



Efecto del nimesulide en la formación de osteoclastos inducidos por estrés mecánico

José Francisco Gómez Clavel,* Antonio César Domínguez Benavides,* Elsa Aurora Calleja Quevedo*

RESUMEN

En este estudio evaluamos el efecto del nimesulide, un inhibidor débil de la biosíntesis de prostaglandinas con el objetivo de observar su efecto en la formación de osteoclastos. A 60 ratas Wistar machos de 250 ± 25 g de peso se les colocó un resorte en forma de U de níquel-titanio de 0.012 pulgadas, entre los primeros molares maxilares. Los animales se dividieron en cuatro grupos, a tres de éstos se les administró nimesulide a dosis baja, media y alta. Fueron sacrificadas a las 24, 48 y 72 horas, se les disecó el maxilar que se descalcificó con EDTA, para incluirse en paraplast y obtener cortes de 7 micrómetros que se tiñeron con hematoxilina y eosina. **Resultados:** El nimesulide disminuyó la población de osteoclastos en todas las dosis. A las 24 horas la inhibición fue dependiente de la dosis. A las 48 y 72 horas todas las dosis fueron efectivas. En el grupo testigo, el número de osteoclastos se incrementó gradualmente a las 24, 48 y 72 horas.

Palabras clave: Nimesulide, osteoclastos, estrés mecánico.
Key words: Nimesulid, osteoclast, mechanical stress.

INTRODUCCIÓN

Los sistemas clínicos ortodóncicos que hoy se emplean utilizan fuerzas biomecánicas para inducir el remodelado óseo y el movimiento dentario deseado, sin embargo el mecanismo exacto por el cual estos estímulos mecánicos son transformados en la actividad celular requerida para la remodelación ósea, no es del todo conocido.¹ El hueso se remodela gracias al aumento de osteoclastos activos en las zonas de presión y del aumento de la acción osteoblástica en la zona de tensión.² A pesar de que la histología del proceso de remodelación ha sido estudiada en forma extensiva, los mecanismos bioquímicos que inician o facilitan el movimiento ortodóncico no han sido del todo comprendidos.

El estrés mecánico ortodóncico induce la síntesis y secreción de prostaglandinas en células locales, lo cual estimula la actividad de resorción de los osteoclastos.^{3,4}

Los antiinflamatorios no esteroideos (AINEs) son ácidos orgánicos débiles que inhiben la biosíntesis de

ABSTRACT

In the present study we observed the effect of nimesulide with the objective of evaluating their effect in osteoclast formation. We used Sixty male Wistar rats weighing around 250 ± 25 g. A uniform standardized U spring, made of 0.012-inch nickel-titanium wire was set in each animals mouth between the right and left upper first molar. The animals were divided into 4 groups and three of them were prescribed with low, medium and high doses of nimesulid. The animals were killed at 24, 48 and 72 hours after the placement of the appliances. The maxillae was removed and fixed in formaldehyde for 48 hours, and subsequently decalcified in EDTA (pH 7.4), and included in Paraplast. Serial sections of 7 micrometers were cut and stained with hematoxylin and eosin. **Results:** the NSAIDs nimesulide in all doses inhibited the formation of osteoclasts. At 24 h the osteoclast inhibition was dosis dependent. At 48 and 72 h all doses were effective. In control group, osteoclasts increase gradually at 24, 48 and 72 h.

las prostaglandinas e inhiben la inflamación. El nimesulide, es un fármaco derivado de las sulfonamidas, es un potente antiinflamatorio, analgésico y con actividad antipirética. Es bien tolerado gástricamente; inhibe selectivamente a la ciclooxigenasa 2 (COX-2), la isoenzima que se expresa durante la inflamación para que se sinteticen las prostaglandinas.^{5,6} Además inhibe la síntesis de enzimas proteolíticas, la formación de radicales libres así como la liberación de la histamina. Reduce la síntesis de citocinas, principalmente del factor de necrosis tisular alfa (TNF).

