



Osteoclastos en el hueso alveolar y las moléculas de adhesión intercelular (icam-1)

En células del ligamento periodontal durante el estrés mecánico, en ratas tratadas con diclofenaco o nimesulide

Alveolar bone osteoclasts and intercellular adhesion molecule 1 (icam-1) On periodontal ligament cells under mechanical stress in rats with diclofenac or nimesulid treatment.

Ana Lilia García Hernández

Calleja Quevedo Elsa

Gómez Clavel José Francisco

Facultad de Estudios Superiores Iztacala. UNAM.

Resumen

El nimesulide es un inhibidor débil de la síntesis de prostaglandinas, capaz de disminuir la población de osteoclastos en el hueso alveolar de rata. La expresión de las moléculas de adhesión ICAM-1 es importante en la migración de las células precursoras de los osteoclastos hacia los sitios de resorción. El diclofenaco, fuerte inhibidor de las prostaglandinas, inhibe la expresión de ICAM-1. En este estudio usamos un modelo de estrés mecánico ortodóncico sobre el hueso alveolar para comparar el efecto del diclofenaco y nimesulide en la población de osteoclastos y en la expresión de ICAM-1. A 15 ratas se les administró diclofenaco y a 15 nimesulide. Se sacrificaron en grupos de cinco a las 24, 48 y 72 hrs. 5 ratas se usaron como controles basales. Se hicieron cortes histológicos de los maxilares que fueron teñidos con HE, y con la reacción de la fosfatasa ácida resistente al tartrato. Otros se trataron para inmunohistoquímica con anticuerpos monoclonales anti-ICAM-1. **Resultados:** entre los animales tratados con diclofenaco y nimesulide no se encontró diferencia significativa en el número de osteoclastos ($p > .001$). En el grupo tratado con diclofenaco la expresión de ICAM-1 fue decreciendo de las 12, 24 y 48 horas y la diferencia de este grupo con los testigos y los animales tratados con nimesulide fue significativa ($p < 0.001$).

Palabras clave: osteoclasto, hueso alveolar, ICAM-1, ligamento periodontal.

Abstract

Nimesulide is a weak inhibitor of prostaglandines synthesis, is capable of diminish considerably the population of osteoclasts in a rat's alveolar bone. The expression of adhesion molecules ICAM-1 are important for precursor osteoclast's cells migrate, towards the sites of resorption. Diclofenac inhibits the expression of ICAM-1. In this study we use a model of orthodontical mechanical stress over alveolar bone in order to compare the effect of both NSAIDs on the population of osteoclasts and in the expression of ICAM-1., fifteen rats were given diclofenac and fifteen other rats were given nimesulide. The animals were sacrificed in group of 5 at 24, 48 and 72 hours. Five rats were used like basal control. Maxilar histological slides were made and were dyed with HE and with TRAP. They were also given an immunohistochemical treatment with monoclonal antibodies anti-ICAM-1. **Results:** between diclofenac and nimesulide animals there was no significative difference found in the number of osteoclasts ($p > .001$), the difference between both experimental group and the control group was significative ($p < 0.001$). In relation to the expression of ICAM-1, the witnesses submitted to mechanical stress, the group treated with diclofenac the ICAM-1 expression decreased at 12, 24 and 48 hours, and the difference between this group and the control and the animals treated with nimesulide was significative ($p = 0.001$).

Key words: osteoclasts, alveolar bone, ICAM-1, periodontal ligament.

Introducción

Los sistemas ortodóncicos se basan en la aplicación de fuerzas que son transmitidas a través de la aparatología a las células del periodonto, la respuesta es la remodelación del hueso alveolar a través de la formación de osteoclastos y osteoblastos, regulado por un sofisticado proceso bioquímico.¹ Las señalizaciones necesarias para la osteoclastogénesis involucran a moléculas solubles como las prostaglandinas e interacciones célula-célula.² En sistemas de cocultivo de células esplénicas de ratón y células osteoblásticas o estromales, se necesita de contactos célula-célula para la maduración de los osteoclastos.³ Las células estromales y los osteoblastos expresan de manera particular la molécula de adhesión intercelular 1 (ICAM-1) que es necesaria para la osteoclastogénesis.^{4,2} La fusión de preosteoclastos y la activación de los osteoclastos formados requiere de la expresión del ligando del receptor nuclear kapa B (RANKL) en los osteoblastos, cuya interacción con el receptor del receptor nuclear kapa B (RANK) en los osteoclastos depende de la adhesión firme entre estas células que es mediada por ICAM-1.⁵ En el tejido óseo, ICAM-1 se expresa en la superficie de los osteoblastos y su ligando o contrarreceptor, el antígeno-1 asociado a las funciones leucocitarias (LFA-1; CD11a), en la superficie del osteoclasto y sus precursores.⁶

