

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO.

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

*EFECTO DEL NÍMULO EN LOS OSTEOCLASTOS
FORMADOS EN RESPUESTA A UN ESTRÉS MECÁNICO.*

TESIS QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

CIRUJANO DENTISTA

PRESENTA:

ERICA HATTORI HARA

TUTOR: MTRO. JOSE FRANCISCO GOMEZ CLAVEL



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.

*En memoria de Dr. Roberto Hara,
un corazón de roble
a obachan Tokumura, un sabio .*

*Y dedicada de todo corazón
a la Sra. Francisca Ortiz de Hara,
un gran ejemplo de vida...*

*La ciencia nos enseña a no pasar nada por alto, a no despreciar los
comienzos pequeños....
porque lo pequeño suele contener lo grande en sí,
como lo grande contiene lo pequeño.*

Michael Guillen.

AGRADECIMIENTOS

Un especial agradecimiento a mis padres y a mi hermana, sin los cuales nunca hubiese podido llegar hasta aquí , ya que son un pilar sólido en mi formación y existencia.

*Mi veneración y cariño a la Universidad Nacional Autónoma de México,
Facultad de Estudios Superiores Iztacala.*

*A mi asesor y padre en conocimiento Mtro. José Francisco Gómez Clavel,
por tantos años de paciencia, ayuda y dedicación.*

*Al Mtro. José del Carmen Benítez, Mtra. María del Rosario González Valle, Mtra Irma
Rivera Montoya y a la Dra. Leticia Verdín, por toda su ayuda técnica, conocimientos,
paciencia y atenciones.*

*A la Dra. Elsa Calleja Quevedo,
por sus acertados comentarios, tiempo y disposición.*

*A mis sinodales: Mtro. Rene Rivera Notholt, C.D. Gerardo Rosas González, C.D.
Rossanna Senties Castilla y CD. Javier Garzón Trinidad, por sus valiosas sugerencias.*

*Mi reconocimiento a cada uno de los profesores de la odontología por guiarme en el
camino y enseñarme que todo aprendizaje trae consigo una transformación.*

*A todos los que en alguna o muchas ocasiones me han brindado su amistad y a todas las
personas que ayudaron para la elaboración de esta tesis.*

*Por último y no por eso menos importante, al C.D. Takeshi Saiki Ramos, por su apoyo
incondicional, gracias...*

ÍNDICE GENERAL.

Resumen	6
Abstract	7
CAPÍTULO I	
Introducción	8
1.1 Justificación	11
1.2 Marco Teórico	12
1.2.1 Metabolismo óseo	12
1.2.2 Células del Hueso	12
a) Osteoblastos	12
b) Osteocitos	13
c) Osteoclastos	14
1.2.3 Mecanismos de Remodelado Óseo.....	15
a) Un nuevo sistema de señales entre las células óseas	15
a) RANK-L/OPG-L/ODF/TRANCE: EL LIGANDO	16
b) RANK: EL RECEPTOR.....	17
c) OPG: EL RECEPTOR SEÑUELO	17
d) Agentes que regulan el sistema RANKL/OPG/RANK	18
1.2.4 Factores reguladores del metabolismo óseo	19
1.2.4.1 Mediadores químicos	19
a) Parathormona	19
b) Vitamina D	19
c) Calcitonina	20
d) Citocinas.....	20
e) Leucotrienos	21
f) Prostaglandinas	22
1.2.4.2 Efecto de las prostaglandinas en el movimiento dental.....	22
1.2.5 Bases Biológicas de la Terapia Ortodóncica	23
1.2.6 Control Biológico del movimiento dental. La teoría de la piezoelectricidad (bioeléctrica)	25

1.2.7 Teoría de la presión-tensión.....	26
1.2.8 Analgésicos Antiinflamatorios no esteroideos	
1.2.8.1 Mecanismos de acción	27
1.2.8.2 Nimesulide.....	28
1.2.9 El crecimiento de la célula, su diferenciación y su muerte.....	31
1.2.9.1 Apoptosis.....	31
 CAPÍTULO II	
Objetivos.....	34
 CAPÍTULO III	
Hipótesis.....	34
 CAPÍTULO IV	
Materiales y Métodos	35
4.1 Metodología de investigación.....	35
4.2 Variables	35
4.3 Aparatología ortodóncica.....	35
4.4 Técnica de rutina	37
4.5 Técnica de Hematoxilina y Eosina	38
4.6 Tinción de TRAP	39
 CAPÍTULO V	
Resultados.....	42
 CAPÍTULO VI	
Discusión.....	48
 CAPÍTULO VII	
Conclusiones	50
 Bibliografía	51
Anexo	60

RESUMEN

El remodelamiento del hueso alveolar por los osteoclastos, marca el inicio del movimiento ortodóncico. Una mayor comprensión del fenómeno de reclutamiento osteoclástico en los sitios de compresión mecánica durante el movimiento ortodóncico, puede tener un impacto en la eficiencia del mismo. Los osteoclastos reciben mensajes locales y sistémicos y el resultado es la resorción ósea. Muchos de estos mensajes involucran neurotransmisores, nucleótidos cíclicos, hormonas, citocinas, prostaglandinas, etc. Está demostrado que la remodelación ósea, inducida por fuerzas ortodóncicas, es mediada por las prostaglandinas (PGs).⁶⁶ Las PGs, disminuyen el periodo de formación del remodelado óseo en el sitio de presión en el movimiento dental y el uso selectivo de periodos de activación y resorción es particularmente importante en la ortodoncia contemporánea. La diferenciación y la activación de estas células es controlada, al menos en parte, por la influencia del contrabalance del ligando de la osteoprotegerina (OPGL) y la osteoprotegerina (OPG).²²

Los fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINEs) han demostrado que inhiben la pérdida ósea *in vivo* y la resorción ósea *in vitro*, y ésta se asocia con la disminución de los osteoclastos sobre la superficie ósea. La OPG también inhibe el efecto estimulador de la prostaglandina E2 (PGE2) en la adhesión osteoclástica al hueso.²²

El Nimesulide ha demostrado tener potencia similar o mayor que la indometacina, el diclofenaco, el piroxicam y el ibuprofeno en modelos de animales con inflamación. Es un inhibidor relativamente débil de prostaglandina que parece expresar sus efectos a través de una variedad de mecanismos incluyendo la búsqueda de radicales libres, los efectos en la liberación de histamina, inhibición de la mieloperoxidasa neutrófila, liberación del factor de necrosis tumoral α , la síntesis de la metaloproteasa y la agregación de plaquetas entre otros.²⁵

El objetivo de este estudio es el de evaluar la influencia del nimesulide, en el número de osteoclastos previamente formados por el estímulo de un estrés mecánico en un modelo de rata. Se utilizaron 42 ratas machos jóvenes (Wistar albino), con un peso entre 250 + - 25g, que se distribuyeron al azar en 3 grupos experimentales y en uno de control. En el día cero se les colocó un resorte en U para estimular la formación de osteoclastos, Las ratas se dividieron al azar en 4 grupos. Grupo I el medicamento fue administrado a las 72hrs después de haberse colocado el aparato; el grupo II el medicamento fue administrado a las 0, 24, 48, 72hrs después de haberse colocado el aparato; el grupo III el medicamento se administro a las 48, 72hrs después de haberse colocado el aparato y el grupo IV

sirvió como grupo control con aparatología, todos los animales de los grupos experimentales fueron sacrificados a las 96 horas, se les disecó el maxilar superior que se descalcificó con EDTA, se incluyeron en parafina para obtener cortes seriados de 6µm que fueron teñidos con hematoxilina-eosina, y con la tinción de TRAP para identificar osteoclastos y células TRAP positivas.

Resultados. Todos los grupos a los que se le aplicó el nimesulide independientemente del número de dosis mostraron una reducción significativa en el número de osteoclastos previamente formados. El nimesulide inhibió el número de células TRAP+ en el modelo de la osteoclastogénesis inducida por estrés mecánico de manera proporcional al número de dosis.

ABSTRACT.

The presence of osteoclasts at locations of alveolar bone remodeling is antecedent to orthodontic tooth movement. A better understanding of osteoclast recruitment to compression sites in orthodontic tooth movement could have a profound impact on the efficiency of each movement. The osteoclast receives local, and systemic messages and the resulting bone resorbing activity of the cell is the integration of these various messages. Several messages involves neurotransmitters, cyclic nucleotides, hormones, cytokines, and prostaglandin, etc. Bone remodeling, induced by orthodontic forces, has been suggested to be mediated by prostaglandins (PGs). Studies of factors such as prostaglandins (PGs) that decrease the formation period of bone remodeling, on the pressure side of the moving tooth and selectivity use activation, and resorption periods for efficient bone resorption are considered to be of particular significance to contemporary orthodontics. The differentiation and activation of this cell is controlled, at least in part, by the counterbalancing influences of osteoprotegerin ligand (OPGL) and osteoprotegerin (OPG).²²

Nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) have been seen shown to inhibit bone loss *in vivo* and bone resorption *in vitro*, and this is associated with a loss of osteoclasts from the bone surface. The OPG also inhibited the stimulatory effect of prostaglandin E2 (PGE2) on osteoclast adhesion to bone.²²

In the group of the NSAIDs we can find the Nimesulide which has exhibited potency similar to or greater than that of indomethacin, diclofenac, piroxicam and ibuprofen in standard animal models of inflammation. Nimesulide is a relatively weak inhibitor of prostaglandin that appears to exert its effects through a variety of mechanisms including free-radical scavenging, effects on histamine release, the neutrophil myeloperoxidase pathway, tumour necrosis factor- α release, metalloprotease synthesis, the platelet aggregation and others.²⁵

The purpose of this study was to estimate the influence of nimesulide on the number of osteoclasts previously formed by a mechanic force on an experimental rat model . Forty two male *Wistar-albino* rats with an average weight of 250+ - 25g, were used in this study. The orthodontic appliance was an U spring, applied at day 0 to stimulated the osteoclast formation. The rats were randomly divided into 3 study groups and one control group. Group I the nimesulide was administered at 72 hrs after the orthodontic appliance was placed; Group II the drug was administered at 0, 24, 48,

72 hrs after the appliance was placed; Group III the treatment were administered at 48, 72 hrs after the appliance was placed and the group IV was the control group with appliance. The rats were decapitated, and maxillae were removed. They were fixed by 1% paraformaldehyde, demineralized in EDTA solution and embedded in paraffin. Six- μ m thick serial sections were cross-sectioned and stained with haematoxylin-eosin, and with TRAP for the identification of osteoclasts and +TRAP cells.

Results. All the experimental groups have reduced significantly the number of osteoclasts previously formed. The nimesulide inhibited the number of +TRAP cells in the model of osteoclastogenesis, induced by a mechanic force in a proportional way for the number of doses.

I. INTRODUCCIÓN

En los organismos multicelulares, la función y el destino de las células son reguladas por mecanismos que responden a programas genéticos, pero que pueden ser modificados por influencias ambientales. Estas células deben responder a los factores ambientales en una manera que promueva la supervivencia y la reproducción del organismo entero. Los mecanismos básicos implicados en esta organización compleja e interdependiente se han conservado a través de la evolución y son notablemente similares en los organismos tan diversos como podría ser la lombriz de tierra, la mosca de fruta, ratones, y seres humanos.¹

La célula en su ciclo vital recorre tres caminos: crecimiento de la célula (división), diferenciación de la célula, y muerte de la célula (apoptosis). Aunque estos se representan como vías distintas, en realidad se interconectan. Las señales extracelulares que regulan estos comportamientos celulares caen en tres clases principales: señales solubles (hormonas y factores del crecimiento), señales extracelulares de la matriz (ECM) (ejemplo, membrana basal), e interacciones de célula a célula (uniones de Gap). Estas señales extracelulares actúan en la célula a través de los receptores específicos, que transmiten esta información a la maquinaria interior de la célula a través de caminos de señales de transducción. La célula debe alternadamente integrar estas señales complejas y responder iniciando programas de crecimiento de la célula, diferenciación, o muerte celular.¹

Entre los organismos vivos y el medio exterior existe una serie de cambios fisiológicos y es lo que nosotros llamamos metabolismo, el cual también se le puede entender como la suma de reacciones químicas llevadas a cabo por el cuerpo o una zona específica de este, por lo anterior, el metabolismo óseo se refiere a las modificaciones que sufre el hueso en su estructura orgánica e inorgánica debidas a la acción de diversos factores locales y sistémicos sobre sus componentes micro y macroestructurales, lo que dará como resultado determinadas respuestas fisiológicas que se engloban en el remodelado óseo.²

A pesar de que el hueso es uno de los materiales más duros del organismo, es también uno de los más plásticos y de los que más responden a fuerzas funcionales.² Una situación *in-vivo* en la que se puede apreciar mejor el remodelado óseo se da en los procesos alveolares luego de aplicar fuerzas mecánicas durante los tratamientos de ortodoncia, el hueso responde a la presión con resorción y a la tensión con deposición ósea. Éstos fenómenos metabólicos se llevan a cabo gracias a una serie

compleja de factores reguladores de los mismos, tal es el caso de algunos mediadores químicos, entre los que destacan las prostaglandinas, leucotrienos y citocinas; algunas proteínas, enzimas, vitaminas, minerales y hormonas también participan en este proceso, el conocimiento de éste es de suma importancia para el ortodoncista debido a que constantemente trabaja con fuerzas que inducen cambios adaptativos del hueso que soporta los órganos dentarios, que con fines fisiológicos y estéticos los están modificando, para lograr posiciones armoniosas con el objetivo final de brindar al paciente un tratamiento óptimo que satisfaga sus necesidades.³

O'Brien (2001) escribe que también hay otros fines por los que fuerzas remodeladoras se llevan a cabo en el hueso, como es la necesidad de crecer y el de servir como depósito de reserva de minerales. Para realizar estas funciones, las células osteoblásticas han desarrollado complejos mecanismos de regulación.²²

Parte de estos mecanismos involucran a la proteína osteoprotegerina (OPG; también conocida como OCIF) y su ligando (OPGL; también conocida como ODF, TRANCE Y RANKL). La OPG es una glucoproteína secretada que pertenece a la familia de receptores del factor de necrosis tumoral (TNF). Este es producido en varios tejidos incluyendo al hueso e inhibe la diferenciación osteoclástica y la resorción ósea. La homeostasis del hueso esta dada por la actividad de las células del linaje osteoblástico y osteoclástico.²²

Con respecto al proceso del movimiento dental ortodóncico Yamasaki en 1980, indica que este es el resultado, de una respuesta biológica del tejido periodontal, al aplicar una fuerza mecánica y Roberts (1994) enfatiza, que el papel de los osteoclastos en la resorción ósea es un factor determinante, en el movimiento dental⁴.

Los osteoclastos son células de origen hemapoyético,⁵⁻⁷ que se caracterizan por su gran tamaño y por ser multinucleadas. Esta célula se encuentra usualmente, adherida a la matriz calcificada que se está reabsorbiendo. La zona de contacto con la matriz, esta altamente especializada para la función que esta célula tiene. Un anillo de proteínas contráctiles⁸, permite una interacción muy cercana entre la membrana y la matriz ósea, que forma un compartimiento sellado, donde la resorción ósea ocurre.³ El citoplasma tiene frecuentemente un aspecto “espumoso” y la membrana tiene procesos extensos los cuales ocasionalmente unen el espacio entre el osteoclasto y el hueso en resorción. Estos procesos junto con algunas hebras de colágena comprenden lo que aparenta ser un “borde de cepillo”. En fotografías

secuenciales de osteoclastos en cultivos de tejido, las extensiones del borde de cepillo de los osteoclastos corresponden a una membrana con pliegues con actividad ondulante.⁹

Varios autores proponen que el remodelado óseo, inducido por fuerzas ortodóncicas, está mediada por las prostaglandinas (PGs).¹⁰⁻¹⁴ Las PGs son sintetizadas y secretadas por células locales en respuesta a un estrés mecánico, han demostrado que estimulan el proceso de los osteoclastos para la resorción ósea.¹⁰ Las PGs son productos de la conversión del ácido araquidónico a través de la vía de la ciclooxigenasa¹⁴ y se forman por transformación de ácidos grasos no saturados.¹¹

Las PGs de la serie *E* y *F*, derivadas del ácido araquidónico, participan en la resorción ósea, disminuyen la síntesis de colágena y aumentan los niveles del monofosfato de adenosina cíclica (AMPC).¹⁵ En las últimas dos décadas, numerosos investigadores, han estudiado la relación que existe entre las PGs y el movimiento dental¹⁵ y por medio de estudios experimentales en animales se ha encontrado que el índice del movimiento dental aumenta significativamente al inyectar PGs.^{12,13,16} 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 mineralización¹⁷, así como la formación de hueso *in vitro*.¹⁸⁻¹⁹ En contraste, las PGs son potentes estimuladores de la resorción ósea en cultivo de órganos²⁰ y resorción ósea^{10,21}, en particular las prostaglandinas E1, E2 e I debido a que estimulan la formación de osteoclastos.

Entre los inhibidores de las prostaglandinas se encuentran fármacos que han demostrado ser eficaces en la inhibición de la inflamación. Los antiinflamatorios no esteroideos (AINEs) son ácidos orgánicos débiles que inhiben la inflamación y la biosíntesis de PGs, al actuar sobre la ciclooxigenasa involucrada en el metabolismo del ácido araquidónico presente en los fosfolípidos de la membrana de la célula.²³ Los AINEs inhiben la expresión de moléculas de adhesión, durante la respuesta inflamatoria, la expresión de estas moléculas en células endoteliales y en los leucocitos, son necesarias para que realice la quimiotaxis que conduce a la acumulación de células características del infiltrado inflamatorio en el sitio lesionado.²⁴

El Nimesulide es un fármaco derivado de las sulfonamidas, con propiedades anti-inflamatorias, antipiréticas y analgésicas. Sus efectos terapéuticos son el resultado de su habilidad para inhibir la síntesis de la prostaglandina, inhibiendo la vía de la ciclo-oxigenasa.²⁵

Justificación

Al realizar el movimiento dentario es necesario la formación de osteoclastos para inducir el remodelado óseo, por lo que es importante el conocimiento sobre los osteoclastos activos, describir los mecanismos y las señales que inducen la formación de estas células, así como su funcionamiento y el efecto de fármacos en la regulación de la actividad osteoclástica que faciliten la resorción ósea y acorten la duración del tratamiento ortodóncico; por otro lado, una vez retirada la aparatología ortodóncica esperamos la mineralización de la matriz ósea alveolar y ya no la formación de osteoclastos que pudieran participar en un nuevo remodelado óseo que nos lleve a movimientos dentarios no deseados, por lo que sí los anti-inflamatorios no esteroides inhiben la formación de osteoclastos podrían ser utilizados en la fase de retención y disminuir la recidiva.²⁷

En algunos casos durante el tratamiento ortodóncico o como secuela del mismo se presenta resorción radicular y muchas veces ésta llega a ser tan severa que el resultado del tratamiento se puede ver comprometido dando un mal pronóstico de la longevidad de los dientes. El uso de los AINEs podría utilizarse para tratar estos casos.

La actividad osteoclástica acompaña a diferentes estados patológicos como la osteoporosis y las metástasis óseas, por lo que es importante estudiar el efecto de fármacos que inhiben la reabsorción ósea, por lo que el modelo de inducción de formación de osteoclastos mediante la aplicación de una fuerza mecánica puede ser utilizada para conocer *in vivo* el efecto de diferentes fármacos en el comportamiento de las células del linaje osteoclástico.