Varios estudios han demostrado que la administración de AINEs durante el tratamiento ortodóncico puede disminuir el movimiento de los dientes. Yamasaki y col. administraron indometacina y encontraron que inhibe la aparición de osteoclastos.⁷ Wong y col. reportaron que la aspirina reduce el movimiento dental

* Facultad de Estudios Superiores Iztacala. Universidad Nacional Autónoma de México.

en cobayos.⁸ Mohammed y col. también observaron la inhibición en el movimiento dental por la indometacina en la rata.⁹ Chumblay y Tuncay observaron que la indometacina reduce el movimiento dental en gatos,¹⁰ finalmente, Sari y col. compararon el efecto de la aspirina y el refecoxib durante el movimiento ortodóncico en humanos, midiendo los niveles de prostaglandinas en el fluido crevicular, y encontraron que la aspirina inhibe en mayor grado la expresión de prostaglandinas que el refecoxib.¹¹

El objetivo de nuestro trabajo es el de describir el efecto de la administración de nimesulide en la población de osteoclastos en el hueso alveolar de ratas sometidas a presión ortodóncica, ya que es un inhibidor relativamente débil de la síntesis de PGs *in vivo* y su potente efecto antiinflamatorio parece deberse a sus otras acciones que también bloquean la respuesta inflamatoria.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se utilizaron 60 ratas Wistar machos de 250 ± 20 g que fueron mantenidas en condiciones de bioterio y alimentadas *ad libitum*. Previa anestesia con pentobarbital sódico (1.5 mL por kg de peso) a todos los animales se les colocó un resorte en forma de U elaborado con alambre de níquel-titanio de 0.012 pulgadas de grosor y activado con una fuerza de 10 g, colocado entre los primeros y segundos molares maxilares de acuerdo a la técnica descrita por Igarachi¹² (Figura 1), y se les distribuyó en los siguientes grupos de 15 animales:

Grupo 1. (Testigo) no se les administró ningún fármaco, solamente solución salina y la colocación del aparato ortodóncico.



Figura 1. El aparato ortodóncico colocado entre los primeros y segundos molares maxilares derechos e izquierdos.

Grupo 2. Se les administró nimesulide por vía oral en dosis de .04 mL = .5 mg. (Dosis baja).

Grupo 3. Se les administró nimesulide por vía oral en dosis de .08 mL = 1 mg. (Dosis media).

Grupo 4. Se les administró nimesulide por vía oral en dosis de .16 mL = 2 mg. (Dosis alta).

Los animales de los 4 grupos se sacrificaron por sedación y decapitación a las 24, 48 y 72 horas, después de la colocación de los aparatos ortodóncicos.

Una vez sacrificados los animales se les diseccionó el maxilar superior y se fijó en formaldehído con picrato durante 48 horas, posteriormente se descalcificó con ácido etilendiaminotetracético (EDTA) a pH 7.4 durante 28 días o hasta que radiográficamente no se obser-

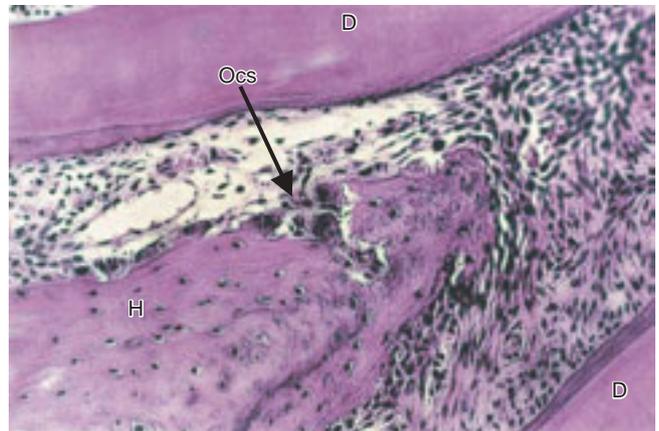


Figura 2. Testigo de 48 horas osteoclastos (Ocs) en la superficie del septum interradicular (H), con D está marcada la dentina.