Los antiinflamatorios no esteroideos (AINEs) tienen como principal mecanismo de acción la inhibición de la síntesis de prostaglandinas. Diversos autores han reportado el efecto de los AINEs en la inhibición del movimiento ortodóncico y la osteoclastogénesis asociada a él.^{7,8} El diclofenaco es un AINE derivado del ácido heteroaril acético que inhibe la expresión de moléculas de adhesión en leucocitos.⁹ El nimesulide es un AINE del grupo de las sulfonamidas que inhibe a la ciclo-oxigenasa II (COX2) por lo que bloquea la síntesis de prostaglandinas destructivas y no modifica la síntesis de prostaglandinas citoprotectoras¹⁰. Del nimesulide no se ha reportado si tiene o no acción inhibitoria en la expresión de las moléculas de adhesión en los leucocitos, por lo que este trabajo se diseñó para explorar los efectos del diclofenaco y el nimesulide en la expresión de ICAM-1 y la formación de osteoclastos en el periodonto de ratas sometidas a estrés ortodóncico.

Material y métodos

El experimento se realizó utilizando 50 ratas wistar macho con 250gr +/- 25gr de peso que se dividieron en 4 grupos: A 45 ratas se les colocó bajo anestesia general vía peritoneal (1.5ml/Kg) un aparato ortodóncico según la técnica descrita por Igarachi¹¹ que consiste en un resorte de expansión elaborado de alambre Ni-Ti de 0.012 pulgadas de grosor y activado con una fuerza de 10gr., entre los primeros y segundos molares maxilares. Se distribuyeron al azar en 3 grupos de 15 ratas cada uno. A uno de ellos se le administró Diclofenaco en dosis de 2mg/kg de peso, vía subcutánea cada 12hrs. A otro se le administró Nimesulide en dosis de 0.08ml vía oral cada 12hrs. y a los 15 animales restantes sirvieron como testigos (TM) y sólo se le administró solución salina. Los animales fueron sacrificados en grupos de 5 a las 24, 48 y 72 horas con exposición a dióxido de carbono. A las 5 ratas restantes no se les dio ningún tratamiento ortodóncico ni con medicamento (TO).

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

A todos los maxilares se les deshidrató en alcoholes crecientes para incluirse en parafina y obtener cortes seriados de 6 micrómetros que fueron teñidos con hematoxilina y eosina y con la reacción de fosfatasa ácida resistente a tartrato (TRAP) para la identificación de los osteoclastos y a otros se les trató para inmunohistoquímica con anticuerpos monoclonales según la técnica indirecta con peroxidasa de rábano para evidenciar la expresión de la molécula de adhesión intercelular- 1 (ICAM-1).

La observación histológica se enfocó al septum intraradicual de las raíces vestibulares de los primeros molares para contar células multinucleadas positivas a TRAP y en la zona del ligamento periodontal para contar células positivas a ICAM-1, en un área de 400 por 800 micras de cada cinco cortes de intervalo de los molares seleccionados. A los datos observados obtenidos se les aplicó la técnica estadística ANOVA, ANOVA de dos vías y la prueba de Tukey para encontrar las diferencias significativas entre los diferentes grupos.

Resultados

En el grupo al que no se le dio ningún tratamiento (T0) no se encontraron células TRAP+. Después de aplicar la fuerza mecánica con el resorte en "U" entre los primeros y segundos molares superiores, a las 24 horas observamos en el grupo con nimesulide un promedio de 3.44 osteoclastos. En el grupo con diclofenaco un promedio de 2.47 osteoclastos y por último en el grupo testigo al que sólo se le aplicó la fuerza mecánica (TM) un promedio de 6.41 osteoclastos. Las diferencias entre el grupos testigo y los experimentales fueron significativas ($P < 0.001$).

