

UNIVERSIDAD DE GRANADA
FACULTAD DE ODONTOLOGÍA



**“HORMONA DEL CRECIMIENTO Y
MELATONINA EN LA
OSTEOINTEGRACIÓN DE IMPLANTES
DENTALES”**

Carlos Gómez de Urda Ruiz de Adana
Granada, 2009

Editor: Editorial de la Universidad de Granada
Autor: Carlos Gómez de Urda Ruiz de Adana
D.L.: GR. 3963-2009
ISBN: 978-84-692-7843-7

*A mis padres, José Luis y Mercedes,
por estar siempre que los necesito.*

Certificaciones

D. ANTONIO CUTANDO SORIANO, Profesor Titular de la asignatura Clínica Odontológica Integrada de Pacientes Especiales del Departamento de Estomatología de la Facultad de Odontología de la Universidad de Granada, certifica que:

D. Carlos Gómez de Urda Ruiz de Adana, Licenciado en Odontología, ha realizado bajo mi dirección el presente trabajo de investigación, titulado: “Hormona del crecimiento y melatonina en la osteointegración de implantes dentales”, que ha sido objeto de su Tesis Doctoral, reuniendo las condiciones necesarias para optar al grado de Doctor.

Granada, 28 de septiembre del 2009

El director,

El interesado,

Antonio Cutando Soriano

Carlos Gómez de Urda Ruiz de Adana

Dña. MARÍA JOSÉ FERRERA RODRÍGUEZ, Directora del Centro de Salud de Pinos Puente (Granada), certifica que:

D. Carlos Gómez de Urda Ruiz de Adana, Licenciado en Odontología, ha realizado bajo mi dirección el presente trabajo de investigación, titulado: “Hormona del crecimiento y melatonina en la osteointegración de implantes dentales”, que ha sido objeto de su Tesis Doctoral, reuniendo las condiciones necesarias para optar al grado de Doctor.

Granada, 28 de septiembre del 2009

La directora,

El interesado,

María José Ferrera Rodríguez

Carlos Gómez de Urda Ruiz de Adana

D. JAVIER GUARDIA MUÑOZ, Doctor en Odontología por la Universidad de Granada, certifica que:

D. Carlos Gómez de Urda Ruiz de Adana, Licenciado en Odontología, ha realizado bajo mi dirección el presente trabajo de investigación, titulado: “Hormona del crecimiento y melatonina en la osteointegración de implantes dentales”, que ha sido objeto de su Tesis Doctoral, reuniendo las condiciones necesarias para optar al grado de Doctor.

Granada, 28 de septiembre del 2009

El director,

El interesado,

Javier Guardia Muñoz

Carlos Gómez de Urda Ruiz de Adana

Publicaciones

PROYECTOS DE INVESTIGACIÓN QUE HAN FINANCIADO EL ESTUDIO:

Esta tesis doctoral ha sido realizada gracias al Proyecto de Investigación titulado: ***“Estudio del sinergismo entre Melatonina y Hormona del Crecimiento sobre los procesos de osteointegración en implantes dentales y regeneración ósea en la cavidad oral”***, financiado por:

- ✦ Fondo de Investigación Sanitaria (FIS) del Ministerio de Sanidad y Consumo (Ref.: P1041610).
- ✦ Ministerio de Educación y Ciencia (Proyecto PETRI nº. 95-0885-OP).
- ✦ Instituto de Salud Carlos III (Red FIS G03/137).
- ✦ Grupos de Investigación CTS-101 y CTS-263 (Junta de Andalucía).

PUBLICACIÓN RELACIONADA CON LOS RESULTADOS DE ESTA TESIS DOCTORAL:

- ✦ *Topical application of melatonin and growth hormone accelerates bone healing around dental implants in dogs.* Clinical Implant Dentistry and Related Research. Aceptado Julio 2009. Pendiente de publicación.

PUBLICACIONES RELACIONADAS CON LA LÍNEA DE TRABAJO DE ESTA TESIS DOCTORAL:

- ✦ Cutando A, *et al.* Relationship between salivary melatonin levels and periodontal status in diabetic patients. J Pineal Res 2003; 35: 239-44.
- ✦ Cutando A, *et al.* Relationship between salivary melatonin and severity of periodontal disease. J Periodontol 2006; 77 (9): 1533-8.
- ✦ Arana C, Cutando A, Ferrera MJ, *et al.* Parameters of oxidative stress in saliva from diabetic and parenteral drug addict patients. J Oral Pathol Med 2006; 35: 554-9.
- ✦ Cutando A, *et al.* Superficies bioactivas en implantología: una nueva perspectiva. Av Periodon Implantol 2007; vol.19, suppl.1, p.43-50.
- ✦ Cutando A, *et al.* Melatonin reduces oxidative stress because of tooth removal. J Pineal Res 2007; 42 (4): 419-20.
- ✦ Cutando A, *et al.* Local application of melatonin into alveolar sockets of Beagle dogs reduces tooth removal-induced oxidative stress. J Periodontol 2007; 78 (3): 576-83.

- ✦ Cutando A, *et al.* *Melatonin: potential functions in the oral cavity.* J Periodontol 2007; 78(6): 1094-102.
- ✦ Gómez-Moreno G, Cutando-Soriano A, *et al.* *Melatonin expression in periodontal disease.* J Periodontal Res 2007; 42: 536–540.
- ✦ Cutando A, *et al.* *Melatonin stimulates osteointegration of dental implants.* J Pineal Res 2008; 45: 174-9.
- ✦ Calvo-Guirado JL, Gómez-Moreno G, Barone A, Cutando A, Alcaraz-Baños M, Chiva F, López-Marí L, Guardia J. *Melatonin plus porcine bone on discrete calcium deposit implant surface stimulates osteointegration in dental implants.* J Pineal Res 2009 Sep; 47(2): 164-72.
- ✦ Guardia J, Gómez-Moreno G, Ferrera MJ, Cutando A. *Evaluation of effects of topic melatonin on implant surface at 5 and 8 weeks in Beagle dogs.* Clinical Implant Dentistry and Related Research. 2009. In press.
- ✦ Gómez-Moreno G, Cutando A, Arana C, Vander Worf C, Guardia J, Muñoz F. *The effects of growth hormone on the initial bone formation around implants.* Internacional Journal of Oral and Maxillofacial Implants. 2009. In press.

Agradecimientos

- Al Prof. Antonio Cutando Soriano, por darme la oportunidad de trabajar en su grupo de investigación y participar en este proyecto. Su orientación ha sido fundamental para la realización de esta tesis doctoral.
- A la Dra. María José Ferrera Rodríguez, por su amabilidad, experiencia y capacidad investigadora.
- Al Dr. Javier Guardia Muñoz, por su gran compañerismo y apoyo incondicional.
- A los Dres. Carlos Arana Molina y Cecilia Van der Worf Úbeda, por su labor previa, que ha facilitado la realización de esta tesis.
- Al Dr. Fernando Muñoz, a la Dra. Mónica López Peña y a todo su equipo, por su excelente trabajo en la histomorfometría, su gran predisposición y profesionalidad investigadora, que han posibilitado la consecución de nuestros objetivos.
- A D. Jesús Martín Zúñiga y D. Juan Serrano, director y veterinario respectivamente del Servicio de Experimentación Animal de la Universidad de Granada, por su colaboración en la fase experimental de este trabajo y por iniciarnos en el cuidado y manejo de los perros *Beagle*.
- A D. Rafael Olivares, director de la Biblioteca de la Facultad de Odontología y Biblioteconomía y Documentación de la Universidad de Granada, por enseñarme a aprovechar todo lo que la biblioteca puede llegar a ofrecer y estar siempre dispuesto a resolver mis dudas con gran rigor científico.
- A *Implant Microdent System*, por el apoyo y respaldo empresarial a este proyecto y su confianza en nuestro equipo investigador.
- A todas aquellas personas que, en definitiva, han hecho posible que se pueda realizar esta tesis, a todas ellas muchas gracias.

La verdadera ciencia enseña, por encima de todo, a dudar y a ser ignorante.

Miguel de Unamuno.

Abreviaturas

ABREVIATURA EMPLEADAS

aFMK: N¹-acetil-N²-formil-5-metoxiquinurenamina.
ADN: ácido desoxirribonucleico.
ALP: fosfatasa alcalina.
AMP: adenosín monofosfato.
Arg: arginina.
ARN: ácido ribonucleico.
ARNm: ARN mensajero.
Asp: aspartato.
ATP: adenosín trifosfato.
BCP: porcentaje de integración o ratio de contacto óseo.
BMPs: proteínas morfogenéticas óseas.
BPO: peróxido de benzoilo.
BSP: sialoproteína ósea.
Ca²⁺: ión calcio.
CBF A1: *core-binding factor A1*.
Cl⁻: ión cloro.
CPI: Índice Periodontal Comunitario.
CT: calcitonina.
GF: factor de crecimiento.
GH: hormona del crecimiento.
GHP: proteína transportadora de GH.
GHRH: hormona liberadora de hormona del crecimiento.
GH-R: receptor de la GH humana.
GIH: hormona inhibidora de hormona del crecimiento (SS).
Gli: glicina.
GM-CFU: unidades formadoras de colonias de granulocitos-macrófagos.
GPx: glutatión peroxidasa.
GRd: glutatión reductasa.
HCl: ácido clorhídrico.
HCO₃⁻: ión bicarbonato.
HIOMT: Hidroxindol-O-Metil Transferasa.
HO•: radical hidroxilo.
HTs: hormonas tiroideas.
H₂O₂: peróxido de hidrógeno.
H⁺: catión hidrógeno.
IFN-γ: Interferón gamma.
IGF: factor de crecimiento semejante a la insulina (Sm).
IGFBP: proteína transportadora de IGF.
Ihh, gen: gen *Indian hedgehog*.
IL-1: interleuquina 1.
IL-2: interleuquina 2.
IL-6: interleuquina 6.
IL-11: interleuquina 11.
MLT: melatonina.
M-CSF: factor estimulador de las colonias de macrófagos.
NAT: N-Acetil Transferasa.
NO•: óxido nítrico.
OC: osteocalcina.