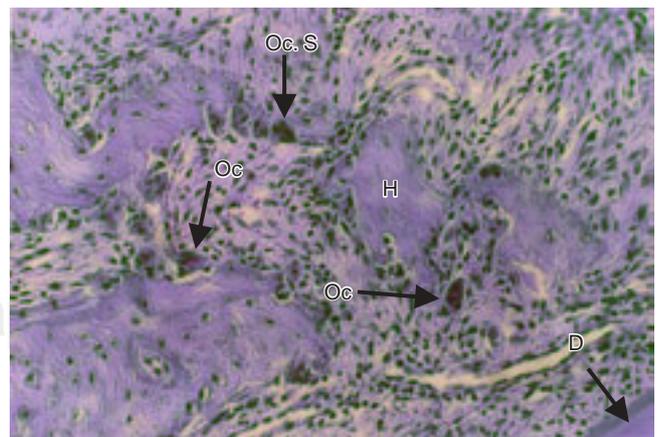


Figura 3. Osteoclastos (Oc) en el septum interradicular (H) de un testigo de 72 h, con D se marca la dentina.

varon zonas de calcificación. A todos los maxilares se les deshidrató en alcoholes crecientes para incluirse en paraplast y obtener cortes seriados de 7 micras que fueron teñidos con hematoxilina y eosina.

El examen histológico se enfocó al septum intrarradicular de las raíces vestibulares de los primeros molares, con el propósito de valorar el grado de reabsorción ósea, se contó el número de osteoclastos en un área de 400 por 800 micras de cada cinco cortes de intervalo, utilizando un aumento de 20x.

RESULTADOS

Encontramos que en las muestras obtenidas de los animales del grupo testigo, la media de osteoclastos fue de 2.2 ± 1.66 a las 24 h; de 4.4 ± 2.68 a las 48 h, y de 9.4 ± 4.52 a las 72 h (Figuras 1, 2 y 3).

En los cortes obtenidos de los animales del grupo experimental que se sacrificaron a las 24 horas, y a los que se les administró la dosis baja, se encontró una media de 1.27 ± 0.20 osteoclastos, las muestras de dosis media 0.35 ± 0.081 y las muestras de dosis alta 0.10 ± 0.082 (Figura 4).

En el caso de las muestras de maxilar de los animales del grupo a los que se les administró nimesulide

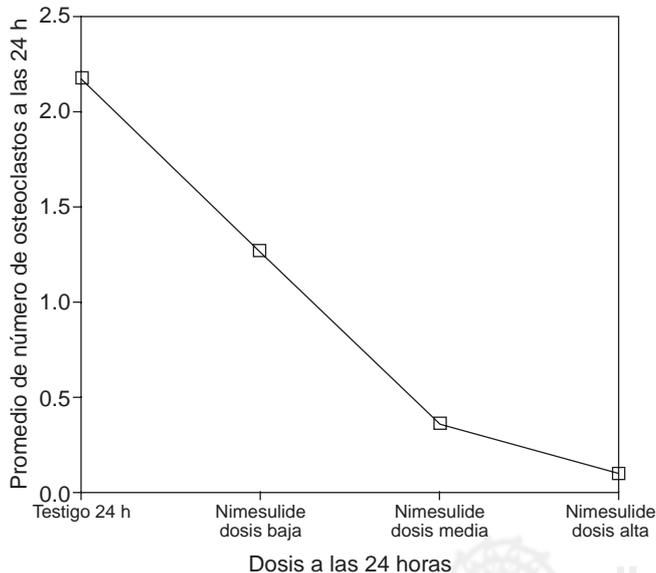


Figura 4. Se observa en la gráfica que la media del número de osteoclastos en el grupo testigo es de 2.17 ± 1.66 , y hay un descenso en el número de osteoclastos en los grupos experimentales, que a las 24 horas, es dependiente de la dosis; la dosis baja tiene una media de 1.27 ± 0.20 , la dosis media de 0.35 ± 0.081 y la dosis alta tiene una media de 0.10 ± 0.082 .