A las 48 horas después de la colocación del resorte en U, observamos en la zona interradicular del primer molar maxilar en el grupo tratado con nimesulide un promedio de 2.4 osteoclastos, en el grupo con diclofenaco, un promedio de 1.88 osteoclastos (Figuras 1 y 2) y en el grupo testigo sin tratamiento farmacológico un promedio de 9.63 osteoclastos. Las diferencias entre el grupo testigo y los experimentales fueron significativas ($p < 0.001$).

A las 72 horas en el grupo con nimesulide observamos un promedio de 1.84 osteoclastos, en el grupo con diclofenaco un promedio de 1.45 osteoclastos y por último en el grupo testigo al que sólo se le aplicó la fuerza mecánica (TM) un promedio de 14.4 osteoclastos. Las diferencias entre el grupos testigo y los experimentales fueron significativas ($P < 0.001$).

Al comparar el número de osteoclastos entre los animales tratados con nimesulide y diclofenaco en los diferentes tiempo de tratamiento encontramos que no hubo diferencia significativa entre ellos y ambos fármacos resultaron igualmente eficaces para disminuir la población de osteoclastos ($p > 0.05$) (Figura 3).

Células positivas a I-CAM: observamos en el grupo experimental tratado con nimesulide, a las 24 hrs. (EN1) un promedio de 12.21 células positivas a ICAM-1 por zona de observación; en el grupo experimental con diclofenaco (ED1) un promedio de 7.6 células que expresaron ICAM-1, en el grupo testigo al que sólo se le aplicó la fuerza mecánica a las 24 horas (TM1) un promedio de 12.67 células positivas a ICAM-1 (Figura 4).

En el grupo tratado con nimesulide observamos a las 48 hrs. (EN2) un promedio de 18.38 células positivas a ICAM-1, en el grupo al que se le administró diclofenaco un promedio de

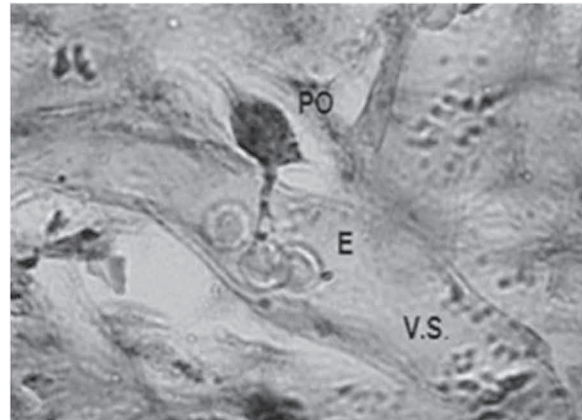


Figura 1. Microfotografía. Técnica H y E. (40x) Experimental nimesulide a las 48 hrs.(EN2) donde se observan osteoclastos adheridos al hueso en el espacio medular adyacente (O: osteoclastos; H.A.: hueso alveolar).

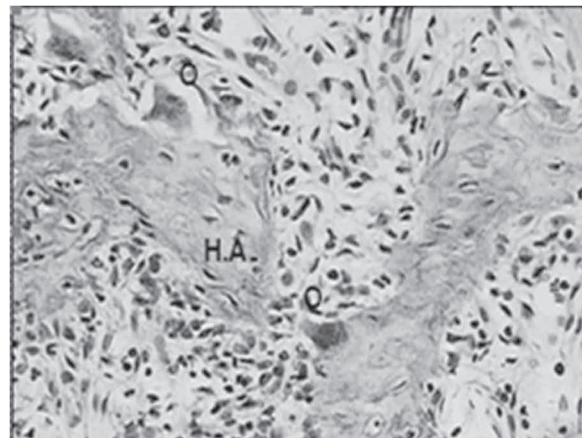


Figura 2. Microfotografía. Técnica Histológica TRAP. (100x) Experimental diclofenaco a las 48 hrs (ED2) donde se observan los preosteoclastos en el espacio del ligamento parodontal y su relación con los vasos sanguíneos. (PO: preosteoclasto; V.S.: vaso sanguíneo; E: eritrocitos).