1.1 Marco Teórico

1.2.1 Metabolismo óseo. El tejido óseo es metabólicamente muy activo, el resultado de esta actividad se refleja tanto en el recambio de sus componentes inorgánicos y orgánicos, a sí como su interacción. Éste se puede categorizar en tres componentes microestructurales: *células* (osteoblastos, osteocitos y osteoclastos), *matriz orgánica* (se compone de un 90% de colágeno tipo I, que confiere al hueso su gran resistencia a la tensión, el resto es un medio gelatinoso homogéneo llamado sustancias fundamentales, que está compuesta de líquido extracelular más 25% de proteoglicanos –osteonectina-, una fosfoproteína –osteopontina-, sialoproteínas, además de condroitín-sulfato y ácido hialurónico que ayudan a controlar el depósito de sales de calcio) y *matriz inorgánica* (formas primarias de Calcio y Fosfato). Las sales cristalinas que se depositan en la matriz orgánica del hueso están compuestas principalmente por Calcio y Fosfato en forma de cristales de hidroxapatita, aunque también existen iones de Magnesio, Sodio, Potasio, Estroncio, Flúor, Berilio, Cadmio y Carbonato, el conjunto de sales forman aproximadamente el 70% del peso húmedo del hueso.²⁸

El hueso es el principal componente del esqueleto adulto por lo que posibilita la acción mecánica de la musculatura, protege órganos vitales y alberga la médula ósea hematopoyética. Posee una resistencia a la tensión similar a la del hierro pero es tres veces más ligero y diez veces más flexible. La matriz ósea es la responsable de las extraordinarias propiedades biomecánicas del hueso. Las fibras colágenas le proporcionan flexibilidad y resistencia a la tensión mientras que las sales minerales le confieren dureza, rigidez y resistencia a la compresión.²

1.2.2 Células del Hueso.

a) Células Osteoblásticas. Las células a las que se debe la mineralización del hueso son los osteoblastos, células de origen mesenquimatoso cuya función primaria es la formación de una matriz mineralizable. Los osteoblastos provienen de la misma rama que los condroblastos, mioblastos y fibroblastos.²⁹⁻³²

Los osteoblastos son células postproliferativas, cuboidales, no sufren división celular, son positivas a la fosfatasa alcalina y las encontramos cubriendo la matriz ósea en los sitios de activa producción ósea. Los osteoblastos también pueden ser reconocidos debido su habilidad para sintetizar macromoléculas específicas de fenotipo o asociadas, incluyendo las proteínas de la matriz ósea como

son: la osteocalcina, la sialoproteína ósea y la osteopontina, ciertos receptores para hormonas y citocinas y factores de crecimiento. El papel fisiológico de la fosfatasa alcalina es incierto, pero se ha hipotetizado que esta involucrado en el proceso de mineralización.³²

El osteoblasto produce la colágena y la sustancia de crecimiento del hueso, extendidas en la superficie de la nueva matriz formada. Esta función explica el alto contenido celular de la maquinaria sintética de proteína (retículo endoplasmático rugoso) y de la mitocondria ya que el proceso sintético requiere grandes cantidades de energía.³²

Ocasionalmente algunos osteoblastos que están produciendo nueva matriz, se ven rodeadas por esta, en vez de permanecer en su acostumbrada posición, a lo largo del borde de la matriz. El osteoblasto encerrado es ahora llamado osteocito y reside en una pequeña cavidad o laguna. Este esta conectado a los vasos sanguíneos a través de un sistema de pequeños tubos, llamados canalículos, aún después de la mineralización de la matriz es rodeado por una laguna de material no mineralizado. El canalículo de una laguna individual se comunica con el canalículo de una laguna adyacente y el proceso citoplasmático del osteocito se extiende dentro del canalículo.^{33, 34}

b) Osteocito. Este es morfológicamente similar al osteoblasto, aunque el retículo endoplasmático puede no ser muy prominente y el núcleo puede aparecer pequeño. Estas observaciones probablemente indican una reducción de la síntesis de proteínas del osteocito. La aparente función del osteocito es el de mantener, a través de su proceso celular en el canalículo, abiertos los caminos del hueso para transportar nutrimentos y materiales de la sangre al hueso y de regreso. Adicionalmente, el osteocito puede estar encargado en un proceso fisiológico activo, osteolisis, por lo cual el hueso mineral se pierde y la matriz se modifica.^{35, 36} Así, el osteocito puede jugar un rol en el metabolismo del calcio, específicamente la regulación de la concentración de calcio en la sangre. Hay un halo identificable el cual rodea al osteocito vivo y presumiblemente incrementa la permeabilidad iónica. Esto ha sido llamado volumen halo y se cree que tiene un componente mineral y matriz. El volumen halo mineral puede ser el sitio de más actividad de cambio sanguíneo en el hueso y actúa más que el resto del mineral esquelético estable en la homeostasis del calcio.³⁶

Desde que el osteocito muere (necrosis), la laguna en el hueso existente puede estar vacía. El hueso sin embargo puede no requerir actividad celular para existir, aunque el hueso acelular sea probablemente reemplazado pasado un tiempo.³⁶

Se ha comprobado que una de sus funciones es la remodelación ósea, denominada en este caso “osteólisis”, no es la osteoclasia ya que esa función es de los osteoclastos, la diferencia radica en que los osteocitos son células superficiales relacionadas con hueso nuevo. Histológicamente a su alrededor existe una actividad proteolítica localizada, además de la desmineralización de la matriz alrededor de la laguna con aparición de productos de degradación en el espacio perilagunar, aportando así pruebas que confirman la osteólisis. Además de su actividad en la resorción; el osteocito joven puede participar en la formación de matriz, aunque menos marcada que en los osteoblastos, esta capacidad disminuye al envejecer la célula.³⁶

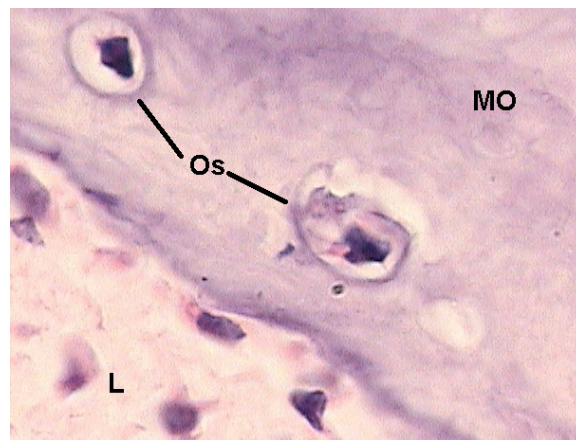


Foto1. Foto tomada con un objetivo de 40x. Osteocito (Os) observese que esta dentro de una laguna, estan rodeados por Matriz ósea (MO), Ligamento peridontal (L).

c) Osteoclastos. Estas células, llamadas así por Kölliker (Kölliker 1873), son células multinucleadas diferenciadas que se originan de células hematopoyéticas. La teoría mejor aceptada es la que dice que los osteoclastos, están formados por la fusión de precursores mononucleados, derivados de la rama hematopoyética en la médula ósea, que aquella teoría que dice que provienen de divisiones celulares.^{7, 37-40} Los osteoclastos comparten una rama común con las células del linaje macrófago-monocítico.⁴¹⁻⁴² La diferenciación de los preosteoclastos en osteoclastos multinucleados maduros, requiere diferentes factores incluyendo estímulos hormonales y locales.^{40,43-44} Son de suma importancia las células osteoblásticas o las células del estroma de la médula ósea, para la diferenciación osteoclástica. Uno de los factores producidos por estas células que suministran la formación osteoclástica, es el factor estimulador de colonias de macrófagos, M-CSF.⁴⁵ El Ligando del Receptor del Activador del factor nuclear Kappa-B (RANKL), conocido como TRANCE, ODF y OPGL es la señal vital³⁹ a través del cual las células del estroma/osteoblásticas estimulan la formación osteoclástica y la resorción vía el Receptor RANK (TRANCER) localizado en los osteoclastos.⁴⁶⁻⁴⁸

1.2.3. Mecanismos del Remodelado Óseo. Una vez alcanzada la masa ósea máxima, lo cual ocurre hacia el fin de la tercera década de la vida, el mantenimiento de la misma depende de un complejo y equilibrado proceso de remodelación ósea, con sus dos fases fundamentales: la resorción (que dura cerca de 3 semanas por sitio), comandada por los osteoclastos, y la formación (fabricación y depósito de matriz extracelular ósea), llevada a cabo por los osteoblastos y que tarda 3 a 4 meses. En ellas intervienen numerosos factores sistémicos de naturaleza inmuno-endocrina, así como elementos de regulación local ⁴⁹.

Las células encargadas del proceso de remodelación son: los *osteoblastos* que se encargan de la formación de "hueso nuevo", y los *osteoclastos* encargados de la eliminación de "hueso viejo" (resorción). Cabe aquí mencionar que los macrófagos y fibroblastos juegan un papel importante en el control de la actividad de los osteoclastos.⁵⁰

Todo esto se halla bajo la dirección de un sistema de señales hormonales a su vez modulada por factores locales óseos que mantienen un equilibrio.⁵⁰

En la actualidad hay mucha información disponible acerca de la fisiología de la remodelación ósea, y de los factores locales y sistémicos que regulan este complejo proceso, pero aun no hay suficientes datos sobre lo que ocurre a nivel molecular. Los nuevos avances en la biología molecular han permitido descubrir los mecanismos que se desarrollan a nivel celular en el microambiente óseo.⁵⁰

a) UN NUEVO SISTEMA DE SEÑALES ENTRE LAS CÉLULAS ÓSEAS. Las células del estroma osteoblástico están esencialmente implicadas en la función y diferenciación osteoclástica a través del contacto célula-célula.⁵¹

Algunos estudios demostraron la presencia de un factor en la membrana de las células osteoblásticas, miembro de la superfamilia de ligandos del TNF (Factor de Necrosis Tumoral): el RANKL. Su producción es máxima en las células indiferenciadas del estroma y se reduce a medida que madura el fenotipo osteoblástico. Estimula la diferenciación, supervivencia y fusión de las células precursoras de osteoclastos, activa los osteoclastos maduros y prolonga su vida útil. Como resultado permite la expansión de la masa osteoclástica activa capaz de formar sitios de resorción ósea.⁵¹

Los efectos del RANKL están mediados por su unión a un receptor altamente específico: el RANK, al cual activan. Es una proteína transmembrana expresada por los osteoclastos. La unión del RANK (Receptor del Activador del Factor Nuclear Kappa-B) con su ligando (RANKL) induce la activación de una cascada de eventos intracelulares que llevan a la diferenciación y activación de los osteoclastos. ⁵¹

Se logro identificar una proteína que inhibe el desarrollo de osteoclastos: la OSTEOPROTEGERINA(OPG) también miembro de la superfamilia de receptores del TNF que funciona como un factor soluble segregado por los osteoblastos no anclados a la membrana. Actúa como receptor señuelo uniéndose al RANKL y neutralizándolo, ocupa e impide su unión con el RANK. Inhibe la diferenciación, sobrevida y fusión de los precursores de osteoclastos, bloquea la activación de los osteoclastos maduros e induce a su apoptosis. ⁵²

En resumen, para diferenciarse y madurar las células de estirpe osteoclástica deben tener contacto directo con los osteoblastos, interrelación mediante la unión de un receptor a su ligando presentes en las respectivas membranas. Si hay suficiente OPG en el medio se unirá al RANKL de los osteoblastos impidiendo su interacción con el RANK de los precursores osteoclásticos lo que frenara el proceso de funcionalización osteoclástica. ⁵²

b) RANK-L / OPG-L / ODF / TRANCE: EL LIGANDO. Todas estas diferentes siglas fueron los nombres con el que fue designado el ligando RANKL, hasta llegar al consenso general de designarlo con este ultimo nombre. ⁵³

El gen promotor de RANKL contiene elementos que responden a glucocorticoides y a vitamina D, como también al factor esencial de transcripción osteoblástica (cbfa-1). ⁵⁴

En experimentos *in vitro* el RANKL demostró estimular la diferenciación, sobrevida y fusión de células precursoras osteoclásticas para activar osteoclastos maduros y para prolongar su lapso de vida por inhibición de la apoptosis, de esta manera aumenta el pool de osteoclastos capaces de formar lagunas de resorción. ⁵⁴

Otros factores como el factor transformante beta y la PGE2 pueden cooperar con la acción del RANKL. ⁵⁴

La administración parenteral de RANKL recombinante en ratones *in vivo* provocan osteoporosis severa asociado con aumento de la actividad osteoclástica, pérdida ósea rápida y severa hipercalcemia. En contraste, ratones deficiente en RANKL tiene severa osteopetrosis, alteración de la erupción dentaria y faltas de osteoclastos maduros, indicando que el RANKL es requerido para la activación y diferenciación osteoclástica.⁵⁴

c) RANK: EL RECEPTOR. El efecto del RANKL esta mediado por la unión a su receptor específico RANK que provoca activación y diferenciación osteoclástica. Esta es una proteína transmembrana de 616 aa., su expresión esta limitada a los osteoclastos, células B y T, células dendríticas y fibroblastos. La activación del RANK induce la osteoclastogénesis *in vitro*. En modelos *in vivo* la presencia de RANK es esencial para la diferenciación y activación osteoclástica. Ratones transgénicos con sobreexpresión de RANK exhiben un fenotipo osteopetrotico y descienden la osteoclastogénesis.⁵⁴

La expresión del RANK sobre células osteoclásticas es estable y con una pequeña regulación por agentes osteotrópicos, a diferencia del RANKL y de la OPG que están regulados por múltiples factores.⁵⁴

d) OPG: EL RECEPTOR SEÑUELO. La OPG o factor inhibidor de la osteoclastogénesis es un nuevo miembro de la superfamilia de receptores del TNF. No tiene dominio transmembrana. Es un péptido de 401 aminoácidos. A diferencia del RANKL y el RANK cuya expresión es restringida, la OPG es expresada en altas concentraciones por una variedad de tejidos y tipos de células. En hueso, la OPG es principalmente producida por células de la línea osteoblástica, con aumento de la producción en células más diferenciadas.⁵⁶

La OPG es un receptor señuelo, actúa neutralizando el RANKL. *In vitro* la OPG inhibe la diferenciación, supervivencia y fusión de las células precursoras osteoclásticas, bloqueando la activación de osteoclastos maduros e induciendo su apoptosis.⁵⁷

La sobre expresión de OPG en ratones transgénicos es asociado con severa osteopetrosis, similar a lo que sucede en ratones sin RANK y sin RANKL. En contraste, la disminución de la expresión de OPG se asocia a severos cuadros de osteoporosis, aumento de la actividad osteoclástica, así como también calcificación arterial severa, lo que indica el papel protector de la osteoprotegerina en el sistema vascular.⁵⁷

La administración parenteral de OPG recombinante en roedores normales produce aumento de la masa ósea y previene la pérdida ósea inducida por ovariectomía sin los efectos colaterales esqueléticos y extraesqueléticos. Esta acción también es mediada por la leptina, una proteína que es secretada por la masa grasa corporal, pues estimula la producción de OPG ⁵⁵

e) AGENTES QUE REGULAN EL SISTEMA RANKL/OPG/RANK. Muchas de las hormonas reguladoras del Ca⁺⁺ y citocinas, incluyendo vitamina D3, PTH, PGE2 e IL-11 actúan estimulando la osteoclastogénesis a través de la doble acción de inhibir la producción de osteoprotegerina y estimulando la producción de RANKL, al igual que los glucocorticoides.⁵⁸ En el otro extremo están los estrógenos que actúan inhibiendo la producción de RANKL. ⁵⁶

La producción de OPG es estimulada por las citoquinas proinflamatorias, IL 1 , IL 11, FNT á y â, TGF â, estrógenos y Ca⁺⁺. Mientras que disminuye por la PG E2, GCC, Calcitriol y PTH.⁵⁷

Si bien RANKL y OPG están regulados por varios factores (ver tabla 1), la expresión de RANK sobre células osteoclásticas se basa en ser estable con una pequeña regulación por agentes osteotrópicos.⁵⁷ Como siempre, en el sistema inmune la expresión de RANK en células T está regulada en más por la IL 4 y el TGF-β, la expresión de RANK en células dendríticas es regulada en menos por el ligando CD 40.⁵⁴

FACTOR	RANKL	OPG
CALCIO	estimula	estimula
PARATHORMONA	estimula	inhibe
CALCITRIOL	estimula	inhibe
PROSTAGLANDINA E2	estimula	inhibe
GLUCOCORTICOIDES	estimula	inhibe
ESTROGENOS	estimula	estimula
FACTOR TRANSFORMANTE â	inhibe	estimula
INTERLEUKINA-1á	estimula	estimula

INTERLEUKINA-1 α	estimula	estimula
INTERLEUKINA 6	estimula	
INTERLEUKINA 11	estimula	estimula
FACTOR DE NECROSIS TUMORAL α	estimula	estimula
FACTOR DE NECROSIS TUMORAL β		estimula

Tabla 1. Acción de los diferentes agentes sobre la regulación de RANKL y OPG en células de la estirpe osteoblástica.