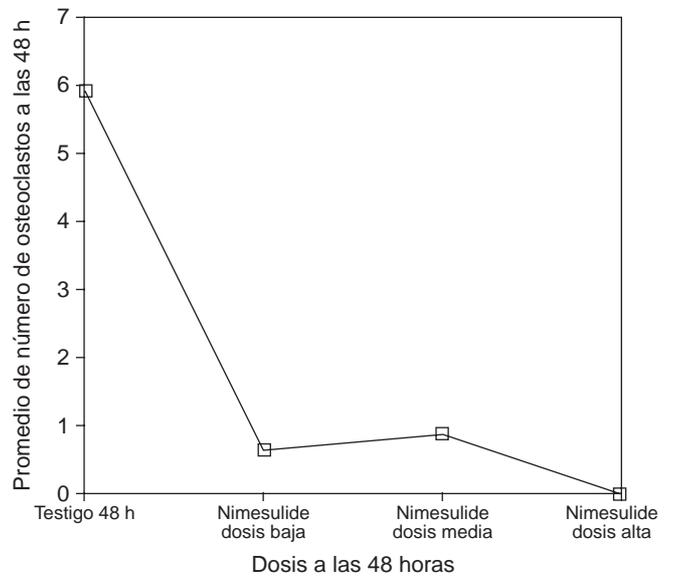


Figura 5. Se observa en la gráfica que la media del número de osteoclastos en el grupo testigo es de 5.94 ± 2.68 y hay una caída en el número de osteoclastos en los grupos experimentales de nimesulide; no se observan diferencias entre la media de los grupos experimentales de dosis baja, de dosis media y dosis alta, aunque en el grupo experimental de dosis alta no se observaron osteoclastos.

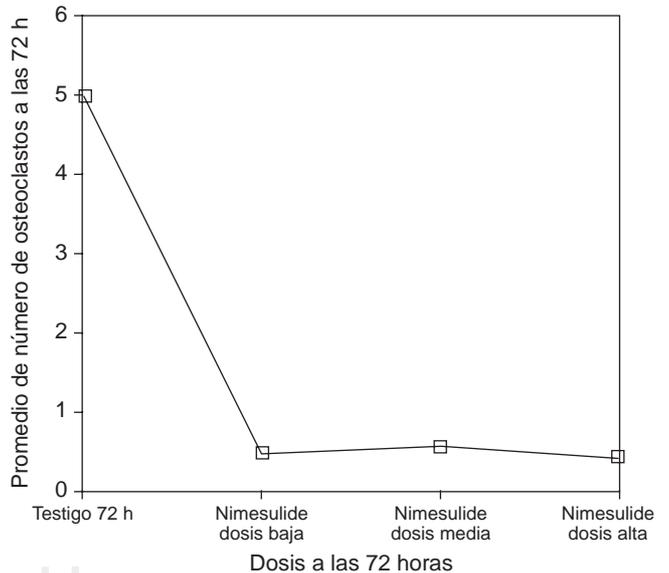


Figura 6. Se observa en la gráfica que la media en el número de osteoclastos en el grupo testigo es de 4.98 ± 1.70 y hay una caída en el número de osteoclastos en los grupos experimentales que a las 72 horas no es dependiente de la dosis, ya que el número de osteoclastos del grupo de dosis baja no difiere estadísticamente de los grupos de dosis media y dosis alta.

de y se sacrificaron a las 48 h, encontramos que el número de osteoclastos en el grupo de dosis baja, la media fue de 0.63 ± 0.43 , el grupo de dosis media de 0.88 ± 0.71 y en la dosis alta el número de osteoclastos fue de cero (Figura 5).

En las muestras obtenidas de los animales del grupo experimental a los que se les administró el nimesulide y se sacrificaron a las 72 h, encontramos que el número de osteoclastos en el grupo de dosis baja fue de 0.47 ± 0.40 , en la dosis media fue de 0.55 ± 0.34 y en la dosis alta de 0.42 ± 0.16 (Figura 6).