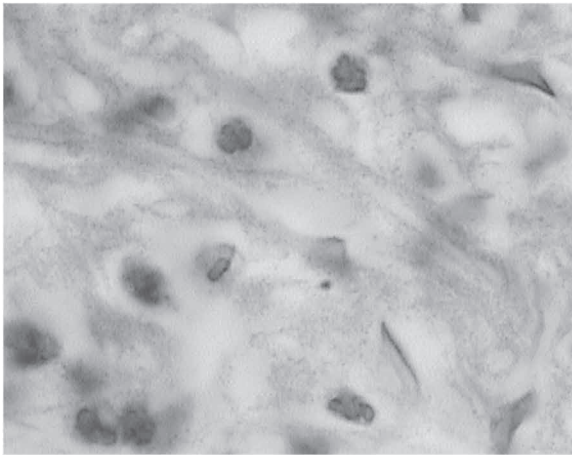


Figura 3. Promedio de osteoclastos por zona de observación en los cuatro grupos del estudio. En el grupo experimental con nimesulide a las 24 hrs. 3.44 osteoclastos; a las 48 hrs. 2.42 osteoclastos y por último a las 72 hrs. 1.84 osteoclastos. En el grupo experimental con diclofenaco a las 24 hrs. 2.47; a las 48 hrs. un promedio de 1.88 osteoclastos. y por último a las 72 hrs. un promedio de 6.41 osteoclastos. En el grupo testigo sin tratamiento mecánico o farmacológico (T0) un promedio de 0 osteoclastos por zona de observación. En el grupo testigo al que sólo se le aplicó la fuerza mecánica (TM) y sin tratamiento farmacológico a las 24 horas un promedio de 6.41 osteoclastos; a las 48 hrs. un promedio de 9.63 osteoclastos y por último a las 72 hrs. un promedio de 14.4 osteoclastos.

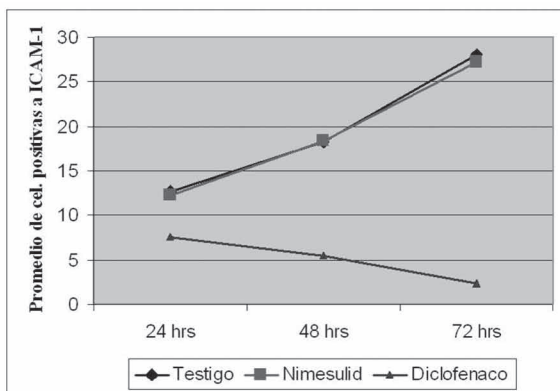


Figura 4. Microfotografía . Técnica inmunohistoquímica. (100x) Testigo con presión mecánica a las 48 hrs. (TM2) donde se observan las células positivas a ICAM-1 en la zona del ligamento parodontal.

5.4 (Figura 5); en el grupo testigo al que sólo se le aplicó la fuerza mecánica a las 48 hrs. (TM2) un promedio de 18.22.

En el grupo experimental con nimesulide observamos a las 72 hrs. (EN3) un promedio de 27.26 células. En el grupo experimental con diclofenaco a las 72 hrs. (ED3) un promedio de 2.3. En el grupo testigo al que sólo se le aplicó la fuerza mecánica a las 72 horas (TM3) un promedio de 28.07.

En relación al número de células positivas a ICAM-1 se encontró que no hubo diferencia significativa entre nimesulide y los testigos TM ($p > .01$) pero ésta si fue significativa entre el grupo tratado con diclofenaco y el grupo TM ($p < .001$). La diferencia entre los grupos tratados con nimesulide y diclofenaco en los diferentes tiempos de tratamiento no fue significativa a las 24 horas ($p > .001$) pero si a las 48 ($p < .001$) y a las 72 horas ($p < .001$) (Figura 6).