ONOO⁻: radical peroxinitrito.
OP: osteopontina.
OPG: osteoprotegerina.
O₂^{-•}: anión superóxido.
PDGF: Factor de crecimiento derivado de las plaquetas.
PG: prostaglandina.
PICP: péptido carboxiterminal del procolágeno tipo I.
PO₄⁻: ión fosfato.
PRP: plasma rico en plaquetas.
PTH: parathormona.
RANK: receptor activador del factor nuclear κB.
RANKL: ligando de unión al receptor-activador del factor nuclear κB.
REM: movimiento ocular rápido.
RGD, secuencia: secuencia de aminoácidos Arg-Gli-Asp.
rhGH: hormona del crecimiento recombinante humana.
ROO•: radical peroxilo.
ROS: especies reactivas del oxígeno.
Sm: somatomedina.
SOD: superóxido dismutasa.
SO₄²⁻: ión sulfato.
SS: somatostatina.
TGF-β: factor de crecimiento transformante beta.
TNF-α: factor de necrosis tumoral alfa.

Índice

ÍNDICE

JUSTIFICACIÓN.....	20
INTRODUCCIÓN.....	22
1. Remodelado óseo y osteointegración.....	23
1.1. Fisiología ósea.....	23
1.1.1. Matriz orgánica u osteoide.....	23
1.1.2. Matriz inorgánica o mineralizada.....	26
1.1.3. Células óseas.....	27
1.1.3.1. Osteoblastos.....	27
1.1.3.2. Osteocitos.....	29
1.1.3.3. Osteoclastos.....	29
1.2. Mecanismos de reabsorción ósea.....	30
1.3. Regulación de la reabsorción ósea.....	32
1.4. Remodelado óseo.....	35
1.5. Factores reguladores del remodelado óseo.....	37
1.5.1. Parathormona (PTH).....	37
1.5.2. Calcitonina (CT).....	38
1.5.3. Vitamina D.....	38
1.5.4. Estrógenos.....	38
1.5.5. Glucocorticoides.....	39
1.5.6. Citoquinas.....	39
1.5.7. Proteínas morfogenéticas óseas (BMPs).....	40
1.5.8. Hormona del crecimiento (GH).....	40
1.5.9. <i>Insuline-like growth factors I y II</i> (IGF I y II).....	40
1.5.10. Melatonina (MLT).....	41
1.6. Osteointegración y biología ósea en implantología oral.....	41
2. Hormona del crecimiento (GH).....	43
2.1. Concepto, biosíntesis y secreción.....	43
2.2. Acciones biológicas de la GH.....	48
2.3. Somatomedinas (IGF).....	52
2.4. Papel de la GH en el remodelado óseo.....	55

3. Melatonina (MLT).....	55
3.1. Concepto, biosíntesis y secreción.....	55
3.2. Acciones biológicas.....	60
3.2.1. Antioxidante y depurador de radicales libres.....	60
3.2.2. Inmunomoduladora.....	62
3.2.3. Estimuladora de la formación ósea.....	63
3.2.4. Melatonina y cavidad oral.....	64
OBJETIVOS.....	66
MATERIAL Y MÉTODOS.....	68
1. Animales, procedimiento quirúrgico y tratamiento.....	69
1.1. Exodoncias.....	69
1.2. Colocación de los implantes.....	71
1.3. Sacrificio y extracción de la mandíbula.....	74
2. Obtención y preparación de las muestras.....	75
3. Evaluación de las muestras.....	80
4. Análisis estadístico.....	83
RESULTADOS.....	84
1. BCP (<i>Bone-to-implant contact ratio</i>).....	87
2. Hueso periimplantario total	88
3. Hueso interrosca	89
4. Neoformación ósea.....	90
DISCUSIÓN.....	93
CONCLUSIONES.....	104
BIBLIOGRAFÍA.....	105

ÍNDICE DE TABLAS, FIGURAS E IMÁGENES

TABLAS

Tabla 1. Proteínas de la matriz osteoide.....	26
Tabla 2. Tinción de Lévai Laczcó.....	79
Tabla 3. Valores histomorfométricos a las dos semanas.....	85
Tabla 4. Valores histomorfométricos a las cinco semanas.....	86
Tabla 5. Valores histomorfométricos a las ocho semanas.....	86

FIGURAS

Figura 1. Esquema de los mecanismos implicados en la reabsorción ósea.....	31
Figura 2. Mecanismos de regulación de resorción ósea.....	33
Figura 3. Fases del remodelado óseo.....	37
Figura 4. Representación esquemática de la forma molecular de GH.....	44
Figura 5. Regulación de la secreción de GH.....	47
Figura 6. Unión GH - GH-R.....	48
Figura 7. Acciones biológicas de la GH.....	49
Figura 8. Eje GH - IGF-I.....	51
Figura 9. Esquema general de las acciones de la GH.....	52
Figura 10. Corte sagital del cerebro.....	56
Figura 11. Biosíntesis de la melatonina a partir de la serotonina.....	59
Figura 12. Mecanismos de neutralización de radicales libres por la melatonina.....	62
Figura 13. Implantes colocados en mandíbula de perros <i>Beagle</i>	72
Figura 14. Representación de los parámetros de osteointegración determinados en el estudio histomorfométrico.....	82
Figura 15. Porcentaje de contacto óseo a las dos, cinco y ocho semanas.....	87
Figura 16. Hueso periimplantario total a las dos, cinco y ocho semanas.....	88
Figura 17. Hueso interrosca a las dos, cinco y ocho semanas.....	89
Figura 18. Neoformación ósea a las dos, cinco y ocho semanas.....	90

IMÁGENES

Imagen 1. Visión histométrica de una sección sagital de un implante del grupo control y corte histológico a cuatro aumentos de la zona periimplantaria del mismo.....	91
Imagen 2. Visión histométrica de una sección sagital de un implante del grupo tratado con GH/MLT y corte histológico a cuatro aumentos de la zona periimplantaria del mismo.....	92

Justificación

JUSTIFICACIÓN

El tratamiento implantológico ha supuesto una revolución dentro del ámbito odontológico. Cada día son más los pacientes que demandan una rehabilitación oral con implantes dentales para satisfacer sus necesidades tanto estéticas como funcionales. Desde que aparecieron los primeros implantes dentales, éstos han sufrido numerosas modificaciones que han tenido como finalidad mejorar de una manera importante la osteointegración, haciendo del implante un tratamiento protésico fiable y duradero.

Aunque actualmente la carga inmediata en los implantes dentales es un hecho que debe reunir una serie de requisitos, en muchas ocasiones, la correcta osteointegración del implante y su posterior carga requiere de un periodo de tiempo más o menos prolongado. Es por ello que nuestra investigación ha tenido como objetivo demostrar que la aplicación de hormona del crecimiento y melatonina sobre hueso receptor y superficie de los implantes respectivamente mejora considerablemente la osteointegración, acelerando este proceso y, por ello, disminuyendo el tiempo necesario para la carga implantaria.

El futuro de la implantología pasa por acelerar los procesos de osteointegración con tratamientos sobre la superficie del implante y/o con elementos que actúen sobre el metabolismo óseo de forma directa, como ocurre con la hormona del crecimiento y la melatonina. Éstas moléculas aportan a la implantología un avance importante en la consecución de esta meta.

Introducción

INTRODUCCIÓN

1. Remodelado óseo y osteointegración

1.1. Fisiología ósea

El hueso es un tejido de sostén altamente especializado y caracterizado por su rigidez y dureza. Sus cuatro funciones principales son: proporcionar **sostén mecánico** (p. ej., costillas), permitir la **locomoción** (p. ej., huesos largos), proporcionar **protección** (p. ej., cráneo) y actuar como **reservorio metabólico** de sales minerales.

Este tejido conectivo mineralizado está formado por:

- células de sostén (osteoblastos y osteocitos);
- células de remodelación (osteoclastos);
- una matriz no mineral de colágeno y glucosaminoglucanos (osteoide o matriz orgánica);
- sales minerales inorgánicas depositadas en la matriz (matriz inorgánica).

La mayoría de los huesos presenta una arquitectura básica compuesta por:

- una zona externa, cortical o compacta;
- una zona interna, trabecular o esponjosa.

El hueso cortical forma un escudo rígido externo, resistente a la deformación, mientras que la malla trabecular interna proporciona resistencia al formar un complejo sistema de contrafuertes internos ⁽¹⁾.

1.1.1. MATRIZ ORGÁNICA U OSTEOIDE: ^(2,3)

La matriz orgánica está formada por proteínas colágenas y no colágenas, producida y mantenida por los osteoblastos y osteocitos (**Tabla 1**).

Colágeno osteoide: el osteoide está formado en un 90% por colágeno, que es principalmente de colágeno tipo I, proteína fibrilar no soluble cuya estructura

primaria posee una secuencia repetida del triplete de aminoácidos Gli-X-Y, en la que X e Y son prolina, hidroxiprolina o hidroxilisina. Además, en su molécula se encuentra la secuencia RGD (Arg-Gli-Asp), que es reconocida específicamente por las integrinas de las células óseas y constituye una de las vías por las que éstas actúan sobre la matriz extracelular.

Proteínas no colágenas: representan un 10% de las proteínas del osteoide y, además de contribuir a tal estructura, intervienen o median fundamentalmente en la fisiología dinámica del hueso.

- **Fosfatasa alcalina**: producida por los osteoblastos, es una enzima que libera fosfato inorgánico a partir de ésteres fosfóricos. Así, por un lado incrementa la concentración de iones fosfato (PO_4^-), necesarios para la mineralización del osteoide, y por otro anula la acción que los ésteres fosfóricos poseen sobre la mineralización.

- **Glucoproteínas con secuencia RGD (osteopontina, osteonectina, fibronectina, trombospondina, sialoproteínas óseas)**: el tripéptido RGD (Arg-Gli-Asp) es reconocido por las integrinas de osteoblastos y osteoclastos, que actúan como receptores para proteínas con esa secuencia. El conjunto de las integrinas y las proteínas RGD constituyen un método de reconocimiento que permite el anclaje de las células óseas a la matriz osteoide y su migración sobre ella, base de los procesos de mineralización, remodelado y reparación de las lesiones óseas.