En las comparaciones obtenidas con los diferentes grupos a las 24 horas utilizando el análisis de varianza (ANOVA), se encontró que la media del grupo testigo tiene una diferencia significativa con el grupo experimental de nimesulide de dosis media y con el de dosis alta; siendo que el grupo de nimesulide de dosis media tiene una diferencia significativa con el testigo y el grupo experimental de nimesulide de dosis alta, tiene una diferencia significativa con el grupo testigo de 24 h ($p = 0.014$).

La diferencia en el número de osteoclastos entre los diferentes grupos a las 48 h es significativa con una p de .002.

En las comparaciones con los grupos testigo y experimental a las 48 h, se encontró que el grupo testigo, la media del número de osteoclastos, tiene una diferencia significativa en cuanto al número de osteoclastos con el grupo experimental de dosis baja, de dosis media y dosis alta. También el grupo de dosis baja tiene una diferencia significativa con el grupo testigo. El grupo experimental de dosis media tiene una diferencia significativa con el testigo y el grupo experimental.

DISCUSIÓN

Está documentado el papel que juegan las prostaglandinas en la reabsorción ósea.^{3,7}

Las prostaglandinas E1, E2 y la I₂ (prostaciclina) inducen la resorción ósea en modelos de hueso intacto, y paradójicamente inhiben la resorción por osteoclastos aislados, lo que sugiere que células residentes en el tejido óseo, producen mediadores de la resorción ósea, inducida por prostaglandinas en modelos de cultivos de órganos.⁴

Los resultados de nuestro estudio sugieren que existen otros factores además de las prostaglandinas en la formación de osteoclastos en los sitios de reabsorción ósea de las zonas de presión del periodonto, cuando se aplica una fuerza ortodóncica.

El nimesulide, un AINE selectivo de COX-II, inhibió fuertemente la aparición de osteoclastos. Los resultados de las 24 horas sugieren que la inhibición es de-

pendiente de la dosis, y que se requiere de un número mayor de concentración del fármaco para lograr la inhibición en la formación de osteoclastos. De manera similar a los resultados reportados por Yamasaki (1980) en el que utiliza indometacina, un AINEs del grupo de los ácidos arilacéticos.

El nimesulide tiene entre sus mecanismos de acción, no sólo la inhibición de la COX-II, sino que además, inhibe la generación de anión superóxido, así como de ácido hipocloroso, el más potente oxidante clorado generado por el sistema de la mieloperoxidasa.¹³

Se han señalado otros mediadores en la resorción ósea como la interleucina-I, TNF y los leucotrienos.

En nuestro modelo, en el que solamente observamos el efecto a las 24, 48 y 72 horas, la inhibición casi total de la formación de osteoclastos nos permiten sugerir que existen otras moléculas además de las prostaglandinas en la señalización requerida para estimular a los preostoclastos locales, para que reconozcan el sitio donde se localizarán en la superficie ósea a reabsorber y la fusión de los mismos.

Nuestro estudio sugiere que las PGs por sí solas no controlan totalmente el remodelado óseo asociado con el movimiento dental, ya que el nimesulide es un inhibidor relativamente débil de la síntesis de PGS.

Son varias las acciones del nimesulide que pueden explicar la eficaz acción inhibitoria de este AINE en la población de osteoclastos. Una acción importante del nimesulide que pudiera estar involucrada es la acción inhibitoria de la síntesis de TNF. Kudo y col (2002) cuantificaron monocitos en presencia del TNF e indujeron la formación de osteoclastos. Ellos encontraron que la IL-1 aumenta de 2 a 4 veces la resorción inducida por TNF y que la osteoprotegerina no inhibe este proceso.¹⁴

Yoshiaki y col (2002) demostraron que la histamina influye en la osteoclastogénesis, incrementando marcadamente los niveles de RANKL (un péptido sintetizado por los osteoblastos que estimula la formación de osteoclastos) en forma dosis dependiente.¹⁵ La acción inhibitoria sobre la liberación de la histamina también puede influir en la inhibición de la población de osteoclastos por el nimesulide.

