diferencias. La COX1 es expresada constitutivamente y ejerce su acción enzimática en diversos órganos, incluyendo el estómago, los intestinos y los riñones, así como en las plaquetas. Existen pruebas que sugieren que la COX1 origina funciones normales mediadas por PG's, como la citoprotección gástrica y la agregación plaquetaria e interviene en la función renal. La COX2 es inducida por diversos agentes. Su expresión constitutiva se ha detectado sólo en un número limitado de tejidos que incluyen el cerebro y los riñones (glomérulos y vasos renales) y se ha comprobado que es la isoforma de la enzima que es inducida por los estímulos proinflamatorios. Basándose en los patrones de expresión y localización, se ha propuesto que la COX2 es la causa primaria de la síntesis de prostanoideos mediadores del dolor, la inflamación y la fiebre, tiene características de enzima inducible en otras células bajo circunstancias patológicas por la intervención de diversas citocinas y por mediadores de la inflamación. (Feng y Col, 1993)



Clasificación química de analgésicos, antipiréticos y antiinflamatorios no esteroideos.

| Inhibidores no selectivos de COX | Inhibidores selectivos de COX2 |
|--|--|
| Derivados del ácido salicílico Aspirina, salicilato de sodio, trisalicilato de magnesio y colina, salsalato, diflunisal, sulfasalazina, oslalazina. | Furanonas con sustitución de diaril Rofecoxib |
| Derivados del paraaminofenol Acetaminofén | Pirazoles con sustitución de diaril Celecoxib |
| Indol y ácidos indenacéticos Indometacina, sulindac | Acidos indolacéticos Etodolac |
| Acidos heteroarilacéticos Tolmetín, diclofenaco, ketorolaco | Sulfonanilidas Nimesulide |
| Acidos arilpropionicos Ibuprofeno, naproxeno, flurbiprofeno, ketoprofeno, fenoprofeno, oxaprozina | |
| Acidos antranílicos (fenamatos) Acido mefenámico, ácido meclofenámico | |
| Acidos enólicos Oxicam (piroxicam, meloxicam) | |
| Alcanonas Nabunetona | |

Otro mecanismo propuesto para explicar el efecto antiinflamatorio de los AINEs es que inhiben la expresión de moléculas de adhesión. Durante la respuesta inflamatoria la expresión de estas moléculas tanto en células endoteliales como en leucocitos, es necesaria para que se realice la quimiotaxis que conduce a la acumulación de células características del infiltrado inflamatorio en el sitio lesionado.

Los AINEs y las PGs no siempre tienen efectos antagónicos, en algunos casos hay evidencias de que tienen acciones sinérgicas. En animales experimentales las PGs pueden disminuir la inflamación cutánea y en articulaciones dependiendo de la dosis. Las PGs inhiben la activación de neutrófilos y macrófagos. El piroxicam, potencializa la capacidad de la PGE de disminuir la interacción del radical superóxido en neutrófilos activados. Los AINEs y PGs tienen el mismo efecto sobre la síntesis de AMPc y la liberación de Ca^{++} intracelular. Algunos AINEs como el meclofenamato inhiben las funciones de los neutrófilos inducidos por el quimiotáctico $C5a$ sin afectar el enlace de esta sustancia con la membrana plasmática de los mismos. De la misma forma pueden inhibir la respuesta de los neutrófilos al factor de activación plaquetaria y los

leucotrienos. Los AINEs también participan en la regulación, inactivación o barrido de las especies tóxicas de oxígeno (radicales de oxígeno libre), por ejemplo el piroxicam bloquea la generación de anión superóxido de neutrófilos expuestos a diversos quimiotácticos (Weissmann, 1991), mientras que el ibuprofeno reduce la producción de H_2O_2 en monocitos estimulados con acetato miristato de phorbol (Zapolska-Downar y col. 2000). La aspirina es capaz de captar radicales hidroxil ($*OH$) de manera más rápida que otros antioxidantes como el ascorbato, el glutatión y la cisteína, aunque no es buen captador de O_2 o H_2O_2 (Shi y col, 1999).

6.11 Los AINEs Diclofenaco y Nimesulide.

El Diclofenaco es un potente, inhibidor de la COX1 y COX2, y la consecuente reducción de PGs como la PGF_2 y la PGE_2 , así como tromboxano TXB, Ku.E.C. y col. (1986), agregan que disminuye la producción de leucotrienos, estimulando la reincorporación del ácido araquidónico libre a triglicéridos. Díaz González y col. (1995) aseguran que inhibe la expresión de moléculas de adhesión en leucocitos, y Halliwell y col. (1991) indican que inhibe la liberación de radicales libres oxigenados que participan en el daño tisular.

Inhibe la migración leucocitaria, la actividad de la catepsina B1 disminuyendo la degradación del cartílago articular. Es un potente analgésico y antiinflamatorio, 100 a 200 veces más potente que la aspirina, pero tiene poco efecto antipirético. También reduce la percepción sensorial. La dosis analgésica es de 0.1 a 0.3 mg/Kg (Hernández, 1996). Puede administrarse intramuscularmente, esto implica una analgesia postoperatoria prolongada (Wilder- Smith, 2003).

El **nimesulide** tiene propiedades analgésicas y antipiréticas. Químicamente es un análogo del grupo de las sulfonamidas. Su acción deriva de poseer un radical ácido metanosulfonilídico. Es un inhibidor débil de COX2 por lo tanto de la biosíntesis de PGs mediadoras de la inflamación. (Barnett, 1994) Inhibe los radicales superóxido producidos por neutrófilos y macrófagos presentes en la oxidación del ácido araquidónico. Actúa como factor protector de la α -1 antitripsina. Esta enzima inhibe la actividad proteolítica de la elastasa de los neutrófilos e inhibe la liberación de histamina de los basófilos y los mastocitos, así como el factor necrótico tisular α (TNF α). Bloquea las dos vías de activación del complemento C3. Reduce la disponibilidad del ácido hipocloroso e inhibe la liberación de enzimas lisosomales.

6.12 Moléculas de adhesión celular.

Las células se adhieren entre sí y a la matriz extracelular mediante proteínas transmembranales denominadas Moléculas de Adhesión Celular, mediante uniones homofílicas y heterofílicas.

Hay cuatro tipos de moléculas de adhesión celular: la superfamilia de las caderinas, la de las selectinas, las integrinas (las tres dependientes de calcio) y las moléculas de adhesión independientes de calcio, miembros de la superfamilia de las inmunoglobulinas. Existen también moléculas de adhesión en la matriz extracelular como la fibronectina, la laminina y el colágeno.

Las moléculas de adhesión están involucradas en la embriogénesis, la respuesta inflamatoria, la reparación tisular, la diferenciación, la comunicación y la movilización celular. Actúan uniéndose a ligandos específicos de otras células o de la matriz extracelular, facilitando las interacciones y las migraciones celulares. También pueden trasducir señales reguladoras de la transcripción luego de la interacción con sus ligandos.

Las caderinas son glucoproteínas transmembranales muy importantes en la adhesión intercelular. La mayoría de los miembros de esta superfamilia están formados por 700 a 750 aminoácidos que se asocian formando dímeros u oligómeros cuya porción larga extracelular consiste en 5 o 6 unidades repetidas relacionadas con dominios de la inmunoglobulina Ig, con calcio unido entre cada par de las unidades repetidas.

Las selectinas contienen un dominio de lectina, éstas son proteínas que se combinan rápidamente con carbohidratos en forma selectiva y reversible. Son dependientes de calcio y tienen gran importancia en la adhesión de los leucocitos al endotelio, durante su migración fuera de los vasos sanguíneos y durante la circulación y recirculación linfocitaria.

La adhesividad de los microorganismos patógenos a un tejido en especial se debe a que los microorganismos también poseen lectinas que se unen en forma selectiva a determinados tejidos.

Las selectinas tienen tres dominios funcionales: uno de anclaje que las fija a la membrana plasmática, otro que forma la mayor parte de la molécula y otro extracelular que es la lectina que une selectivamente a los carbohidratos. El dominio intracelular sirve para trasducir señales reguladoras que afectan la función de las integrinas y la producción de citocinas.

Familia de las selectinas

| Tipo de Selectina | Nombre alterno | Distribución | Contra receptor | Regulación |
|----------------------|----------------------------|--|--|--|
| E-selectina (CD62-E) | ELAM-1 | Endotelio activado | Sialil Lewis X (CD15s) Sialil Lewis A, L-selectina LFA-1, CD66, ESL-1 CLA (antígeno cutáneo leucocitario) | Expresión aumentada por IL-1, TNF-a,, IFN-g, IL-4, sustancia P, LPS |
| L-selectina (CD63-L) | LECAM-1, Leu-8 Mel-14Ag | Leucocitos en reposo | E-selectina, P-selectina GlyCAM (PNAd), CD34 MAdCAM-1, PSGL-1 Sialil Lewis X | Se aumenta rápidamente luego de la activación, para luego ser liberada por clivaje |
| P-selectina (CD62-P) | GMP-140, PADGEM) | Plaquetas activadas, endotelio activado | Sialil Lewis X (CD15s) Lewis X (CD15), PSGL-1 L-selectina, PNAd | Expresión aumentada por trombina, histamina, PAF, C5a, LPS, ROIs |

La familia de **las integrinas** están formadas por glucoproteínas heterodiméricas de membrana (cadenas a y b); se han caracterizado muchas subunidades que se unen por enlace no covalentes formado más de 20 combinaciones diferentes. Se clasifican de acuerdo a sus cadenas b.

Las interacciones con sus ligandos son dependientes de cationes divalentes: calcio para los b1 integrinas y magnesio para los b 2.

Su nombre deriva de su función de interacción a nivel intercelular con proteínas del citoesqueleto para integrar la información del medio extracelular con la actividad de la célula.

Familia de las integrinas

| Tipo de Integrinas | Nombre alternativo | Subunidades | Distribución tisular | Contra-receptor | Regulación |
|---------------------------|--|-------------|---|---|---|
| b1 (CD29) VLA-1 | CD49a/CD29 | a1b1 | Linfoc. T activados, fibroblastos, sinusoides hepáticos, mesangio | Laminina, Colágeno | Los antígenos y mitógenos elevan la expresión |
| VLA-2 | CD49b/CD29, ECMRII | a2b1 | Linfoc. T activados, endotelio, plaquetas, basófilos Glomérulo, Tiroides, membrana basal | Laminina, Colágeno Tenascina Laminina, Colágeno, fibronectina, Epiligrina | Los antígenos y mitógenos elevan la expresión |
| VLA-3 | CD49c/CD29, ECMRI | a3b1 | Linfocitos, monocitos, eosinófilos, basófilos, mastocitos, NK | | Los antígenos y mitógenos elevan su expresión y actividad |
| VLA-4 | CD49d/CD29, LPAM-1 | a4b1 | Linfocitos, monocitos, endotelio, basófilos, mastocitos, fibroblastos | Fibronectina, VCAM-1 | Los antígenos elevan su actividad |
| VLA-5 | CD49e/CD29, ECMRVI, Receptor de fibronectina | a5b1 | Plaquetas, Linfoc. T, eosinófilos | Fibronectina | Los antígenos elevan su actividad |
| VLA-6 | CD49f/CD29 | a6b1 | Plaquetas, linfocitos B | Laminina | |
| — | CD51/CD29 | aVb1 | Queratinocitos, músculo hepatocitos, epitelio respiratorio | Fibronectina, vitronectina | — |
| — | — | a9b1 | | Tenascina | — |
| b2 (CD18) | Integrinas leucocitarias | | | | |
| LFA-1 | CD11a/CD18 | aLb2 | Todos los leucocitos | ICAM-1, 2 y 3 E-selectina | PAF, IL-3, 5, 6 GM-CSF |
| MAC-1 | CD11b/CD18, CR3 | aMb2 | Monocitos, granulocitos, linf. grandes granulares | C3bi, ICAM-1, CD23 Factor X, fibrinógeno | PAF, IL-3, 5, 6 GM-CSF, LTB4 |
| p150,95 | CD11c/CD18, CR4 | aXb2 | Monocitos, granulocitos, linf. grandes granulares, plaquetas y algunos Linf. B | C3bi, fibrinógeno, CD23 | PAF, IL-3, 5, 6 GM-CSF, LTB4 |
| — | aD/CD18 | aDb2 | Macrófagos tisulares | ICAM-3 | Constitutiva |
| | Citoadhesinas | a11b3 | Plaquetas, endotelio | Fibronectina, Factor von Willebrand, fibrinógeno, vitronectina | Expresión elevada por múltiples estímulos |

| | | | | | |
|--|-------------|------|---|---|---|
| | CD41/CD61 | aVb3 | Endotelio, plaquetas, céls. mesenquimales | Vitronectina, CD31, fibrinógeno, Factor von Willebrand, trombospondina, laminina, tenascina | Expresión elevada por múltiples estímulos |
| | CD51/CD61 | a6b4 | Células endoteliales y epiteliales | Laminina, Epiigrina | --- |
| | CD49f/CD104 | a4b7 | Algunos Linf. T de memoria, eosinófilos, basófilos, endotelio | MadCAM-1, VCAM-1, fibronectina | --- |
| | CD49d/b7 | aEb7 | | E-cadherina | Expresión elevada |
| | CD103/b7 | | Linf. Intestinales intraepiteliales, linf. T pulmonares | | por TGF- β . Disminuida por TNF- α , IFN- γ , IL-1 |
| | CD51/CD - | aVb5 | Céls. Carcinoma | Vitronectina, fibronectina | --- |
| | --- | aVbs | Céls. carcinoma | Péptidos RDG | --- |

La superfamilia de **las inmunoglobulinas** comprende aquellas proteínas que tienen uno o más dominios extracelulares homólogos a las inmunoglobulinas.