- **Proteoglucanos**: son macromoléculas sintetizadas por los osteoblastos, con un núcleo proteico al que se enlazan oligosacáridos y cadenas de glucosaminoglucanos. Existen cuatro tipos de estas moléculas: condroitín-sulfato (proteoglucano de mayor tamaño, está presente en áreas de formación ósea, donde sirve para reservar espacio para el hueso maduro); hialuronano (interviene en la morfogénesis ósea); decorina y biglucano (moduladores de los efectos de ciertos factores de crecimiento) ⁽⁴⁾.

- **Proteínas con ácido gamma-carboxiglutámico:** se hallan dos proteínas: osteocalcina y proteína del osteoide con ácido gamma-carboxiglutámico. Estas proteínas, producidas por los osteoblastos, median la mineralización de la matriz orgánica y facilitan la adhesión de las células óseas a la misma.

- **Factores de crecimiento (GFs):** son un conjunto de polipéptidos multifuncionales que transmiten mensajes para el control de la diferenciación, crecimiento y proliferación celulares. En el hueso se encuentran varios, que median los efectos que sobre la fisiología ósea ejercen tanto los factores mecánicos locales, como los sistémicos. Entre ellos destacan los factores de crecimiento semejantes a la insulina (IGF-I y II) y los factores de crecimiento transformadores β (TGF- β). Los IGFs son producidos por los osteoblastos y hepatocitos y poseen receptores en los propios osteoblastos. En estas células estimulan la síntesis de colágeno y median la interacción osteoblasto-osteoclasto, vía por la que intervienen en el remodelado óseo. Los TGF- β son una familia de citoquinas producidas en numerosos tejidos como respuesta a una lesión y desempeñan un importante papel en la reparación de estructuras dañadas.

- **Osteoproteínas morfogenéticas (BMPs):** estructuralmente están relacionadas con los TGF- β , con los que comparten una misma secuencia de aminoácidos. Se han identificado siete de estas BMPs, alguna de ellas, como la osteogenina, con capacidad de estimular la síntesis de hueso nuevo.

- **Proteínas séricas retenidas en la matriz:** en el hueso existen cantidades significativas de albúmina, hemoglobina, inmunoglobulinas, α_1 -antitripsina, β_2 -microglobulina, α_2 -SH-glucoproteína y lipoproteína Apo A-1.

Tabla 1. Proteínas de la matriz osteoide ⁽²⁾

3.1. Colágeno tipo I (90%)
3.1. Proteínas no colágenas (10%):
a) Glucoproteínas:
• Fosfatasa alcalina
• Glucoproteínas con secuencia RGD (osteopontina, osteonectina, fibronectina, trombospondina, sialoproteínas óseas)
b) Proteoglucanos
c) Proteínas con ácido γ -carboxiglutámico (osteocalcina, proteína del osteoide con ácido γ -carboxiglutámico)
d) Factores de crecimiento
e) Osteoproteínas morfogenéticas (BMPs)
f) Proteínas séricas retenidas en el hueso

1.1.2. MATRIZ INORGÁNICA O MINERALIZADA:

La matriz inorgánica, también conocida como mineralizada, responde al 60-70% del hueso deshidratado. Contiene aproximadamente un 99% del calcio, un 85% del fósforo y alrededor de un 40% y 60% del sodio y del magnesio, respectivamente, que contiene el organismo ⁽¹⁾.

El cristal de hidroxiapatita $[\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2]$ se caracteriza por su pequeño tamaño y su gran asimetría física y electrostática. Estas características le confieren una gran superficie por unidad de peso y, además, facilitan el depósito de agua e iones en su superficie. Estos cristales se incrustan entre las fibras de colágeno para formar un tejido que reúne las características adecuadas de rigidez, flexibilidad y resistencia ⁽⁵⁾.

1.1.3. CÉLULAS ÓSEAS:

1.1.3.1. Osteoblastos:

Derivan de células pluripotenciales de origen mesenquimatoso. La transformación de estas células embrionarias hasta osteoblastos (células finales que no sufren mitosis) se realiza gracias a la diferenciación celular que sufren determinadas células osteoprogenitoras y células inducibles osteoprogenitoras. Estas células originan osteoblastos, además de fibroblastos, condrocitos, adipocitos y células musculares, algunas de cuyas características fenotípicas son semejantes a las del osteoblasto ⁽⁶⁾.

Al microscopio óptico, los osteoblastos maduros son células grandes de forma cuboidea, de 20-30 μm de diámetro mayor, con un núcleo ovalado y citoplasma basófilo azulado por su abundante ARN. Con el microscopio electrónico muestran un notable retículo endoplasmático rugoso, propio de las células que desarrollan una intensa síntesis proteica ⁽²⁾.

El desarrollo de los osteoblastos está controlado por dos genes:

- a) El CBF A1 (*core-binding factor A1*), codificador del factor de transcripción específico de los progenitores del osteoblasto. Este factor regula la expresión de genes de proteínas específicas de esta célula, como osteopontina, osteocalcina, colágeno tipo I, sialoproteínas óseas y el ligando del receptor-activador del factor nuclear κB (RANKL).
- b) El gen *Ihh* (*Indian hedgehog*), igualmente necesario para el desarrollo embrionario del hueso y la actividad de los osteoblastos ^(6,7).

Los osteoblastos maduros son células polarizadas, dispuestas en forma de empalizada sobre la matriz orgánica que sintetizan y segregan, y actúan de forma coordinada. Tal coordinación entre osteoblastos se debe a la comunicación mediante uniones puntiformes que permiten el paso de mensajeros (Ca^{2+} , citoquinas, prostaglandinas), o por el contacto entre

proteínas localizadas en la superficie. Así, en la membrana plasmática del osteoblasto se ha identificado un conjunto de glucoproteínas conocidas como integrinas, que sirven de enlace entre el citoesqueleto de una célula con otra o con la matriz extracelular⁽⁸⁾.

Los osteoblastos son células secretoras metabólicamente activas que expresan proteínas como la osteocalcina y osteopontina, la osteonectina y otros proteoglicanos y factores señalizadores solubles (BMPs, TGF- β , IGF I y II, IL-1 y PDGF). La expresión de estos productos por parte de los osteoblastos ocurre durante la embriogénesis ósea y durante su mantenimiento (remodelación) y reparación. Las señales que dirigen la mineralización osteoide todavía no han sido identificadas. Es probable que la acumulación de proteínas, a las cuales se une el calcio, sea el inicio del proceso de mineralización^(8,9).

Las acciones fisiológicas de los osteoblastos son:

- Producir la práctica totalidad de las proteínas que constituyen la matriz osteoide.
- Dirigir la organización o correcta disposición de esa matriz en forma de fibrillas y fibras, que permiten una gran resistencia.
- Contribuir a la adecuada mineralización de esa matriz orgánica, un proceso en el que es esencial la fosfatasa alcalina que producen los osteoblastos.
- Mediar en los efectos que sobre los osteoclastos tienen las hormonas y factores estimulantes de la reabsorción ósea, desempeñando por tanto también un papel intermediario en la reabsorción ósea.

Aunque los osteoblastos están polarizados hacia el hueso, la liberación de las proteínas de la matriz osteoide no se limita a su polo basal, sino que muchos de ellos van quedando envueltos en tal matriz, convirtiéndose en osteocitos incluidos en las lagunas que se forman en ella. Junto con ese destino, los osteoblastos pueden derivar a osteocitos de superficie, también conocidos como células limitantes o de revestimiento. Ambos tipos de osteocitos poseen

receptores para parathormona (PTH) y expresan *in vivo* ARNm de: actina- β , factores de transcripción c-fos y c-jun, colágeno y proteínas no colágenas, así como el ARNm del factor de crecimiento semejante a insulina I (IGF-I) ⁽¹⁰⁾.

1.1.3.2. Osteocitos:

Son células relativamente inactivas, no se dividen ni secretan matriz, aunque su metabolismo es crucial para la viabilidad del hueso y para el mantenimiento de la homeostasis. Poseen forma estrellada, con numerosas y finas prolongaciones. Los osteocitos ocupan una pequeña laguna o cavidad dentro de la matriz que se denomina laguna ósea. Éstas están interconectadas entre sí a través de una red de canaliculas, que garantizan la vitalidad del hueso. Estas canaliculas son las que permiten a los osteocitos interaccionar a través de las hendiduras y permiten la transmisión de señales a los osteoblastos y de los osteoblastos a los osteocitos ⁽¹⁾.

Precisamente, un papel fisiológico primordial de los osteocitos es la detección de estímulos mecánicos y variaciones de tensión y morfología del hueso, producidas por las cargas que soportan en su superficie, así como su traducción en el remodelado óseo. Cuando se produce la reabsorción del hueso por los osteoclastos, los osteocitos quedan fuera de las lagunas como células de revestimiento en reposo ⁽¹¹⁾.

Osteoblastos, osteocitos y osteoclastos juegan un papel muy importante en la regulación del calcio y en la homeostasis del hueso, que son los procesos fisiológicos fundamentales de la modelación y remodelación del hueso ⁽¹²⁾.

1.1.3.3. Osteoclastos:

Embriológicamente, los osteoclastos proceden de células progenitoras hematopoyéticas denominadas “unidades formadoras de colonias de granulocitos/macrófagos” (conocidas por su acrónimo inglés GM-CFU: *granulocyte-macrophage colony-forming units*), precursoras de monocitos y

macrófagos. Estas células progenitoras alcanzan el hueso bien directamente desde la médula incluida en su seno, o desde la circulación ⁽¹³⁾.

Las células precursoras de osteoclastos y éstos mismos expresan en su superficie el receptor de RANKL, producido por los osteoblastos, vía por la que, junto con citoquinas como las interleuquinas 1, 6 y 11, el factor de necrosis tumoral α (TNF- α), el interferón γ y el factor estimulador de colonias de macrófagos (M-CSF), se diferencian y activan ⁽¹⁴⁾.

Morfológicamente, son células gigantes (20-100 μ m de diámetro), multinucleadas (10-12 núcleos), ricas en vacuolas y mitocondrias y, como los osteoblastos, polarizadas. La microscopía electrónica muestra en una de sus caras un sinfín de finísimos entrantes y salientes (borde plegado o en cepillo), donde se desarrollará la reabsorción ósea ⁽²⁾.