1.2.4. Factores Reguladores del Metabolismo Óseo.

1.2.4.1 Mediadores químicos (Factores Generales).

a) La PTH (Parathormona) se secreta por las glándulas paratiroideas y es importante para el mantenimiento de la calcemia. Esta hormona aumenta la resorción ósea, aumenta la reabsorción tubular renal de calcio, y aumenta la absorción intestinal de calcio estimulando la síntesis renal de 1,25-vitamina D; por lo tanto aumenta la calcemia. Su secreción aumenta cuando desciende la calcemia y disminuye cuando esta aumenta.⁵⁹

Parte del efecto de la PTH sobre sus órganos blanco es mediado por el mecanismo del Monofosfato de Adenosina Cíclico (AMPc), en pocos minutos, tras la administración de PTH, la concentración de AMPc aumenta en los osteocitos, osteoclastos y otras células blanco. A su vez, este AMPc probablemente es responsable de funciones como la secreción de enzimas y ácidos por los osteoclastos para provocar la reabsorción ósea. Por lo anterior, se puede establecer que es muy importante para la regulación de los movimientos dentales después de aplicar fuerzas ortodóncicas.⁵⁰

b) La Vitamina D es producida principalmente por la piel. En la piel se sintetiza por la acción de la luz solar sobre el 7-dehidrocolesterol; pero debe transformarse en 1,25-vitamina D, para ejercer actividad biológica. Esta transformación se produce principalmente en el riñón por estímulo de la PTH. Produce un aumento en la absorción intestinal de calcio, manteniendo los niveles normales de calcemia contribuyendo a la normal mineralización del hueso.⁵⁰

c) La Calcitonina es una hormona secretada por las células C de la glándula tiroides. Su secreción se estimula por varios factores, entre ellos el aumento de la calcemia. Sus efectos predominantes son el descenso de la resorción ósea y de la reabsorción tubular renal de calcio.⁵⁰

Otras hormonas actúan sobre el metabolismo del calcio y del hueso, como los esteroides gonadales y suprarrenales, la tiroxina, la insulina y la hormona del crecimiento, aunque, a diferencia de las hormonas calciotropas, su secreción no depende principalmente de la concentración extracelular de calcio.⁵⁰

La concentración de las hormonas que regulan el metabolismo del calcio determina la dirección del recambio óseo, pero los factores locales modulan el efecto final y, a su vez, modifican la concentración de las hormonas y la respuesta biológica a nivel de los osteoblastos y los osteoclastos.⁵⁰

d) Citocinas. Son mediadores bioquímicos locales polipeptídicos secretados por células mononucleares que pueden interactuar directa o indirectamente (afectando otras células vecinas) con las células óseas. Son proteínas solubles que controlan la actividad del sistema inmunitario.⁶¹

La IL-1 es una citocina producida por una gran variedad de células pero de manera principal por los macrófagos, es considerada un importante mediador de la inflamación, ya que se encuentra en los sitios inflamatorios y es capaz de inducir muchos de los signos característicos de la respuesta inflamatoria. La IL-1 es también una importante macromolécula que permite la vinculación del sistema neuroendocrino con las respuestas inflamatoria e inmunitaria. Es también un potente estimulador de la resorción ósea en modelos de cultivo de órganos.⁶¹

La IL-1 tiene también efectos en la actividad osteogénica que ocurre en cultivos de hueso, así como en los cultivos de osteoblastos. La IL-1 estimula la proliferación de osteoblastos así como la síntesis de DNA. El efecto en la síntesis de colágena es bifásico, produciendo estimulación de la producción de colágena a dosis bajas e inhibiendo la síntesis de esta proteína fibrosa a dosis alta o después de la exposición por tiempos prolongados. Ya que la IL-1 estimula tanto la resorción como la formación ósea *in-vitro* la posibilidad de que la citocina pueda tener un papel importante en el acoplamiento en las funciones de los osteoclastos y osteoblastos es un indicador de que la IL-1 estimula

la resorción ósea a través de estimular en primer lugar los osteoblastos. Cuando se aplica una fuerza ortodóncica se induce la síntesis de IL-1 β por las células de los tejidos periodontales.⁶¹

La IL-6 es una citocina involucrada en la regulación de la respuesta inmunitaria, respuesta de fase aguda y en la hematopoyesis y al igual que la IL-1 la fuente principal es el linaje monocito-macrófago y participa modificando el metabolismo óseo en los procesos de remodelación, resorción y aposición ósea. Estimula la formación de osteoclastos y la actividad de resorción ósea de los osteoclastos preformados. Se ha demostrado su presencia en el periodonto sometido a fuerza ortodóncica.⁶¹⁻⁶⁵

Algunos autores mencionan que las citocinas evocan la síntesis y secreción de PGs a través de su célula blanco.⁶⁶

Se ha especulado que la PTH actúa a través de la estimulación rápida de la expresión del gen osteoblástico IL-6 por lo que la citocina estimula la reabsorción.⁶⁷

e) Leucotrienos (Lts). Son los productos finales de la vía de la lipooxigenasa, tienen acciones parecidas a las de la histamina como la inducción de aumento de la permeabilidad vascular. Están muy relacionados con las PGs ya que sus niveles se modifican en presencia de éstas, durante el movimiento dental ortodóncico, y son producidos en los tejidos periodontales, por la conversión de ácido araquidónico por medio de la vía de la lipoxigenasa. La inhibición de la síntesis de LTs combinada con estrés mecánico, bloquea la reabsorción ósea.⁷¹

Existen muchos mecanismos a través de los cuales los leucotrienos pueden afectar el movimiento dental. Los productos de la lipooxigenasa se han involucrado con la mediación de una respuesta inflamatoria. Se ha sugerido a la inflamación como un factor importante en la iniciación de la respuesta de remodelación ósea inducida por los movimientos ortodóncicos, por lo tanto, la inhibición de leucotrienos puede dar como resultado una respuesta de remodelación ósea más débil vía inhibición de una respuesta inflamatoria.⁷¹

Los leucotrienos en combinación con las PGs pueden tener aplicación clínica futura que puede resultar en el aumento del movimiento dental.⁷¹

f) Prostaglandinas. Las PGs se sintetizan prácticamente en todos los tejidos corporales, son ácidos grasos insaturados, de 20 carbonos, que tienen un anillo de ciclopentano. Son productos de la conversión de ácido araquidónico a través de la vía de la ciclooxygenasa, la cual puede ser inhibida por el grupo de fármacos que en general se denominan Antiinflamatorios no esteroideos (AINEs) y entre los cuales están la aspirina, la indometacina, el ibuprofeno y el Nimesulide.⁵⁹

Existen distintos tipos de PGs, que difieren en el grado de saturación del anillo y en la cadena alifática lateral. Las PGs del grupo F tienen un hidroxilo en la posición 9 y las E un grupo cetona. En la cadena alifática se encuentra un número variable de enlaces dobles, y tomando en cuenta esta característica se les designa como PGE1, PGE2, etc.⁵⁹

1.2.4.2 Efectos de las prostaglandinas en el movimiento dental. Las PGs son mediadores químicos que juegan un papel importante en la regulación del movimiento dental que se da en respuesta a una fuerza ortodóncica. Se dice que inhiben a osteoclastos maduros y que son inhibidas por la indometacina, pero su síntesis y secreción es inducida por las citocinas.⁶⁸

La PGE es mediadora del efecto de compresión en el osteoclasto durante el movimiento dental, induce movimiento, es potente estimulador de la reabsorción ósea, eleva el calcio sistémico, es sintetizada por los fibroblastos y puede afectar la remodelación ósea por interactuar con células óseas vecinas.⁶⁸

La síntesis de PGE (reguladora de la inflamación en periodonto) y AMPc se elevan en respuesta a la aplicación de estrés mecánico o fuerzas tensionales en cultivos de células óseas, aumentando su síntesis de ADN.¹⁵

Las PGs son usadas en ortodoncia para disminuir el período del movimiento dental. Su administración sistémica tiene un efecto más marcado en la reabsorción ósea.¹⁵

Klein y Raisz²¹ en 1970, reportaron por primera vez, que las PGs promovían la reabsorción radicular al actuar sobre los osteoclastos. Desde entonces, en todo el mundo, se ha enfocado la atención sobre sus efectos tisulares. Yamasaki, encontró en ratas, que el estrés mecánico producido durante el movimiento ortodóncico inducía la síntesis y secreción de PGs que estimulan la reabsorción ósea, por

lo cual Yamazaki y Shisaki¹² (1982) administraron a monos, en la encía de caninos sujetos a movimiento dental ortodóncico, PGE1 y PGE2 y observaron que lo aceleraba.

Más adelante, Yamazaki y col. demostraron en pacientes la aceleración del movimiento dental mediante la administración de PGE1 en el tejido subgingival bucocervical de los dientes. Lee examinó en ratas, los tejidos de molares previamente movilizadas por la administración local y sistémica de PGE1 y observó que el número de lagunas óseas y osteoclastos era mayor con la administración por vía sistémica, que cuando se aplicaba localmente.¹³

En el campo de la ortodoncia, la fuerza utilizada para movilizar los dientes causa inflamación local, durante la cual aumenta la permeabilidad vascular, se estimula la infiltración de linfocitos, monocitos, y macrófagos y se liberan las PGs. Las PGs, a su vez, activan la adenilciclasa, que induce un aumento de AMPc intracelular y éste estimula una nueva liberación de PGs. Por otra parte, la secreción de PGs aparentemente es regulada por otro mecanismo de retroalimentación, ya que al alcanzar un umbral inhiben la actividad de la adenilciclasa. Se ha reportado que las PGs promueven la resorción ósea, al estimular el aumento del número y tamaño de los osteoclastos, y activan a los existentes.⁶⁹

La administración de PGs por inyección produce dolor, por lo que la administración oral de un análogo de la PGE1 (Misoprostol) se ha sugerido como una forma terapéuticamente aceptable de aumentar el movimiento ortodóncico sin producir efectos secundarios.⁷⁰

1.2.5. Bases Biológicas de la Terapia Ortodóncica. El tratamiento ortodóncico se basa en la premisa de que, cuando una fuerza es aplicada a un diente y por ende transmitida a los tejidos adyacentes, se producen modificaciones estructurales en estos tejidos que permiten el movimiento dental. Los cambios que ocurren en el tejido alveolar que rodea la raíz del diente cuando es movilizado ortodóncicamente, son los siguientes: resorción en el lado de presión del alvéolo, lo que origina el espacio necesario para el desplazamiento del diente y aposición en el lado de tensión para mantener una pared alveolar funcional, para el diente que avanza.

El hueso trabecular (esponjoso) como el cortical (compacto) crecen, se adaptan y renuevan por dos mecanismos fundamentalmente distintos: *modelado* y *remodelado*. W. Eugene Roberts (1990) y la Federación Mundial de Ortodoncia WFO (1997) establecen estos conceptos de la siguiente forma:

Modelado. El modelado del hueso comprende sitios independientes de resorción y formación que cambian la forma (configuración y/o tamaño) de un hueso. *Remodelado* óseo es una secuencia específica y acoplada de acontecimientos de resorción y formación para reemplazar hueso previamente existente. Desde una perspectiva ortodóntica, la respuesta biomecánica al movimiento dentario implica un conjunto integrado de sucesos de modelado y remodelado del hueso.⁷⁸

Yehya (1983 en Perris, 1971 y Sutherland, 1969) encontró que varios estímulos afectan las células óseas. El primer estímulo o primer mensajero, puede alterar la actividad de la célula a través de la membrana plasmática. Las enzimas asociadas a la membrana plasmática, junto con los iones de calcio, actúan elevando las moléculas de monofosfato de adenosina cíclica (cAMP) y el monofosfato de guanosina cíclica (cGMP). Los nucleótidos cíclicos se caracterizan por ser los segundos mensajeros: esto es que estas moléculas convierten el efecto de la membrana en una respuesta celular. La elevación en concentraciones de cAMP alrededor del diente ortodónticamente tratado puede dar como resultado un incremento en el número de células activas en la membrana periondotal y la médula ósea.

En el primer libro americano de ortodoncia, publicado en 1880, Kingsley⁷² describió el hueso alveolar y la respuesta que tenía cuando se ejercían fuerzas externas y concluyó que el movimiento ortodóntico de los dientes era el resultado de la “elasticidad” del hueso alveolar.

En 1888, Farrar⁷³ demostró que el movimiento dental ortodóntico era el resultado de la resorción y la aposición del hueso que experimentaba un “doblamiento” a nivel del proceso alveolar.

Angle⁷⁴, en 1907, publicó que la resorción del proceso alveolar ocurría antes del movimiento dental y que este proceso era seguido por el de aposición, pero que la principal respuesta a la fuerza ortodóntica era el “doblamiento” del proceso alveolar.

Sicher y Weinmann⁷⁵, en 1944, demostraron que los dientes humanos se movían a lo largo de la vida del individuo. Ellos llamaron a éste proceso “movimiento dental fisiológico” y lo compararon con el movimiento dental ortodóntico.

Proffit⁷⁶ explicó que al aplicar una presión prolongada sobre un diente, éste se moviliza al remodelarse el hueso que lo rodea, y arrastra el aparato de anclaje. También consideró que la respuesta ósea es mediada por el ligamento periodontal (LP).

1.2.6 Control Biológico del movimiento dental

La teoría de la piezoelectricidad (bioeléctrica). Las señales que podrían iniciar el movimiento dental inducido por el estrés mecánico iniciado por una fuerza ortodóntica induce una carga eléctrica polarizada, a la cual se le denominó respuesta piezoeléctrica. La piezoelectricidad es un fenómeno observado en muchas sustancias cristalinas por el que la deformación de la estructura cristalina produce un flujo de corriente eléctrica al desplazar los electrones de una parte de la retícula cristalina a otra. Los cristales orgánicos también pueden tener piezoelectricidad (hidroxiapatita). No solo es piezoeléctrica la estructura cristalina del mineral óseo, también lo es la colágena, y los potenciales generados por la tensión en las muestras de hueso disecado puede atribuirse a la piezoelectricidad. Las señales piezoeléctricas tienen dos características: 1. Una decadencia muy rápida, aunque se mantenga la fuerza y 2. la producción de una señal equivalente de dirección opuesta cuando la fuerza deja de actuar.

Cuando se deforma la estructura cristalina, los electrones migran de un punto a otro y se observa un cambio eléctrico.⁷⁷

Los iones de los líquidos que bañan el tejido óseo vivo interactúan con el complejo campo eléctrico generado al deformarse el hueso, provocando cambios de temperatura a demás de señales eléctricas.⁷⁷ En regiones electronegativas, la formación ósea ocurre, mientras que la resorción ósea predomina en áreas electropositivas. Epker y Frost en 1965 y Zengo en 1974 realizaron estudios *in vitro* e *in vivo* donde indican áreas que describieron como predominantemente osteoblásticas con cargas electronegativas y las áreas con cargas neutras o positivas predominantemente osteoclásticas, demostrando que las fibras de colágena poseen propiedades piezoeléctricas. Se postula que el primer evento biológico ortodóntico es generado por las propiedades piezoelectricas de la matriz y también que la matriz cargada podía activar la membrana polarizada afectando los niveles de cAMP. Al parecer las corrientes piezoeléctricas podrían inducir los primeros cambios necesarios para modificar la actividad de las células del tejido óseo.⁷⁶

1.2.7 *Teoría de la presión-tensión.* Esa teoría relaciona el movimiento dentario con la producción de mensajeros químicos por las células que detectan en su membrana alteraciones producidas por cambios originados por la presión mecánica. Durante los últimos años se han presentado una gran cantidad de información sobre las moléculas que sirven como señales de la actividad de las células implicadas en

los mecanismos básicos de resorción y aposición ósea. Por lo regular se acepta que las células responden a señales de otras células y a los cambios del medio. Las señales pueden clasificarse como endocrinas, paracrinas o autocrinas sobre la base de la distancia a la cual debe actuar la señal. El control del metabolismo de las células óseas es regulado por señales endocrinas como en el caso de las hormonas parathormona y calcitonina cuyos efectos en el tejido óseo describimos anteriormente. También hay señalización paracrina y en este caso los ejemplos son las prostaglandinas, el RANK, la osteoprotegerina, las interleucinas, el TNF, aunque también algunas de estas moléculas participan mediante mecanismos de regulación autocrina, en donde la célula que libera el mensajero responde al mismo.^{76,78} Con base en la información que tenemos, la teoría de la presión-tensión esta sustentada por una gran cantidad de información por lo que la investigación actual y la de esta tesis esta dirigida a conocer mejor los mecanismos de regulación a través de mensajeros químicos que apoyan esta última teoría.^{76, 78}

1.2.8. *Analgesicos Antiinflamatorios no esteroideos*. Los AINEs se utilizan con frecuencia para el control de síntomas en las enfermedades inflamatorias. Existen cinco grupos principales de AINEs, los salicilatos, los derivados de los ácidos arilpropiónicos y acéticos, antranílicos, pirazolonas y oxicanes.⁸⁰

Diferentes agentes pueden producir disturbios en las membranas celulares, e iniciarse procesos de señalización asociados a las proteínas G, que dan como resultado que los fosfolípidos en las membranas plasmáticas de las células se hagan disponibles para las acciones de la fosfolipasa A; lo que conduce a liberar el ácido araquidónico en el área. Este se puede metabolizar en prostaglandinas, tromboxanos y prostaciclina por las enzimas de la vía de la ciclooxigenasa.⁸¹ La vía de la lipooxigenasa produce leucotrienos y ácidos hidroxiecosatetraenoicos del ácido araquidónico.⁸⁰ Los fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINEs) son de valor terapéutico debido a su capacidad de interferir con el metabolismo del ácido araquidónico y por tanto inhibir el proceso inflamatorio⁷⁹. Algunos AINEs al inhibir la expresión de moléculas de adhesión alteran la respuesta de los neutrófilos polimorfonucleares (PMN) de la inflamación no relacionada con la inhibición de las prostaglandinas.²⁴

Desde el punto de vista del desarrollo espectacular de estos fármacos es preciso establecer que su incorporación progresiva se basa en la mejoría teórica de su doble capacidad analgésica y antiinflamatoria y en la minimización de sus efectos adversos. Además, su consumo se acepta que es muy elevado y creciente, de tal forma que existe una permanente inquietud por mejorar sus

características farmacocinéticas y farmacológicas. Las indicaciones más comunes corresponden a patologías fundamentalmente óseas y musculoesqueléticas.⁸⁰

1.2.8.1. Mecanismos de acción Los mecanismos generales de acción de estas moléculas, a pesar de su relativamente débil relación química, se explican por el efecto inhibitorio que poseen sobre la actividad de las enzimas ciclooxigenasas (COX) y la correspondiente inhibición de la síntesis de prostaglandinas (PG) de las series E, F e I, 12, tromboxano A2 (TXA2) y prostaciclina (PGI2).⁸⁰⁻⁸²

Al menos, existen dos isoformas de la ciclooxigenasa (COX-1 y COX-2), con localizaciones y funciones diferentes. La COX-1 se expresa de forma constitutiva en la mayoría de los tejidos. La COX-2, cuya expresión constitutiva se ha detectado en el sistema nervioso central (SNC) y en la mucosa gástrica, tiene características de enzima inducible en otras células bajo circunstancias patológicas por el concurso de diversas citocinas y por mediadores de la inflamación.⁸²

La participación de algunas de las sustancias químicas previamente mencionadas en la patogenia de la inflamación y la capacidad potencial de inhibición de sus síntesis por los AINEs constituyen el pilar trascendental para su actividad farmacológica. La inhibición de la síntesis de prostaglandinas por los AINEs y la presencia de éstas en gran parte de los mecanismos patogénicos que cursan con la presencia de fiebre, dolor e inflamación explican su utilización terapéutica, la cual está avalada por diversos estudios experimentales tradicionales que actualmente se han ampliado de manera considerable al observar también la inhibición de otros agentes químicos mediadores que participan en el proceso inflamatorio. En este sentido es preciso considerar también la inhibición de las lipooxigenasas (modulación de los leucotrienos) y la interacción con derivados del anión superóxido.⁸²

Otros mecanismos de acción descritos en relación con la utilización de los AINEs incluyen su eventual efecto sobre la migración leucocitaria, la vía metabólica del calcio y de las proteínas G y GTP, el sistema de la adenilciclasa, la inhibición de síntesis de proteínas por los propios tejidos inflamatorios y los efectos sobre la función linfocitaria; todos estos mecanismos hipotéticos de acción de los AINEs definen las actuales vías de investigación farmacológica de estas moléculas y se acepta que no son compartidas en todos los AINEs.⁸⁴

Otro de los mecanismos propuestos para explicar el efecto de los AINEs es el de inhibir la expresión de moléculas de adhesión, durante la respuesta inflamatoria la expresión de estas moléculas

en células endoteliales como en leucocitos son necesarias para que se realice la quimiotaxis que conduce a la acumulación de células características del infiltrado inflamatorio en el sitio lesionado.²⁴

Se ha establecido que la función de los osteoclastos es modulada localmente por cambios en la concentración del Ca^{++} proveniente de la disolución de la hidroxiapatita. También el óxido nítrico producido localmente por las células endoteliales inhibe fuertemente la resorción ósea y finalmente las formas reactivas de oxígeno pueden estimular la resorción ósea estimulando directamente la actividad osteoclástica.⁸⁴

Los preosteoclastos presentan en su superficie moléculas de adhesión como la molécula intercelular de adhesión tipo 1 (ICAM-1), por lo que los anti-inflamatorios no esteroideos pueden influir en la formación de osteoclastos. El diclofenaco por ejemplo es capaz de inhibir la expresión de las moléculas de adhesión ICAM-1 y la molécula de adhesión celular 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 inhibitorio.⁸³

1.2.8.2. NIMESULIDE. Es un antiinflamatorio no esteroide (AINE) que tiene propiedades analgésicas y antipiréticas, químicamente es un análogo del grupo de las sulfonamidas. Los efectos terapéuticos del nimesulide son por el resultado de su modo de acción, que apunta hacia los mediadores dominantes del proceso inflamatorio: que son las prostaglandinas, mediadores de COX-2 (ciclooxigenasa-2), radicales libres y enzimas proteolíticas. Es un inhibidor específico de la COX-2 con solubilidad al cloroformo. Actúa como inhibidor del lanzamiento de la histamina, y reduce *in vitro* la formación del anión del superóxido por los neutrófilos activados. Puede también inhibir el lanzamiento del factor alfa de necrosis tumoral y reducir así la formación de citocinas.²⁵

Adicionalmente ha demostrado tener otras propiedades bioquímicas como la inhibición de la traslocación de la fosfodiesterasa tipo IV e inhibición de la liberación de histamina de los basófilos y las células cebadas. Además de neutralizar el ácido hipocloroso, el cual es el agente más tóxico generado por los neutrófilos durante el proceso inflamatorio.²⁵

El Nimesulide tiene un $pK_a = 6.5$ y difiere de otros AINEs en que su estructura química contiene una sulfonamida.²⁵

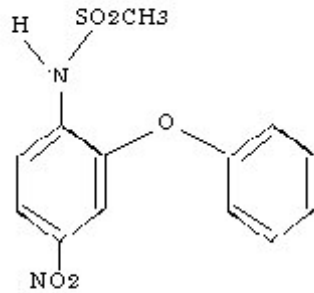


Fig.1 Estructura química del Nimesulide.