Se subdividen en dos tipos: los C1, involucrados en el reconocimiento de los antígenos y los tipo C2 que son las proteínas de adhesión celular y las fijadoras del complemento.

Las tipo C2 poseen un número variable de dominios extracelulares homólogos de las inmunoglobulinas, con secuencias de cisteína conservadas que forman puentes disulfuro para estabilizar la estructura terciaria de la molécula.

La expresión de varias de las proteínas de adhesión celular tipo C2 está regulada positivamente por varias citocinas, aumentando la unión de los leucocitos al endotelio durante los procesos inflamatorios. Esa adhesión fuerte se realiza por la interacción de las moléculas tipo C2 con las integrinas b1, b2 y b7 expresadas en los leucocitos.

ICAM-1, también llamada CD54 posee cinco dominios extracelulares tipo Ig capaz de ligar a contrarreceptores LFA-1 de la familia de las integrinas: es el principal ligando endotelial de las b integrinas.

Se expresa en forma constitutiva en endotelio vascular, en el epitelio tímico, fibroblastos, en macrófagos, en leucocitos incluyendo linfocitos T, y puede ser "up- regulada" en endotelio y fibroblastos por la presencia de

IL1, TNF α e IFN gamma, por lo que participa en la adhesión firme de los leucocitos al endotelio, la migración transendotelial y en la activación de linfocitos T.

Superfamilia de las inmunoglobulinas

| Nombre | Nombre alternativo | Distribución | Contra receptor | Regulación |
|---------------------|--------------------|---|--|---|
| ICAM-1 | CD54 | Endotelio, fibroblastos epitelio, monocitos linfocitos, cél. dendríticas condrocitos | LFA-1, Mac-1 CD43 (leucosialina) | Expresión constitutiva; aumenta por IL-1, TNF- α IFN-g, LPS. Disminuye por IL-6 |
| ICAM-2 | CD102 | Endotelio, linfocitos monocitos, plaquetas | LFA-1 | Expresión constitutiva |
| ICAM-3/ICAM-R | CD50 | Linfocitos, monocitos polimorfonucleares | LFA-1, aD/CD18 | Aumenta la expresión con la activación |
| VCAM-1 | CD106 | Endotelio, monocitos células dendríticas fibroblastos, estroma médula ósea | VLA-4, a4b7, LPAM-1 | Aumenta la expresión por IL-1, TNF- α , IL-4 IL-13, LPS |
| LFA-2 | CD2 | Linfocitos T, NK | LFA-3, CD59, CD48 | Expresión constitutiva |
| LFA-3 | CD58 | Endotelio, Leucocitos células epiteliales | LFA-2 | — |
| PECAM-1, EndoCAM | CD31 | Endotelio, plaquetas leucocitos, músculo | CD31, Heparina, aVb3 | Tiene formas muy polimórficas |
| MadCAM-1 | — | Endotelio de mucosas, vénulas de lámina propia y placas de Peyer, bazo | LPAM-1 (a4b7) L-selectina | expresión aumentada por IL-1, TNF- α , IFN-g |
| NCAM | — | Céls. Neurales, gliales corazón, músculo, riñón NK, algunos T activados | NCAM, heparán sulfato heparina, aVb3 | — |

6.13 Moléculas de adhesión en osteoclasto.

Taşman y col (1999) estudiaron las moléculas de adhesión celular con técnicas inmunohistoquímicas en pulpas dentales de dientes sanos y en dientes con enfermedad periodontal, encontraron que las moléculas de adhesión celular presentes son las selectinas, que participan en la actividad de rodamiento (rolling) y adhesión de los leucocitos sobre las células endoteliales; las de la superfamilia de las inmunoglobulinas que son las moléculas de adhesión intercelular como ICAM-1, y las que contribuyen en la adhesión al endotelio como VCAM-1 que participan en la adhesión y la activación de los leucocitos. Existen además moléculas de adhesión de plaquetas a los vasos sanguíneos (integrina B₁ y PECAM-1) necesarias para la diapedesis, así como las endoglinas y la MUC-18, cuya función es desconocida. Ellos encontraron que las selectinas, VCAM-1, ICAM-1 e ICAM-2 se expresan más durante el proceso inflamatorio que en las pulpas normales.

Los preosteoclastos presentan en su superficie ICAM-1, por lo que los antiinflamatorios no esteroideos pueden influir en la formación de osteoclastos, La expresión de ICAM-1 en el modelo de artritis inducida por adyuvante de Freund no es inhibida por el naproxeno (Wilson y col, 1998). Como ya de dijo, el diclofenaco es capaz de inhibir la expresión de moléculas de adhesión ICAM-1 y la molécula de adhesión vascular 1 (VCAM-1) en el modelo de células endoteliales de vénulas de cordón umbilical humano estimuladas por lipopolisacárido, mientras que otros AINEs como el ketoprofen, la fenilbutazona, la indometacina, el ibuprofeno y la aspirina no tuvieron este efecto inhibitor (Sakai A, 1996).

La molécula de VCAM-1 expresada en los osteoblastos participa en la interacción entre osteoblastos y las células del linaje osteoclástico en el proceso de diferenciación de los osteoclastos (Feuerbach y Feyen, 1996). Karachi y col 1993 reportan la participación de la molécula ICAM-1 en el proceso de formación de osteoclastos. Harada (1998) demostró con inmunofluorescencia que en la superficie de las células del linaje osteoclástico además de ICAM-1 también se expresa como molécula de superficie el antígeno 1 función-asociado de linfocitos LFA-1.

Las caderinas se expresan en diferentes células expresándose también en los osteoclastos. Mbalaviele y col (1995) demuestran la participación de la E-cadherina en este proceso de fusión. La E-cadherina se expresa en la zona del sellado entre el osteoclasto y la zona de reabsorción. La incorporación de un péptido que contiene las secuencias de reconocimiento de adhesión celular de la E-cadherina al medio en donde se cultivan osteoclastos, inhibe la resorción ósea expresada como zonas de reabsorción (Ilversaro y col, 1998). Se han realizado estudios para analizar el efecto de los AINEs en la resorción ósea. Se ha estudiado la Indometacina (Yamasaki 1980, Chambers 1983, Kehoe 1996), Acetaminofen (Kehoe 1996, Franchi 1998) e Ibuprofeno (Kehoe 1996).

Estos estudios cuantifican la población de osteoclastos o el movimiento dentario y se fundamentan en la función de la PGE2 en la activación de los osteoclastos.

Recientemente Márquez Sánchez y Gómez Clavel(2002), Domínguez Benavides y Gómez Clavel (2003) probaron que los AINEs diclofenaco y nimesulide disminuyen significativamente la población de osteoclastos en el hueso alveolar de los molares sometidos a estrés mecánico ortodóncico. No se sabe si en este fenómeno influye la inhibición que puedan causar estos fármacos de las ICAM-1 necesarias para la fusión de los preosteoclastos y la adhesión de los osteoclastos a la superficie.

Premisas:

1. Las PGs disparan la resorción ósea durante el proceso de resorción ósea inducido por el estrés mecánico ortodóncico.
2. Los AINEs Diclofenaco y Nimesulide inhiben las PGs.
3. Las ICAM-1 son importantes en el proceso de diferenciación de los osteoclastos.
4. El Diclofenaco inhibe la expresión de ICAM-1 y Nimesulide no la inhibe.

7. HIPOTESIS

Si se trata a dos grupos de animales experimentales sometidos a estrés mecánico ortodóncico, uno con diclofenaco y otro con nimesulide, en los tratados con diclofenaco se encontrará disminuido el número de células que expresan ICAM-1 en la zona de presión del hueso.

8. METODOLOGIA DE LA INVESTIGACION

Investigación experimental

9. MATERIAL Y METODOS

Se trabajo con un universo de 50 ratas Wistar machos, para eliminar la variabilidad hormonal que se presenta en las hembras debida a los ciclos reproductivos, (Storey E. 1955) de 250 gr \pm 25 gr de peso. Mantenido en el Bioterio de la FES Iztacala. Con temperatura de 21^o a 27^o C y humedad de 45 a 55% en fotoperíodo de 12/12 horas. Alimentadas *ad libitum*.

Se dividieron en 3 grupos al azar de 15 ratas cada uno y un grupo de 5 ratas.

Dos de ellos fueron tratados con medicamento, diclofenaco en dosis de 2 mg/Kg, vía subcutánea cada 12 horas o nimesulide en dosis de .08 ml = 1 mg, vía oral cada 12 horas, una hora antes de colocarles el aparato ortodóncico. Al tercer conjunto de ratas se les administró solución salina cada 12 horas previa colocación del aparato ortodóncico. Al último grupo no se le administró nada y no se le puso el aparato.

Se distribuyeron en los siguientes grupos.

Grupos Experimentales (E)

Ratas tratadas con Diclofenaco(ED)

5 maxilares a nivel del 1er molar a las 24 horas de tratamiento. (ED1)

5 maxilares a nivel del 1er molar a las 48 horas de tratamiento. (ED2)

5 maxilares a nivel del 1er molar a las 72 horas de tratamiento. (ED3)

Ratas tratadas con Nimesulide(EN)

5 maxilares a nivel del 1er molar a las 24 horas de tratamiento. (EN1)

5 maxilares a nivel del 1er molar a las 48 horas de tratamiento. (EN2)

5 maxilares a nivel del 1er molar a las 72 horas de tratamiento. (EN3)

Grupos Testigos (T)

Ratas tratadas con solución salina con estrés mecánico(TM)

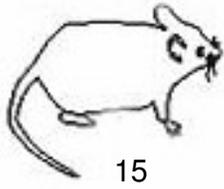
5 maxilares a nivel del 1er molar a las 24 horas de tratamiento. (TM1)

5 maxilares a nivel del 1er molar a las 48 horas de tratamiento. (TM2)

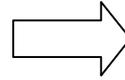
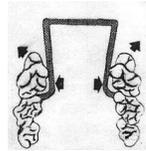
5 maxilares a nivel del 1er molar a las 72 horas de tratamiento. (TM3)

Ratas sin tratamiento y sin estrés mecánico (T0)

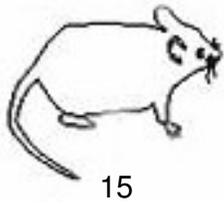
5 maxilares a nivel del 1er molar.(T0)



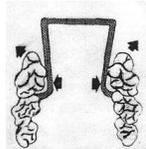
ED
Diclofenaco



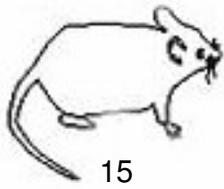
-5 → 24 h.
-5 → 48 h.
-5 → 72 h.
→



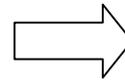
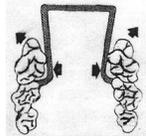
EN
Nimesulide



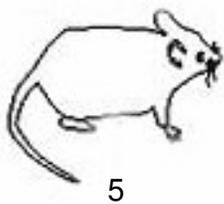
-5 → 24 h.
-5 → 48 h.
-5 → 72 h.
→



T
Sol. Salina



-5 → 24 h.
-5 → 48 h.
-5 → 72 h.
→



T0



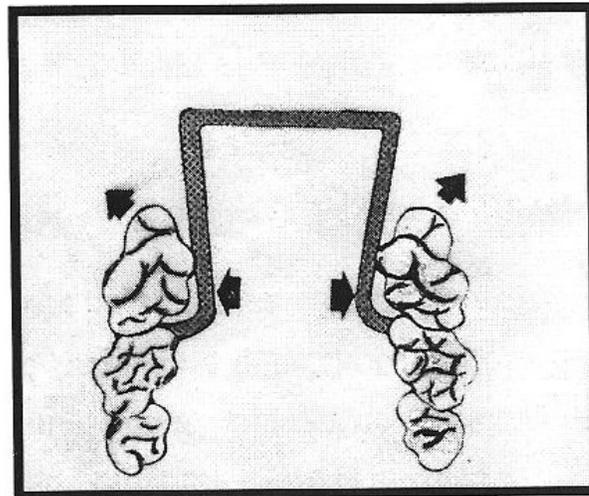
-5 → 0 h

50

Procedimientos ortodóncicos.

Los animales de anestesiaron con pentobarbital sódico (Anestesa) diluido vía peritoneal (1.5 ml por Kg de peso), se les colocó un aparato ortodóncico (resorte de expansión) elaborado de alambre Ni-Ti de .012 de grosor y activado con una fuerza de 10g, entre los primeros y segundos molares maxilares de acuerdo a la técnica descrita por Igarashi y col, 1998.

RESORTE EN FORMA DE “U”



El aparato ortodóncico colocado entre los primeros y segundos molares maxilares derechos e izquierdos. Las flechas señalan la dirección del movimiento.(Igarashi y col, 1998).

Todos los animales fueron sacrificados previa sedación y decapitación a las 24, 48 y 72 horas después de la colocación de los aparatos ortodóncicos.

Una vez sacrificados los animales se les disecó el maxilar superior y se fijaron en paraformaldehído en buffer de fosfatos durante 48 hrs., posteriormente se descalcificó con ácido etilendiaminotetracético (EDTA) a pH 7.4 durante 28 días o hasta que radiográficamente se observó la completa descalcificación.

A todos los maxilares se les deshidrató en alcoholes crecientes para incluirse en parafina y obtener cortes seriados de 6 μ m que fueron teñidos con hematoxilina y eosina y con tinción de TRAP para la identificación de los osteoclastos.

La observación histológica se enfocó al septum intrarradicular de las raíces vestibulares de los primeros molares, con el propósito de contar células TRAP positivas o ICAM-1 positivas en un área de 400 por 800 micras de cada cinco cortes de intervalo de los molares seleccionados. El conteo se realizó con un microscopio óptico marca Nikon, modelo Eclipse E400

Tinción con Hematoxilina y Eosina

Previamente se colocan los portaobjetos con los cortes en el horno a 57^o C aproximadamente. Por espacio de 12 horas mínimo.