Existe una comunicación recíproca entre osteoblastos y osteoclastos que activa la dinámica de la reabsorción. Cuando los osteoblastos se dispersan en respuesta a la hormona paratiroidea (PTH), los osteoclastos tienen la oportunidad de unirse a esa superficie osteoide mineralizada. Esta unión implica además la adhesión a la superficie de moléculas como integrinas y otras proteínas como la osteopontina, una fosfoproteína que afianza la unión de los osteoclastos al hueso. El perímetro de unión se conoce como “zona de unión” y dentro de esta zona se desarrolla el borde rugoso. Este límite rugoso constituye el territorio donde tienen lugar las roturas enzimáticas de la superficie del hueso.

1.2. Mecanismos de reabsorción ósea

La reabsorción ósea es un proceso complejo que incluye la disolución de la fase mineral o inorgánica y la posterior degradación de las proteínas de la matriz ósea. Los mecanismos señalizadores responsables de la formación y activación de los osteoclastos no son del todo conocidos. Sí sabemos que estas células sintetizan enzimas necesarias para la reabsorción ósea y expresan una

ATPasa bombeara de protones, un intercambiador bicarbonato/cloro, una fosfatasa ácida resistente a tartrato, catepsina K y la anhidrasa carbónica tipo II.

Los osteoclastos (**Figura 1**) se adhieren a la superficie ósea mediante integrinas que reconocen específicamente a proteínas de la matriz osteoide. El área de sellado delimita un microespacio entre los osteoclastos y la superficie ósea. La desmineralización se produce mediante la acidificación de ese microespacio gracias a la acción de una ATPasa de H^+ localizada en la membrana del borde en cepillo. Para mantener el pH fisiológico en su seno, el osteoclasto dispone de un intercambiador Cl^-/HCO_3^- en la cara opuesta al borde en cepillo y, en este borde, un canal de Cl^- acoplado a la ATPasa de H^+ . Como consecuencia de todo lo anterior, el osteoclasto secreta HCl en el microespacio subosteoclástico, con el consiguiente descenso del pH hasta 4.4 y la disolución del mineral. Esta disolución precede a la degradación de la matriz orgánica, llevada a cabo, a su vez, por proteasas como la catepsina K, secretada por los osteoclastos, y colagenasa por los osteoblastos (15,16).

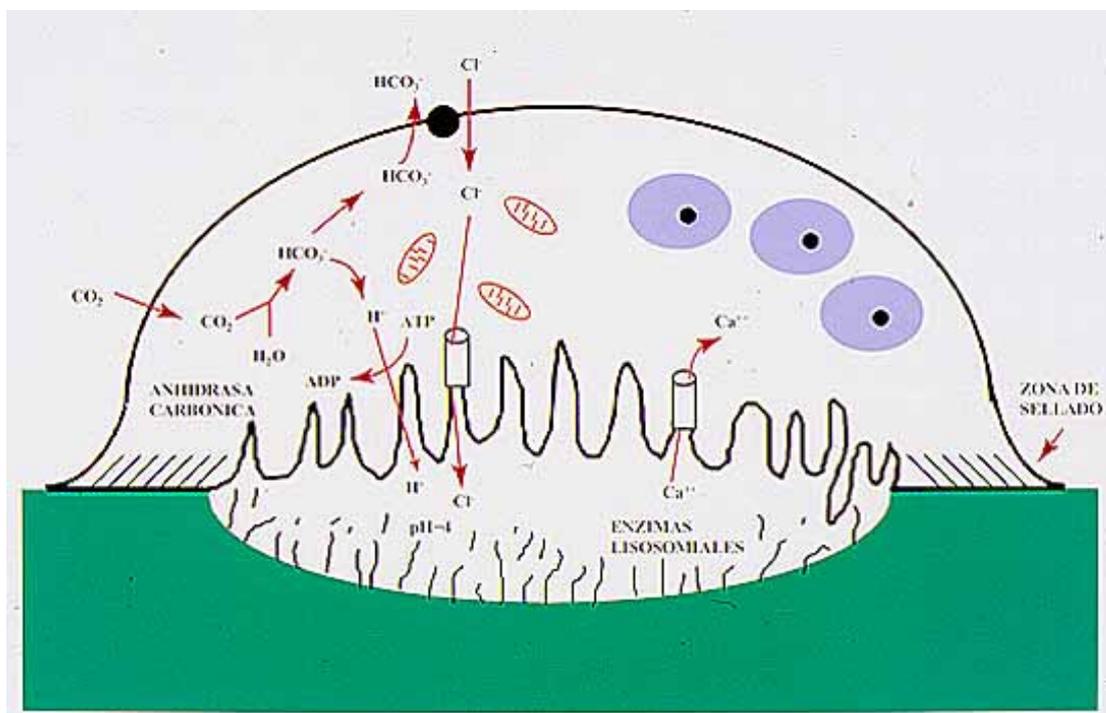


Fig. 1. Esquema de los mecanismos implicados en la reabsorción ósea por parte de los osteoclastos. Reproducida de: Serrano S. Estructura y función del hueso normal. II Congreso Virtual Hispanoamericano de Anatomía Patológica. www.conganat.org/.../018/images/figura10.jpg

1.3. Regulación de la reabsorción ósea

El proceso de reabsorción ósea está controlado por una compleja interacción entre las células osteoblásticas y osteoclasticas (**Fig. 2**). El sistema RANK-RANKL-OPG es la vía común a través de la cual actuarán hormonas y factores locales para regular la interacción osteoblasto, osteoclasto y remodelado óseo.

El receptor RANK (receptor-activador del factor nuclear kB) es un péptido que se expresa en osteoclastos maduros y preosteoclastos, cuya activación da lugar a cambios en el citoesqueleto y actividad del osteoclasto, de tal forma que induce a dicha célula a reabsorber hueso y a no morir por apoptosis; se trata de una señal de activación y supervivencia para la misma.

El ligando encargado de activar al receptor RANK es RANKL (ligando de unión al receptor-activador del factor nuclear kB), que es una molécula que aparece anclada a la membrana del osteoblasto, aunque aparece también en células inmaduras mesenquimales de médula ósea. Su principal función es, mediante la unión a RANK, estimular la diferenciación de los osteoclastos, su activación y la inhibición de su apoptosis.

El RANKL, tras unirse a su receptor (RANK) en los preosteoclastos, estimula de forma potente todos los aspectos de la actividad osteoclastica: aumenta la diferenciación, incrementa la actividad y disminuye la apoptosis de los osteoclastos, como se comentaba anteriormente. El RANKL es necesario y suficiente para la activación osteoclastica, requiriendo de otros factores permisivos.

A la interacción RANK-RANKL se opone el señuelo del receptor osteoprotegerina (OPG), también producida por los osteoblastos, que evita la activación de los osteoclastos, ligando al RANKL e impidiendo su unión al receptor⁽¹⁷⁾, por lo que su acción es inhibidora de la actividad osteoclastica.

Para la osteoclastogénesis también es necesario el factor estimulador de colonias de macrófagos (M-CSF), que pueden sintetizar los osteoblastos, que se liga al receptor c-fms, incrementando la replicación de los osteoclastos.

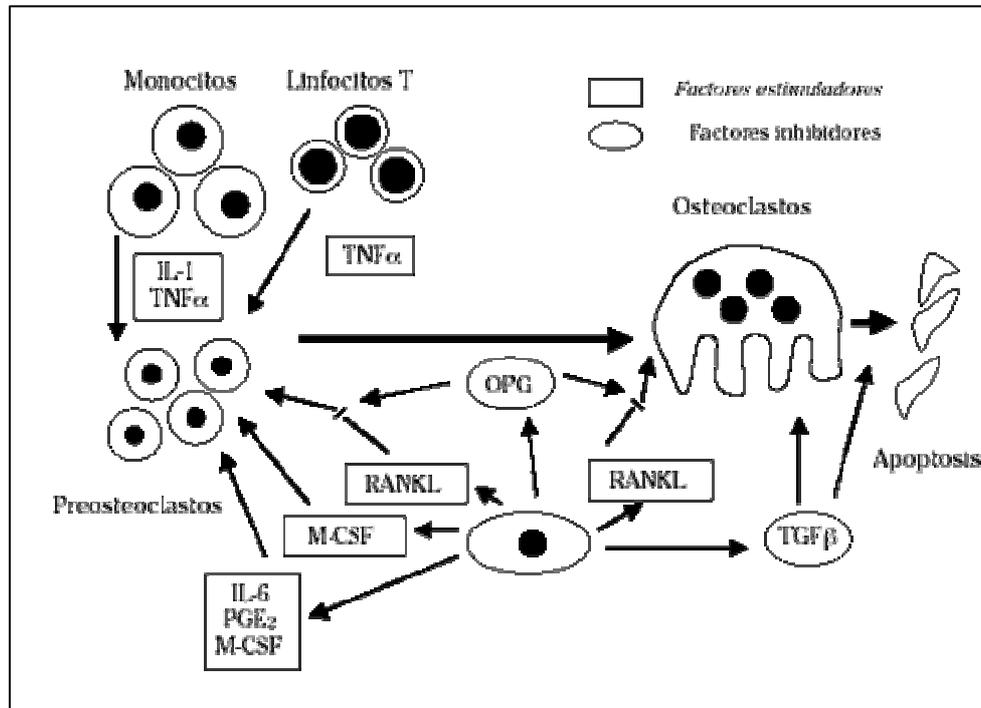


Fig. 2. Mecanismos de regulación de resorción ósea. (En: Lafita J. Fisiología y fisiopatología ósea. Anales Sis San Navarra, 2003; v.26 supl.3.)

El papel de las citoquinas sigue siendo controvertido, explicando la interacción de las células de la médula ósea con las células de la línea osteoblástica; así la Interleuquina 1 (IL-1), Interleuquina 6 (IL-6), factor de necrosis tumoral α (TNF- α) y prostaglandina E2 parecen incrementar la activación osteoclástica; sin embargo, el *transforming growth factor* β (TGF- β) reduciría la pérdida ósea, incrementando la apoptosis de los osteoclastos. Las hormonas sistémicas que estimulan la reabsorción ósea, generalmente, no actúan directamente sobre los precursores de células osteoclásticas, sino sobre las células del estroma-osteoblásticas. Tanto la parathormona (PTH), 1,25 dihidroxi-vitamina D y las hormonas tiroideas (HTs), incrementan la expresión de RANKL en este tipo celular, así como, en algunos casos, inhiben la síntesis de OPG con un efecto neto de incremento de la reabsorción ósea ⁽¹⁸⁾.