Se ha visto que el mecanismo de acción de este fármaco es más complejo de la que antes se pensaba y puede ser que interfiera con otros mediadores aparte de las prostaglandinas como son las enzimas, citocinas, factor activador de plaquetas (PAF) e histamina.²⁵

Cuando los leucocitos polimorfonucleares (PMNs) son activados en sitios de inflamación, hay un marcado crecimiento en el consumo de oxígeno el cual genera metabolitos tóxicos de oxígeno como son los aniones de superóxido, peróxido de hidrógeno y ácido hipocloroso. Aunque los radicales de oxígeno normalmente defienden al huésped contra los microorganismos que están invadiendo, una excesivo y/o inapropiada respuesta leucocitaria puede resultar en un daño tisular en los sitios de inflamación. Los radicales de oxígeno, particularmente el ácido hipocloroso, son capaces de una reacción rápida con muchas moléculas biológicas y son responsables de muchas lesiones de tejido y mediadores de la inflamación por los PMNs.²⁵

El Nimesulide reduce la generación del anión superóxido generado por la activación de los neutrófilos sin influenciar sus respuestas fagocíticas o respuestas quimiotácticas e inhibe la respiración leucocitaria a través de la inhibición de la fosfodiesterasa (PDE) tipo IV. En adicción, el Nimesulide inactiva la disponibilidad extracelular del ácido hipocloroso generada vía de la mieloperoxidasa durante el proceso fagocítico.²⁵

En el humano inhibe la fosfodiesterasa tipo IV haciendo que la liberación de histamina de los basófilos se inhiba *in vitro*.²⁵

Para encontrar el sitio de inflamación, los neutrófilos circulantes se adhieren a las células vasculares del endotelio y migran atravesando las paredes de los vasos sanguíneos en respuesta a una variedad de estímulos quimiotácticos. El factor activador plaquetario (PAF) es un importante quimiotáctico que regula el paso de los neutrófilos a través de las capas de las células endoteliales, estimula la producción de citocinas y actúa como un mensajero intercelular en la activación de eosinófilos. El Nimesulide reduce la agregación de neutrófilos, la adherencia a las células endoteliales y la producción de PAF en el estímulo fagocítico de los neutrófilos humanos.²⁵

El Nimesulide es un inhibidor relativamente débil de la síntesis de prostaglandinas *in vivo* y parece expresar sus efectos a través de una variedad de mecanismos incluyendo la búsqueda de radicales libres, los efectos en la liberación de histamina, inhibición de la mieloperoxidasa neutrófila, la actividad de la bradicinina, la liberación del factor de necrosis tumoral α , la degradación de cartílago, la síntesis de la metaloproteinasas, la inhibición de la fosfodiesterasa tipo IV, la agregación de plaquetas y la síntesis del factor activador de plaquetas. Estudios en animales han sugerido que el Nimesulide es menos ulcerogénico que la aspirina, indometacina, naproxeno, piroxicam y el ibuprofeno. Parece solamente que tiene pequeños efectos en la síntesis de prostaglandina en ratas.²⁵

El Nimesulide ha demostrado tener potencia similar o mayor que la indometacina, el diclofenaco, el piroxicam y el ibuprofeno en modelos estandarizados de animales con inflamación. La potencia analgésica del nimesulide es similar a la del ibuprofeno y menos efectiva que la indometacina en ratas.²⁵

Eficacia Terapéutica. Estudios clínicos han establecido la eficacia analgésica, anti-inflamatoria y antipirética del Nimesulide administrado por vía oral (cerca de 200mg/día) o rectal (400mg/día) en el tratamiento de una variedad de condiciones inflamatorias que cursan con dolor, y entre las que se incluyen las asociadas con la osteoartritis, los procesos oncológicos, trauma postoperatorio, lesiones deportivas, desórdenes en oído, nariz y garganta, cirugías dentales, bursitis, tendinitis, tromboflebitis, inflamación de vías aéreas altas y desórdenes ginecológicos. En estas indicaciones, el Nimesulide es más efectivo que un placebo y a dosis terapéuticas es al menos, tan efectivo como otros AINEs, incluyendo al piroxicam, ketoprofeno, naproxeno, etodolaco, ácido mefenámico, diclofenaco, y flurbiprofeno. El efecto terapéutico del Nimesulide se caracteriza por una rápida acción analgésica.²⁵

1.2.9. *El crecimiento de la Célula, su diferenciación y su muerte.* Las células reciben diversas claves de su medio ambiente a través de señales a través de las cuales las células regulan la expresión de genes que determinan si una célula en descanso debe entrar en el ciclo de crecimiento, diferenciación o muerte.⁷²

1.2.9.1 Apoptosis. La apoptosis (o "muerte celular programada") es un proceso biológico ordenado y "silencioso", que no produce ningún tipo de reacción en los tejidos, pero que resulta necesario para evitar la sobreproducción celular. Así, por ejemplo, se encuentra estimulado cuando hay células envejecidas o mutaciones neoplásicas. El proceso afecta sólo a determinadas células, no necesariamente contiguas.⁸⁶

Normalmente existe un equilibrio entre la división celular y la apoptosis, funcionando como un mecanismo esencial del mantenimiento del recambio celular en los tejidos del organismo. En este sentido se ha dicho a propósito de la apoptosis que mientras que la muerte del organismo humano es una tragedia, la muerte permanente de la mitad de sus células es esencial para su existencia.⁸⁶

La apoptosis se caracteriza por hipereosinofilia y retracción citoplasmáticas con fragmentación nuclear (cariorrhexis) desencadenada por señales celulares controladas genéticamente. Estas señales pueden originarse en la célula misma o de la interacción con otras células. La apoptosis tiene un significado biológico muy importante, que es opuesto al de la mitosis en la regulación del volumen tisular. La apoptosis contribuye a dar la forma a los órganos durante la morfogénesis y elimina células inmunológicamente autoreactivas, las células infectadas y las genéticamente dañadas, cuya existencia es potencialmente dañina para el huésped. Mientras que durante la vida embrionaria la división celular es mayor que la apoptosis, hay otros momentos del desarrollo en los que predomina la apoptosis; de esa forma es posible que desaparezcan ciertos vestigios de tejidos que de otro modo persistirían en forma de alteraciones congénitas.⁸⁷

La apoptosis se ha conocido con otros nombres: cuerpos de Councilman (hígado), cuerpos cariolíticos (criptas intestinales), cuerpos tingibles (ganglio linfático), cuerpos de Civatte (piel), cuerpos hematoxilínicos (varios)⁸⁷

Al microscopio de luz, las células apoptóticas se observan como células pequeñas, hipereosinófilas, de citoplasma redondeado u oval con o sin material nuclear basófilo. El citoplasma en fases más avanzadas aparece fragmentado, que varían de tamaño considerablemente. La cromatina

aparece como masas hiperbasófilas, densas. La fagocitosis de los cuerpos apoptóticos no induce a los macrófagos para que estimulen una respuesta inflamatoria.⁸⁵

Al microscopio electrónico, en la fase temprana hay condensación de la cromatina, para formar masas crescéticas uniformemente densas, delimitadas; el nucléolo presenta disposición periférica de la cromatina con formación de gránulos osmiofílicos hacia el centro del núcleo; el núcleo fibrilar proteico forma una masa granular compacta usualmente adosada a la superficie interna de la cromatina condensada. Los desmosomas aparecen desestructurados y estructuras de superficie como microvellosidades están desorganizadas. El volumen celular está disminuido y la densidad celular aumentada, los organelos citoplasmáticos aparecen compactos y la silueta de la célula (citoplasma y núcleo) está convoluta.⁸⁵

En la fase avanzada el núcleo se observa fragmentado y con condensación de la cromatina. En el citoplasma hay agregación de filamentos intermedios, formación de grumos de proteínas ribosomales, agrupación concéntrica de retículo endoplásmico rugoso, las células con abundante citoplasma forman prolongaciones muy prominentes. Finalmente éstas se separan para formar los fragmentos denominados cuerpos apoptóticos. *In vivo*, estos cuerpos son rápidamente fagocitados por células epiteliales adyacentes, fagocitos mononucleares e incluso células neoplásicas. Esta fagocitosis y degradación rápida pueden explicar la ausencia de inflamación en este fenómeno. Esta secuencia de alteraciones ocurre muy rápidamente: la retracción citoplasmática y la aparición de prolongaciones sucede en minutos y los cuerpos apoptóticos son digeridos en algunas horas.⁸⁵

La apoptosis ocurre en el desarrollo normal, diferenciación celular terminal, recambio celular normal en tejido adultos, pérdida celular cíclica en tejidos maduros, involución, atrofia patológica en tejidos hormono-dependientes y obstrucción mecánica, y regresión de hiperplasia, inmunidad celular, neoplasia, quimioterapia y toxinas. Se ha hablado de muerte celular programada. Esto se debe a que algunas células aparecen como programadas a morir en un cierto momento como parte de la función o desarrollo normal de los tejidos. Por ejemplo, el desarrollo embrionario (involución de órganos transitorios, conformación de órganos como en la metamorfosis, fusión de fisuras y surcos como el paladar, etc), recambio celular normal como en epidermis y maduración normal de células como linfocitos en centros germinales de linfonodos.⁸⁷

La apoptosis no presenta las fases de necrobiosis, necrofanerosis y necrolisis. Los signos morfológicos de la apoptosis son muy semejantes a los de la necrofanerosis. En la apoptosis las alteraciones nucleares representan los cambios más significativos e importantes de la célula muerta y los organelos permanecen inalterados incluso hasta la fase en que aparecen los cuerpos apoptóticos. A diferencia de la apoptosis, la necrosis es una forma de muerte celular que resulta de un proceso pasivo, accidental y que es consecuencia de la destrucción progresiva de la estructura con alteración definitiva de la función normal en un daño irreversible; este daño está desencadenado por cambios ambientales como la isquemia, temperaturas extremas y traumatismos mecánicos.⁸⁷

En la necrosis, se observan numerosas células vecinas en similares circunstancias, en estadios diferentes de desintegración, y sus causas son siempre patológicas (agentes tóxicos, traumáticos, etc.). La principal diferencia con la apoptosis es que se trata de una muerte celular accidental, con liberación del contenido celular de la célula necrótica al tejido y la consiguiente inflamación y daño tisular.⁸⁷

II. OBJETIVOS

1. Observar el efecto del nimesulide en los osteoclastos formados previamente como resultado de un estímulo mecánico en el septum Interradicular del primer molar superior de rata.
2. Observar el efecto del nimesulide dependiente de tiempo (número de dosis) en el número de células TRAP+ presentes en el ligamento periodontal de la zona del septum interradicular del primer molar de ratas sometido a estrés mecánico.

III. HIPÓTESIS

El nimesulide disminuirá el número de osteoclastos previamente formados por el estímulo de una fuerza ortodóncica (estrés mecánico), así como el número total de células TRAP+.

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Metodología de investigación.

Investigación experimental con casos y testigos.

Se utilizaron ratas machos jóvenes (Wistar albino), con un peso entre 250 +- 25 g criadas y mantenidas en el Bioterio de la FESI. Con una temperatura de 21° - 27°C, una humedad de 45 – 55% en un fotoperíodo de 12/12 horas y alimentadas *ad libitum*.

Para eliminar la variabilidad hormonal, que se presentan en las hembras debida a los ciclos reproductivos, se experimentaron en ratas macho. (Storey E.,1954).

Las ratas adultas se distribuyeron al azar en 3 grupos experimentales y en uno de control. Las dosis de la droga se escogió con base en estudios experimentales previos (Domínguez Cesar, 2002). La dosis administrada del fármaco Nimesulide fue de 2mg vía oral cada 12 horas.

4.2 Variables.

VARIABLE DEPENDIENTE

Número de osteoclastos, número de células TRAP+, vesículas fagocíticas.

VARIABLE INDEPENDIENTE

Fármaco Nimesulide

Tiempo de administración (número de dosis)

4.3 Aparatología ortodóncica.

Las ratas fueron anestesiadas utilizando Pentobarbital sódico (Anestesal) vía peritoneal (1.5 ml por kg de peso), se les colocó un aparato ortodóncico elaborado de alambre Ni-Ti de .012 de grosor y activado con una fuerza de 10g, que fue colocado entre los primeros y segundos molares maxilares de acuerdo a la técnica descrita por Igarashi y col. 1998.

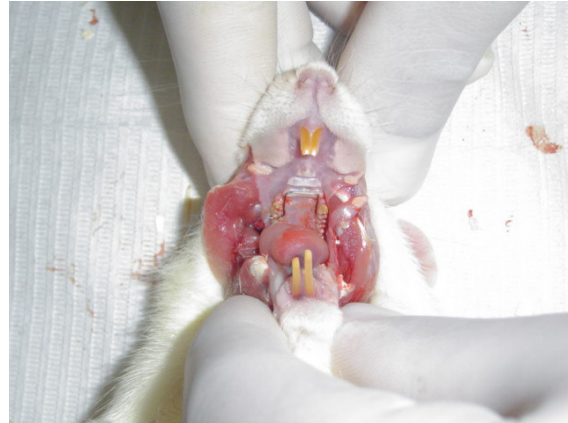
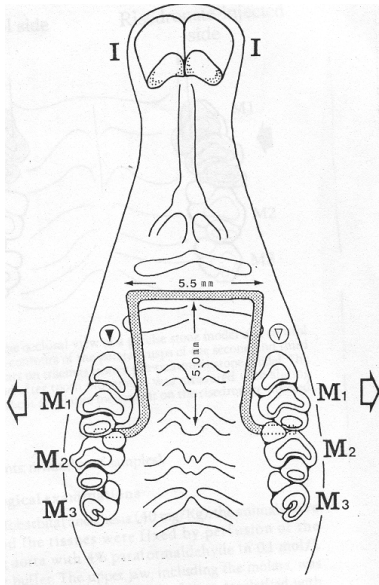


Foto 2. Resorte de Ni-Ti colocado entre el primer y segundo molar superior.

Todos los animales fueron sacrificados por sedación y decapitación a las 72, y 96 hrs. Después de la colocación de los aparatos ortodóncicos.

Una vez sacrificados los animales se disecaron los maxilares superiores y se fijaron en paraformaldehído con un buffer de fosfatos durante 48 hrs., posteriormente se descalcificaron con Ácido Etilendiaminotetracético (EDTA) a pH 7.4 durante 30 días, 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 μm que fueron teñidos con hematoxilina-eosina, y con la tinción de TRAP para identificar osteoclastos y células TRAP positivas.

La observación histológica se enfocó al septum intrarradicular de las raíces vestibulares de los primeros molares, con el propósito de contar el número de células multinucleadas con citoplasma acidófilo y adheridas al hueso (núcleos se tiñen de morado mientras que el citoplasma tiñe de rosa), aquellas que dieron positivo a la reacción de TRAP (células de color rojo) y vesículas fagocíticas dentro de los osteoclastos en un área de 400 x 800 μm . El conteo se realizó con un microscopio marca Nikon, modelo Eclipse E400 (foto3).



Foto 3. Microscópio óptico marca Nikon.

Las ratas se dividieron al azar en 4 grupos. Grupo I (n=6) el medicamento fue administrado a las 72 hrs después de haberse colocado el aparato; el grupo II (n=6) el medicamento fue administrado a las 0, 24, 48, 72hrs después de haberse colocado el aparato; el grupo III (n=6) el medicamento se administro a las 48, 72 hrs después de haberse colocado el aparato, los animales de los tres grupos anteriores fueron sacrificados a las 96 hrs, el grupo IV (n= 24) sirvió como grupo control con aparatología, 6 fueron sacrificadas a las 24 hrs, 6 fueron sacrificadas a las 48 hrs, 6 a las 72 hrs. y 6 a las 96 hrs.

4.4 Técnica de rutina.

A continuación se describirá a detalle la técnica de rutina que se utilizó para preparar las muestras y verlas al microscopio. Después de sacrificadas las ratas se utilizó el paraformaldehído (CHOH) como fijador. Por medio de la fijación se buscó evitar los procesos autolíticos de las células, para que se conservara de la manera más fidedigna posible el estado y la situación en que se encontraban en los tejidos vivos. Se pretendió con esto, prevenir los cambios post-mortem a través de la inactivación de enzimas, preservar los constituyentes celulares lo mejor posible, convirtiendo la constitución semifluida de las células en una consistencia semisólida y previniendo la putrefacción debido a bacterias y/u hongos. Se seleccionó el CHOH debido a su bajo precio, sencillez de empleo así como los buenos resultados que se obtienen con ella, ya que deja a la mayoría de los grupos activos en condiciones para reaccionar con cualquier reactivo que se tenga ocasión de emplear.

Después de la fijación de las muestras, estas se lavaron para eliminar los restos de líquido fijador que puede interferir con el proceso de deshidratación e inclusive en el de tinción. El lavado se realizó poniendo las muestras en agua corriente, esto es bajo flujo de agua de la llave por 2 hrs. Para evitar que la muestra se salga cuando este bajo el chorro del agua es conveniente usar gasa sujeta con una liga a la boca del frasco.

El tejido se deshidrató en alcohol etílico de concentración creciente desde alcohol etílico al 50% hasta alcohol etílico absoluto (con duración de 30 a 60 min).

El aclaración inicial se hizo en xilol mínimo 10 min y máximo 20 min. Posteriormente se colocaron en aceite para terminar el aclaramiento, permaneciendo en este medio por 24hrs.

Antes de la inclusión se hicieron 2 cambios de parafina (permaneciendo de 1 a 2hrs en cada una). Para la inclusión definitiva, el tejido se coloca en parafina fundida dentro de los moldes o las escuadras de Leukort y se deja enfriar a temperatura ambiente. Una vez que se han enfriado los bloques, están listos para ser cortados en el microtomo (Foto 4).