Se sumergen los cortes en las canastillas de tinción en el siguiente orden:

*De entrada

Xilol I por 10 min. Para comenzar a desparafinar.

Xilol II por 15 min.

Alcohol a 100% por 5-10 min.

Alcohol a 96% por 3-5 min.

Alcohol a 90% por 3-5 min.

Alcohol a 80% por 3-5 min.

Alcohol a 70% por 3-5 min.

Agua por 3-5 min.

*Tinción

Hematoxilina por 7-15 min.
Alcohol ácido por 10 seg.
Agua amoniacal por 10-15 seg.
Eosina por 3 min.

*De salida

Alcohol a 80% por 15 seg.
Alcohol a 90% por 15 seg.
Alcohol a 96% por 15 seg.
Alcohol a 100% por 15 seg.
Xilol I por 3 min.
Xilol II por 15 seg.

Se limpia el portaobjeto con una gasa, se coloca una gota de resina en el corte y se coloca el cubreobjetos evitando burbujas de aire.

Procedimientos para la tinción de TRAP

La actividad de la fosfatasa ácida resistente a tartrato se demuestra usando naftol de ASTR- fosfato (en N,N-dimetil formamida) como sustrato y clorhidrato de pararosanilina como agente acoplante en L(+) ácido tartárico a 37° C por 30 minutos. La actividad de TRAP produce como producto una coloración roja. La especificidad se verifica con el uso de controles negativos.

Se hidrataron los tejidos:

Xilol I por 10 min. Para comenzar a desparafinar.
Xilol II por 15 min.
Alcohol a 100% por 5-10 min.
Alcohol a 96% por 3-5 min.
Alcohol a 90% por 3-5 min.
Alcohol a 80% por 3-5 min.
Alcohol a 70% por 3-5 min.
Agua por 3-5 min.

Procedimiento para la fijación:

1. Etiquetar 2 vasos de precipitado (A y B)
2. Realizar la preparación de la solución A:
 - a. 23 ml de agua a 37° C
 - b. 1 ml de solución de acetato
 - c. 1 ml de solución de naphthol con ácido fosfórico
3. Realizar la preparación de la solución B:
 - a. 22 ml de agua a 37° C
 - b. 1 ml de solución de acetato
 - c. 1 ml de solución de naphthol con ácido fosfórico
 - d. 1 ml de tartrato
4. A la solución A y B se les agrega a cada una la mitad del contenido de una cápsula de sal aceleradora (Fast Garnet GBC salt) y posteriormente se incorpora perfectamente con una mosca magnética entre 30-60 segundos.
5. Filtrar ambas soluciones
6. Ambas soluciones permanecen a 37° C, esto se corrobora con la ayuda de un termómetro antes de adicionar las soluciones a los portaobjetos
7. Incubar los portaobjetos con la solución A durante 13 minutos a 37° C en total oscuridad en cámara húmeda.
8. Posteriormente se enjuagan y se lavan con agua desionizada por 3 minutos
9. Se incuban los portaobjetos con la solución B durante 1 hora a 37° C en total oscuridad en cámara húmeda.
10. Lavar los portaobjetos con agua desionizada por 3 minutos y se dejaron secar al aire

11. Totalmente secos se observan las muestras microscópicamente usando aceite de inmersión. El fabricante recomienda que no se utilice un medio de montaje con solvente ya que causa desvanecimiento en las muestras es por esto que se utilizó glicerina para montar los portaobjetos

Inmunohistoquímica

El tejido fijado en paraformaldehído en buffer de fosfatos. Los cortes incluidos en parafina y montados en portaobjetos con polilisina se hidratarán:

| | |
|--------------|--------|
| Xilol I | 5 min. |
| Xilol II | 5 min. |
| Alcohol 100% | 3 min. |
| Alcohol 90% | 1 min. |
| Alcohol 80% | 1 min. |
| Alcohol 70% | 1 min. |
| Agua Mq | 5 min. |
| PBS1x | 1 min. |

Se seca por abajo del portaobjeto con papel y marca con sharpic la zona donde está el tejido.

***Recuperación antigénica**

Urea 6% acuosa 30 min. (preparada al momento) en cámara húmeda.

Lavar 3 veces con PBS 1x1 min. Cada uno.

Bloquear peroxidasa endógena: metanol 10ml+ 30 μ l H₂O₂ 30min. (0.03%) en cámara húmeda.

Lavar 3 veces con PBS 1x.

Bloquear con albumina de huevo al 50% por 30 min. En cámara húmeda.

PBS tritón 0.05% por 30 min.

Los cortes se incubaron en un anticuerpo de ratón contra ICAM-1. Anticuerpo biotilado (CD54 ICAM-1) 1:100 en PBS tritón al 0.05% 30min. En oscuridad y en cámara húmeda por 60 min (se prepara 200 a 300 μ l por laminilla).

Lavar con PBS tritón.

Lavar 3 veces con PBS 1x 1min. cada uno.

Anticuerpo IgA AP 1:100 en PBS tritón por 60 min. en oscuridad y en cámara húmeda.

Lavar con PBS tritón.

Lavar 3 veces con PBS 1x 1min. cada uno.

Poner sustrato de AP-1-Step NBT/BCIP 30 min. En cámara húmeda.

Se observa cuando cambia a coloración púrpura.

Lavar 3 veces con PBS 1x 1min. cada uno.

Contratinción con hematoxilina de Mayer 20 seg.

Agua Mq enjuagar.

Alcohol 70% 2min.

Alcohol 80% 2min.

Alcohol 90% 2min.

Alcohol 100% 2min.

Xilol I 5min.

Xilol II 5min.

Se monta en resina sintética. Se observan los cortes al microscopio y se toman fotografías. Se cuentan con el objeto de 40X las células que dan positivo a la reacción de la zona descrita a continuación.

10. VARIABLES

Variables dependientes

- Número de osteoclastos
- Número de células positivas para ICAM-1

Variables independientes

- Fármacos diclofenaco y nimesulide
- Tiempos de administración del fármaco: 24, 48, 72 hrs.
- Fuerzas mecánicas ortodóncicas

11. CONSIDERACIONES ÉTICAS

En la actual investigación:

- Se evitó el sufrimiento innecesario de los animales de experimentación
- Se realizó la colocación de los aparatos de ortodoncia bajo anestesia general
- Los animales se mantuvieron en condiciones de bioterio, con agua y alimento *ad libitum*
- Solo se utilizó una sola vez cada animal
- Se sacrificaron con sobredosis anestésica

12. RESULTADOS

Pruebas estadísticas aplicadas.

Se compararon los resultados de los diferentes grupos para encontrar diferencias estadísticas entre sus medias utilizando la prueba de ANOVA y ANOVA de dos sentidos, el análisis de correlación y la prueba de Tukey para encontrar las diferencias entre los grupos.

Población de osteoclastos

ANOVA

Hipótesis nula

La administración de los AINES diclofenaco y nimesulide no influye en la formación de osteoclastos durante el movimiento inducido por fuerzas ortodóncicas en el modelo de estudio

Hipótesis alterna

La administración de los AINES diclofenaco y nimesulide disminuyen la formación de osteoclastos durante el movimiento inducido por fuerzas ortodóncicas en el modelo de estudio

ANOVA

No. de osteoclastos

| | Sum of Squares | df | Mean Square | F | Sig. |
|----------------|----------------|----|-------------|---------|------|
| Between Groups | 796.930 | 8 | 99.616 | 153.201 | .000 |
| Within Groups | 23.408 | 36 | .650 | | |
| Total | 820.338 | 44 | | | |

La tabla de ANOVA presenta un valor de significancia ($p < 0.001$), por lo que rechazamos la hipótesis nula y aceptamos la hipótesis alterna: la administración de los AINES diclofenaco y nimesulide disminuyen la población de osteoclastos durante el movimiento inducido por fuerzas ortodóncicas en el modelo de estudio.

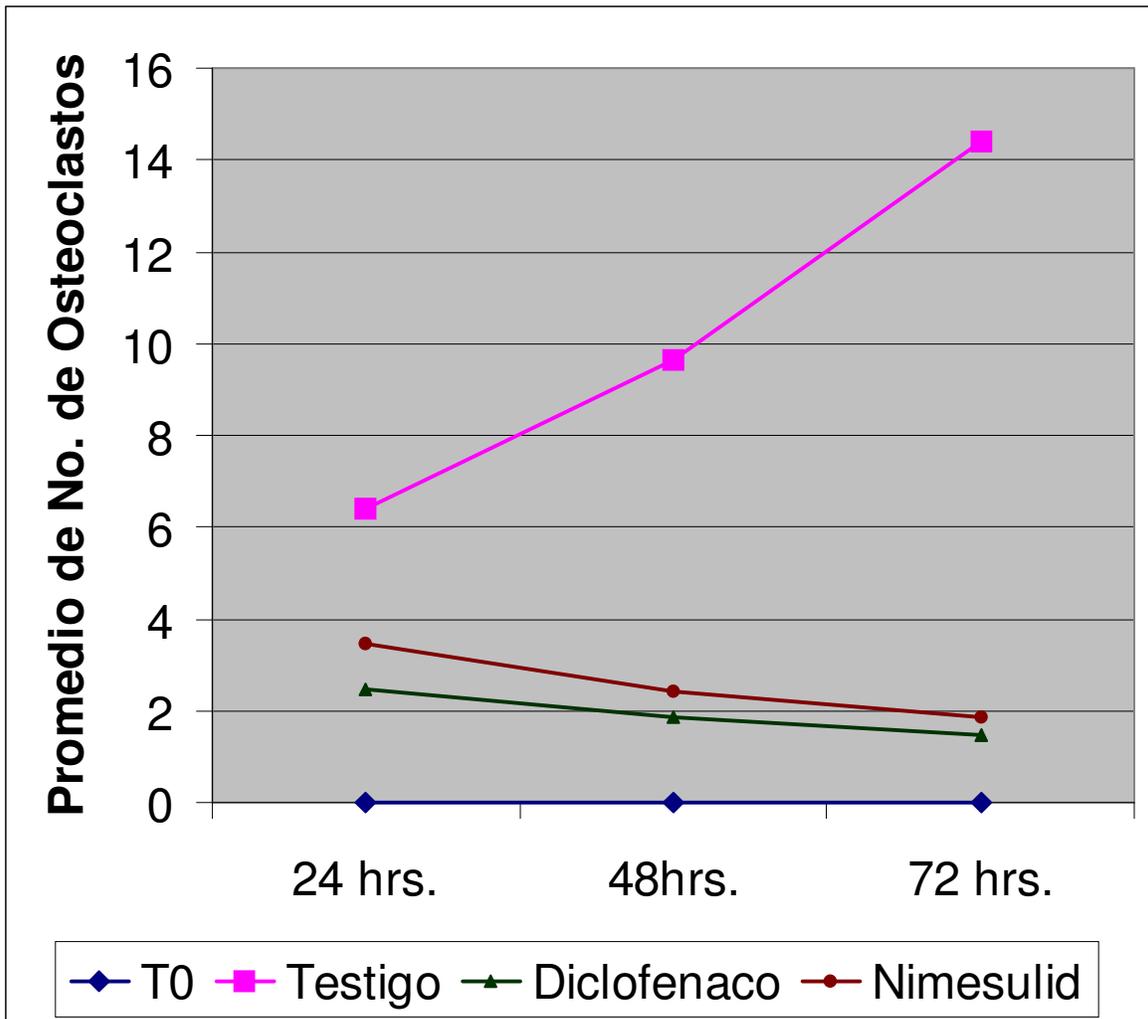
Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: No. de osteoclastos

| Source | Type III Sum of Squares | df | Mean Square | F | Sig. |
|-------------------|-------------------------|----|-------------|----------|------|
| Corrected Model | 796.930 ^a | 8 | 99.616 | 153.201 | .000 |
| Intercept | 1073.699 | 1 | 1073.699 | 1651.254 | .000 |
| tiempo * tratamie | 796.930 | 8 | 99.616 | 153.201 | .000 |
| Error | 23.408 | 36 | .650 | | |
| Total | 1894.037 | 45 | | | |
| Corrected Total | 820.338 | 44 | | | |

a. R Squared = .971 (Adjusted R Squared = .965)

La prueba de ANOVA de dos sentidos presenta un valor de significancia ($p < 0.001$),. En la que observamos significación en la relación tiempo-tratamiento. Lo que indica que la combinación tiempo y tratamiento tienen un efecto de interacción.



Grafica 1. Después de aplicar la fuerza ortodónica con resorte modelo en “U” entre los primeros y segundos molares superiores, observamos en el grupo experimental con nimesulide a las 24 hrs. un promedio de 3.44 osteoclastos por zona de observación. A las 48 hrs. un promedio de 2.42 osteoclastos y por último a las 72 hrs. un promedio de 1.84 osteoclastos. Estas diferencias no fueron significativas. En el grupo experimental con diclofenaco a las 24 hrs. un promedio de 2.47 osteoclastos por zona de observación. A las 48 hrs. un promedio de 1.88 osteoclastos. y por último a las 72 hrs. un promedio de 6.41 osteoclastos. Estas diferencias no fueron significativas. Observamos en el grupo testigo sin ningún tratamiento (T0) un promedio de 0 osteoclastos por zona de observación. En el grupo testigo al que sólo se le aplicó la fuerza mecánica (TM) a las 24 horas un promedio de 6.41 osteoclastos. A las 48 hrs. un promedio de 9.63 osteoclastos y por último a las 72 hrs. un promedio de 14.4 osteoclastos. Las diferencias de T0 con los demás testigos fue significativa. Las diferencias entre los grupos TM no fueron significativas.

En relación a la prueba de ANOVA de dos sentidos existe interacción entre el tratamiento con diclofenaco y nimesulide y el tiempo de tratamiento.