El efecto de los estrógenos parece ser indirecto, a través de la regulación de diversos mediadores, ya que su papel de control en el sistema RANK-RANKL se lleva a cabo exclusivamente incrementando los niveles de OPG, efecto que se potencia con su papel supresor sobre la síntesis de: IL-1, IL-6, PGE₂, GM-CSF y TNF- α , frenando la diferenciación y activación de los preosteoclastos. Los estrógenos también actúan sobre los osteoclastos ya activados, incrementando su apoptosis, tanto directamente como potenciando la síntesis de TGF- β .⁽¹⁹⁾ La otra hormona que influye sobre la reabsorción ósea, la calcitonina, inhibe directamente la actividad osteoclástica, si bien de forma transitoria, por un fenómeno rápido de regulación (*downregulation*) de sus receptores, expresados sobre los osteoclastos.

Además de los mecanismos comentados, existen otros factores locales que pueden condicionar el nivel de resorción ósea; por ejemplo, un nivel elevado de calcio, en el borde en cepillo de los osteoclastos, es capaz de inducir su apoptosis.

El proceso de reabsorción puede llegar a incrementar la fragilidad ósea más allá de lo esperable simplemente por la disminución de la densidad mineral. En las espículas del hueso esponjoso se producen erosiones durante la reabsorción así como aumento de porosidad en el hueso cortical; si el fenómeno se repite varias veces en el mismo territorio, el resultado será de pérdida del almacén, sobre el que debería sustentarse el fenómeno acoplado de formación ósea, y también discontinuidad de las espículas. Además, el proceso de formación ósea requiere más tiempo que el de reabsorción, por lo que si el recambio óseo está muy acelerado, se compromete la mineralización, con posterior incremento de la fragilidad del hueso. Todo ello explicaría la asociación, independiente de otros factores, del riesgo de fracturas con una tasa elevada de reabsorción ósea (valorada por marcadores bioquímicos); así como que la inhibición terapéutica de la reabsorción puede conseguir resultados, en cuanto a la prevención de fracturas, superiores a los esperables por el mero aumento de la masa ósea⁽¹⁷⁾.

1.4. Remodelado óseo:

La masa ósea total alcanza el máximo entre los 20 y 30 años. Posteriormente, se mantienen las mismas tasas de formación y reabsorción hasta los 40 a 50 años de edad, momento a partir del cual la reabsorción comienza a superar a la formación y la masa ósea total desciende lentamente. El proceso de recambio óseo continuo en el adulto, conocido como remodelado óseo, afecta al 10% de la masa ósea total cada año ⁽²⁰⁾.

Este remodelado está ligado a las superficies óseas y comprende una secuencia ordenada de acciones celulares. De tal manera, en puntos determinados de la superficie cortical o trabecular en reposo se agrupan en primer lugar células hematopoyéticas precursoras que se diferencian *in situ* a osteoclastos. Poco después, estas células se activan y proceden a la reabsorción ósea ^(21,22). Éstos comienzan a reabsorber el hueso, de forma que a lo largo de unas dos semanas labran una pequeña cavidad que se denomina Lagunas de Howship.

Al finalizar esta fase de reabsorción de hueso, la cavidad labrada por los osteoclastos es tapizada por células mononucleares de naturaleza no bien conocida. Es la llamada fase de inversión. Después se reclutan precursores de osteoblastos, que proliferan y se diferencian. Los osteoblastos se disponen en una monocapa y comienzan a sintetizar osteoide que va rellenando el hueco abierto por los osteoclastos. Es la fase de formación de hueso, que se prolonga durante dos a cuatro meses. La mineralización de las láminas de osteoide se va produciendo según se depositan, pero con un retraso de unas dos semanas. Al final del proceso, el resultado es que un pequeño volumen de hueso viejo ha sido renovado por hueso nuevo ⁽²³⁾.

Fases del remodelado óseo ⁽²³⁾:

El remodelado óseo puede ser dividido en las siguientes fases (**Fig. 3**):

1. Fase quiescente: se dice del hueso en condiciones de reposo. Los factores que inician el proceso de remodelado aún no son conocidos.

2. Fase de activación: el primer fenómeno que tiene lugar es la activación de la superficie ósea previa a la reabsorción, mediante la retracción de las células limitantes (osteoblastos maduros elongados existentes en la superficie endóstica) y la digestión de la membrana endóstica por la acción de las colagenasas. Al quedar expuesta la superficie mineralizada se produce la atracción de osteoclastos circulantes procedentes de los vasos próximos.

3. Fase de reabsorción: seguidamente, los osteoclastos comienzan a disolver la matriz mineral y a descomponer la matriz osteoide. Este proceso es acabado por los macrófagos y permite la liberación de los factores de crecimiento contenidos en la matriz, fundamentalmente TGF- β (factor transformante del crecimiento β), PDGF (factor de crecimiento derivado de las plaquetas), IGF-I y II (factores de crecimiento semejantes a la insulina I y II).

4. Fase de formación: simultáneamente, en las zonas reabsorbidas se produce el fenómeno de agrupamiento de preosteoblastos, atraídos por los factores de crecimiento que se liberaron de la matriz que actúan como quimiotácticos y además estimulan su proliferación. Los preosteoblastos sintetizan una sustancia cementante sobre la que se va a adherir el nuevo tejido y expresan BMPs (proteínas morfogenéticas óseas), responsables de la diferenciación. A los pocos días, los osteoblastos ya diferenciados van a sintetizar la sustancia osteoide que rellenará las zonas horadadas.

5. Fase de mineralización: a los 30 días del depósito de osteoide comienza la mineralización, que finalizará a los 130 días en el hueso cortical y a los 90 días en el trabecular.

Y de nuevo empieza la fase quiescente o de descanso.

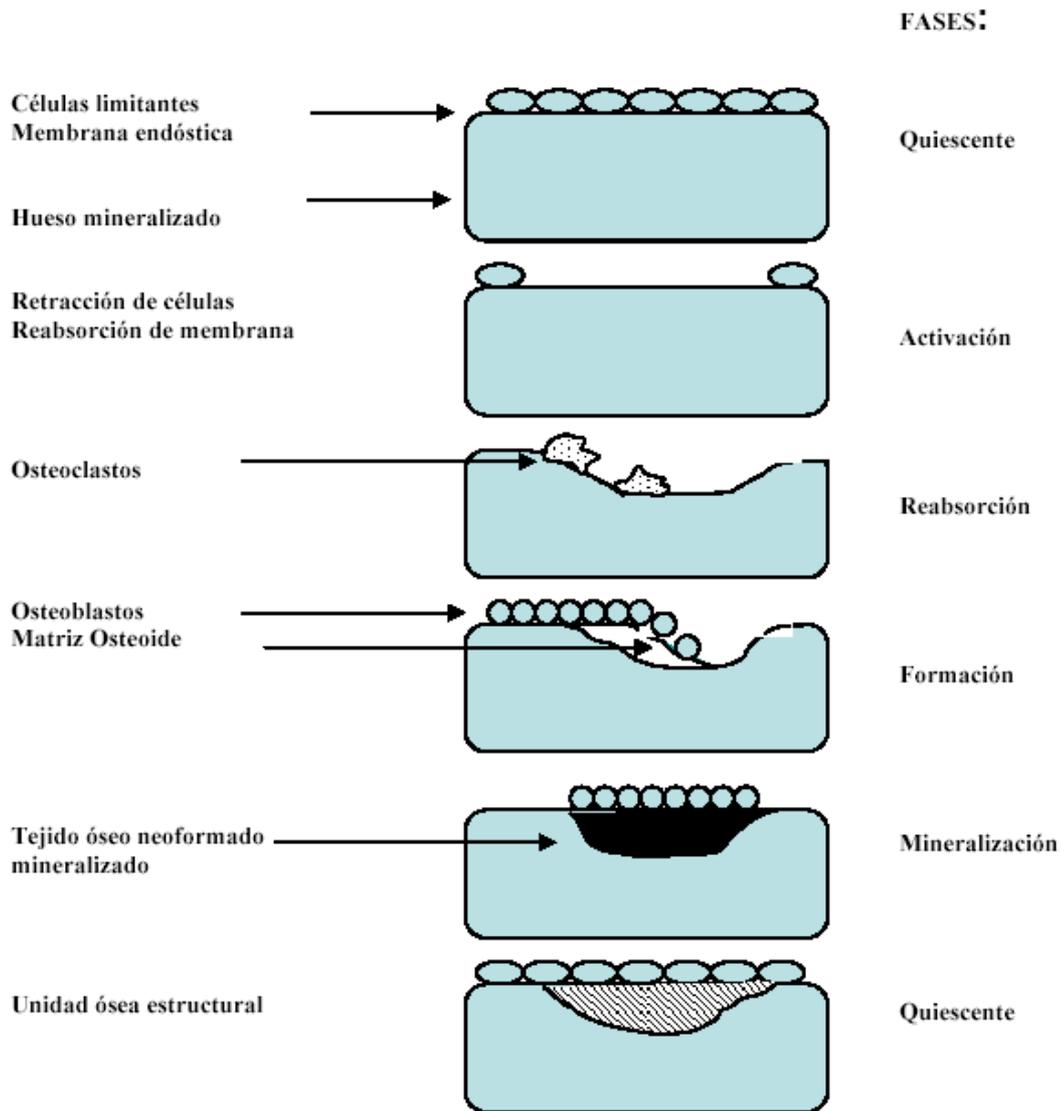


Fig. 3. Fases de Remodelado Óseo. Modificado de: Compston JE. Sex steroids and bone. *Physiol Rev* 2001;81:419-47.

Este remodelado se produce a lo largo de toda la vida y está influido por ciertos factores reguladores.