Discusión

En nuestro trabajo hemos demostrado que el nimesulide es igualmente efectivo que el diclofenaco en la reducción de la población de osteoclastos. El nimesulide tiene la ventaja de ser un inhibidor preferencial de COX2 que no tiene efecto secundario sobre los riñones, como el diclofenaco y a la inversa de otros AINES es gastroprotector. Además, mientras que otros inhibidores de COX2 incrementan el riesgo de enfermedades cardiovasculares, nimesulide no tiene acción cardiotoxica significativa. Se ha dicho que nimesulide es un AINE atípico, diferente de los inhibidores no selectivos y selectivos de COX2.¹²

En los animales testigo se encontraron precursores intravasculares TRAP positivo desde las 24 horas de tratamiento, lo que sugiere que independientemente de que los preosteoclastos presentes en el ligamento periodontal inicien la diferenciación hacia células de resorción, la llegada de preosteoclastos por vía sanguínea, también es precoz.

En el estudio de Okada y col.² tanto en los cultivos con médula ósea y en los cocultivos de células del bazo y osteoblastos, los osteoclastos inducidos por 1,25 dihidroxicolecalciferol (1,25D), la hormona paratiroidea (PTH) e interleucina 1-alfa (IL-1alfa) fueron inhibidos por anticuerpos anti ICAM-1 o anti LFA-1. Estos anticuerpos también inhibieron la liberación de calcio y la resorción ósea. Estos resultados

sugieren que la estimulación de la resorción con 1,25D, PTH e IL-1alfa se asocia, al menos en parte, con un incremento de la expresión de ICAM-1 en osteoblastos. Ellos proponen que IL1, 1,25D y PTH inducen no sólo a RANKL, que es esencial para la maduración de los osteoclastos, si no también a ICAM-1, que es el mediador de la alta afinidad de adhesión entre los osteoblastos y los precursores de los osteoclastos y es un prerrequisito para el eficiente funcionamiento de RANKL durante la osteoclastogénesis.

En contraste con la IL-1, 1,25D y PTH, también PGE2 induce la expresión de RANKL. PGE2 no induce la expresión de ICAM-1 en los osteoblastos, y la inducción de la resorción ósea por la PGE2 no es inhibida por anticuerpos anti ICAM1/LFA. Okada y col.² sugieren que PGE2 induce una vía alterna que estimula la formación de osteoclastos en una forma independiente de la adhesión celular, aunque contradice las evidencias que indican que los osteoclastos deben tener contacto físico con las células estromales para poder diferenciarse en células maduras. Estos resultados parecen indicar que los mecanismos de interacción entre osteoblastos y osteoclastos pueden diferir de acuerdo con los diferentes estimuladores de la resorción ósea.

El diclofenaco inhibe COX1 y COX2 y también la síntesis de ICAM-1.¹³ Inicialmente nosotros encontramos células positivas a ICAM-1 porque la expresión de esta proteína es constitutiva, pero el número de células positivas va decreciendo conforme aumenta la duración del tratamiento con diclofenaco.

El diclofenaco inhibe la actividad de los osteoblastos.¹⁴ La beta1 integrina de la que depende la adhesión de los osteoblastos a la matriz induce ICAM-1 y RANKL y la formación de osteoclastos vía la tirosina cinasa. Nakayadama y col.⁵ proponen que la beta1-integrina media la señalización inductora de los osteoblastos que estimula la expresión de ICAM-1 y RANKL y la maduración de los osteoclastos.

Blair y Athanasou¹⁵ proponen que si bien los factores locales y sistémicos que influyen en el metabolismo óseo ejercen su influencia alterando el sistema RANK/RANKL/OPG, las citocinas TNF-alfa, IL-1 e IL-6 también promueven la osteoclastogénesis por un mecanismo independiente pero interrelacionado con el sistema RANK/RANKL/OPG. Otros estudios con cultivos de monocitos de sangre periférica humana, y en presencia de M-CSF, a los

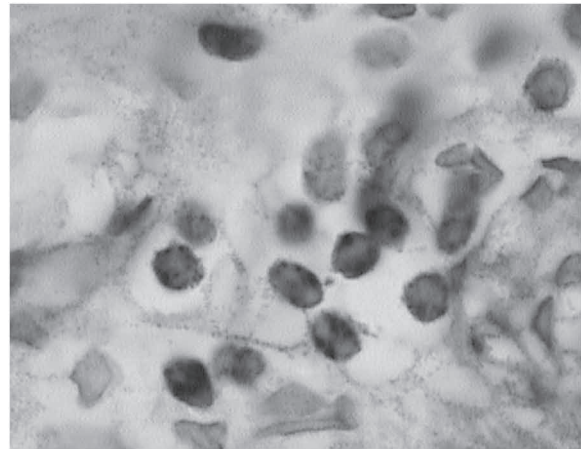


Figura 5. Microfotografía. Técnica inmunohistoquímica. (100x) Experimental con diclofenaco a las 48 hrs. (ED2) donde se observan las células positivas a ICAM-1 en la zona del ligamento parodontal.