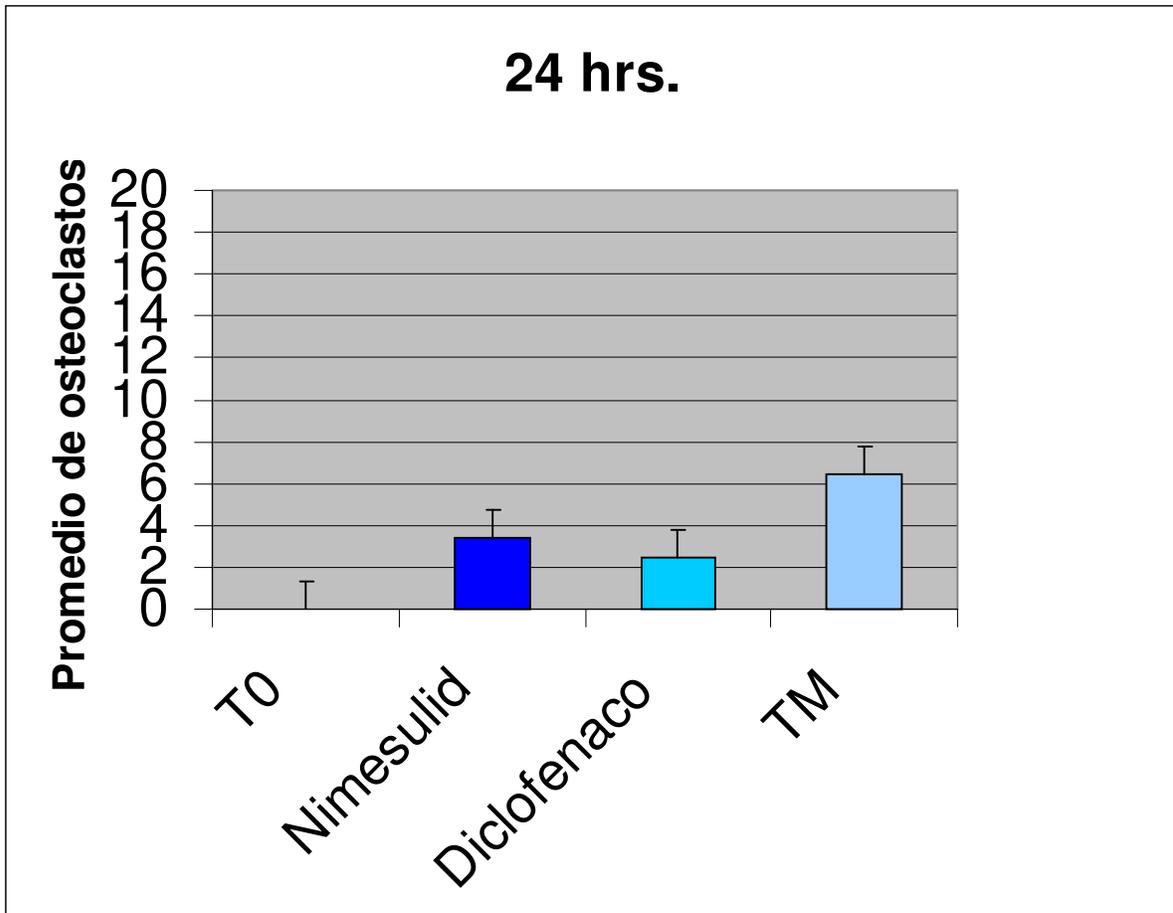
Multiple Comparisons

Dependent Variable: No. de osteoclastos
Tukey HSD

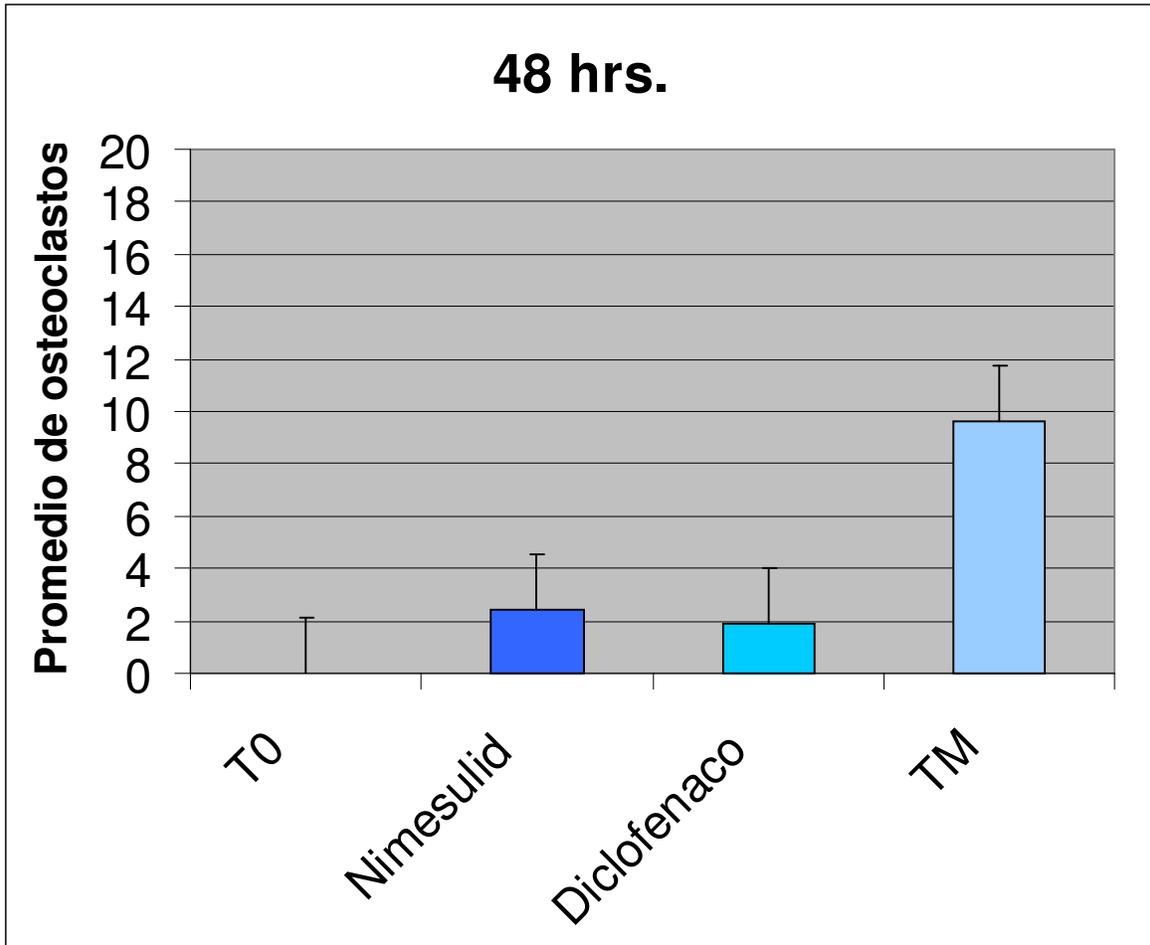
| (I) AINE | (J) AINE | Mean Difference (I-J) | Std. Error | Sig. | 95% Confidence Interval | |
|-----------------|-----------------|-----------------------|------------|-------|-------------------------|-------------|
| | | | | | Lower Bound | Upper Bound |
| Nimesulide/24 | Diclofenaco /24 | -.9740 | .5100 | .612 | -.7075 | 2.6555 |
| | Testigo/24 | -2.9660* | .5100 | .000 | -4.6475 | -1.2845 |
| | Nimesulide /48 | 1.0180 | .5100 | .556 | -.6635 | 2.6995 |
| | Diclofenaco/48 | 1.5640 | .5100 | .085 | -.1175 | 3.2455 |
| | Testigo/48 | -6.1880* | .5100 | .000 | -7.8695 | -4.5065 |
| | Nimesulide/72 | 1.6000 | .5100 | .073 | -8.1506E-02 | 3.2815 |
| | Diclofenaco/72 | 1.9880* | .5100 | .011 | .3065 | 3.6695 |
| | Testigo/72 | -10.9560* | .5100 | .000 | -12.6375 | -9.2745 |
| Diclofenaco /24 | Nimesulide/24 | -.9740 | .5100 | .612 | -2.6555 | .7075 |
| | Testigo/24 | -3.9400* | .5100 | .000 | -5.6215 | -2.2585 |
| | Nimesulide /48 | 4.400E-02 | .5100 | 1.000 | -1.6375 | 1.7255 |
| | Diclofenaco/48 | .5900 | .5100 | .960 | -1.0915 | 2.2715 |
| | Testigo/48 | -7.1620* | .5100 | .000 | -8.8435 | -5.4805 |
| | Nimesulide/72 | .6260 | .5100 | .945 | -1.0555 | 2.3075 |
| | Diclofenaco/72 | 1.0140 | .5100 | .561 | -.6675 | 2.6955 |
| | Testigo/72 | -11.9300* | .5100 | .000 | -13.6115 | -10.2485 |
| Testigo/24 | Nimesulide/24 | 2.9660* | .5100 | .000 | 1.2845 | 4.6475 |
| | Diclofenaco /24 | 3.9400* | .5100 | .000 | 2.2585 | 5.6215 |
| | Nimesulide /48 | 3.9840* | .5100 | .000 | 2.3025 | 5.6655 |
| | Diclofenaco/48 | 4.5300* | .5100 | .000 | 2.8485 | 6.2115 |
| | Testigo/48 | -3.2220* | .5100 | .000 | -4.9035 | -1.5405 |
| | Nimesulide/72 | 4.5660* | .5100 | .000 | 2.8845 | 6.2475 |
| | Diclofenaco/72 | 4.9540* | .5100 | .000 | 3.2725 | 6.6355 |
| | Testigo/72 | -7.9900* | .5100 | .000 | -9.6715 | -6.3085 |
| Nimesulide /48 | Nimesulide/24 | -1.0180 | .5100 | .556 | -2.6995 | .6635 |
| | Diclofenaco /24 | -4.400E-02 | .5100 | 1.000 | -1.7255 | 1.6375 |
| | Testigo/24 | -3.9840* | .5100 | .000 | -5.6655 | -2.3025 |
| | Diclofenaco/48 | .5460 | .5100 | .975 | -1.1355 | 2.2275 |
| | Testigo/48 | -7.2060* | .5100 | .000 | -8.8875 | -5.5245 |
| | Nimesulide/72 | .5820 | .5100 | .963 | -1.0995 | 2.2635 |
| | Diclofenaco/72 | .9700 | .5100 | .617 | -.7115 | 2.6515 |
| | Testigo/72 | -11.9740* | .5100 | .000 | -13.6555 | -10.2925 |
| Diclofenaco/48 | Nimesulide/24 | -1.5640 | .5100 | .085 | -3.2455 | .1175 |
| | Diclofenaco /24 | -.5900 | .5100 | .960 | -2.2715 | 1.0915 |
| | Testigo/24 | -4.5300* | .5100 | .000 | -6.2115 | -2.8485 |
| | Nimesulide /48 | -.5460 | .5100 | .975 | -2.2275 | 1.1355 |
| | Testigo/48 | -7.7520* | .5100 | .000 | -9.4335 | -6.0705 |
| | Nimesulide/72 | 3.600E-02 | .5100 | 1.000 | -1.6455 | 1.7175 |
| | Diclofenaco/72 | .4240 | .5100 | .995 | -1.2575 | 2.1055 |
| | Testigo/72 | -12.5200* | .5100 | .000 | -14.2015 | -10.8385 |
| Testigo/48 | Nimesulide/24 | 6.1880* | .5100 | .000 | 4.5065 | 7.8695 |
| | Diclofenaco /24 | 7.1620* | .5100 | .000 | 5.4805 | 8.8435 |
| | Testigo/24 | 3.2220* | .5100 | .000 | 1.5405 | 4.9035 |
| | Nimesulide /48 | 7.2060* | .5100 | .000 | 5.5245 | 8.8875 |
| | Diclofenaco/48 | 7.7520* | .5100 | .000 | 6.0705 | 9.4335 |
| | Nimesulide/72 | 7.7880* | .5100 | .000 | 6.1065 | 9.4695 |
| | Diclofenaco/72 | 8.1760* | .5100 | .000 | 6.4945 | 9.8575 |
| | Testigo/72 | -4.7680* | .5100 | .000 | -6.4495 | -3.0865 |
| Nimesulide/72 | Nimesulide/24 | -1.6000 | .5100 | .073 | -3.2815 | 8.151E-02 |
| | Diclofenaco /24 | -.6260 | .5100 | .945 | -2.3075 | 1.0555 |
| | Testigo/24 | -4.5660* | .5100 | .000 | -6.2475 | -2.8845 |
| | Nimesulide /48 | -.5820 | .5100 | .963 | -2.2635 | 1.0995 |
| | Diclofenaco/48 | -3.600E-02 | .5100 | 1.000 | -1.7175 | 1.6455 |
| | Testigo/48 | -7.7880* | .5100 | .000 | -9.4695 | -6.1065 |
| | Diclofenaco/72 | .3880 | .5100 | .997 | -1.2935 | 2.0695 |
| | Testigo/72 | -12.5560* | .5100 | .000 | -14.2375 | -10.8745 |
| Diclofenaco/72 | Nimesulide/24 | -1.9880* | .5100 | .011 | -3.6695 | -.3065 |
| | Diclofenaco /24 | -1.0140 | .5100 | .561 | -2.6955 | .6675 |
| | Testigo/24 | -4.9540* | .5100 | .000 | -6.6355 | -3.2725 |
| | Nimesulide /48 | -.9700 | .5100 | .617 | -2.6515 | .7115 |
| | Diclofenaco/48 | -.4240 | .5100 | .995 | -2.1055 | 1.2575 |
| | Testigo/48 | -8.1760* | .5100 | .000 | -9.8575 | -6.4945 |
| | Nimesulide/72 | -.3880 | .5100 | .997 | -2.0695 | 1.2935 |
| | Testigo/72 | -12.9440* | .5100 | .000 | -14.6255 | -11.2625 |
| Testigo/72 | Nimesulide/24 | 10.9560* | .5100 | .000 | 9.2745 | 12.6375 |
| | Diclofenaco /24 | 11.9300* | .5100 | .000 | 10.2485 | 13.6115 |
| | Testigo/24 | 7.9900* | .5100 | .000 | 6.3085 | 9.6715 |
| | Nimesulide /48 | 11.9740* | .5100 | .000 | 10.2925 | 13.6555 |
| | Diclofenaco/48 | 12.5200* | .5100 | .000 | 10.8385 | 14.2015 |
| | Testigo/48 | 4.7680* | .5100 | .000 | 3.0865 | 6.4495 |
| | Nimesulide/72 | 12.5560* | .5100 | .000 | 10.8745 | 14.2375 |
| | Diclofenaco/72 | 12.9440* | .5100 | .000 | 11.2625 | 14.6255 |

*. The mean difference is significant at the .05 level.