1.5. Factores reguladores del remodelado óseo:

1.5.1. PARATHORMONA (PTH): producida en las glándulas paratiroides, que responden al descenso en la calcemia, es la hormona hipercalcemiantes por excelencia al favorecer la reabsorción. Estimula el agrupamiento y actividad de los osteoclastos, favoreciendo la reabsorción en el que debe ser su principal

efecto sobre el hueso. Además, la PTH posee una acción estimuladora de la formación ósea mediada por factores de crecimiento, a través de la síntesis de IGF-I y TGF- β ⁽²⁴⁾. Este doble efecto de reabsorción y formación se explicaría porque la PTH administrada de forma continua estimularía la reabsorción ósea a través de la síntesis de un factor favorecedor de la osteoclastogénesis (RANKL) por parte de las células osteoblásticas, mientras que a dosis intermitentes estimularía la formación de hueso, asociado a un incremento de los factores de crecimiento mencionados anteriormente y a una disminución de la apoptosis de los osteoblastos.

1.5.2. CALCITONINA (CT): inhibe la proliferación de las células precursoras de osteoclastos y, mediante receptores en éstos, disminuye la reabsorción ósea. Es discutible que tal efecto tenga importancia en el remodelado fisiológico, ya que los osteoclastos escapan pronto del bloqueo de su acción por la CT.

1.5.3. 1,25(OH)₂ o VITAMINA D: hormona esteroidea que favorece la absorción intestinal de calcio y fósforo y, por tanto, la mineralización ósea. Los metabolitos activos de la vitamina D son necesarios para la mineralización normal de la matriz ósea y para el desarrollo fisiológico del esqueleto, y simultáneamente poseen un efecto estimulador de la reabsorción ósea por los osteoclastos ⁽²⁵⁾.

1.5.4. ESTRÓGENOS: los estrógenos, tanto como los andrógenos y la progesterona, tienen un efecto anabolizante sobre el hueso, bien directamente, merced a receptores en osteoblastos, o mediante la síntesis de factores locales de crecimiento estimulantes de la acción de esas células. Los estrógenos tienen un doble efecto sobre el metabolismo óseo: por un lado favorecen la formación ósea al aumentar el número y función de los osteoblastos y, por otro, disminuyen la reabsorción. Se han descrito receptores de estrógenos en osteoblastos, osteocitos y osteoclastos humanos. Investigaciones recientes han comprobado que los estrógenos pueden aumentar los niveles de osteoprotegerina (OPG), proteína producida por los osteoblastos que inhibe la reabsorción ⁽²⁶⁾, por lo que podrían jugar un papel importante en la regulación de la osteoclastogénesis. Es por esto que la deficiencia de estrógenos durante la

menopausia constituye el factor patogénico más importante de la pérdida ósea asociada a la osteoporosis.

1.5.5. GLUCOCORTICOIDES: inhiben la producción de IGF-I por los osteoblastos y su síntesis de matriz osteoide. A dosis altas tienen efectos catabólicos sobre el hueso, ya que inhiben la síntesis de IGF-I por los osteoblastos, y suprimen directamente la BMP-2 y el Cbfa1, que son factores críticos para la osteoblastogénesis ⁽²⁷⁾. Sin embargo, estudios recientes han demostrado que a dosis fisiológicas tienen capacidad osteogénica favoreciendo la diferenciación osteoblástica ⁽²⁸⁾.

1.5.6. CITOQUINAS: son polipéptidos sintetizados en células linfocíticas y monocíticas que juegan un papel importante en múltiples funciones celulares, como en la respuesta inmunológica, la inflamación y la hematopoyesis, con un efecto autocrino y paracrino. En el hueso son importantes las siguientes:

- Interleuquina 1 (IL-1): estimula directamente la reabsorción osteoclástica, incrementando la proliferación y diferenciación de los preosteoclastos así como la actividad osteoclástica e inhibiendo la apoptosis de los osteoclastos ⁽²⁹⁾. En realidad son tres moléculas diferentes relacionadas: IL-1 α , IL-1 β y antagonista del receptor de IL-1, siendo esta última inhibidora del efecto de las dos primeras. Su acción sobre la reabsorción puede ser directa e indirecta, a través de la síntesis de prostaglandinas.
- Interleuquina 6 (IL-6): estimula la reabsorción ósea y parece implicada en la patogenia de la enfermedad de Paget ⁽³⁰⁾. Se cree que juega un papel importante en las etapas iniciales de la osteoclastogénesis. Se produce en respuesta a PTH, IL-1 y 1,25(OH)₂D₃.
- Interleuquina 11 (IL-11): se produce en la médula ósea e induce la osteoclastogénesis.

- Prostaglandinas (PG): *in vitro* favorecen la reabsorción ósea, fundamentalmente la PGE₂, pero también la PGE₁, PGG₂, PGI₂ y PGH₂⁽³¹⁾. Estudios *in vivo*, midiendo los niveles de prostaglandinas en el líquido crevicular, han demostrado su participación en la destrucción ósea que tiene lugar en la enfermedad periodontal ⁽³²⁾.

1.5.7. PROTEÍNAS MORFOGÉNICAS ÓSEAS (BMPs: *Bone Morphogenetic Proteins*): las proteínas morfogenéticas óseas están incluidas dentro de la familia de los TGF-β. Constituyen un grupo de 15 proteínas capaces de conseguir la transformación de tejido conjuntivo en tejido óseo, por lo que se consideran osteoinductivas. Asimismo, son capaces de estimular la diferenciación de células pluripotenciales hacia diferentes líneas celulares (tejido adiposo, cartilaginoso y óseo). Son muy abundantes en el tejido óseo y durante la embriogénesis participan en la formación de hueso y cartílago.

Actualmente se las considera como los factores más potentes de la diferenciación osteoblástica ⁽⁶⁾. Canalis *et al.* ⁽³³⁾ creen que además de estimular la osteogénesis inhiben la osteoclastogénesis.

1.5.8. HORMONA DEL CRECIMIENTO (GH): estimula la producción de colágeno y proteínas no colágenas por los osteoblastos y, además, al estimular la síntesis de los factores de crecimiento semejantes a la insulina (IGFs) por el hígado y los propios osteoblastos, favorece la diferenciación de los preosteoblastos y la proliferación de osteoblastos ⁽³⁴⁾. Por ser una de las moléculas objeto de nuestro estudio se hablará de ella más adelante.

1.5.9. INSULINE-LIKE GROWTH FACTORS I Y II (IGF I y II): incrementan el número y función de los osteoblastos, favoreciendo la síntesis de colágeno ⁽³⁵⁾. Circulan unidos a proteínas de unión (IGFBP de *IGF-binding protein*), que a su vez pueden ejercer efectos estimulantes o inhibidores sobre el hueso. Los IGFs están regulados por hormonas y factores de crecimiento locales; así la GH, los estrógenos y la progesterona aumentan su producción, mientras que los glucocorticoides la inhiben. Asimismo, IGF-I y II, median en la interacción osteoblasto-osteoclasto e intervienen de forma activa en el remodelado óseo ⁽³⁶⁾.

El IGF-II es el factor de crecimiento más abundante de la matriz ósea, es importante durante la embriogénesis, pero sus efectos sobre el esqueleto ya desarrollado actualmente se desconocen ⁽³⁷⁾.

1.5.10. MELATONINA (MLT): numerosos trabajos señalan a la melatonina como un importante mediador en la estimulación y formación de hueso. Por ser una de las moléculas objeto de nuestro estudio se hablará de ella más adelante.

1.6. Osteointegración y biología ósea en implantología oral

Las enormes posibilidades terapéuticas que ofrece han hecho de la implantología oral la rama de la Odontología que más se ha desarrollado en los últimos 20 años.

Un requisito imprescindible para el éxito del tratamiento implantológico es la unión firme, estable y duradera del implante dental al sustrato óseo que lo engloba, para luego poder construir sobre él una restauración protésica. En este sentido, Brånemark (1965) fue el primero en definir el concepto de osteointegración como: *“La conexión directa, estructural y funcional entre el hueso y la superficie del implante sometido a carga funcional”* ⁽³⁸⁾. En 1976-1978, Schroeder designa esta propiedad de la osteointegración como “anquilosis funcional”, dando a entender la relación íntima existente entre la superficie del hueso y la del implante. No existe por lo tanto ningún tipo de movimiento entre el implante y el hueso que lo rodea. Esta integración mecánica le da al implante una buena resistencia frente a fuerzas de tracción, pero una baja resistencia a las fuerzas de tensión, las cuales se producen perpendiculares al hueso que rodea al implante ⁽³⁹⁾.

La osteointegración requiere la formación de hueso nuevo alrededor del implante, proceso resultante de la remodelación en el interior del tejido óseo. El proceso lo inician los osteoclastos, que son las células responsables de reabsorber la zona necrótica originada por el fresado óseo durante la preparación del lecho receptor óseo. Junto a ellos, la neoformación vascular

aportará los elementos celulares, los osteoblastos, que crearán hueso nuevo capaz de interactuar con la capa de óxido de titanio del implante para integrar biológicamente al mismo. Los osteoblastos se diferenciarán posteriormente a osteocitos incluidos en la matriz ósea mineralizada.

Si consideramos ultraestructuralmente la interfase hueso-implante debemos referirnos al concepto de biointegración, que es la unión bioquímica directa entre el hueso vivo y la superficie del implante, demostrable a través de microscopía electrónica, independientemente de cualquier mecanismo mecánico de interunión. Así, el espacio existente entre el tejido óseo mineralizado y la capa de plasma de titanio del implante no es mayor de 10 Å y aparece lleno de un material matriz, los proteoglucanos ⁽⁴⁰⁾. Una red de colágeno rodea los osteocitos y se inserta en la capa de glucoproteínas, que se fusiona con la capa de óxido de titanio. Se cree que el óxido de titanio del implante induce la formación de glucosaminoglucanos sulfatados ⁽⁴¹⁾. Las trabéculas óseas crecen acercándose al implante y contactando con la capa de plasma. Por ellas llegan los vasos que aportan nutrición, elementos celulares para la remodelación rodeando completamente el implante; los fibroblastos y osteoblastos aumentan, y al acercarse al implante se unen a la capa de óxido. Forman sustancia fundamental que llena los espacios trabeculares y se fusiona con la capa de óxido de titanio. Por tanto, y en contra de lo que se creía hasta hace unos años, la interfase implante-hueso es una zona dinámica sometida a una intensa actividad remodeladora por parte de las células óseas y la matriz extracelular ⁽⁴²⁾.