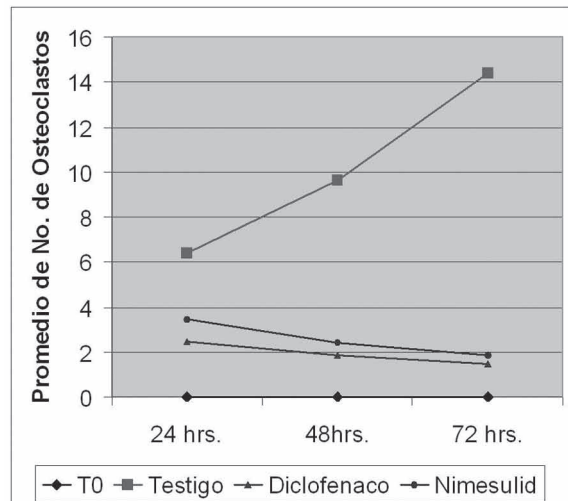


Figura 6. Después de aplicar el estímulo mecánico a través del resorte en U entre los primeros y segundos molares superiores, el promedio de células ICAM-1 positivas observadas en el grupo testigo, sin tratamiento farmacológico al as 24 horas fue de 12.67, a las 48 horas de 18.22 y a las 72 horas de 20.07. En los grupos a los que se le administró nimesulid observamos un promedio de células ICAM-1 positivas a las 24 horas de 12.21, a las 48 horas 18.38 y a las 72 horas de 27.26. En los grupos tratados con diclofenaco los promedios de las células que expresaron ICAM-1 son, a las 24 horas 7.6, a las 48 horas 5.4 y a las 72 horas, 2.3.



que fueron adicionadas TNF-alfa, IL-6 e IL-11, activaron la osteoclastogénesis,¹⁶ lo que sugiere que la osteoclastogénesis inducida por estas citocinas es totalmente independiente del sistema RANK-RANKL-OPG¹⁷. Los osteoclastos tratados con OPG sólo se diferencian en presencia de TNF-alfa e IL-1, lo que también apoya la idea de que el sistema de las citocinas puede estimular la diferenciación osteoclástica por un mecanismo independiente del sistema RANKL/RANK/OPG¹⁸. Se piensa que este mecanismo es de tipo "salvador" o "escape", y que no actúa en condiciones óseas normales.¹⁶ El aumento de la expresión de ICAM-1 en los grupos testigos y en los tratados con Nimesulide puede deberse a que este mecanismo esté presente en la inducción de la resorción bajo estrés mecánico y el Nimesulide inhibe la expresión del TNF-alfa, pero no de la IL-1, que es el inductor de ICAM-1. Habrá que diseñar nuevos experimentos para explorar esta hipótesis.

Los resultados de la prueba de ANOVA de dos sentidos muestran que el efecto de los tratamientos progresivos en el tiempo con diclofenaco y nimesulide tiene un efecto sumatorio en relación al número de osteoclastos, mientras que el efecto del diclofenaco en la expresión de ICAM-1 es multiplicativo esto se debe a que la inhibición de ICAM-1 no sólo ocurre en los osteoclastos, si no también en fibroblastos, monocitos, osteoblastos y células endoteliales.