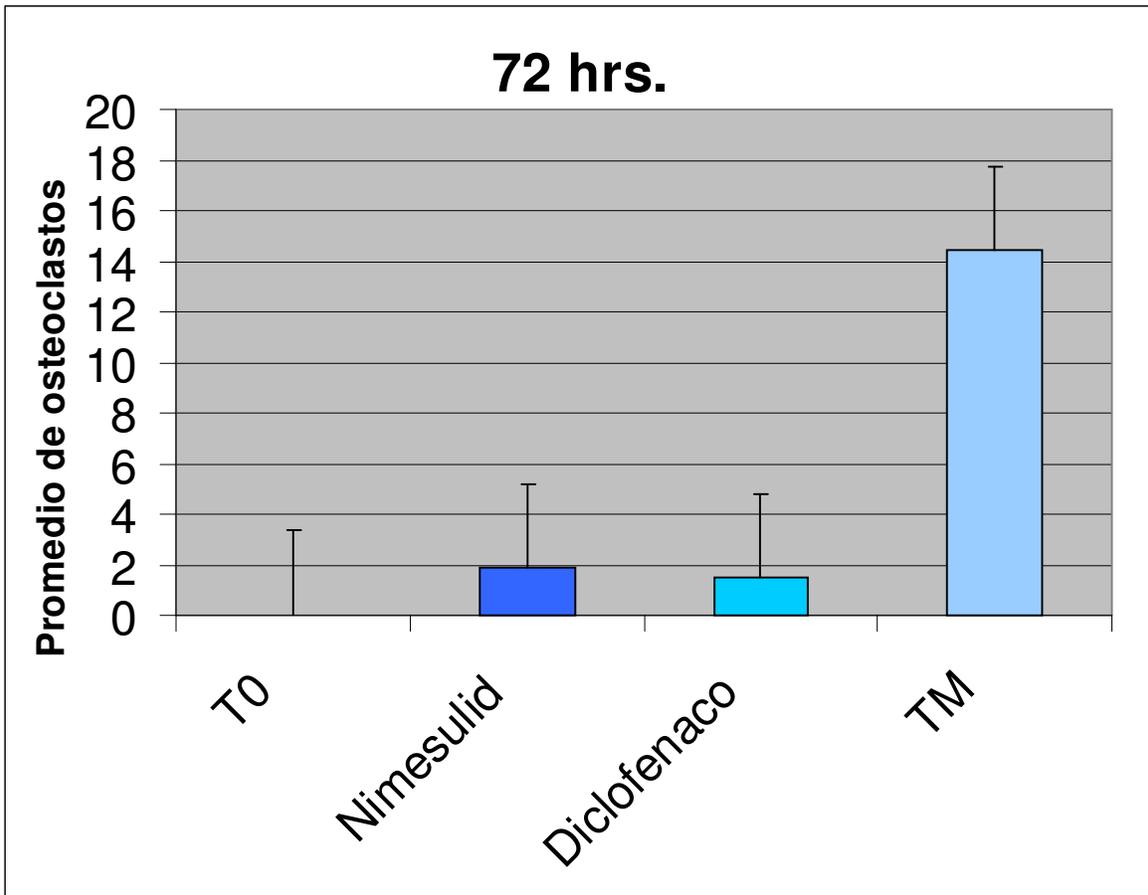
En la Tabla de Tukey observamos el número de osteoclastos en los diferentes grupos, encontrando que a las 24, 48 y 72 horas la diferencia en el número de osteoclastos es significativa entre ambos grupos testigos, al que no se le dió ningún tipo de tratamiento (T0) y al grupo testigo al que sólo se le aplicó la fuerza mecánica (TM) ($p < 0.001$). Ambos grupos experimentales EN y ED también tienen diferencias significativa respecto a ambos grupos testigos, pero no son significativamente diferentes entre sí en ninguno de los grupos estudiados (24, 48 y 72 horas).



Grafica 2. Después de aplicar la fuerza ortodóncica con resorte modelo en “U” entre los primeros y segundos molares superiores, observamos en el grupo testigo sin ningún tratamiento (T0) un promedio de 0 osteoclastos por zona de observación. En el grupo con nimesulide a las 24 horas un promedio de 3.44 osteoclastos. En el grupo con diclofenaco a las 24 horas un promedio de 2.47 osteoclastos y por último, en el grupo testigo al que sólo se le aplicó la fuerza mecánica (TM) a las 24 horas un promedio de 6.41 osteoclastos. Las diferencias entre los grupos testigos y los experimentales fueron significativas.

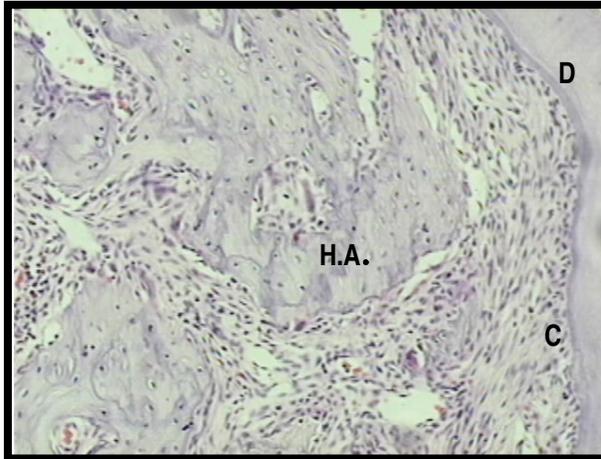


Grafica 3. Después de aplicar la fuerza ortodónica con resorte modelo en “U” entre los primeros y segundos molares superiores, observamos en el grupo testigo sin ningún tratamiento (T0) un promedio de 0 osteoclastos por zona de observación. En el grupo con nimesulide a las 48 horas un promedio de 2.4 osteoclastos. En el grupo con diclofenaco a las 48 horas un promedio de 1.88 osteoclastos y por último, en el grupo testigo al que sólo se le aplicó la fuerza mecánica (TM) a las 48 horas un promedio de 9.63 osteoclastos. Las diferencias entre los grupos testigos y los experimentales fueron significativas.



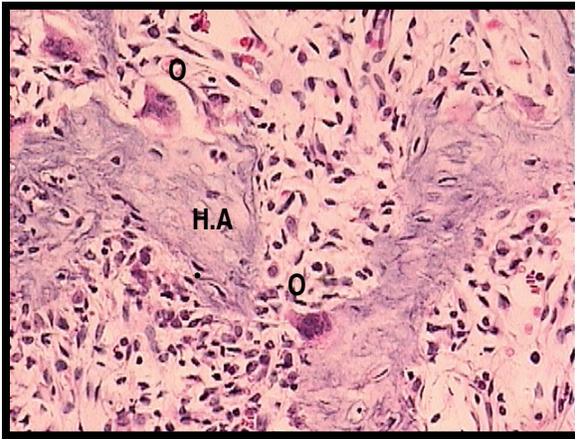
Grafica 4. Después de aplicar la fuerza ortodóncica con resorte modelo en “U” entre los primeros y segundos molares superiores, observamos en el grupo testigo sin ningún tratamiento (T0) un promedio de 0 osteoclastos por zona de observación. En el grupo con nimesulide a las 72 horas un promedio de 1.84 osteoclastos. En el grupo con diclofenaco a las 72 horas un promedio de 1.45 osteoclastos y por último, en el grupo testigo al que sólo se le aplicó la fuerza mecánica (TM) a las 24 horas un promedio de 14.4 osteoclastos. Las diferencias entre los grupos testigos y los experimentales fueron significativas.

TESTIGO SIN TRATAMIENTO



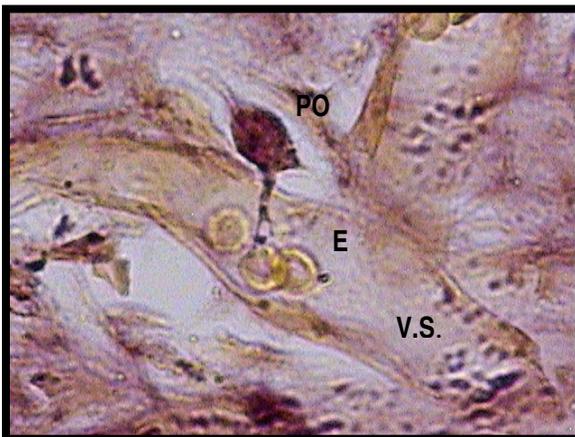
Microfotografía 1. Técnica H y E. Testigo sin ningún tratamiento (T0) donde se observa la ausencia de osteoclastos (D: dentina; C: cemento; H.A.: hueso alveolar)

EXPERIMENTAL NIMESULIDE 48 HRS.



Microfotografía 2. Técnica H y E. Experimental nimesulide a las 48 hrs.(EN2) donde se observan osteoclastos adheridos al hueso en el espacio medular adyacente (O: osteoclastos; H.A.: hueso alveolar)

EXPERIMENTAL DICLOFENACO 48 HRS.



Microfotografía 3. Técnica Histológica TRAP. Experimental diclofenaco a las 48 hrs (ED2) donde se observan los preosteoclastos en el espacio del ligamento parodontal y su relación con los vasos sanguíneos. (PO: preosteoclasto; V.S.: vaso sanguíneo; E: eritrocitos)

Presencia de células que expresan ICAM-1

ANOVA

Hipótesis nulas

- La disminución de la población de osteoclastos en las ratas tratadas con diclofenaco, no se acompaña de inhibición de la expresión de ICAM-1.
- La disminución de la población de osteoclastos en las ratas tratadas con nimesulide, se acompaña también de inhibición de la expresión de ICAM-1.

Hipótesis alternas

- La disminución de la población de osteoclastos en las ratas tratadas con diclofenaco, se acompaña también de inhibición de la expresión de ICAM-1.
- La disminución de la población de osteoclastos en las ratas tratadas con nimesulide, no se acompaña de inhibición de la expresión de ICAM-1.

ANOVA

células positivas a ICAM

| | Sum of Squares | df | Mean Square | F | Sig. |
|----------------|----------------|----|-------------|--------|------|
| Between Groups | 3308.357 | 8 | 413.545 | 95.259 | .000 |
| Within Groups | 156.285 | 36 | 4.341 | | |
| Total | 3464.642 | 44 | | | |

La tabla de ANOVA presenta una significación ($p < 0.001$), por lo que rechazamos la hipótesis nula y aceptamos la hipótesis alterna: la disminución de la población de osteoclastos en las ratas tratadas con diclofenaco, se acompaña también de inhibición de la expresión de ICAM-1.

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: Células positivas a ICAM-1

| Source | Type III Sum of Squares | df | Mean Square | F | Sig. |
|------------------|-------------------------|----|-------------|----------|------|
| Corrected Model | 3308.276 ^a | 8 | 413.534 | 95.228 | .000 |
| Intercept | 9713.175 | 1 | 9713.175 | 2236.726 | .000 |
| Horas * tratamie | 3308.276 | 8 | 413.534 | 95.228 | .000 |
| Error | 156.333 | 36 | 4.343 | | |
| Total | 13177.784 | 45 | | | |
| Corrected Total | 3464.609 | 44 | | | |

a. R Squared = .955 (Adjusted R Squared = .945)

Prueba de ANOVA de dos sentidos presenta un valor de significación ($p < 0.001$), En la que observamos significación en la relación tiempo - tratamiento. Lo que significa que existe una interacción entre ambas variables: tratamiento y duración del mismo para el número de células positivas a ICAM-1.