Aunque hoy en día los nuevos diseños y tratamientos de superficie de los implantes están permitiendo en algunos casos reducir los tiempos de carga, se establece de forma general un periodo de osteointegración de tres meses en mandíbula y de seis meses en el maxilar superior.

Las investigaciones actuales en implantología van encaminadas a conseguir una rápida integración del implante con el tejido óseo. El éxito o fracaso de este proceso depende del comportamiento de la interfase tejido óseo-implante ⁽⁴³⁾. En este proceso participan muchas variables: material utilizado,

forma, topografía y tipo de superficie sin olvidar cargas mecánicas, técnica quirúrgica y aspectos inherentes a cada paciente que afectan a su metabolismo óseo, sin olvidarnos tampoco de los tejidos blandos, los cuales participan del éxito del implante formando una barrera alrededor del implante protegiendo la interfase implante-hueso ⁽⁴⁴⁾. Cuando todo el proceso tiene éxito hablamos de osteointegración. Hoy en día, las investigaciones se centran en el desarrollo de superficies denominadas bioactivas, las cuales son capaces de interactuar con el hueso que rodea al implante, como ocurre cuando el implante es revestido con carbonato cálcico o bien con flúor. Pero sabemos que dentro del metabolismo óseo, juegan importantes papeles, moléculas, como son la hormona del crecimiento y la melatonina entre otras, las cuales deben de ser tenidas en cuenta a la hora de hablar de osteointegración. Esta es la idea de nuestro estudio. Si bien hasta ahora las investigaciones en osteointegración se han centrado en variar la técnica quirúrgica y el implante, nosotros buscamos la intervención sobre la parte receptora del implante, el hueso, su metabolismo. Podemos potenciar dicho metabolismo en la dirección de conseguir una mejora de la producción de matriz osteoide a través de una estimulación de la acción osteoblástica y una disminución de la osteoclastogénesis, como ocurre con estas dos moléculas. Sin lugar a dudas esto repercutirá en una más rápida y mejor osteointegración.

2. Hormona del Crecimiento (GH)

2.1. Concepto, biosíntesis y secreción

La hormona del crecimiento, somatotropina u hormona somatotropa (GH, *Growth hormone*) es un péptido formado por 191 aminoácidos dispuestos en una sola cadena en la que existen dos puentes disulfuro que unen las cisteínas que ocupan las porciones 53 y 182 con las respectivamente localizadas en posiciones 165 y 189. Esta estructura, con un peso molecular de 22 K (22.650 dalton), es la forma principal de secreción de la GH por la hipófisis anterior (o adenohipófisis) y la más abundante, tanto en el plasma como en las propias células somatotropas (**Fig. 4**). En los últimos años se han identificado una serie

de variantes, de ellas, la más importante, hasta el punto de representar un 20% de GH en la hipófisis, parece ser la forma 20 K⁽⁴⁵⁾.

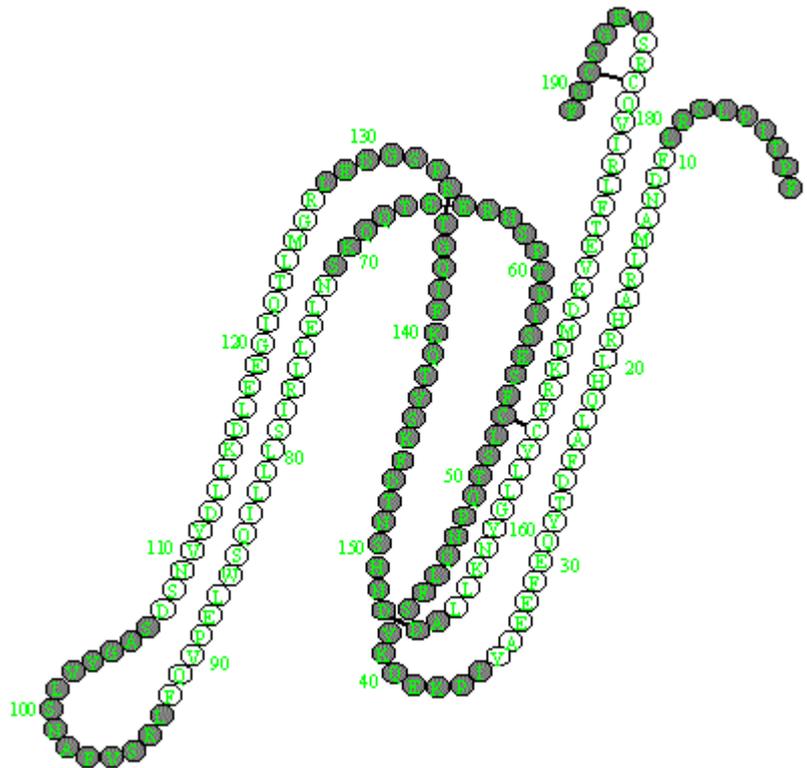


Fig. 4. Representación esquemática de la forma molecular de GH 22 K.

La GH está codificada por un único gen, localizado en el brazo largo del cromosoma 17. Este gen forma parte de una familia de cinco genes relacionados entre sí, que constituyen el denominado *cluster* de genes de GH. Este gen sólo se expresa en las células somatotropas de la pituitaria anterior, que son las productoras de GH. Son las células más numerosas (alrededor del 50%) de la hipófisis anterior⁽⁴⁶⁾. Son generalmente grandes, ovaladas o poligonales. Ultraestructuralmente, las somatotropas contienen abundantes gránulos electrodensos situados al azar, y miden unos 300-600 nm de diámetro, aunque la mayoría se hallan entre 350-450 nm. El retículo endoplasmático rugoso está ordenado en apilamientos paralelos, muchos situados paralelos a la membrana celular.

El ARN mensajero dirige la síntesis de una prehormona. Tras la eliminación de una señal peptídica, la hormona completa se almacena en

gránulos. La síntesis de GH es estimulada por su hormona liberadora hipotalámica específica, la hormona liberadora de hormona del crecimiento (GHRH), y por la hormona tiroidea y el cortisol.

La secreción (**Fig. 5**) de GH por exocitosis es estimulada por la GHRH, un péptido hipotalámico de 44 aminoácidos. La GHRH interacciona con su receptor de la membrana plasmática, tras lo cual se generan como segundos mensajeros calcio, derivados del fosfatidilinositol y AMP cíclico.

La hormona inhibidora de hormona del crecimiento (GIH) o somatostatina (SS), un péptido hipotalámico con una forma de 14 y otra de 28 aminoácidos, es un potente inhibidor de la liberación de GH. La somatostatina bloquea no competitivamente la estimulación por GHRH. El inhibidor actúa a través de su propio receptor en la membrana plasmática, en parte al disminuir tanto la entrada de calcio en las células como la cantidad de AMP cíclico. La GH se segrega en pulsos originados por la liberación intermitente de GHRH hacia la sangre de las venas porta hipofisarias. La somatostatina también disminuye la frecuencia y amplitud de los pulsos de GHRH ⁽⁴⁷⁾.

La secreción de GH depende de muchos factores. Sin embargo, la vía final común de la mayoría de los estimuladores de la GH es el aumento de GHRH, la disminución de la somatostatina o ambos. Por el contrario, las sustancias que suprimen la GH disminuyen la GHRH, aumentan la somatostatina o ambos efectos. Algunos agentes pueden modificar la secreción de GH mediante acción directa sobre las somatotropas.

La liberación de GH está regulada metabólicamente por los sustratos energéticos glucosa y ácidos libres, y por los aminoácidos. Una disminución brusca de las concentraciones de glucosa o de ácidos grasos libres estimula un gran aumento de la GH plasmática, mientras que la elevación de la cantidad de las mismas reduce considerablemente la GH plasmática. Tanto el ayuno breve como la privación prolongada de proteínas y calorías incrementan la secreción de GH. La obesidad, en cambio, reduce la respuesta de la GH ante cualquier estímulo, incluida la GHRH ⁽⁴⁸⁾.

La regulación de la secreción de GH por el sistema nervioso central adopta diversas formas. Se produce una oleada nocturna de GH 1 o 2 horas después del comienzo del sueño profundo. Por el contrario, el sueño ligero, asociado a movimientos oculares rápidos (sueño REM), inhibe la liberación de GH. Diversas situaciones de agresión, como traumatismos, cirugía, anestesia, etc., elevan la GH plasmática. Estos procesos actúan sobre las neuronas hipotálamicas secretoras de GHRH y somatostatina (SS) a través de diversas monoaminas neurotransmisoras.

Las concentraciones plasmáticas basales de GH en reposo son de 1 a 5 ng/ml. La hormona circula vinculada a una proteína de unión (GHBP-I), idéntica al dominio extracelular de los receptores de GH en la membrana plasmática.

La regulación de la secreción de GH por retroalimentación negativa tiene lugar a todos los niveles. La somatomedina (Sm), un producto periférico de la acción de la GH, ejerce una retroalimentación negativa de asa larga. Inhibe la liberación de esta última sobre la célula somatotropa, y estimula la liberación de somatostatina. La propia GH ejerce una retroalimentación negativa de asa corta, estimulando la liberación de somatostatina. La GHRH lleva a cabo una retroalimentación negativa de asa ultracorta a través de sinapsis con neuronas somatostatinérgicas⁽⁴⁹⁾.