Referencias bibliográficas

1. Masella RS, Meister M. Current concepts in the biology of orthodontic tooth movement. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 2006; 129:458-468.
2. Okada Y, Morimoto I, Ura K, Watanabe K, Eto S, Kumegawa M, Raisz L, Pilbeam C, Tanaka Y. Cell-to-Cell adhesion via intercellular adhesion molecule-1 and leukocyte function-associated antigen-1 pathway is involved in 1alpha,25(OH)2D3, PTH and IL-1alpha-induced osteoclast differentiation and bone resorption. *Endocr J*. 2002; 49(4):483-95.
3. Udagawa N, Takahashi N, Akatsu T, Sasaki T, Yamaguchi A, Kodama H, Martin TJ, Suda T. The bone marrow-derived stromal cell lines MC3T3-G2/PA6 and ST2 support osteoclast-like cell differentiation in cocultures with mouse spleen cells. *Endocrinology*. 1989; 125(4):1805-13.
4. Takahashi N, Akatsu T, Udagawa N, Sasaki T, Yamaguchi A, Moseley JM, Martin TJ, Suda T. Osteoblastic cells are involved in osteoclast formation. *Endocrinology*. 1988; 123 (5):2600-2602.
5. Nakayama S, Okada Y, Saito K, Tamura M, Tanaka Y. b1 integrin/focal adhesion kinase-mediated signaling induces intercellular adhesion molecule 1 and receptor activator of nuclear factor kappa B ligand on osteoblasts and osteoclast maturation. *J. Biol. Chem.* 2003; 278 (46): 45368-45374.
6. Tanaka Y, Maruo A, Fujii K, Nomi M, Nakamura T, Eto S, y Minami Y. Intercellular adhesion molecule 1 discriminates functionally different populations of human osteoblasts: characteristic involvement of cell cycle regulators. *J. Bone Miner. Res.* 2000; 15 (10) 1912-1923.
7. de Carlos F, Cobo J, Díaz-Esnal B, Arguelles J, Vijande M, Costales M. Orthodontic tooth movement after inhibition of cyclooxygenase-2. *Am J Orthod Dentofacial Orthop*. 2006; 129(3):402-6.
8. Arias OR, Marquez-Orozco MC. Aspirin, acetaminophen, and ibuprofen: their effects on orthodontic tooth movement. *Am J Orthod Dentofacial Orthop*. 2006; 130(3):364-70.
9. Díaz-González F, González-Alvaro Y, Campanero MR y col. Prevention of in vitro neutrophil-endothelial attachment through shedding of L-selectin by nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *J Clin Invest* 1995; 95:1756-1765.
10. Suleyman H, Cadirci E, Albayrak A, Halici Z. Nimesulide is a selective COX-2 inhibitory, atypical non-steroidal anti-inflammatory drug. *Curr Med Chem*. 2008; 15(3):278-83.
11. Igarashi K, Miyoshi K, Shinoda H, Saeki A, Mitani H. Diurnal variation in tooth movement in response to orthodontic force in rat. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 1998; 114:8-14.
12. Suleyman H, Cadirci E, Albayrak A y Halici Z. Nimesulide is a Selective COX-2 Inhibitory, Atypical Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drug. *Curr Med Chem*. 2008; 15(3):278-83.
13. Sakai A. Diclofenac inhibits endothelial cell adhesion molecule expression induced with lipopolysaccharide. *Life Sci*. 1996; 58(26):2377-87.
14. Pablos AB, Ramalho SA, König B Jr, Furuse C, de Araújo VC, Cury PR. Effect of meloxicam and diclofenac sodium on peri-implant bone healing in rats. *J Periodontol*. 2008; 79(2):300-6.
15. Blair HC, Athanasou NA. Recent advances in osteoclast biology and pathological bone resorption. *Histol Histopathol*. 2004; 19(1):189-99
16. Steeve KT, Marc P, Sandrine T, Dominique H y Yannick F IL-6, RANKL, TNF-alpha/IL-1: interrelations in bone resorption pathophysiology. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2004 ; 15(1):49-60.
17. Fuller K, Murphy C, Kirstein B, Fox SW, Chambers TJ. TNFalpha potentially activates osteoclasts, through a direct action independent of and strongly synergistic with RANKL. *Endocrinology*. 2002; 143(3):1108-18.
18. Suda T, Kobayashi K, Jimi E, Udagawa N, Takahashi N. The molecular basis of osteoclast differentiation and activation. *Novartis Found Symp*. 2001;232:235-47; discussion 247-5
19. Tanaka Y, Maruo A, Fujii K, Nomi M, Nakamura T, Eto S, Minami Y. Intercellular adhesion molecule 1 discriminates functionally different populations of human osteoblasts: characteristic involvement of cell cycle regulators. *J Bone Miner Res*. 2000; 15(10):1912-23