Multiple Comparisons

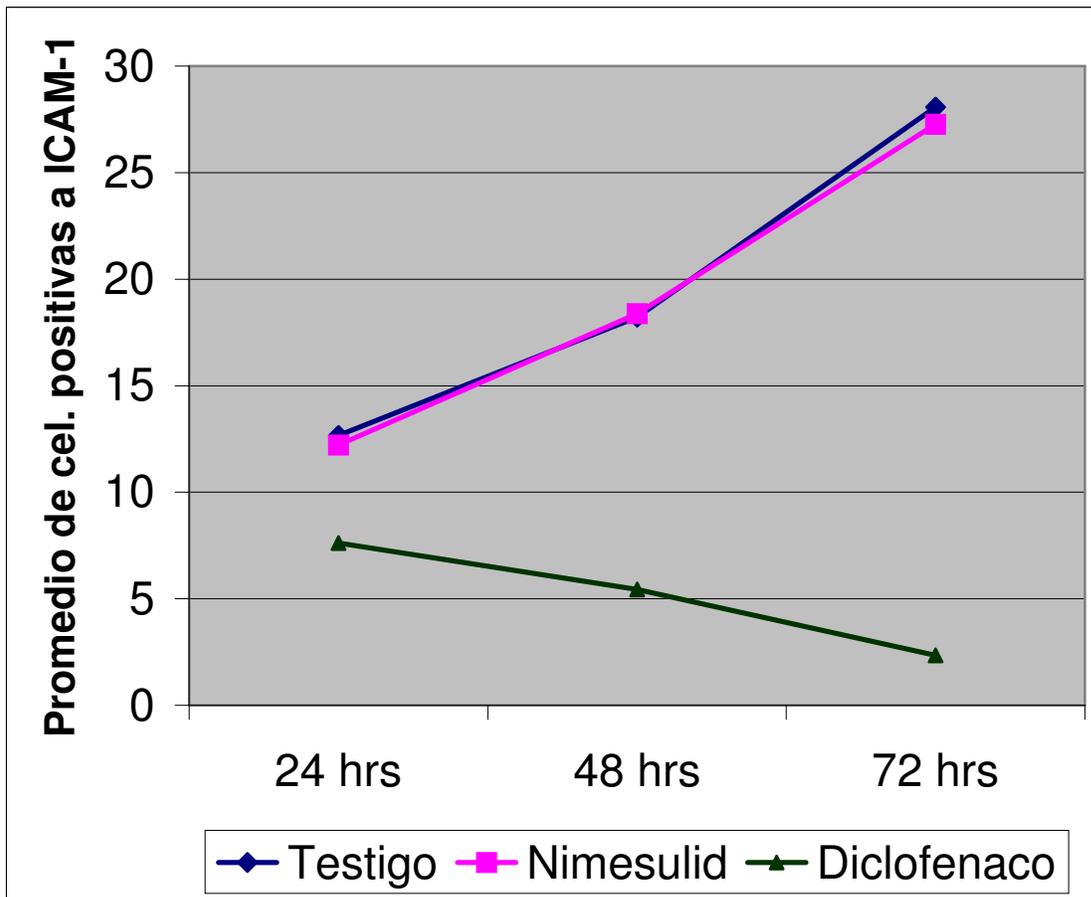
Dependent Variable: células positivas a ICAM
Tukey HSD

| (I) AINE | (J) AINE | Mean Difference (I-J) | Std. Error | Sig. | 95% Confidence Interval | |
|-----------------|-----------------|-----------------------|------------|-------|-------------------------|-------------|
| | | | | | Lower Bound | Upper Bound |
| Nimesulide/24 | Diclofenaco /24 | 4.5940* | 1.3178 | .031 | .2492 | 8.9388 |
| | Testigo/24 | -.4560 | 1.3178 | 1.000 | -4.8008 | 3.8888 |
| | Nimesulide /48 | -6.1720* | 1.3178 | .001 | -10.5168 | -1.8272 |
| | Diclofenaco/48 | 6.7800* | 1.3178 | .000 | 2.4352 | 11.1248 |
| | Testigo/48 | -6.0100* | 1.3178 | .002 | -10.3548 | -1.6652 |
| | Nimesulide/72 | -15.0500* | 1.3178 | .000 | -19.3948 | -10.7052 |
| | Diclofenaco/72 | 9.8740* | 1.3178 | .000 | 5.5292 | 14.2188 |
| | Testigo/72 | -15.8560* | 1.3178 | .000 | -20.2008 | -11.5112 |
| Diclofenaco /24 | Nimesulide/24 | -4.5940* | 1.3178 | .031 | -8.9388 | -.2492 |
| | Testigo/24 | -5.0500* | 1.3178 | .013 | -9.3948 | -.7052 |
| | Nimesulide /48 | -10.7660* | 1.3178 | .000 | -15.1108 | -6.4212 |
| | Diclofenaco/48 | 2.1860 | 1.3178 | .766 | -2.1588 | 6.5308 |
| | Testigo/48 | -10.6040* | 1.3178 | .000 | -14.9488 | -6.2592 |
| | Nimesulide/72 | -19.6440* | 1.3178 | .000 | -23.9888 | -15.2992 |
| | Diclofenaco/72 | 5.2800* | 1.3178 | .008 | .9352 | 9.6248 |
| | Testigo/72 | -20.4500* | 1.3178 | .000 | -24.7948 | -16.1052 |
| Testigo/24 | Nimesulide/24 | .4560 | 1.3178 | 1.000 | -3.8888 | 4.8008 |
| | Diclofenaco /24 | 5.0500* | 1.3178 | .013 | .7052 | 9.3948 |
| | Nimesulide /48 | -5.7160* | 1.3178 | .003 | -10.0608 | -1.3712 |
| | Diclofenaco/48 | 7.2360* | 1.3178 | .000 | 2.8912 | 11.5808 |
| | Testigo/48 | -5.5540* | 1.3178 | .005 | -9.8988 | -1.2092 |
| | Nimesulide/72 | -14.5940* | 1.3178 | .000 | -18.9388 | -10.2492 |
| | Diclofenaco/72 | 10.3300* | 1.3178 | .000 | 5.9852 | 14.6748 |
| | Testigo/72 | -15.4000* | 1.3178 | .000 | -19.7448 | -11.0552 |
| Nimesulide /48 | Nimesulide/24 | 6.1720* | 1.3178 | .001 | 1.8272 | 10.5168 |
| | Diclofenaco /24 | 10.7660* | 1.3178 | .000 | 6.4212 | 15.1108 |
| | Testigo/24 | 5.7160* | 1.3178 | .003 | 1.3712 | 10.0608 |
| | Diclofenaco/48 | 12.9520* | 1.3178 | .000 | 8.6072 | 17.2968 |
| | Testigo/48 | .1620 | 1.3178 | 1.000 | -4.1828 | 4.5068 |
| | Nimesulide/72 | -8.8780* | 1.3178 | .000 | -13.2228 | -4.5332 |
| | Diclofenaco/72 | 16.0460* | 1.3178 | .000 | 11.7012 | 20.3908 |
| | Testigo/72 | -9.6840* | 1.3178 | .000 | -14.0288 | -5.3392 |
| Diclofenaco/48 | Nimesulide/24 | -6.7800* | 1.3178 | .000 | -11.1248 | -2.4352 |
| | Diclofenaco /24 | -2.1860 | 1.3178 | .766 | -6.5308 | 2.1588 |
| | Testigo/24 | -7.2360* | 1.3178 | .000 | -11.5808 | -2.8912 |
| | Nimesulide /48 | -12.9520* | 1.3178 | .000 | -17.2968 | -8.6072 |
| | Testigo/48 | -12.7900* | 1.3178 | .000 | -17.1348 | -8.4452 |
| | Nimesulide/72 | -21.8300* | 1.3178 | .000 | -26.1748 | -17.4852 |
| | Diclofenaco/72 | 3.0940 | 1.3178 | .342 | -1.2508 | 7.4388 |
| | Testigo/72 | -22.6360* | 1.3178 | .000 | -26.9808 | -18.2912 |
| Testigo/48 | Nimesulide/24 | 6.0100* | 1.3178 | .002 | 1.6652 | 10.3548 |
| | Diclofenaco /24 | 10.6040* | 1.3178 | .000 | 6.2592 | 14.9488 |
| | Testigo/24 | 5.5540* | 1.3178 | .005 | 1.2092 | 9.8988 |
| | Nimesulide /48 | -.1620 | 1.3178 | 1.000 | -4.5068 | 4.1828 |
| | Diclofenaco/48 | 12.7900* | 1.3178 | .000 | 8.4452 | 17.1348 |
| | Nimesulide/72 | -9.0400* | 1.3178 | .000 | -13.3848 | -4.6952 |
| | Diclofenaco/72 | 15.8840* | 1.3178 | .000 | 11.5392 | 20.2288 |
| | Testigo/72 | -9.8460* | 1.3178 | .000 | -14.1908 | -5.5012 |
| Nimesulide/72 | Nimesulide/24 | 15.0500* | 1.3178 | .000 | 10.7052 | 19.3948 |
| | Diclofenaco /24 | 19.6440* | 1.3178 | .000 | 15.2992 | 23.9888 |
| | Testigo/24 | 14.5940* | 1.3178 | .000 | 10.2492 | 18.9388 |
| | Nimesulide /48 | 8.8780* | 1.3178 | .000 | 4.5332 | 13.2228 |
| | Diclofenaco/48 | 21.8300* | 1.3178 | .000 | 17.4852 | 26.1748 |
| | Testigo/48 | 9.0400* | 1.3178 | .000 | 4.6952 | 13.3848 |
| | Diclofenaco/72 | 24.9240* | 1.3178 | .000 | 20.5792 | 29.2688 |
| | Testigo/72 | -.8060 | 1.3178 | .999 | -5.1508 | 3.5388 |
| Diclofenaco/72 | Nimesulide/24 | -9.8740* | 1.3178 | .000 | -14.2188 | -5.5292 |
| | Diclofenaco /24 | -5.2800* | 1.3178 | .008 | -9.6248 | -.9352 |
| | Testigo/24 | -10.3300* | 1.3178 | .000 | -14.6748 | -5.9852 |
| | Nimesulide /48 | -16.0460* | 1.3178 | .000 | -20.3908 | -11.7012 |
| | Diclofenaco/48 | -3.0940 | 1.3178 | .342 | -7.4388 | 1.2508 |
| | Testigo/48 | -15.8840* | 1.3178 | .000 | -20.2288 | -11.5392 |
| | Nimesulide/72 | -24.9240* | 1.3178 | .000 | -29.2688 | -20.5792 |
| | Testigo/72 | -25.7300* | 1.3178 | .000 | -30.0748 | -21.3852 |
| Testigo/72 | Nimesulide/24 | 15.8560* | 1.3178 | .000 | 11.5112 | 20.2008 |
| | Diclofenaco /24 | 20.4500* | 1.3178 | .000 | 16.1052 | 24.7948 |
| | Testigo/24 | 15.4000* | 1.3178 | .000 | 11.0552 | 19.7448 |
| | Nimesulide /48 | 9.6840* | 1.3178 | .000 | 5.3392 | 14.0288 |
| | Diclofenaco/48 | 22.6360* | 1.3178 | .000 | 18.2912 | 26.9808 |
| | Testigo/48 | 9.8460* | 1.3178 | .000 | 5.5012 | 14.1908 |
| | Nimesulide/72 | .8060 | 1.3178 | .999 | -3.5388 | 5.1508 |
| | Diclofenaco/72 | 25.7300* | 1.3178 | .000 | 21.3852 | 30.0748 |

*. The mean difference is significant at the .05 level.

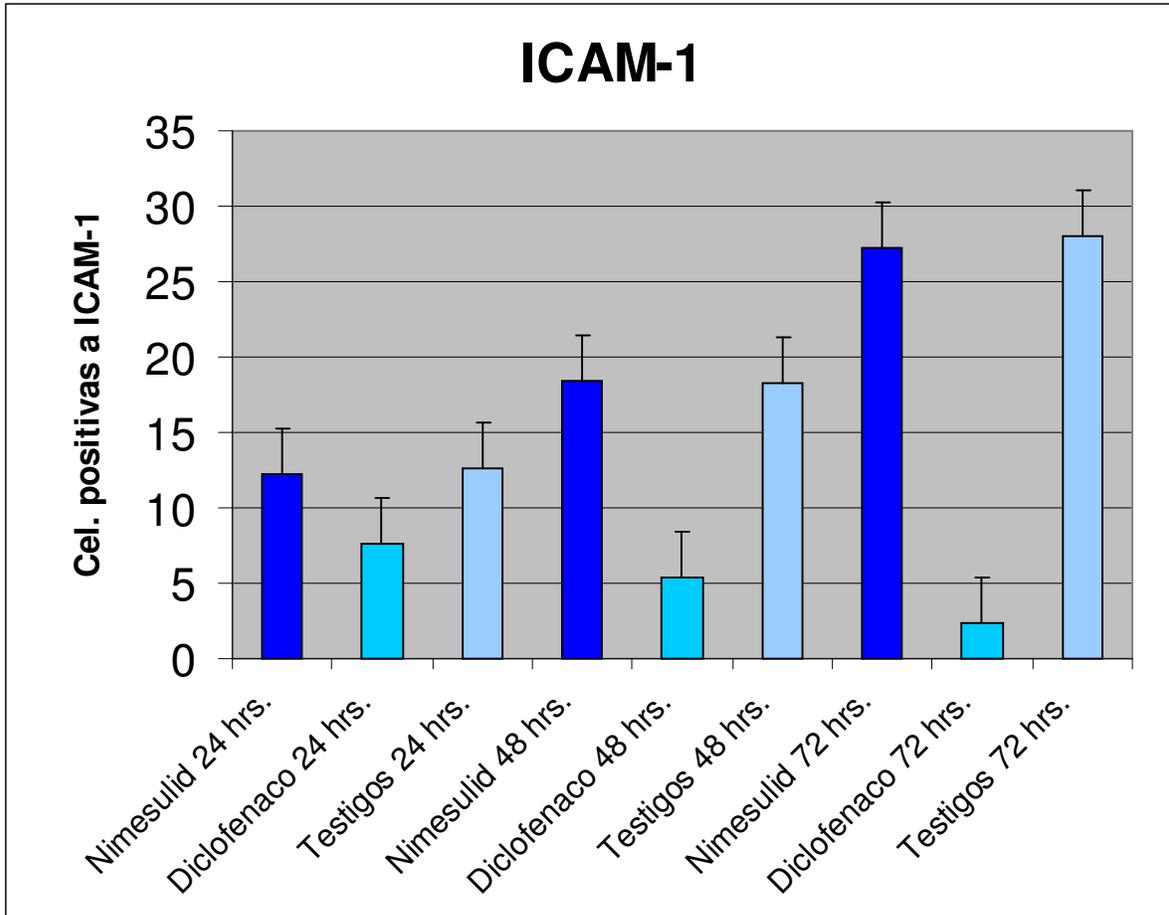
En esta tabla observamos el número de células que expresan ICAM-1 en los diferentes grupos, encontrando que el número de células que expresan ICAM-1 en los grupos a los que se les administró nimesulide (EN) a las 24, 48 y 72 hrs. así como los grupos testigos a los que sólo se les aplicó la fuerza mecánica (TM) no tienen significancia entre sí, pero cada grupo son significativamente diferentes en cuanto a los tiempos. ($p < 0.001$).