Foto 4. Microtomo LEICA RM2125RT

4.5 Técnica de Hematoxilina y Eosina

Los núcleos se tiñen de morado mientras que el citoplasma tiñe de naranja a rosa.

Se desparafinaron las muestras calentándolas a 57°C (en una estufa de cultivo Marca BG Modelo E-33 durante toda la noche) y sumergiéndolas en 2 cambios de xilol durante 10min el primero

y el segundo 15min. Se hidrataron las muestras en un tren descendente de alcoholes (100, 96, 90, 80 y 70%) hasta agua corriente.



Foto 5. Tren de tinción para HE

Se tiñó con un colorante básico que es la Hematoxilina de Harris (7 minutos) se lavó con agua corriente para virar de color carmesí a violáceo, se lavó con agua destilada, se deshidrató en alcohol ácido (10seg), se sumergió en agua amoniacal (10 seg), y se tiñó con un colorante ácido como es la Eosina (3 min).

Se continuó la deshidrataron las muestras utilizando el tren ascendente de alcoholes (80%, 90%, 96% y 100%), finalmente se aclara con 2 cambios de xilol de 3min cada uno.

Se montaron las muestras con resina sintética y se observó la tinción en un microscopio de luz, viendo los núcleos morados y el citoplasma rosado.

En esta tinción los osteoclastos se veían de un rosa más intenso y con múltiples núcleos (Aguilar, 1996)

4.6 Tinción de TRAP (Fosfatasa ácida Resistente a Tartrato)

La fosfatasa ácida, se encuentra presente en casi todos los elementos celulares hemapoyéticos, presentando una actividad específica, que se expresa de forma característica en células T-linfoblásticas ó en el linaje osteoclástico (MERCK Microscopía).⁸⁸

La fosfatasa ácida cataliza la hidrólisis de fosfatos en medio ácido a partir del Naftol de ASTR-fosfato, liberando N, N-dimetil formamida y con la aplicación de clorhidrato de pararosanilina. En el ácido tartárico se libera Naftol para dar una coloración rojiza. Las células que muestran esta enzima presentan esta coloración mientras que las células restantes un color pardo.

Los cortes histológicos se desparafinaron e hidrataron en un tren descendente de alcoholes (100%, 90%, 80%, 70% y agua destilada).



Foto 6. Tren para hidratar cortes para la técnica de TRAP.

Se prepararon las soluciones A (46 ml de Agua desionizada a 37°C, 2 ml de solución de acetato, 2 ml de Naphtol con ácido fosfórico y una cápsula con sal aceleradora “Fast Garnet GBC SALT”) y solución B (44 ml de Agua desionizada a 37°C, 2 ml de solución de acetato, 2 ml de Naphtol con ácido fosfórico, 1 ml de tartrato y una cápsula con sal aceleradora “Fast Garnet GBC SALT”) ver foto 7.

Las soluciones fueron mezcladas perfectamente con una barra magnética. Ambas soluciones fueron filtradas y mantenidas a 37°C.

La solución A se aplicó a cada laminilla hasta cubrir el tejido y se incubó por 3 minutos en cámara húmeda a 37°C. Posteriormente se enjuagó con agua desionizada y se colocó la solución B a cada laminilla a modo de cubrir todo el tejido. Se incubó durante una hora a 37 °C en total oscuridad.

Las muestras se enjuagaron en agua desionizada por 3 minutos, se dejaron secar al aire, se observaron al microscopio (Nikon eclipse E400) con un objetivo de 40X y 100X.

Se recomienda utilizar un medio de montaje acuoso, como es la glicerina o Permout® Mounting Medium (Fisher Cat.#SP15-100) ya que si se usa un medio de montaje con solvente causa desvanecimiento en las muestras.⁸⁸

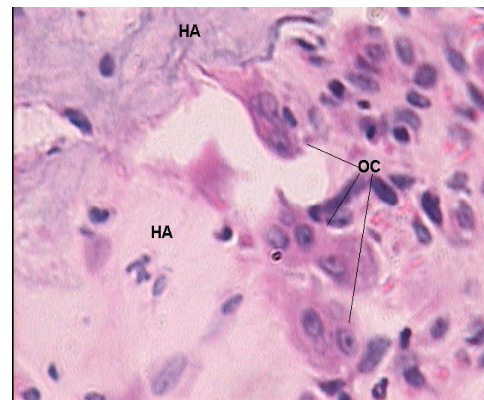
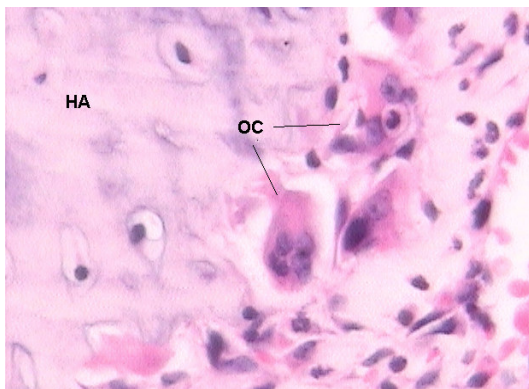
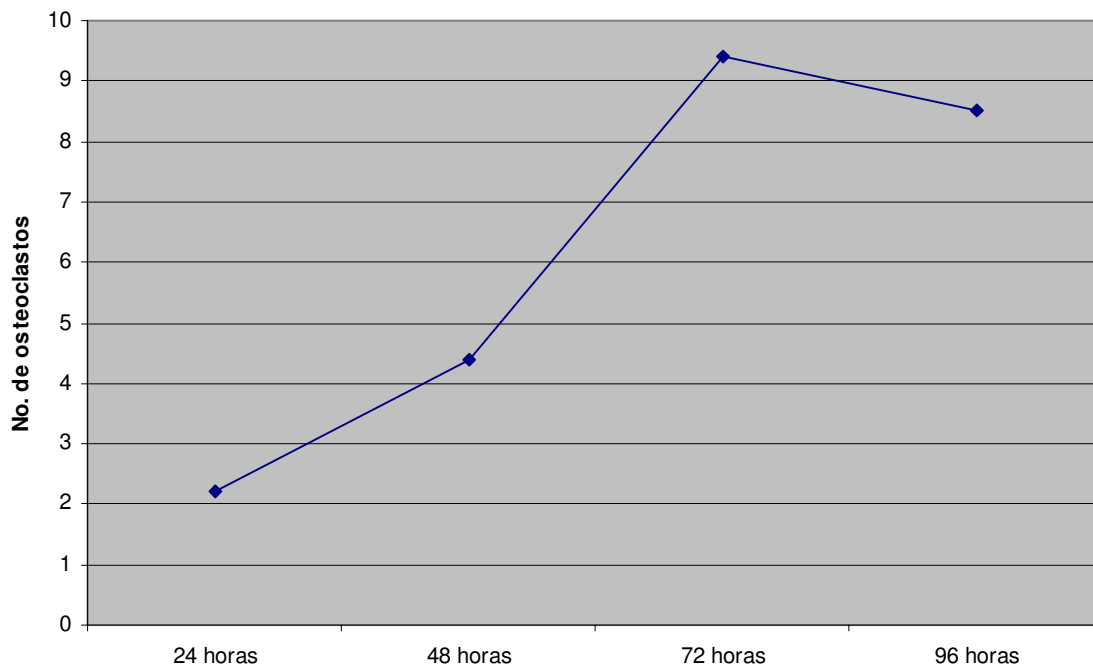


Foto 7. Kit para TRAP marca SIGMA.

V. RESULTADOS

El grupo testigo (animales con resorte y sin medicamento) tuvo un promedio de 2.2 osteoclastos a las 24 horas de la colocación del resorte; 4.4 osteoclastos a las 48 horas; 9.4 a las 72 horas y 8.5 a las 96 horas. (Fig 2). (Fotografía 8). Existen diferencias significativas entre el grupo testigo de las 24, 48 y 72 horas ($p > .05$) (Ver tablas en el Anexo).

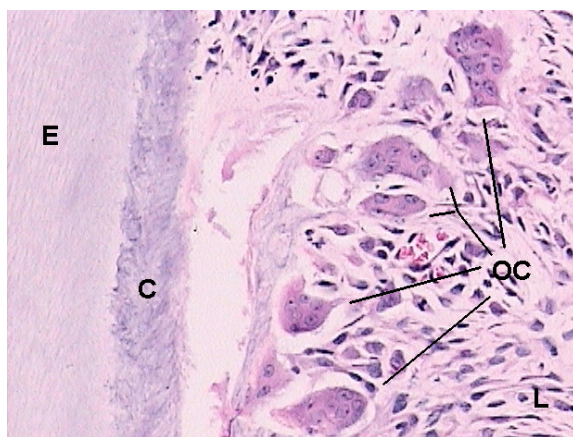
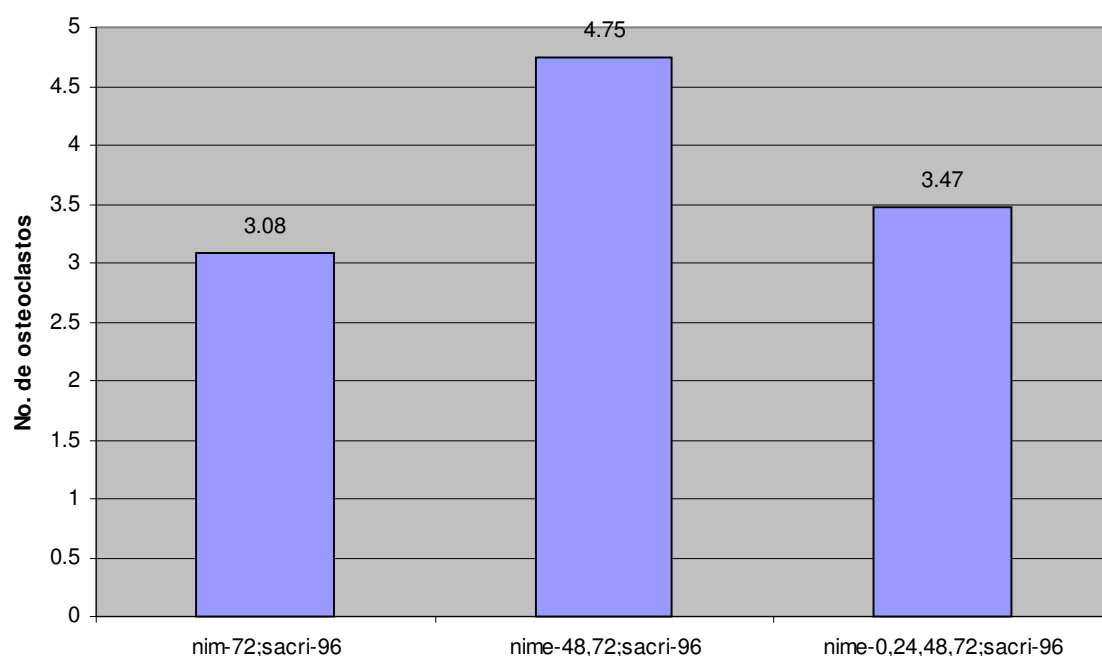
Fig. 2 estrés mecánico



Fotografía 8. Microfotografías observadas con un objetivo de 40x. Tinción de H-E. OC osteoclastos, HA hueso alveolar.

El número de osteoclastos en los grupos de animales a los que se les colocó resorte en el día cero y se le administró nimesulide solamente a las 72 horas y se sacrificó a las 96, tuvo un promedio de 3.08 osteoclastos; el grupo al que se le administró nimesulide a las 48 horas y 72 horas y se sacrificó a las 96, tuvo un promedio de 4.75 osteoclastos, el grupo al que se administró el nimesulide a las: cero, 24, 48 y 72 horas, sacrificándose a las 96 horas, el promedio de osteoclastos fue de 3.47. (Fig.3) (Fotografía 9) No encontramos diferencias significativas entre los tres tratamientos con nimesulide ($p < .05$) aunque si entre los grupos experimentales y el grupo testigo ($p > .05$) (Ver tablas en el Anexo).

Fig. 3 Estrés mecánico y nimesulide

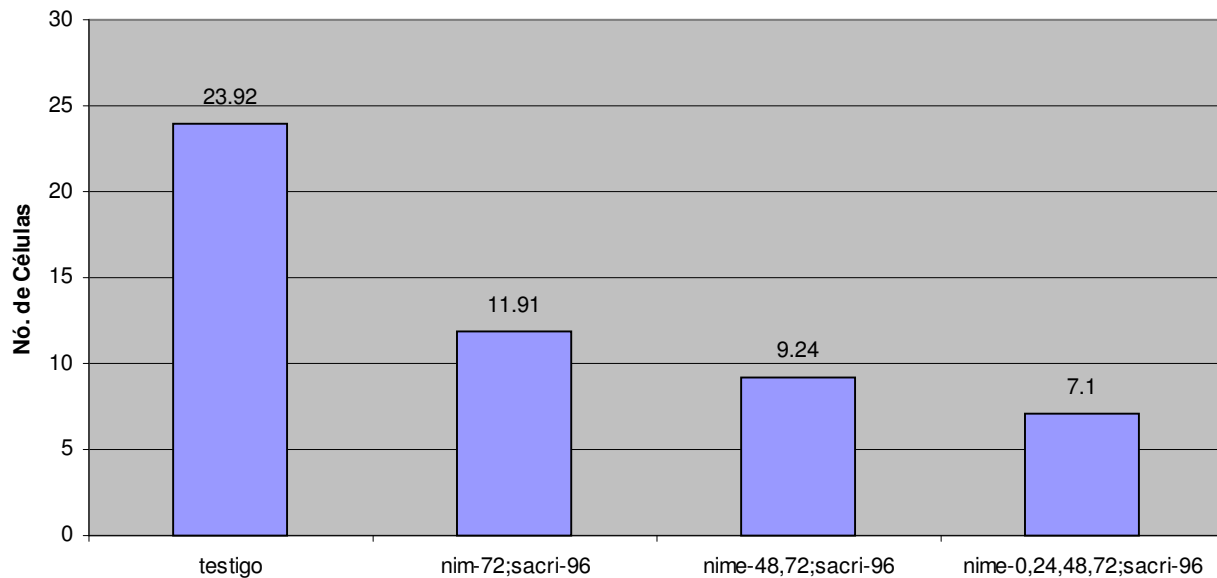


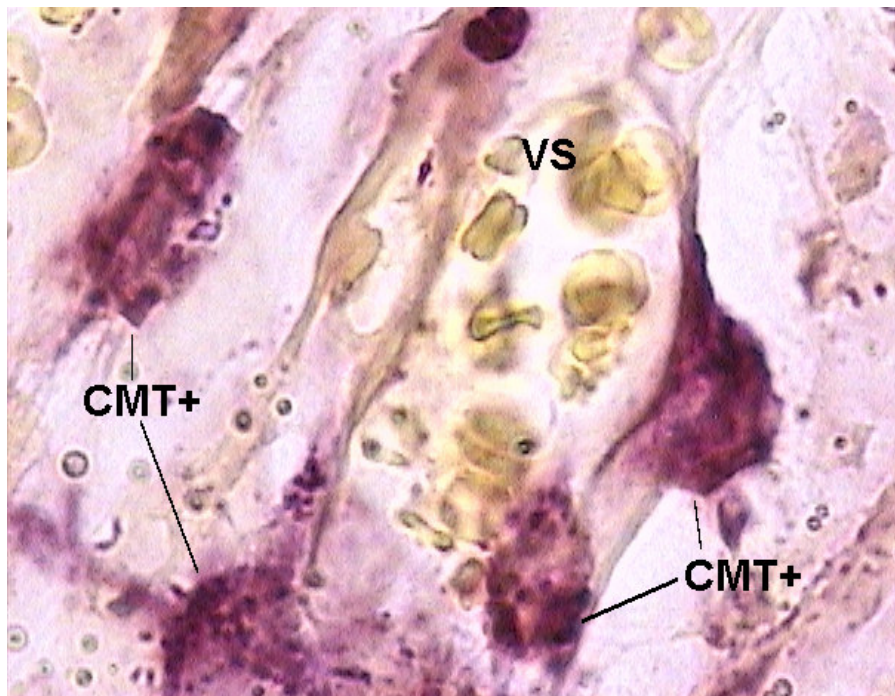
Fotografía 9. Microfotografías observadas con un objetivo de 40x en el septum intrarradicular del primer molar sup. Técnica H-E, **OC** osteoclastos, **L** ligamento periodontal, **E** esmalte, **C** cemento.

El número de células mononucleares TRAP positivas en el grupo testigo a las 24 horas es de 9.78; a las 48 horas 7.5; a las 72 horas, 6.8, y a las 96 horas, 23.92

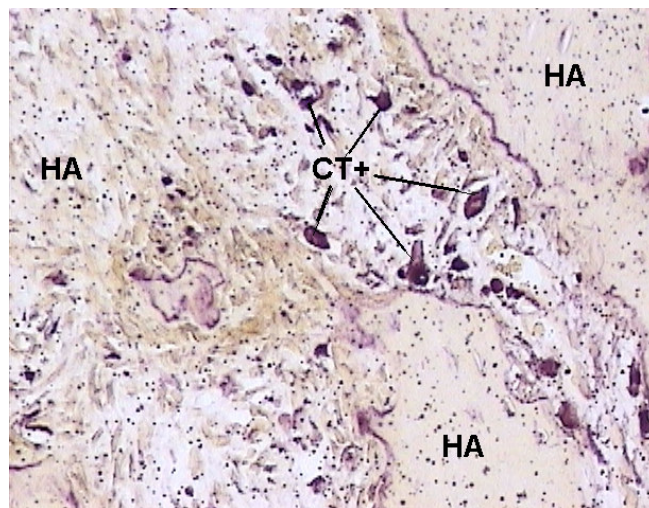
El número de células mononucleares TRAP positivas en los grupos de animales a los que se les colocó resorte en el día cero y se le administró nimesulide solamente a las 72 horas y se sacrificó a las 96 fue de 11.91 células mononucleares, en el grupo que se colocó resorte en el día cero y se administró nimesulide a las 48 y 72 horas y se sacrificaron a las 96 horas tuvo un promedio de 9.2 células mononucleares TRAP positivas, y en el grupo que se colocó el resorte en el día cero y se administró el nimesulide a las: cero, 24, 48 y 72 horas, y se sacrificaron a las 96 horas tuvieron un promedio de 7.16 células mononucleares TRAP positivas. (Fig. 4) (Fotografía 10 Y 11) No existen diferencias significativas entre los tres tratamientos con nimesulide ($p < 0.05$), aunque si hay una diferencia significativa entre los tres tratamientos con nimesulide y el grupo testigo ($p > 0.05$) (Ver tablas en el Anexo).