Los estudios en animales sugieren que el nimesulide es menos ulcerogénico que la indometacina, pero en su acción analgésica y antiinflamatoria son equivalentes.

CONCLUSIONES

1. El AINE nimesulide es eficaz para disminuir la población de osteoclastos.
2. Es probable que existan otros mediadores, además de las PGS, que regulen el remodelado óseo durante el movimiento ortodóncico.

REFERENCIAS

1. Kohno T, Matsumoto Y, Kanno Z, Warita H. Experimental tooth movement under light orthodontics forces: rates of tooth movement and changes of the periodontium. *J Orthodontics* 2002; 29:129-135
2. Cho Y. A histologic study of the alveolar bone remodeling on the periosteal side incident to experimental tooth movement. *Dentistry in Japan* 1997; 33: 79-82.
3. Yamazaki K, Miura F, Suda T. Prostaglandin as a mediator of bone resorption induced by experimental tooth movement in rat. *J Dent Res* 1980; 9: 1635-42.
4. Kansaki H, Chiba M, Shimizu Y, Mitani H. Periodontal ligament cells under mechanical stress induce osteoclastogenesis by receptor activator nuclear factor kappaB ligand up-regulation via prostaglandin E2 synthesis. *J Bone Miner Res* 2002; 17(2): 210-20.
5. Rick D, Brogden RN. Nimesulide An Update of its pharmacodynamic and pharmacokinetic Properties, and Therapeutic Efficacy. *Drugs* 1994; 48(3): 431-54.
6. de Leval X, Julemont F, Benoit V, Frederich M, Pirotte B, Dogne JM. First and second generations of COX-2 selective inhibitors. *Mini Rev Med Chem* 2004; 4(6): 597-601.
7. Yamasaki K, Shibata Y, Fukuhara T. The effect of prostaglandins on experimental tooth movement in monkeys (*Macaca fuscata*). *J Dent Res* 1982; 61: 1444-1446.
8. Wong A, Reynolds EC, Vest VC. The effect of acetylsalicylic acid on orthodontic tooth movement in the Guinea pig. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 1992; 102: 360-5.
9. Mohammed AH, Tatakis DN, Dziak R. Leukotrienes in orthodontic tooth movement. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 1989; 95: 231-7.
10. Chumbley AB, Tunkay OC. The effect of indomethacin (an aspirin-like drug) on the rate of orthodontic tooth movement. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 1986; 89: 312-14.
11. Sari E, Ölmes H, Gürton Ü. Comparison of some effects of acetylsalicylic acid and rofecoxib during orthodontic tooth movement. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 2004; 125: 310-5.
12. Igarashi K, Miyoshi K, Shinoda H, Saeki S, Mitani H. Diurnal variation in tooth movement in response to orthodontic force in rat. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 1998; 114: 8-14.
13. Zheng SX, Mouithys-Mickalad A, Deby-Dupont GP, Deby CM, Maraoulis AP, Labasse AH, Lamy ML, Crielard JM, Reingster JY, Henrotin YE. *In vitro* Study of the antioxidant properties of nimesulide and 4-OH nimesulide: effects on HRP- and luminal-dependent chemiluminescence produced by human chondrocytes. *Osteoarthritis Cartilage* 2000; 8(6): 419-425.
14. Fijikawa YK, Itonaga I, Sabokbar A, Torisu T, Athenasou NA. Proinflammatory cytokine (TNF α /IL-1 β) induction of human osteoclast formation. *J Pathol* 2002; 198(2): 220-7.
15. Yoshiaki D, Takashi K, Gen-ichi O, Yi-Gang F, Sadaaki T, Mitsutoki H, Yoshitaka Y, Kuniaki S. Histamine stimulates production of osteoclast differentiation factor/ receptor activator of nuclear factor- kappa B ligand by osteoblast. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2002; 298(2): 240-246.

Dirección para correspondencia:
Mtro. José Francisco Gómez Clavel
 Facultad de Estudios Superiores Iztacala.
 Universidad Nacional Autónoma de México.
 56 23 11 45 ó 63