Estos grupos EN y TM tienen diferencia significativa respecto a los grupos que se les administró diclofenaco (ED) a las 24, 48 y 72 hrs. ($p < 0.031$).



Grafica 5. Después de aplicar la fuerza ortodóncica con resorte modelo en “U” entre los primeros y segundos molares superiores, observamos en los grupos testigos a los que sólo se le aplicó la fuerza mecánica (TM) a las 24hrs. un promedio de 12.67 osteoclastos. A las 48 hrs. un promedio de 18.22 osteoclastos y por último a las 72 hrs. un promedio de 28.07 osteoclastos. Estas diferencias fueron significativas. En los grupos experimentales a los que se les aplicó nimesulide (EN) a las 24 hrs. un promedio de 12.21 osteoclastos. A las 48 hrs. un promedio de 18.38 osteoclastos y por último, a las 72 hrs. un promedio de 27.26 osteoclastos. Estas diferencias fueron significativas. Observamos en los grupos experimentales a los que se les aplicó diclofenaco (ED) a las 24 hrs. un promedio de 7.6 osteoclastos. A las 48 hrs. un promedio de 5.4 osteoclastos y por último, a las 72 hrs. un promedio de 2.3 osteoclastos. Estas diferencias no fueron significativas entre las 24 y 48 hrs., pero si fueron significativas entre las 24 y 72 hrs.

De acuerdo con los resultados de la prueba de ANOVA de dos sentidos existe interacción entre el tratamiento con diclofenaco y el tiempo de administración.



Grafica 6. Después de aplicar la fuerza ortodónica con resorte modelo en “U” entre los primeros y segundos molares superiores, observamos en el grupo experimental nimesulide a las 24 hrs. (EN1) un promedio de 12.21 osteoclastos por zona de observación. En el grupo experimental diclofenaco a las 24 hrs. (ED1) un promedio de 7.6 osteoclastos. En el grupo testigo al que sólo se le aplicó la fuerza mecánica a las 24 horas (TM1) un promedio de 12.67 osteoclastos. En el grupo experimental nimesulide a las 48 hrs. (EN2) un promedio de 18.38 osteoclastos. En el grupo experimental diclofenaco a las 48 hrs. un promedio de 5.4 osteoclastos. En el grupo testigo al que sólo se le aplicó la fuerza mecánica a las 48 hrs. (TM2) un promedio de 18.22. En el grupo experimental nimesulide a las 72 hrs. (EN3) un promedio de 27.26 osteoclastos. En el grupo experimental diclofenaco a las 72 hrs. (ED3) un promedio de 2.3 osteoclastos. En el grupo testigo al que sólo se le aplicó la fuerza mecánica a las 72 horas (TM3) un promedio de 28.07 osteoclastos

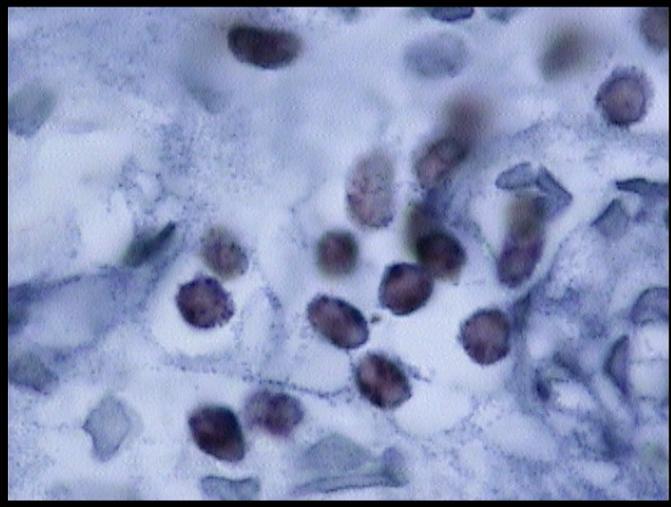
Correlations

| | | No. de osteoclastos | Células positivas a ICAM-1 |
|----------------------------|---------------------|---------------------|----------------------------|
| No. de osteoclastos | Pearson Correlation | 1 | .547** |
| | Sig. (2-tailed) | . | .000 |
| | N | 45 | 45 |
| Células positivas a ICAM-1 | Pearson Correlation | .547** | 1 |
| | Sig. (2-tailed) | .000 | . |
| | N | 45 | 45 |

** . Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed).

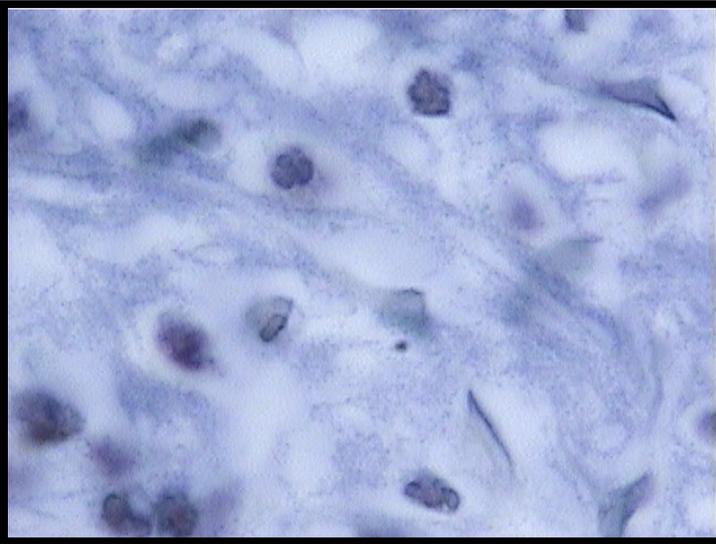
Análisis de correlación. Nos indica que estadísticamente existe correlación positiva entre los resultados que encontramos en el número de osteoclastos con el número de células positivas a ICAM-1 en todos los grupos.

TESTIGO CON PRESIÓN MECÁNICA A LAS 48 HRS



Microfotografía 4. Técnica inmunohistoquímica. Testigo con presión mecánica a las 48 hrs. (TM2) donde se observan las células positivas a ICAM-1 en la zona del ligamento parodontal.

EXPERIMENTAL DICLOFENACO A LAS 48 HRS



Microfotografía 5. Técnica inmunohistoquímica. Experimental con diclofenaco a las 48 hrs. (ED2) donde se observan las células positivas a ICAM-1 en la zona del ligamento parodontal.

13. DISCUSION

Los movimientos dentarios producidos por el tratamiento ortodónico se disparan por la aplicación de una fuerza mecánica. Se ha postulado que los osteoblastos poseen receptores que detectan el estrés mecánico y que la proteína G reactiva esta acoplada a dichos receptores y como resultado de este estímulo se favorece la activación de la fosfolipasa A_2 que es la enzima responsable de la síntesis del ácido araquidónico, precursor de prostaglandinas y leucotrienos. Los eicosanoides activan la adenilciclase, (una enzima que es controlada por la proteína G). Prostaglandinas y leucotrienos también activan el metabolismo de la fosfoinositol sintetasa (posiblemente también mediada por proteína G). De esta vía derivan dos importantes segundos mensajero: el diacilglicerol que activa la proteincinasa C y el inositol trifosfato que libera calcio del retículo endoplasmático liso.

A su vez el catabolismo del diacilglicerol puede contribuir a elevar la producción del ácido araquidónico. El inositol tetrafosfato se cree que dispara la entrada de calcio extracelular al interior del osteoblasto, se piensa que esos canales iónicos son regulados por la proteína G. (Sandy, 1992).

La posible explicación de porque moléculas tan diferentes como las que conforman el grupo de sustancias conocidas como AINEs puedan tener como efecto común la inhibición de la síntesis de prostaglandinas, puede resultar de sus propiedades físicas, mismas que les permiten interactuar con las membranas biológicas.

Estas características son: ser moléculas planas, aniónicas y lipofílicas. Varios estudios nos indican que las prostaglandinas juegan un papel importante para la formación de osteoclastos en los sitios de compresión durante el movimiento ortodónico y que la administración de AINEs inhiben la formación de osteoclastos y la reducción del movimiento dentario evitando también la resorción radicular.

Nuestros resultados coincidieron con los de otros autores en el sentido de que los AINES diclofenaco y nimesulide disminuyen significativamente la población de osteoclastos en el hueso alveolar de los molares sometidos a estrés mecánico ortodónico.

La población de células óseas esta influenciada por factores sistémicos y locales. Desde que Rodan y Martin propusieron en 1981 que la función de los osteoclastos es regulada por los osteoblastos y que la PGE2 es el mediador de dicha interacción se han estudiado los efectos de las PGs en la población de osteoclastos, obteniéndose resultados contradictorios probablemente debido a: los diferentes métodos de estudio que se

han usado (células aisladas, co-cultivos celulares, cultivos de hueso y modelos animales); la gran cantidad de factores que influyen en la regulación de la población de osteoclastos y las diferencias regionales y en los diferentes huesos, en cuanto a la actividad de estas células.

En nuestro estudio hemos demostrado que probablemente la expresión de ICAM-1, que es uno de los factores locales que pudieran estar influenciando la llegada de los preosteoclastos al hueso sometido a una presión mecánica, no juega un papel decisivo en el arribo de estas células al hueso, ya que en los animales experimentales a los que se les administraron los AINES diclofenaco y nimesulide una hora antes de aplicarles la presión mecánica se encontraron osteoclastos activos 24 horas después, no solamente adheridos al hueso, si no también preosteoclastos migrando en la zona del ligamento periodontal sin que se encontrara una diferencia significativa entre el número de preosteoclastos marcado por la reacción de TRAP y tratados con diclofenaco que inhibe la expresión de ICAM-1 y las tratadas con nimesulide que no inhiben la expresión de ICAM-1; sin embargo el número de células en la zona del ligamento periodontal que expresaron ICAM-1, detectadas por la inmunohistoquímica, fue significativamente mayor para el grupo tratado con nimesulide y para los testigos tratados sólo con la presión mecánica y sin medicamento.

En relación a la inhibición de la expresión de ICAM-1 por el diclofenaco, nuestros resultados concuerdan con los de Díaz Gonzáles y col (1995) ya que en los cortes histológicos de las ratas tratadas con diclofenaco la reacción inmunohistoquímica para ICAM-1 resultó negativa. Los osteoblastos promueven la síntesis de IL1 y TNF α que son los estimuladores de la expresión de ICAM-1 por lo que es probable que el diclofenaco interfiera con la liberación de estos factores estimuladores de la expresión de ICAM-1

El número de preosteoclastos a las 24, 48 y 72 horas tanto con el diclofenaco como con el nimesulide fue decayendo progresivamente aunque las diferencias no fueron significativas. Las ratas del grupo testigo al que se aplicó la fuerza mecánica sin medicamento, fue progresivamente aumentando, aunque las diferencias entre los tres días de tratamiento tampoco fueron significativas. Lo anterior sugiere la posibilidad de que si los tratamientos se prolongarán por más tiempo las diferencias también pudieran ampliarse.

En forma semejante la expresión de ICAM-1 se fue incrementando día con día en forma significativa en los testigos y en los animales experimentales tratados con nimesulide.

De la misma forma fue disminuyendo progresivamente la expresión de ICAM-1 en los animales tratados con diclofenaco, pero la diferencias entre el número de células a las 24 y 72 hrs. si fue significativa, habrá que hacer estudios a mayor plazo para ver que sucede con tratamientos más prolongados.

Los resultados de la prueba de ANOVA de dos sentidos muestran que el efecto de los tratamientos progresivos con diclofenaco y nimesulide en el tiempo tienen un efecto sumatorio en relación al número de osteoclastos, mientras que el efecto del diclofenaco en la expresión de ICAM-1 es multiplicativo; durante el mismo periodo de tiempo.

Esto puede explicarse pensando que son muchos los factores que regulan la población de osteoclastos y los fármacos sólo bloquean algunos de estos factores, mientras que la expresión de ICAM-1 es inducida por la síntesis de IL1 y TNF α de los osteoblastos y probablemente estas dos moléculas son inhibidas, disminuyendo la expresión de ICAM-1, no sólo en los osteoclastos, si no también en fibroblastos y células endoteliales.

Otra explicación posible para la acción del diclofenaco sobre la expresión de ICAM-1 es que éste fármaco inhiba al factor movilizador de los macrófagos, que se sabe que es el responsable de la síntesis de TNF α .

Mientras que la reacción de fosfata ácida resistente a tartrato (TRAP) es selectiva para las células mononucleares, la expresión de ICAM-1 no es exclusiva de los preosteoclastos, también la expresan las células endoteliales, los linfocitos y los fibroblatos, todas ellas presentes en el tabique interradicular. Sin embargo en los cortes teñidos con Hematoxilina y Eosina (H y E) no se detectó infiltración linfocitaria y las células endoteliales tienen una ubicación precisa tapizando los vasos sanguíneos, por lo que pensamos que en nuestro experimento, las células positivas para ICAM-1 son fibroblastos y preosteoclastos, lo que explica la diferencia entre el número de osteoclastos y células ICAM-1 positivas que hemos contabilizado.

Coincidiendo con los resultados de Wellington (2001) en los animales testigo de encontraron precursores intravasculares TRAP positivo, lo que sugiere que independientemente de que inicialmente los preosteoclastos presentes en el ligamento periodontal, inicien la diferenciación hacia células de resorción, la llegada de preosteoclastos por vía sanguínea, también es precoz.