Fig. 4 Células mononucleares TRAP+





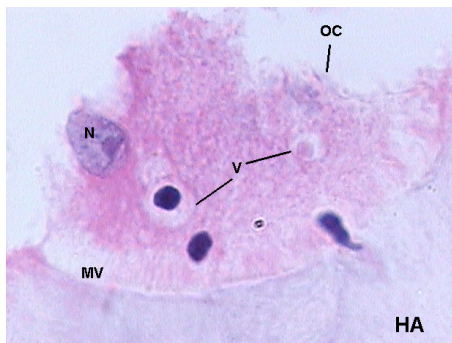
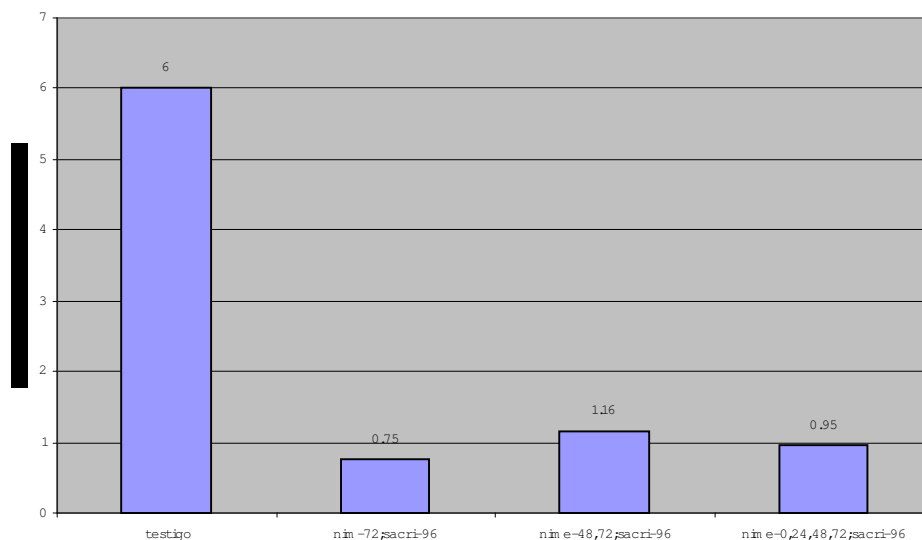
Fotografía 10. Microfotografías observadas con un objetivo de 100x. Véase la relación que tiene la célula mononucleada TRAP positiva con el vaso sanguíneo, muy posiblemente se encuentra saliendo de él.
CMT+ célula mononucleadas TRAP positivas, VS vaso sanguíneo. Tinción de TRAP.



Fotografía 11. Microfotografías observadas con un aumento de 20x. CT+ células TRAP positivas, HA hueso alveolar. Tinción de TRAP.

La presencia de vesículas fagocíticas promedio por campo en el grupo testigo fue a las 24 horas de .40; a las 48 horas, .60; a las 72 horas, 6.20, a las 96 horas, 6. El número de vesículas fagocíticas en los grupos de animales a los que se les colocó resorte en el día cero y se le administró nimesulide solamente a las 72 horas y se sacrificó a las 96, tuvo un promedio de .75 vesículas fagocíticas por campo; en el grupo que se colocó resorte en el día cero y se administró nimesulide a las 48 y 72 horas y se sacrificaron a las 96 horas tuvo un promedio de una vesícula fagocítica por campo y en el grupo que se colocó el resorte en el día cero y se administró el nimesulide a las: cero, 24, 48 y 72 horas, sacrificándolas a las 96 horas, el promedio de vesículas fagocíticas 1.16 por campo. No encontramos diferencias significativas entre los tres tratamientos con nimesulide ($p < 0.05$). (Fig. 5) (Fotografía 12) (Ver tablas en el Anexo).

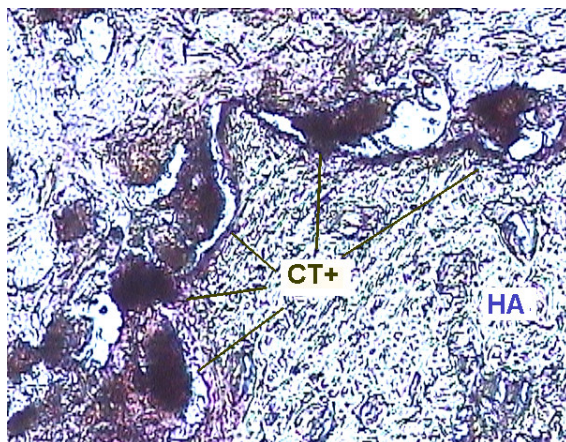
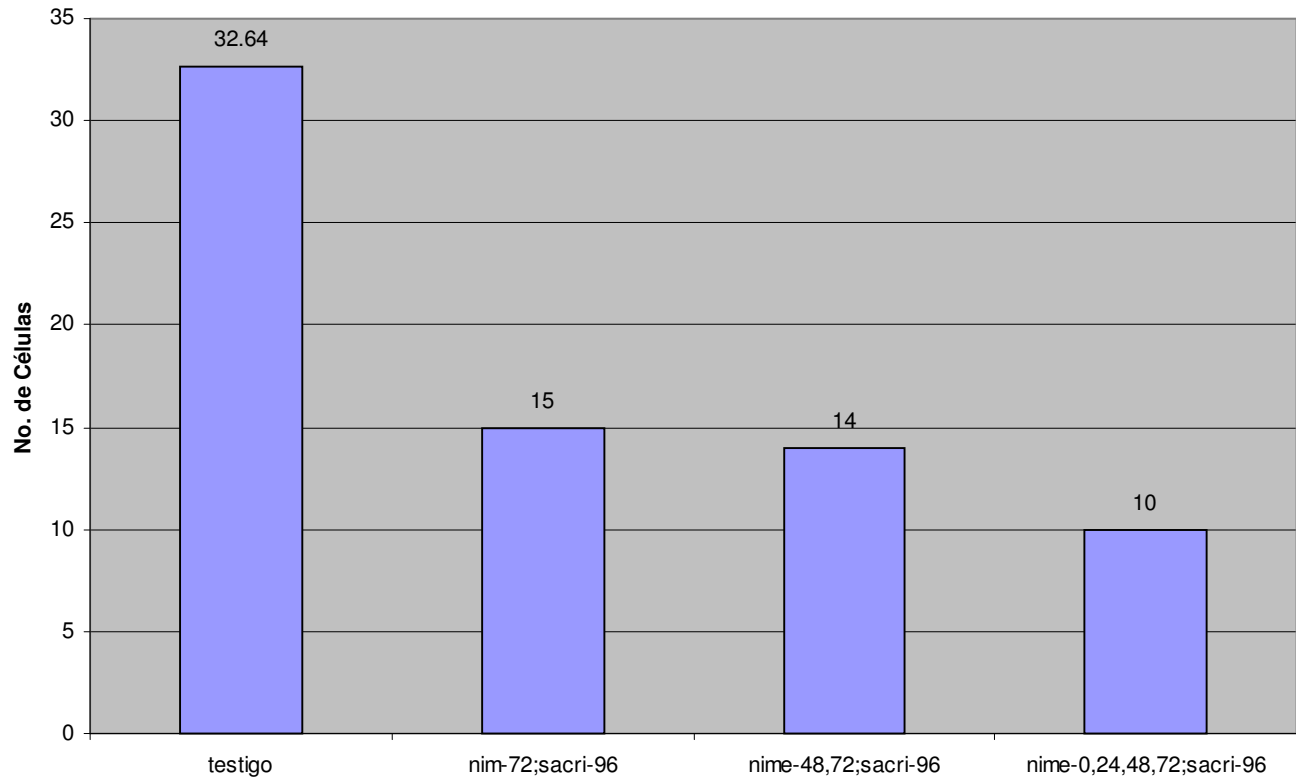
Fig. 5 Vesículas Fagocitarias



Fotografía 10. Microfotografías vistas con un objetivo de 100x. Fotografía tomada de un testigo a las 96 horas. Véase las vesículas fagocíticas dentro de las vacuolas. **OC** osteoclasto, **HA** hueso alveolar, **MV** microvellosidades formando el borde de cepillo, **V** vacuola, **N** núcleo. Tinción H-E

El análisis de varianza revela que el nimesulide inhibe de manera significativa el número de osteoclastos y células TRAP +, aunque no existen diferencias significativas entre los tres tratamientos con nimesulide ($p < 0.05$). (Fig. 6) (Fotografía 11) (Ver tablas en el Anexo).

Fig. 6 Células TRAP+



Fotografía 11. Microfotografías vistas con un objetivo de 40x. Fotografía tomada de un grupo testigo a las 48-72 hrs. **CT+** células TRAP positivas, **HA** hueso alveolar. Tinción de TRAP

VI. DISCUSIÓN

Esta demostrado que las prostaglandinas juegan un papel esencial en la formación de osteoclastos.⁹¹ Algunas moléculas que inducen resorción ósea como el TNF sólo son capaces de inducir la formación de osteoclastos y la posterior actividad de erosión de las superficies óseas cuando se encuentran osteoblastos en los cultivos, o si se agrega a los cultivos de osteoclastos medio sobrenadante de cultivos de osteoblastos, lo que indica que la señalización celular se da a través de la activación de los osteoblastos.⁹² El movimiento dentario inducido por la aplicación de fuerzas ortodóncicas probablemente active a receptores de superficie de los osteoblastos como la proteína G, y que esta activación se traduzca en la activación de la fosfolipasa A₂ que es la enzima responsable de la síntesis del ácido araquidónico, precursor de Prostaglandinas y leucotrienos, moléculas que inducen la resorción ósea.⁹³

Los AINEs son un grupo de moléculas lipofílicas que tienen en común la inhibición de la síntesis de prostaglandinas, a través de bloquear la enzima ciclo-oxigenasa. El nimesulide, un bloqueador selectivo de la isoenzima 2 de la ciclo-oxigenasa (COX-2), tiene además entre sus mecanismos de acción antiinflamatorios el de bloquear la generación de formas reactivas de oxígeno como el anión superóxido y el peróxido de hidrógeno en los polimorfonucleares, así como inhibir la síntesis de LTCB₄, un poderoso quimiotáctico para polimorfonucleares.⁹⁴

En nuestros resultados el nimesulide inhibió al igual que otros AINEs el número de osteoclastos presentes en el septum interradicular, esta inhibición se dio a pesar de que el nimesulide es un débil inhibidor de las prostaglandinas, por lo que es probable que otros mediadores o mensajeros jueguen un papel importante en la señalización necesaria para la estimulación de las células progenitoras del linaje monocitos-macrófagos, la salida de los precursores mononucleares de los vasos a los sitios de resorción y el reconocimiento del sitio en el que deben llevar a cabo la función de resorción y finalmente la adhesión de varias células mononucleares para formar un osteoclasto multinuclear.

El fenotipo de los osteoclastos se caracteriza por su multinuclearidad, la presencia de receptores para paratohormona y la presencia de la enzima fosfatasa ácida resistente a tartrato (TRAP), los precursores de osteoclastos (preosteoclastos) son células mononucleares que también poseen TRAP. El número total de células TRAP+ (osteoclastos y preosteoclastos) se inhibe en

todos los grupos en donde se aplicó el nimesulide, inhibición que es dependiente del número de dosis, lo anterior puede ser explicado con base en el bloqueo de la expresión de la molécula de adhesión CD 11b que es necesaria para la salida de los leucocitos durante la quimiotaxis, y no así por la inhibición de otras moléculas de adhesión como la ICAM-1 (intercelular adhesive molecule).⁹⁴ Sin embargo, el número de osteoclastos no tuvo un comportamiento que se asociara al número de dosis, de hecho el número de osteoclastos en el grupo al que se le aplicó sólo las 2 dosis el día anterior previo al sacrificio tuvo un número menor de osteoclastos que el grupo al que se le aplicó nimesulide durante dos días, aunque la diferencia entre estas medias no fue significativa, por lo que es probable que atendiendo a la cinética de formación de osteoclastos en el grupo testigo (sin fármaco) y de acuerdo a los resultados publicados por diferentes autores entre el día tres y el cuatro hay una disminución en el número de osteoclastos, por lo que la inhibición de prostaglandinas inducida por el nimesulide inhibió no solo la llegada de nuevas células TRAP+ sino que probablemente, aumentara la disminución que regularmente ocurre en el número de osteoclastos en el día cuatro.

La formación de osteoclastos es mediada no sólo por la generación de prostaglandinas por parte de las células del ligamento periodontal sujeto a estrés mecánico como en nuestro diseño experimental, sino que como demuestra Kansaki y col (2002), las prostaglandinas estimulan la producción del receptor activador del factor nuclear kappa B (RANKL) y de osteoprotegerina, dos de los principales reguladores de la osteoclastogénesis, por lo que el menor número de osteoclastos en los grupos en los que se administró el nimesulide, al inhibir las prostaglandinas, suponemos se debió a la disminución de la expresión de RANKL por las células del ligamento periodontal.⁹⁵

Se ha reportado que el nimesulide induce la apoptosis de células tumorales de colon, y en células tumorales de lengua inducidas por 4-NQO⁹⁶, también se ha demostrado que este AINE potencia la inducción de la apoptosis por el TNF- α en células HeLa.⁹⁷ La disminución en el número de osteoclastos que ocurre en los tres grupos, pero sobre todo a los del grupo en donde solo se les aplicó Nimesulide en el tercer día y en el que el número de osteoclastos cae de 8.5 a 3.08 puede ser explicado probablemente por la inducción de mecanismos de apoptosis en los osteoclastos previamente formados como ya ha sido reportado por Rana y col. (2001)⁹⁸ y Noxon y col. (2001).⁹⁹

VII. CONCLUSIONES

El nimesulide inhibe el número de células TRAP+ en el modelo de de osteoclastogénesis inducida por estrés mecánico de manera proporcional al número de dosis

El nimesulide disminuye el número de osteoclastos previamente formados a las 96 horas, independientemente del número de dosis previas.

BIBLIOGRAFÍA.

1. Adams JM, Cory S. (1998): The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. *Science*; 281(5381):1322-1326.
2. Gonzalez Macias J, Serrano Figueras S.(1995): Enfermedades óseas. En Farreras P, ed. Medicina Interna, decimotercera edición, Madrid: Mosby-Doyma, 1064-1089.
3. Norton AL, Burstone, J. Charles(1989): The biology of Toothmovement, Edición CRC Press, Florida.
4. Roberts WE. (1994): Bone physiology, metabolism, and biomechanics in orthodontic practice. En: Graber TM, Vanarsdall RL Jr, ediciones. Orthodontics: current principles and techniques, 2nd ed. St Luis: CV Mosby; pp. 193-234.
5. Kahn AJ, Simmons DJ. (1975): Investigation of the cell lineage in bone using a chimera of chick and quail embryonic tissue. *Nature* 258:325-7.
6. Mundy GR, Roodman GD. (1987): Osteoclast ontogeny and function. En: Peck WA, ed. Bone and mineral research75. Amsterdam: Elsevier, p. 209-79.
7. Chambers TJ. (1989): The origin of the osteoclast. En Peck WA, ed. Bone and mineral research/6. Amsterdam: Elsevier, p 1-25.
8. King GJ, and Holtrop ME. (1975): Actin-like filaments in bone cells of cultured mouse calvaria as demonstrated by binding to heavy meromyosin. *J. Cell Biol.*, 66, p. 445.
9. Seong SH, Holmstedt JOV (1981): Human Microscopic Anatomy, Mc Graw-Hill, USA, pp.109-129.
10. Reza, S. Ali, Mousavizadeh, K. Reza P. Hamid, Sari A Fatemeh (2002): Efect of misoprostol, a prostaglandin E₁ analog, on orthodontic tooth movement in rats. *Am J Orthod Dentofacial Orthop*;122:542-7.
11. Sandy JR, Harris M (1984): Prostaglandins and tooth movement. *Eur J Orho*; 6:175-182
12. Yamasaki K, Shibasaki Y (1980): Prostaglandin as a mediator of bone resorption induced by experimental tooth movement in rats. *J Dent Res*; 59:1635-1642.

13. Yamasaki K, Shibata (1982): The effect of prostaglandins on experimental tooth movement in monkeys (macaca fuscata). J Dent Res; 61:1444-1446.
14. Abbas H. Mohammed (1989): Leukotrienes in orthodontic tooth movement. Am J. Orthod Dentofac Orthop; 95:231-7.
15. Lee W. (1990): Experimental study of the effect of prostaglandin administration on tooth movement with particular emphasis on the relationship to the method of PGE1 administration. AJO-DO; 98:231-241.
16. Giunta D. (1995): Influence of indomethacin on bone turnover related to orthodontic tooth movement in miniatura pigs. Am. J. Orthod. Dentofac. Orthop; 108:361-6.
17. Flanagan AM, Chambers TJ. (1992): Stimulation of bone nodule formation in vitro by prostaglandin E1 and E2. Endocrinology; 130:443-448.
18. Chyun YS, Raisz LG. (1984): Stimulation of bone formation by prostaglandin E2. Prostaglandin; 27:97-103.
19. Keller J, Klamer A, Bak B (1991): Short-term effect of local application of PGE2 on callus in rabbit osteotomy. Eur J Exp Musculoskel Res; 1-7.
20. Mundy GR, Roodman G.D. (1987): Osteoclast ontogeny and function, In Peck Bone and Mineral Research. Amsterdam, Elsevier p. 209-279.
21. Klein DC, Raisz LG. (1970): Prostaglandin: stimulation of bone resorption in tissue culture. Endocrinology; 86:1436-40.
22. O'Brien. J.H.H. Williams and M. J. Marshall (2001): Osteoprotegerin is produced when prostaglandin synthesis is inhibited causing osteoclasts to detach from the surface of mouse parietal bone and attach to the endocranial membrane. Bone Vol. 28, No.2 February;208-214.
23. Roche J, Cisneros J, George J. (1997): The effect of acetaminophen on tooth movement in rabbits, Angle Orthod; 67(3):231-236.
24. Gómez Clavel JF, Verdin L. (1997): Antiinflamatorios no esteroideos (AINEs). Práctica Odontológica; 17: 24-26.
25. Rick D, Brogden N. Rex (1994): Nimesulide An Update of its pharmacodynamic and pharmacokinetic Properties, and Therapeutic Efficacy, Drugs, 48 (3): 431-454.
26. Ktsuhiro Ono (2003): The effect of deletion of cyclooxygenase-2, prostaglandin receptor EP2 or EP4 in bone marrow cells on osteoclasts induced by mouse mammary cancer cell lines, Bone 3;798-804

27. Márquez S D. (2002): Efecto de los AINEs Clonixinato de lisina y Diclofenaco en la formación de osteoclastos durante el movimiento ortodóncico, Tesis profesional de licenciatura. Facultad de Estudios Superiores Iztacala, Universidad Nacional Autónoma de México, México,
28. Gurley AM, Roth SI. Bone en Sternberg SS (1992): Histology for Pathologists. New York: Raven Press, pp.61-80.
29. Bennett JH, Joyner CJ, Triffitt JT & Owen ME (1991) Adipocytic cells cultured from marrow have osteogenic potential., J Cell Sci. 99, (Pt 1); 131- 139.
30. Grigoriadis AE, Heersche JN y Aubin JE (1988): Differentiation of muscle, fat, cartilage, and bone from progenitor cells present in a bone-derived clonal cell population: effect of dexamethasone. J Cell Biol 106; 2139- 2151.
31. Yamaguchi A & Kahn AJ(1991): Clonal osteogenic cell lines express myogenic and adipocytic developmental potential. Calcified Tissue Int 49; 221-225.
32. Wennberg C, Hessle L, Lundberg P, Mauro S, Narisawa S, Lerner UH & Millan JL (2000): Functional characterization of osteoblasts and osteoclasts from alkaline phosphatase knockout mice. J Bone Miner Res 15; 879- 1888.
33. Bonewald LF & Mundy GR (1990): Role of transforming growth factor-beta in bone remodeling. Clin Orthop Relat R ; 261- 276.
34. Menton DN, Simmons DJ, Chang SL y Orr BY(1984): From bone lining cell to osteocyte--an SEM study. Anat Rec; 209: 29- 39.
35. Burger EH & Klein-Nulend J (1999): Mechanotransduction in bone--role of the lacuno-canalicular network. FASEB J 13, Suppl: S101- S112.
36. Mikuni-Takagaki Y. (1999): Mechanical responses and signal transduction pathways in stretched osteocytes. J Bone Miner Metab; 17: 57-60.
37. Göthling G & Ericsson JLE (1976): The osteoclast. Review of the ultrastructure, origin, and structure-function relationship. Clin Orthop Relat R;120: 201- 228.
38. Kahn AJ & Simmons DJ (1975) Investigation of cell lineage in bone using a chimaera of chick and quail embryonic tissue. Nature; 258: 325- 327.
39. Suda T, Takahashi N, Martin TJ. (1992): Modulation of osteoclast differentiation [published erratum appears in Endocr Rev May;13(2):191];. Endocr Rev 13: 66- 80.