14. CONCLUSIONES

De nuestros resultados podemos concluir que:

1. En el grupo al que no se le dio ningún tratamiento prácticamente no se encontraron osteoclastos y la diferencia respecto a los demás grupos fue altamente significativa
2. En los grupos testigos tratados sólo con estrés mecánico, la población de osteoclastos fue significativamente menor a las 24 hrs. que el mismo grupo a las 48 y 72 hrs.
3. El diclofenaco y el nimesulide son fuertes inhibidores de la población de las células de resorción durante el estrés mecánico ortodóncico.
4. En el grupo tratado con nimesulide a las 24 hrs. la población de células positivas a ICAM-1 es significativamente menor que el mismo grupo a las 48 y 72 hrs.
5. En el grupo tratado con diclofenaco a las 24 hrs. la población de células positivas a ICAM-1 es significativamente mayor que el mismo grupo a las 72 hrs.
6. La inhibición de las moléculas de adhesión ICAM-1 por el diclofenaco probablemente no es decisiva en la inhibición de la población de estas células cuando se compara con el nimesulide que no inhibe las moléculas de adhesión ICAM-1, en los primeros 3 días de tratamiento.
7. Las células positivas a ICAM-1 decrecen significativamente en los animales tratados con diclofenaco, mientras que éstas aumentan en forma significativa en los controles y en las ratas tratadas con nimesulide.
8. Existe correlación positiva entre los resultados que encontramos en el número de osteoclastos con el número de células positivas a ICAM-1 en todos los grupos, lo que sugiere que las células positivas a ICAM-1 incluyen tanto a los fibroblastos como a los preosteoclastos.
9. Existe una interacción entre el tratamiento con diclofenaco y el tiempo de administración en cuanto a la expresión de ICAM-1.

10. Existe una interacción entre el tratamiento con diclofenaco y nimesulide y el tiempo de tratamiento en cuanto a la población de osteoclastos.
11. Es conveniente hacer experimentos más prolongados para saber si este comportamiento de las poblaciones de las células de la resorción varía con el tiempo.

15. BIBLIOGRAFIA

1. Akatsu T, Takahashi N, Debari K, Morita L, Murota S, Nagata N, Takatani O and Suda T. Prostaglandins promote osteoclast like cell formation by a mechanism involving cyclic adenosine 3',5' monophosphate in mouse bone marrow cell cultures. *J. Bone Miner Res*:1989; 4: 29-35.
2. Alam A S, Huang CL, Blake DR, Zaidi M A. Hypothesis for the local control of osteoclast function by Ca²⁺, nitric oxide and free radicals. *Biosci Rep*: 1992;12:369-380.
3. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. *Molecular Biology of the cell* Ed. Garland Science, 2002.
4. Ali, NN, Boy De, A y Jones S.J Motility and resorption: osteoclastic activity in vitro. *Anatomical Embriology*. 1984: 170;51-56.
5. Barnett J, Chow J, Ives D, Chiou M, Mackenzie R, Osen E, Nguyen B, Tsing S, Bach C, Freire J, Chan H, Sigal E, Ranessa C, Purification characterization and selective inhibition of human prostaglandin G/H synthase 1 and 2 expressed in the baculovirus system. *Biochim Biophys Acta* 1994: 1209: 130-139.
6. Baron , Neff L, Tran-Van P, Nefussi JR, Vignery A. Kinetic and cytochemical identification of osteoclast precursors and their differentiation into multinucleated osteoclast. *Am J Pathol* 1986;122:363-378.
7. Burstone CJ, Groves MH: Threshold and optimum force values for maxillary anterior tooth movement, *J Dent Res* 39:695,1961.
8. Cecchini Mg, Fleisch H. Bisphosphonates in vitro specifically inhibit, among the hematopoietic series, the development of the mouse mononuclear phagocyte lineage. *J Bone Miner Res* 1990;5:1019-1027.
9. Chambers, TJ y Ali NN. Inhibition of osteoclastic motility by prostaglandins I₂, E₁, E₂ and 6-oxo-E₁. *J of pathology I*. 1983: 39;383-389.
10. Chumbley AB, Tuncay OC. The effect of indomethacin (an aspirin-like drug) on the rate of orthodontic tooth movement. *Am J Orthod*. 1986;6:312-314.
11. Clifford J. Rosen Restoring aging bones. *Scientific American*. 2004;14;3:71-77
12. Connie Krawczyk, Antonio Oliveira-dos-Santos, Takehiko Sasaki, Emily Griffiths, Pamela S. Ohashi, Scott Snapper, Fred Alt and Josef M. Penninger. Vav1 Controls Integrin Clustering and MHC/Peptide-Specific Cell Adhesion to Antigen-

Presenting Cells *Immunity*, Volume 16, Issue 3, March 2002, Pages 331-343.

13. Devendra K. Vora, Craig L. Rosenbloom, Arthur L. Beaudet and Robert W. Cottingham. Polymorphisms and Linkage Analysis for ICAM-1 and the Selectin Gene Cluster *Genomics*, Volume 21, Issue 3, June 1994, Pages 473-477.
14. Díaz-González F, González-Alvaro Y, Campanero MR y col. Prevention of in vitro neutrophil-endothelial attachment through shedding of L-selectin by nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *J Clin Invest* 1995; 95:1756-1765.
15. Domínguez Benavidez Antonio Cesar. *Tesis de licenciatura* (Cirujano Dentista) Asesor: Mtro Gomez Clavel. Efecto del nimesulide en la formación de osteoclastos durante el movimiento ortodoncico, 2003. FES Iztacala UNAM.
16. Efstratiadis T y Moss PW. Tartrate- resistant acid phosphatase of human lung: apparent identity with osteoclastic acid phosphatase. *Enzyme*: 1985b ;33, 34-80.
17. Feng L, Sun W, Xia Y, Tang WW, Chamigan P, Soyoola E, Wilson CB Hawang D. Cloning two isoforms of rat cyclooxygenase: diferencial regulation of their expresión. *Arch Biochem Biophys* 1993;307: 361-8.
18. Feuerbach D, Feyen JHM. Expression of the cell-adhesion molecule VCAM-1 by stromal cells is necessary for osteoclastogenesis. *FEBS Lett.* 1996;402:21-24.
19. Flanagan AM, Chambers TJ. Stimulation of bone nodule formation in vitro by prostaglandin E1 and E2. *Endocrinology* 1992;130:443-448.
20. Geneser Finn. *Histología*, Madrid España 2001 3ra ed, Ed Médica Panamericana.
21. Halliweil B, Hoult R, Blake DR. Oxidants, inflammation and anti-inflammatory drugs *FASEB J* 1988; 2: 2867-2873.
22. Hernández Márquez VM, Toranzo Fernández J M, Lara Guevara FJ. Estudio comparativo entre ibuprofeno, buprenofina y ketorolaco en el control del dolor en le remoción de 3ros molares. *ADM Vol LII*, Marzo-Abril 1996, No. 2: 99-102.
23. Hoyeon Chung, Young Soon Kang, Cgan Sun Hawang, Inkul Moon, Chang Hoom Ylm, Kyu Hong Chol, Klz Clkz Ham, Hak Chul Jang, Hyun Koo Yoon, In Kwon Han. Deflazacort Increases osteoclast formation in mouse bone marrow culture and the radio of RANK/OPG mRNA expression in marrow stromal cells. *J Korean Med Sci*, 2001 Dec; 16(6):760-73.
24. Igarashi K, Miyoshi K, Shinoda H, Saeki A, Mitani H. Diurnal variation in tooth movement in response to orthidintic force in rat. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 1998;114:8-14.
25. Katzung Bertram G. *Farmacología Básica y Clínica*. México DF, 1999, Ed. Manual Moderno.

26. King GJ, Keeling SD, Wronski TJ. Histomorphometric study of alveolar bone turnover in orthodontic tooth movement. *Bone* 1991;12:401-9.
27. Ku E C, Lee W, Kithari H V, Scholer D W. Effect of diclofenac sodium on the arachidonic cascade. *Am J Med* 1986;80: (suppl. 4B): 18-23.
28. Mangham DC, Scoones DJ, Drayson MT. Complement and the recruitment of mononuclear osteoclast. *J Clin Pathol* 1993; 46: 517-521.
29. Marks SC, Popoff SN. Bone cell biology: the regulation of development structure, and function in the skeleton. *Am J Anat* 1998;183:1-44.
30. Márquez Sánchez Diana. *Tesis de Licenciatura* (Cirujano Dentista). Asesor. Mtro. Gomez Clavel. Efecto de los AINES clonixinato de lisina y diclofenaco en la formación de osteoclastos durante el movimiento ortodóncico, 2002. FES Iztacala UNAM.
31. Mostafa Y, Weaks- Dybvig, Osodoby P. Orchestration of tooth movement. *Am J Orthod dentofacial Orthoped* 1983; 83:245-50.
32. Mundy GR, Roodman GD. Osteoclast ontogeny and function, In Perck Bone and Mineral Research. *Amsterdam, El Servier* 1987; 209-279.
33. Oppenheim, A.: Human tissue response to orthodontic intervention of short and long duration. *Am. J. Orth. And Oral Surg*, 28:263-301, 1942.
34. Palokangas H, Metsikkö K, Väänänen K. Active vacuolar H⁺-ATPase is required for both endocytic and exocytic processes during viral infection of BHK-21 cells. *J Biol Chem* 1994; 269:17577-17585.
35. Parfitt AM. Osteonal and hemi-osteonal remodeling: the spatial and temporal framework for signal traffic in adult human bone. *J Cell Biochem Biophys Res Commun* 1996:220:515-519.
36. Proffit W. *Contemporary Orthodontics* 2nd ed USA: Mosby Year book 1993:110-112.
37. Reitan K: Tissue behavior during orthodontic tooth movement, *Am J Orthod* 46:881,1960.
38. Riggs LB, Melton JL. Involutional Osteoporosis. *The new England journal of medicine*. June 26, 1986;26;314:1676-1684.
39. Ritter Nm, Farach- Carson Ms, Buttler WT. Evidence for the formation a complex between osteopontin ans osteoclastin. *J*

Bone Miner Res 1992;7:877-885.

40. Saito S, Ngan P, Rosol T, Saito M, Shimizu H, Shinjo N, Shanfeld J, Davidovitch Z. Involvement of PGE synthesis in the effect of intermittent pressure and interleukin-1 β on bone resorption. *J Dent Res* 1991;70:27-33.
41. Sakai A. Diclofenac inhibits endothelial cell adhesion molecule expression induced with lipopolysaccharide. *Life Sci* 1996;58:2377-2387.
42. Sakai R. Osteogenic activin in young normal rats and young, adult and aged rats after overextraction. *Bone (Suppl)*. 1998;23:467.
43. Sandstedt C: Einige Beiträge zur Zahnregulierung. *Nord Tandl Tidssk* 5:236, 1904; 6:1, 1905.
44. Sandy JR, Farndale RW, Meickle M. Recent advances in understanding mechanically induced bone remodeling and their relevance to orthodontic theory and practice. *Am J Orthod Dentofac Orthop* 1993;103:212-222.
45. Snipes RG, Lam KW, Dodd RC, Gray TK y Cohen MS. Acid phosphatase in mononuclear phagocytes and the U937 cell line. Monocyte-derived macrophages express tartrate-resistant acid phosphatase. *Blood*. 1986; 56; 729-734.
46. Stein GE, Guarneros SL, Hernández ME. Mecanismos celulares de la prostaglandina E1 en relación con la inducción de la destrucción ósea en ratas. *ADM* 1986;2,XLIII:2-8.
47. Stephen W. Chung, Barbara Gould and Reginald Gorczynski. The role of ICAM-1 in the induction of antigen-specific T cell hyporesponsiveness. *Immunology Letters*, Volume 50, Issue 3, May 1996, Pages 155-159.
48. Storey E. Bone changes associated with tooth movement. A histological study of the effect of force for varying duration in the rabbit, guinea pig and rat. *Aust. Dent. J.* 1955; 59; 209-219.
49. Takeshita A, Hanazawa S, Amano S, Matumoto T, Kitano S. IL-1 induces expression of monocyte chemoattractant JE in Clonal mouse osteoblastic cell line MC3T3-E1. *J Immunol* 1993;150:1554-1562.
50. Taşman Fügen, DDS, Ph D, Attita Dagdeviren MD, Banu, Kemdir MD Bahar Özçelik, et. al. Endothelial Cell Adhesion Molecules in Human Dental Pulp: A Comparative Immunohistochemical Study on Chronic Periodontitis. *J Endodontics*, 1999 Oct;25(10):664-67.
51. Teitelbaum SL. Bone resorption by osteoclast. *Science*. 2000; 289;1504-1508.
52. Vane J R. Inhibition of prostaglandin synthesis as a mechanism of action for Aspirin-like drug. *Nature. New Biology*. Vol

235.Jun 1971.

53. Wellington J Rody Jr, Gregory J. King and Gaoman Gu. Osteoclast recruitment to sites of compression in orthodontic tooth movement. *American Journal of orthodontics and dentofacial orthopedics*. Nov 2001: 120(5); 447-489.
54. Yamasaki K, Miura F, Suda T. Prostaglandin as a mediator of bone resorption induced by experimental tooth movements in rats. *J Dent Res* 1980; 59:1635-1642.
55. Yamasaki K, Y Shibasaki, and, T, Fukuhara. Behavior of Mast Cells in Periodontal ligament associated with experimental tooth movement in rats. *J Dent Res* 61(12): 1447-1450, Dec 1982.
56. Zaidi M, Twhidul Alam , Shankar VS, Bax BE, Bax CMR, Mooga BS et. Al. Cellular biology of bone resorption. *rev*;1993;689:197-264.