40. Walker DG (1975a): Bone resorption restored in osteopetrotic mice by transplants of normal bone marrow and spleen cells. Science; 190: 784- 785.
41. Ash P, Loutit JF, Townsend KM (1980): Osteoclasts derived from haematopoietic stem cells. Nature; 283: 669- 670.
42. Kerby JA, Hattersley G, Collins DA, Chambers TJ (1992): Derivation of osteoclasts from hematopoietic colony-forming cells in culture. J Bone Miner Res; 7: 353- 62.
43. Zheng MH, Papadimitriou JM, Nicholson GC. (1991): A quantitative cytochemical investigation of osteoclasts and multinucleate giant cells. Histochem J; 23: 180- 188.
44. Athanasou NA, Quinn J, McGee JO (1988): Immunocytochemical analysis of the human osteoclast: phenotypic relationship to other marrow-derived cells. Bone Miner; 3: 317- 333.
45. Yoshida H, Hayashi S, Kunisada T, Ogawa M, Nishikawa S, Okamura H, Sudo T, Shultz LD, Nishikawa S 1990: The murine mutation osteopetrosis is in the coding region of the macrophage colony stimulating factor gene. Nature; 345: 442- 444.
46. Yasuda H, Shima N, Nakagawa N, Yamaguchi K, Kinosaki M, Mochizuki S, Tomoyasu A, Yano K, Goto M, Murakami A, Tsuda E, Morinaga T, Higashio K, Udagawa N, Takahashi N, Suda T. (1998b) Osteoclast differentiation factor is a ligand for osteoprotegerin/osteoclastogenesis-inhibitory factor and is identical to TRANCE/RANKL. Proc Natl Acad Sci USA; 95: 3597- 3602.
47. Wong BR, Josien R, Lee SY, Sauter B, Li HL, Steinman RM & Choi Y (1997a) TRANCE (tumor necrosis factor [TNF]-related activation-induced cytokine), a new TNF family member predominantly expressed in T cells, is a dendritic cell-specific survival factor. J Exp Med; 186: 2075- 2080.
48. Lacey DL, Timms E, Tan HL, Kelley MJ, Dunstan CR, Burgess T, Elliott R, Colombero A, Elliott G, Scully S, Hsu H, Sullivan J, Hawkins N, Davy E, Capparelli C, Eli A, Qian YX, Kaufman S, Sarosi I, Shalhoub V, Senaldi G, Guo J, Delaney J, Boyle WJ (1998): Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation. Cell; 93: 165- 176.
49. Guyton. (1989): Tratado de fisiología médica. 7ª edición. México. Editorial Interamericana. Cap.79. Pag 933-941
50. Murria RK, Mayes PA, Granner DK, Rodwell VW (1994): Bioquímica de Harper, 13ª edición. México. Editorial El manual moderno. Cap 47. 609-17.

51. Suda T, Takahashi N, Udagawa N, Jimi E, Gillespie MT, Martin TJ.(1999): Modulation of osteoclast differentiation and function by the new members of the tumor necrosis factor receptor and ligand families. Endocr Rev, 20: 345-57
52. Simonet WS, Lacey DL, Dunstan CR, Kelley M (1997): Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density. Cell ,89:159-6
53. The American Society for Bone and Mineral Reserch President`s Committee on Nomenclature (2000): Proposed standard nomenclature for new tumor necrosis factor family members involved in the regulation of bone resorption, Bone Miner Res; 5:2293-6.
54. Hofbauer LC, Heufelder AE. (2000): The Role of Receptor Activator of Nuclear Factor-KB Ligand and Osteoprotegerin in the Pathogenesis and Treatment of Metabolic Bone Diseases. J Clin Endocrinol Metab ; 85:2355-63.
55. Burguera B, Hofbauer LC, Thomas T, Gori F, EvansGL, Khosla S, Riggs BL (2001): Turner RT. Leptin reduces ovariectomy-induced bone loss in rats. Endocrinology 142:3546-53.
56. Aubin JE, Bonnellye E. (2000): Osteoprotegerin and its ligand: a new paradigm for regulation of osteoclastogenesis and bone resorption. Osteoporos Int 11: 905-13
57. Montenegro SD, Pedroza Nuñez IJ, Vargas ES, Ramos MH. (2002): METABOLISMO OSEO: ACTUALIZACION, Revista de Posgrado de la Via Cátedra de Medicina - N° 117 Julio
58. Hofbauer LC, Gori F, Riggs BL, Lacey DL (1999): Stimulation of osteoprotegerin ligand and inhibition of osteoprotegerin production by glucocorticoids in human osteoblastic lineage cells: potential paracrine mechanisms of glucocorticoid-induced osteoporosis. Endocrinology, 140:4377-81
59. Vilardell E. (1988): Endocrinología. En: Medicina Interna. 11ed. España: Ediciones Doyma pp.1797-1798.
60. Igarashi K. (1998): Diurnal variation in tooth movement in response to orthodontic force in rats. Am J Orthod Dentofac Orthop; 114: 8-14.
61. Alhashimi N, Lars F, Pongsri B, Moiz B. (2001): Orthodontic tooth movement and de novo síntesis of proinflammatory cytokines, Am J Orthod Dentofacial Orthop 119:307-12.
62. Canalis E, McCarthy T, Centrella M (1988): Growth factors and the regulation of bone remodeling. J Clin Invest 81:277-81.

63. Baylink DJ, Finkelman RD, Mohan S. (1993): Growth factors to stimulate bone formation. J Bone Miner REs 8(suppl):S565-75.
64. Kurihara N, Bertolini D, Suda T, Akiyama Y, Roodman GD (1990): Interleukin-6 stimulates osteoclast-like multinucleated cell formation in long-term human marrow cultures by inducin IL-1 release. J Immunol, 144:426-30.
65. Roodman GD, Kurihara N, Ohsaki Y, Kukita A, Hosking D, Demulder A (1991): Interleukin-6: potential autocrine/paracrine factor in Paget's disease of bone. J Clin Invest 89:46-52.
66. Saito M, Saito S, Bgan PW, Shanfeld J, Davidovitch Z (1991): Interleukin 1 beta and prostaglandin E are involved in the response of periodontal cells to mechanical stress in vivo and in vitro; Am J Orthod Dentofac Orthop 99:226-40.
67. Olugbenga A. (1998): Mode of action on interleukin-6 on mature osteoclasts. Novel interactions with extracellular Ca²⁺ sensing in the regulation of osteoclastic bone resorption. The journal of Cell Biology, 142; 5:1347-1356.
68. Chumbley AB, Tuncay OC.(1986): The effect of indomethacin (an aspirin-like drug) on the rate of orthodontic tooth movement. Am J Orthod; 6:312-314.
69. Santero M, Jaffe M, Simmons J. (1977): Bone Resorption In Vitro and In Vivo in GBE Treated Mice. Proc Soc Exp Biol Med. 156:373-379.
70. Sekhavat RA, Mousavizadeh Kazem, Pakshir R H, Aslani FS (2002) Effect of misoprostol, a prostaglandin E₁ analog, on orthodontic tooth movement in rats, Am J Orthod Dentofacial Orthop, 122:542-7.
71. Abbas H. Mohammed (1989): Leukotrienes in orthodontic tooth movement. Am J. Orthod Dentofac Orthop 95:231-7.
72. Stone DK (1998): Receptors: structure and function. Am J Med 105(3):244-250
73. Farrar J. (1988): Philosophy of Correcting Irregularities of The Teeth. Dental Cosmos 30:496-498.
74. Angle E. (1907): Treatment of Malocclusion of the Teeth. 7th ed Philadelphia. SS White Dental Manufacturing Company. 6:333-338.
75. Sicher H, Weinmann J. (1944): Bone Growth and Physiologic Tooth Movement. Am J Orthodontics & Oral Surg. 30:109-111.
76. Proffit R W. (2001): Ortodoncia Contemporanea 3era. Edición, Madrid, Ediciones Harcourt S.A, pp.110-112.

77. Bassett CA (1995): Bioelectromagnetics in the service of medicine, Electromagnetic Fields 250:261-275, (in Advances in Chemistry Series)
78. Graber M T., Vanarsdall L R (1997): Ortodoncia Principios generales y técnicas, Argentina, Editorial Médica Panamericana, p.p. 113-120
79. Singla AK, Charla M, Singh A. (2000): Nimesulide: some pharmaceutical and pharmacological aspects- an update, 52 (5):467-86.
80. Vallano A, Barceló ME, Valles JA, Cucurvel E. (1999): Aspectos farmacológicos básicos de los antiinflamatorios no esteroideos. Medicine; 7 (119): 5.561-5.569.
81. Feria M. (1998): Analgésicos, antipiréticos y antiinflamatorios no esteroideos. Medicine; 7 (105):4.891-4.907.
82. Mitchell A, Akarasereenont P, Thiemermann C, Flower RJ, Vane JR. (1993): Selectivity of nonsteroidal antiinflammatory drugs as inhibition of constitutive and inducible cyclooxygenase. Proc Natl Acad Sci, USA: 11.693-11.697.
83. Sakai A. (1996): Diclofenac inhibits endothelial cell adhesion molecule expression induced with lipopolysaccharide. Life Sci; 58: 2377-2387.
84. Alam AS, Huang CL, Blake DR, Zaidi M.(1992): A hypothesis for the local control of osteoclast function by Ca²⁺, nitric Oxide and free radicals. Biosci Rep; 12: 369-380.
85. Anderson JR (1982) Patología de Muir. Traducción de la 11^a edición inglesa. Espaxs, Barcelona.
86. Eder M, Gedik P (1979) Manual de Patología General y Anatomía Patológica. Traducción de la 30^a edición alemana. Editorial Científica-Médica, Barcelona.
87. H. David Humes; editors, Herbert L. DuPont (2000) Kelly's textbook of internal medicine. Philadelphia, 4^{ta} ed. LIPPINCOTT WILLIAMS & WILKINS. Cap. 4

88. MERK, IVD Producto Sanitario para diagnóstico in vitro (2003) 1.16304. LEUCOGNOST ® SP consulta en pagina de Internet <http://www.merck.de>, última actualización Mayo 2003.
89. Alerman TA. (1990), Histological and Histochemical Methods, 2ª.ed. Pergamon Press, New York USA.
90. Aguilar MM (1996), Manual General de Técnicas Histológicas y Histoquímicas, 1ra ed. Facultad de Ciencias UNAM, México.
91. Lader CS, Flanagan AM (1998), Prostaglandin E2, interleukin 1alpha, and tumor necrosis factor-alpha increase human osteoclast formation and bone resorption in vitro, *Endocrinology*; 139(7):3157-64.
92. Thomson BM, Mundy Gr, Chambers TJ (1987), Tumor necrosis factors alpha and beta induce osteoblastic cells to stimulate osteoclastic bone resorption, *J Immunol*;138(3):775-9.
93. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts Keith, Walter P (2002), Molecular Biology of the cell, 4ta. Edición, Garland Publishing Inc, Nueva York
94. Nakamura Y, Kozuka M, Naniwa K, Takabayashi S, Torikai K, Hayashi R, Sato T, Ohigashi H, Osawa T (2003), Arachidonic acid cascade inhibitors modulate phorbol ester-induced oxidative stress in female ICR mouse skin: differential roles of 5-lipoxygenase and cyclooxygenase-2 in leukocyte infiltration and activation. *Free Radic Biol Med*. Nov1;35(9):997-1007.
95. Kanzaki H, Chiba M, Shimizu Y, Mitani H (2002), Periodontal ligament cells under mechanical stress induce osteoclastogenesis by receptor activator of nuclear factor kappaB ligand up-regulation via prostaglandin E2 synthesis. *J Bone Miner Res*, Feb;17(2):210-20.

96. Orii S, Yamaguchi T, Anzai H, Saito S, Chiba T, Suzuki K (2003), Chemoprevention for colorectal tumorigenesis associated with chronic colitis in mice via apoptosis. J Exp Clin Cancer Res, Mar;22(1):41-6.
97. Yoshida K, Tanaka T, Kohno H, Sakata K, Kawamori T, Mori H, Wakabayashi K (2003), A COX-2 inhibitor, nimesulide, inhibits chemically-induced rat tongue carcinogenesis through suppression of cell proliferation activity and COX-2 and iNOS expression. Jan;18(1):39-48.
98. Rana MW, Pothisiri V, Killiany DM, Xu XM (2001), Detection of apoptosis during orthodontic tooth movement in rats. Am J Orthod Dentofacial Orthop;119:516-21.
99. Noxon SJ, King GJ, Gu G, Huang G (2001), Osteoclast clearance from periodontal tissues during orthodontic tooth movement. Am J Orthod Dentofacial Orthop; 120:466-76.

ANEXO.

Fijadores para Inmunohistoquímica.

PBS 10X

pH 7.2 0.2M

- Na Cl80g
- Fosfato de sodio, dibásico (Na_2HPO_4) ó Fosfato de potasio, dibásico (K_2HPO_4).....11.46g
- Fosfato de sodio, monobásico ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) ó Fosfato de potasio, monobásico (KH_2PO_4)..... 2g
- KCl..... 2g

1. Mezclar todos los ingredientes perfectamente en 700ml de agua destilada e incorporarlos con una barra magnética.
2. Una vez incorporada y disuelta la sustancia aforar a 1000ml.⁸⁹

Buffer de paraformaldehído al 1%

- Paraformaldehído 10g
- PBS 1x 800ml

1. Calentar un poco el PBS 1x, agregar 10g de paraformaldehído, añadir 2-5 gotas de 1.0M (4%) de hidróxido de sodio acuoso, necesario para disolver el paraformaldehído y agitar hasta que se haga transparente la solución.
2. Filtrar, enfriar y llevar a 1000ml con el PBS 1x. ⁸⁹

EDTA 7%

- EDTA 70g
- Agua destilada 800ml
- Hidróxido de Sodio
- Ácido clorhídrico

1. Para preparar 1ltr. se agrega 70g de EDTA a 800ml de Agua destilada. Se va agregando hidróxido de Sodio y se disuelve con ayuda de una barra magnética hasta que se disuelva todo el EDTA.
2. Se ajusta el ph a 7.4 con ayuda del Ácido Clorhídrico, y por último la solución se afora a 1000 ml. ⁸⁹

Hematoxilina de Harris.

- Hematoxilina cristales..... 5gm
- Alcohol 100%..... 50ml
- Alumbre de potasio 100gm
- Agua destilada 1000ml
- Oxido de Mercurio (rojo)..... 25gm

1. Se disuelve la hematoxilina en el alcohol, en baño María y tapanlo. Disolver el alumbre de potasio en el agua por medio de calor.
2. Se retiran del calor y se mezclan las 2 soluciones. A continuación se incorporan perfectamente con una barra magnética y se calienta la mezcla por un minuto.
3. Se retira del calor y se añade el óxido de mercurio muy lentamente (con mucho cuidado pues puede explotar). Se vuelve a calentar y se deja agitando la muestra, hasta que su color se torne en un púrpura oscuro. En cuanto la mezcla tome este color, remuévelo inmediatamente del calor y enfríe la mezcla colocándo esta misma dentro de un recipiente con agua.
4. La mezcla estará lista para usarse, tan pronto como se enfríe. Agregándole de 2 a 4 ml de ácido acético glacial por 100ml de Hematoxilina de Harris, se incrementa la precisión de la mezcla para teñir núcleos.
5. Filtrar antes de usar.⁹⁰

Eosina.

- Eosina Bluish 1g
- Orange G 1g
- Alcohol al 70% 100ml

Disolver la eosina y el orange G en el alcohol, agregando poco a poco las dos substancias.⁹⁰

Ruyter.

- Acetona 20ml
- Benzoato de Metilo 0.5ml
- Agua destilada 80ml
- Clara de Huevo
- Glicerina

1. Se preparan 2 soluciones, la A (20ml de Acetona, con .5ml ó 10 gotas de Benzoato de Metilo) y la solución B (en 80ml de agua destilada, agregar Clara de huevo:glicerina, V/V)
2. Se mezcla la solución A y B.
3. Se filtra por que puede precipitarse la albúmina
4. Se guarda en frío a 4°C hasta su uso. ⁹⁰

Tablas

Oneway No. de Osteoclastos

Descriptives

osteoclastos

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
t 24h	5	2.2000	1.0954	.4899	.8398	3.5602	1.00	4.00
t 48h	5	4.4000	1.5166	.6782	2.5169	6.2831	3.00	7.00
t 72h	5	9.4000	1.8166	.8124	7.1444	11.6556	7.00	12.00
t 96h	5	8.5120	1.0289	.4602	7.2344	9.7896	7.00	9.60
nim72s96	5	3.0860	1.4832	.6633	1.2444	4.9276	1.57	5.37
ni0-24-48-72s96	6	3.4700	1.3574	.5542	2.0455	4.8945	2.15	5.68
ni48-72s96	5	4.5640	.7373	.3298	3.6485	5.4795	4.00	5.80
Total	36	5.0453	2.8502	.4750	4.0809	6.0097	1.00	12.00

ANOVA

osteoclastos

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	232.710	6	38.785	21.789	.000
Within Groups	51.622	29	1.780		
Total	284.331	35			

Post Hoc Tests

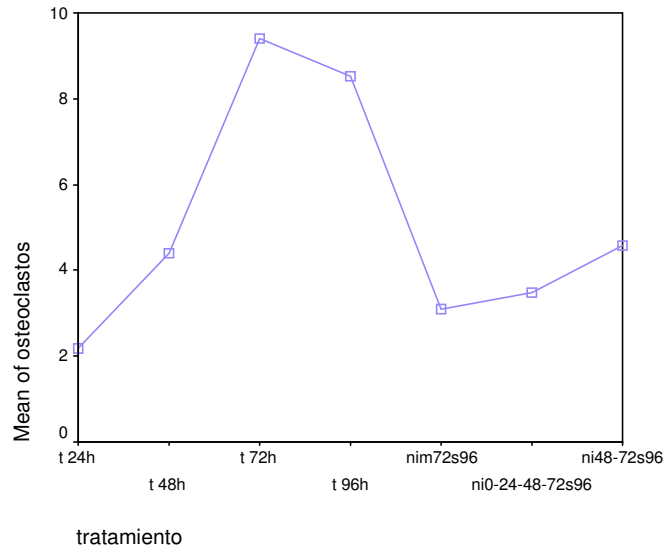
Multiple Comparisons

Dependent Variable: osteoclastos
Tukey HSD

(I) tratamiento	(J) tratamiento	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
t 24h	t 48h	-2.2000	.8438	.161	-4.8699	.4699
	t 72h	-7.2000*	.8438	.000	-9.8699	-4.5301
	t 96h	-6.3120*	.8438	.000	-8.9819	-3.6421
	nim72s96	-.8860	.8438	.937	-3.5559	1.7839
	ni0-24-48-72s96	-1.2700	.8079	.700	-3.8263	1.2863
	ni48-72s96	-2.3640	.8438	.109	-5.0339	.3059
t 48h	t 24h	2.2000	.8438	.161	-.4699	4.8699
	t 72h	-5.0000*	.8438	.000	-7.6699	-2.3301
	t 96h	-4.1120*	.8438	.001	-6.7819	-1.4421
	nim72s96	1.3140	.8438	.709	-1.3559	3.9839
	ni0-24-48-72s96	.9300	.8079	.906	-1.6263	3.4863
	ni48-72s96	-.1640	.8438	1.000	-2.8339	2.5059
t 72h	t 24h	7.2000*	.8438	.000	4.5301	9.8699
	t 48h	5.0000*	.8438	.000	2.3301	7.6699
	t 96h	.8880	.8438	.937	-1.7819	3.5579
	nim72s96	6.3140*	.8438	.000	3.6441	8.9839
	ni0-24-48-72s96	5.9300*	.8079	.000	3.3737	8.4863
	ni48-72s96	4.8360*	.8438	.000	2.1661	7.5059
t 96h	t 24h	6.3120*	.8438	.000	3.6421	8.9819
	t 48h	4.1120*	.8438	.001	1.4421	6.7819
	t 72h	-.8880	.8438	.937	-3.5579	1.7819
	nim72s96	5.4260*	.8438	.000	2.7561	8.0959
	ni0-24-48-72s96	5.0420*	.8079	.000	2.4857	7.5983
	ni48-72s96	3.9480*	.8438	.001	1.2781	6.6179
nim72s96	t 24h	.8860	.8438	.937	-1.7839	3.5559
	t 48h	-1.3140	.8438	.709	-3.9839	1.3559
	t 72h	-6.3140*	.8438	.000	-8.9839	-3.6441
	t 96h	-5.4260*	.8438	.000	-8.0959	-2.7561
	ni0-24-48-72s96	-.3840	.8079	.999	-2.9403	2.1723
	ni48-72s96	-1.4780	.8438	.589	-4.1479	1.1919
ni0-24-48-72s96	t 24h	1.2700	.8079	.700	-1.2863	3.8263
	t 48h	-.9300	.8079	.906	-3.4863	1.6263
	t 72h	-5.9300*	.8079	.000	-8.4863	-3.3737
	t 96h	-5.0420*	.8079	.000	-7.5983	-2.4857
	nim72s96	.3840	.8079	.999	-2.1723	2.9403
	ni48-72s96	-1.0940	.8079	.821	-3.6503	1.4623
ni48-72s96	t 24h	2.3640	.8438	.109	-.3059	5.0339
	t 48h	.1640	.8438	1.000	-2.5059	2.8339
	t 72h	-4.8360*	.8438	.000	-7.5059	-2.1661
	t 96h	-3.9480*	.8438	.001	-6.6179	-1.2781
	nim72s96	1.4780	.8438	.589	-1.1919	4.1479
	ni0-24-48-72s96	1.0940	.8079	.821	-1.4623	3.6503

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

Means Plots



Vesículas Fagocíticas.

Descriptives

Vesículas fagocíticas

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
t 24h	5	.4000	.5477	.2449	-.2801	1.0801	.00	1.00
t 48h	5	.6000	.5477	.2449	-8.0087E-02	1.2801	.00	1.00
t 72h	5	6.2000	1.4832	.6633	4.3583	8.0417	4.00	8.00
t 96h	5	6.0000	2.5495	1.1402	2.8344	9.1656	3.00	10.00
nim72s96	5	.7500	1.2990	.5809	-.8630	2.3630	.00	3.00
ni0-24-48-72s96	6	1.1667	1.1690	.4773	-6.0171E-02	2.3935	.00	3.00
ni48-72s96	5	.9500	.7159	.3202	6.110E-02	1.8389	.00	2.00
Total	36	2.2639	2.7183	.4530	1.3442	3.1836	.00	10.00

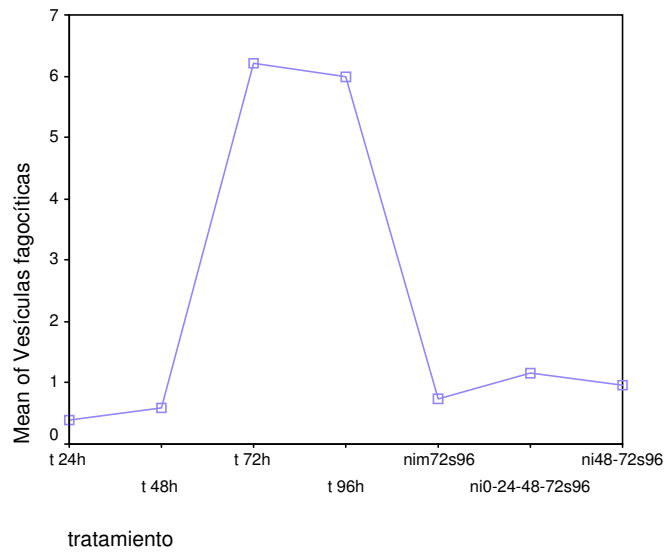
Multiple Comparisons

Dependent Variable: Vesículas fagocíticas
Tukey HSD

(I) tratamiento	(J) tratamiento	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
t 24h	t 48h	-.2000	.8537	1.000	-2.9011	2.5011
	t 72h	-5.8000*	.8537	.000	-8.5011	-3.0989
	t 96h	-5.6000*	.8537	.000	-8.3011	-2.8989
	nim72s96	-.3500	.8537	1.000	-3.0511	2.3511
	ni0-24-48-72s96	-.7667	.8173	.963	-3.3528	1.8194
	ni48-72s96	-.5500	.8537	.995	-3.2511	2.1511
t 48h	t 24h	.2000	.8537	1.000	-2.5011	2.9011
	t 72h	-5.6000*	.8537	.000	-8.3011	-2.8989
	t 96h	-5.4000*	.8537	.000	-8.1011	-2.6989
	nim72s96	-.1500	.8537	1.000	-2.8511	2.5511
	ni0-24-48-72s96	-.5667	.8173	.992	-3.1528	2.0194
	ni48-72s96	-.3500	.8537	1.000	-3.0511	2.3511
t 72h	t 24h	5.8000*	.8537	.000	3.0989	8.5011
	t 48h	5.6000*	.8537	.000	2.8989	8.3011
	t 96h	.2000	.8537	1.000	-2.5011	2.9011
	nim72s96	5.4500*	.8537	.000	2.7489	8.1511
	ni0-24-48-72s96	5.0333*	.8173	.000	2.4472	7.6194
	ni48-72s96	5.2500*	.8537	.000	2.5489	7.9511
t 96h	t 24h	5.6000*	.8537	.000	2.8989	8.3011
	t 48h	5.4000*	.8537	.000	2.6989	8.1011
	t 72h	-.2000	.8537	1.000	-2.9011	2.5011
	nim72s96	5.2500*	.8537	.000	2.5489	7.9511
	ni0-24-48-72s96	4.8333*	.8173	.000	2.2472	7.4194
	ni48-72s96	5.0500*	.8537	.000	2.3489	7.7511
nim72s96	t 24h	.3500	.8537	1.000	-2.3511	3.0511
	t 48h	.1500	.8537	1.000	-2.5511	2.8511
	t 72h	-5.4500*	.8537	.000	-8.1511	-2.7489
	t 96h	-5.2500*	.8537	.000	-7.9511	-2.5489
	ni0-24-48-72s96	-.4167	.8173	.999	-3.0028	2.1694
	ni48-72s96	-.2000	.8537	1.000	-2.9011	2.5011
ni0-24-48-72s96	t 24h	.7667	.8173	.963	-1.8194	3.3528
	t 48h	.5667	.8173	.992	-2.0194	3.1528
	t 72h	-5.0333*	.8173	.000	-7.6194	-2.4472
	t 96h	-4.8333*	.8173	.000	-7.4194	-2.2472
	nim72s96	.4167	.8173	.999	-2.1694	3.0028
	ni48-72s96	.2167	.8173	1.000	-2.3694	2.8028
ni48-72s96	t 24h	.5500	.8537	.995	-2.1511	3.2511
	t 48h	.3500	.8537	1.000	-2.3511	3.0511
	t 72h	-5.2500*	.8537	.000	-7.9511	-2.5489
	t 96h	-5.0500*	.8537	.000	-7.7511	-2.3489
	nim72s96	.2000	.8537	1.000	-2.5011	2.9011
	ni0-24-48-72s96	-.2167	.8173	1.000	-2.8028	2.3694

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

Means Plots



Oneway Células mononucleares TRAP positivas

Descriptives

Trap post mononucleares

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
t 24h	5	9.7860	2.3759	1.0625	6.8359	12.7361	7.09	13.50
t 48h	5	7.5000	2.8136	1.2583	4.0065	10.9935	2.70	9.70
t 72h	5	6.8000	3.0937	1.3836	2.9586	10.6414	3.10	9.25
t 96h	5	23.9280	3.9987	1.7883	18.9629	28.8931	21.40	31.00
nim72s96	5	11.9120	1.4832	.6633	10.0704	13.7536	9.63	13.43
ni0-24-48-72s96	6	7.1667	3.5707	1.4578	3.4194	10.9139	3.54	11.32
ni48-72s96	5	9.2440	.6060	.2710	8.4915	9.9965	8.54	10.20
Total	36	10.8014	6.1628	1.0271	8.7162	12.8866	2.70	31.00

ANOVA

Trap post mononucleares

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	1098.808	6	183.135	23.040	.000
Within Groups	230.509	29	7.949		
Total	1329.317	35			

Multiple Comparisons

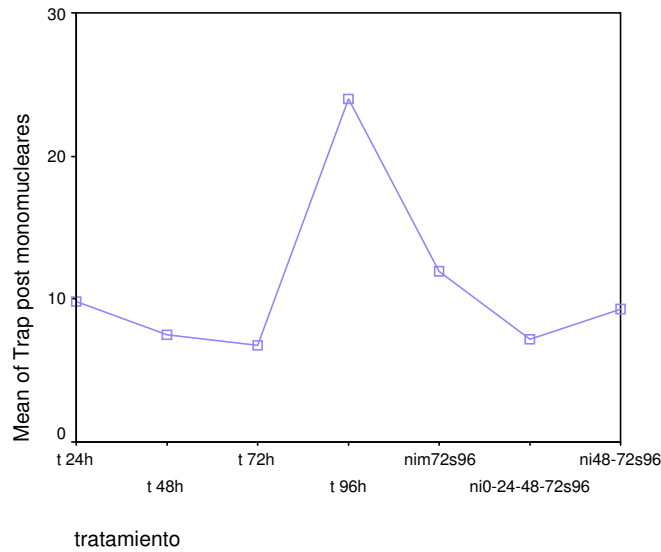
Dependent Variable: Trap post monomucleares

Tukey HSD

(I) tratamiento	(J) tratamiento	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
t 24h	t 48h	2.2860	1.7831	.854	-3.3560	7.9280
	t 72h	2.9860	1.7831	.637	-2.6560	8.6280
	t 96h	-14.1420*	1.7831	.000	-19.7840	-8.5000
	nim72s96	-2.1260	1.7831	.891	-7.7680	3.5160
	ni0-24-48-72s96	2.6193	1.7072	.723	-2.7824	8.0211
	ni48-72s96	.5420	1.7831	1.000	-5.1000	6.1840
t 48h	t 24h	-2.2860	1.7831	.854	-7.9280	3.3560
	t 72h	.7000	1.7831	1.000	-4.9420	6.3420
	t 96h	-16.4280*	1.7831	.000	-22.0700	-10.7860
	nim72s96	-4.4120	1.7831	.206	-10.0540	1.2300
	ni0-24-48-72s96	.3333	1.7072	1.000	-5.0684	5.7351
	ni48-72s96	-1.7440	1.7831	.955	-7.3860	3.8980
t 72h	t 24h	-2.9860	1.7831	.637	-8.6280	2.6560
	t 48h	-.7000	1.7831	1.000	-6.3420	4.9420
	t 96h	-17.1280*	1.7831	.000	-22.7700	-11.4860
	nim72s96	-5.1120	1.7831	.096	-10.7540	.5300
	ni0-24-48-72s96	-.3667	1.7072	1.000	-5.7684	5.0351
	ni48-72s96	-2.4440	1.7831	.812	-8.0860	3.1980
t 96h	t 24h	14.1420*	1.7831	.000	8.5000	19.7840
	t 48h	16.4280*	1.7831	.000	10.7860	22.0700
	t 72h	17.1280*	1.7831	.000	11.4860	22.7700
	nim72s96	12.0160*	1.7831	.000	6.3740	17.6580
	ni0-24-48-72s96	16.7613*	1.7072	.000	11.3596	22.1631
	ni48-72s96	14.6840*	1.7831	.000	9.0420	20.3260
nim72s96	t 24h	2.1260	1.7831	.891	-3.5160	7.7680
	t 48h	4.4120	1.7831	.206	-1.2300	10.0540
	t 72h	5.1120	1.7831	.096	-.5300	10.7540
	t 96h	-12.0160*	1.7831	.000	-17.6580	-6.3740
	ni0-24-48-72s96	4.7453	1.7072	.114	-.6564	10.1471
	ni48-72s96	2.6680	1.7831	.745	-2.9740	8.3100
ni0-24-48-72s96	t 24h	-2.6193	1.7072	.723	-8.0211	2.7824
	t 48h	-.3333	1.7072	1.000	-5.7351	5.0684
	t 72h	.3667	1.7072	1.000	-5.0351	5.7684
	t 96h	-16.7613*	1.7072	.000	-22.1631	-11.3596
	nim72s96	-4.7453	1.7072	.114	-10.1471	.6564
	ni48-72s96	-2.0773	1.7072	.882	-7.4791	3.3244
ni48-72s96	t 24h	-.5420	1.7831	1.000	-6.1840	5.1000
	t 48h	1.7440	1.7831	.955	-3.8980	7.3860
	t 72h	2.4440	1.7831	.812	-3.1980	8.0860
	t 96h	-14.6840*	1.7831	.000	-20.3260	-9.0420
	nim72s96	-2.6680	1.7831	.745	-8.3100	2.9740
	ni0-24-48-72s96	2.0773	1.7072	.882	-3.3244	7.4791

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

Means Plots



Oneway No. total de células TRAP+

Descriptives

No. total de células TRAP+

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
t 24h	5	11.9860	1.9992	.8941	9.5036	14.4684	10.60	15.50
t 48h	5	11.9000	1.4633	.6544	10.0831	13.7169	9.70	13.70
t 72h	5	16.2000	4.5548	2.0370	10.5445	21.8555	10.75	21.25
t 96h	5	32.6400	3.0246	1.3526	28.8845	36.3955	31.00	38.00
nim72s96	5	15.0000	.0000	.0000	15.0000	15.0000	15.00	15.00
ni0-24-48-72s96	6	10.6667	4.4121	1.8012	6.0364	15.2969	6.00	17.00
ni48-72s96	5	14.0000	1.2247	.5477	12.4793	15.5207	13.00	16.00
Total	36	15.9064	7.5443	1.2574	13.3538	18.4590	6.00	38.00

ANOVA

No. total de células TRAP+

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	1744.610	6	290.768	34.075	.000
Within Groups	247.463	29	8.533		
Total	1992.073	35			

Post Hoc Tests

Multiple Comparisons

Dependent Variable: No. total de células TRAP+

Tukey HSD

(I) tratamiento	(J) tratamiento	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
t 24h	t 48h	8.600E-02	1.8475	1.000	-5.7598	5.9318
	t 72h	-4.2140	1.8475	.287	-10.0598	1.6318
	t 96h	-20.6540*	1.8475	.000	-26.4998	-14.8082
	nim72s96	-3.0140	1.8475	.664	-8.8598	2.8318
	ni0-24-48-72s96	1.3193	1.7689	.988	-4.2776	6.9162
	ni48-72s96	-2.0140	1.8475	.926	-7.8598	3.8318
t 48h	t 24h	-8.6000E-02	1.8475	1.000	-5.9318	5.7598
	t 72h	-4.3000	1.8475	.266	-10.1458	1.5458
	t 96h	-20.7400*	1.8475	.000	-26.5858	-14.8942
	nim72s96	-3.1000	1.8475	.635	-8.9458	2.7458
	ni0-24-48-72s96	1.2333	1.7689	.992	-4.3636	6.8302
	ni48-72s96	-2.1000	1.8475	.911	-7.9458	3.7458
t 72h	t 24h	4.2140	1.8475	.287	-1.6318	10.0598
	t 48h	4.3000	1.8475	.266	-1.5458	10.1458
	t 96h	-16.4400*	1.8475	.000	-22.2858	-10.5942
	nim72s96	1.2000	1.8475	.994	-4.6458	7.0458
	ni0-24-48-72s96	5.5333	1.7689	.054	-6.3558E-02	11.1302
	ni48-72s96	2.2000	1.8475	.892	-3.6458	8.0458
t 96h	t 24h	20.6540*	1.8475	.000	14.8082	26.4998
	t 48h	20.7400*	1.8475	.000	14.8942	26.5858
	t 72h	16.4400*	1.8475	.000	10.5942	22.2858
	nim72s96	17.6400*	1.8475	.000	11.7942	23.4858
	ni0-24-48-72s96	21.9733*	1.7689	.000	16.3764	27.5702
	ni48-72s96	18.6400*	1.8475	.000	12.7942	24.4858
nim72s96	t 24h	3.0140	1.8475	.664	-2.8318	8.8598
	t 48h	3.1000	1.8475	.635	-2.7458	8.9458
	t 72h	-1.2000	1.8475	.994	-7.0458	4.6458
	t 96h	-17.6400*	1.8475	.000	-23.4858	-11.7942
	ni0-24-48-72s96	4.3333	1.7689	.215	-1.2636	9.9302
	ni48-72s96	1.0000	1.8475	.998	-4.8458	6.8458
ni0-24-48-72s96	t 24h	-1.3193	1.7689	.988	-6.9162	4.2776
	t 48h	-1.2333	1.7689	.992	-6.8302	4.3636
	t 72h	-5.5333	1.7689	.054	-11.1302	6.356E-02
	t 96h	-21.9733*	1.7689	.000	-27.5702	-16.3764
	nim72s96	-4.3333	1.7689	.215	-9.9302	1.2636
	ni48-72s96	-3.3333	1.7689	.506	-8.9302	2.2636
ni48-72s96	t 24h	2.0140	1.8475	.926	-3.8318	7.8598
	t 48h	2.1000	1.8475	.911	-3.7458	7.9458
	t 72h	-2.2000	1.8475	.892	-8.0458	3.6458
	t 96h	-18.6400*	1.8475	.000	-24.4858	-12.7942
	nim72s96	-1.0000	1.8475	.998	-6.8458	4.8458
	ni0-24-48-72s96	3.3333	1.7689	.506	-2.2636	8.9302

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

Means Plots