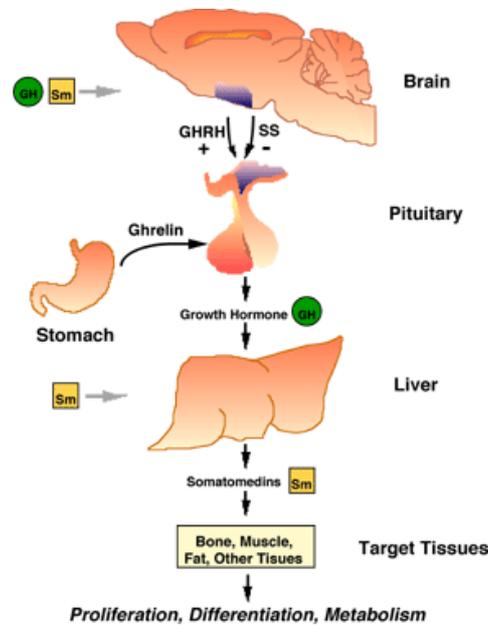


Fig. 5. Regulación de la secreción de GH. Dos péptidos hipotalámicos, uno inhibidor (SS) y otro estimulador (GHRH), regulan la liberación de GH. La retroalimentación negativa por la somatomedina (Sm), su producto periférico, se ejerce a nivel hipotalámico e hipofisario. Existe además una compleja regulación por sustratos e influencias neurales. Reproducida de www.biochem.northwestern.edu/.../GH-Axis.gif

RECEPTORES DE GH: ⁽⁴⁵⁾

El receptor de la GH humana (GH-R) es una proteína transmembrana de 620 aminoácidos codificada por un gen ubicado en el cromosoma 5.

A diferencia de lo que ocurre con la unión GH-GHBP-I (proteína transportadora), la unión de la hormona a su receptor es de 1:2, es decir, una molécula de la hormona debe unirse a dos moléculas del receptor para poder originar un complejo más activo, lo que está en consonancia con la existencia en la molécula de GH de dos sitios activos de unión. La importancia de este modo de unión viene determinada porque de esta forma el máximo efecto de GH se obtiene a concentraciones menores de las que serían necesarias para ocupar todos los receptores si la unión fuese mol a mol.

En la inducción de los efectos biológicos de GH existe al menos un doble mecanismo de acción (**Fig. 6**):

- Mecanismo clásico de generación de mensaje tras la unión de la hormona a su receptor en la membrana plasmática.
- Actuación a nivel nuclear tras la internalización de GH acoplada al receptor.

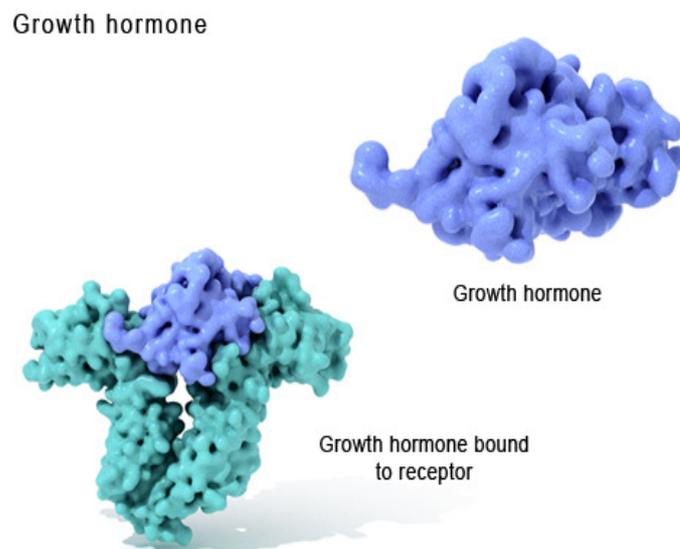


Fig. 6. Unión de GH – GH-R. Reproducida de U.S. National Library of Medicine.

2.2. Acciones biológicas de la GH

CRECIMIENTO ⁽⁴⁵⁾

La GH estimula el crecimiento somático y actúa sobre el metabolismo intermediario estimulando el anabolismo proteico y la lipólisis. La marcada acción anabolizante de la GH se hace patente de forma inmediata tras la administración de la hormona a niños GH-deficientes por activación de todos los procesos implicados en la neosíntesis proteica. Aunque los efectos anabolizantes de la hormona del crecimiento ocurren en tejidos tan variados como hueso, cartílago, músculo, hígado y una serie de vísceras y glándulas, quizá es en músculo e hígado donde alcanzan mayor expresión (**Fig. 7**).

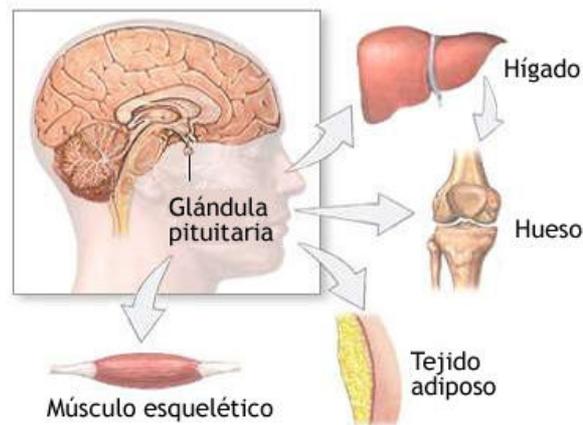


Fig. 7. Acciones biológicas de la GH. Reproducida de A.D.A.M Interactive anatomy. www.adam.com.

A nivel muscular, se observa un incremento del transporte de aminoácidos al interior de la célula, que aparece rápidamente y es bloqueable por inhibidores de la síntesis proteica. Unas horas más tarde hay un claro aumento del ARN ribosómico, de la síntesis de ADN y neosíntesis proteica. Estos mismos fenómenos ocurren en el hígado, donde la GH promueve la fabricación de gran número de proteínas (entre ellas las somatomedinas/IGF-I).

La síntesis de nuevas proteínas es un fenómeno clave para el crecimiento, tanto somático como visceral. El crecimiento somático va a efectuarse a expensas, fundamentalmente, del crecimiento óseo que, tras el nacimiento, va a ser directamente dependiente del sistema GH-somatomedinas ⁽⁵⁰⁾.

El crecimiento del hueso puede ser en longitud y en espesor. El desarrollo longitudinal depende del cartílago de crecimiento, que bajo la acción de la GH determina el alargamiento diafisario, mientras que el aumento de espesor óseo se produce por aposición perióstica. Histológicamente, el cartílago de crecimiento es una zona de gran multiplicación de condrocitos, que bioquímicamente se caracteriza por una intensa síntesis de grandes moléculas del grupo de los proteoglicanos, responsables de la estructura de la trama ósea. Durante el desarrollo, tanto la proliferación celular como la síntesis de macromoléculas está perfectamente compensada. Tras el mismo, el crecimiento óseo va a ser fundamentalmente dependiente de GH.

Por este motivo, en situaciones de déficit de GH se producirá el cese o la disminución del crecimiento lineal, ya que se interrumpen los procesos de proliferación y transformación de los condrocitos. El tratamiento con GH exógena estimula la condrogénesis y la aparición de osteoblastos ⁽³⁵⁾.

Desde el punto de vista bioquímico se ha comprobado que en el cartílago y el hueso la GH incrementa la incorporación de SO_4^{2-} en los proteoglucanos, la incorporación de timidina en el ADN condrocítico y la conversión de prolina en hidroxiprolina en el colágeno. El que estos efectos no se observasen *in vitro* hizo suponer que la hormona no actuaba directamente, sino que lo hace a través de la somatomedina (mediador de la acción de la hormona somatotropa), también llamada IGF (*Insulin-like Growth Factor*).

La acción de la GH sobre el crecimiento óseo longitudinal queda así subordinado a la fabricación periférica, en el hígado, de un factor mediador responsable último de esta acción, estableciéndose un eje GH-somatomedina-crecimiento (**Fig. 8**).

Existe un sistema mucho más complejo, según el cual la propia hormona sería capaz de actuar también directamente sobre el cartílago de crecimiento. GH y somatomedina estimularían de esta forma diferentes poblaciones de condrocitos y la GH induciría directamente la diferenciación de estas células, haciendo que expresen el gen codificador de somatomedina. Los condrocitos diferenciados comenzarían a producir somatomedina, y ésta desencadenaría la proliferación clonal y maduración de nuevos condrocitos por mecanismos auto o paracrinos ⁽³⁵⁾.

De esta forma, en la secuencia ordenada de acontecimientos que tiene lugar en la maduración celular en el cartílago, y que llevan el crecimiento longitudinal de hueso, la GH sería el primer desencadenante y la somatomedina el segundo.

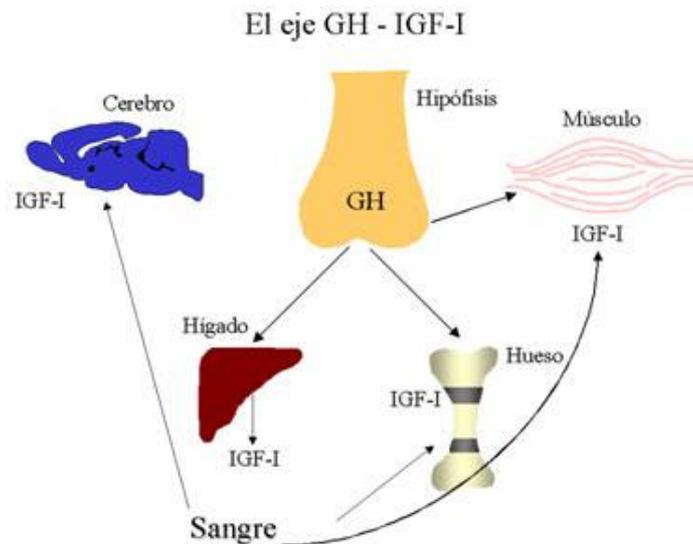


Fig. 8. El eje endocrino de la hormona del crecimiento hipofisaria (GH) y del IGF-I hepático controla el crecimiento de muchos tejidos así como su funcionamiento adecuado. Reproducida de: Carro Díaz E, Trejo Pérez JL y Torres Alemán I. Efectos beneficiosos del ejercicio físico sobre el cerebro. Ciencia al día internacional, 2003. www.ciencia.cl/.../CADi_V5_N1_Art2_Fig1-ok.jpg

OTRAS ACCIONES:

Entre otras de las acciones (**Fig. 9**) que desempeña la GH, las siguientes son las más significativas, después del crecimiento:

- Lipolítica: la GH desempeña un papel en la regulación de niveles plasmáticos de colesterol y triglicéridos, disminuyendo los primeros e incrementando los segundos. Con la destrucción de los triglicéridos y oxidación de los ácidos grasos se consigue la energía necesaria para la fabricación de proteínas ⁽⁴⁵⁾.
- Diabetógena: la GH influye sobre el metabolismo de los hidratos de carbono y los lípidos. Estimula la expresión del gen de la insulina. Sin embargo, también induce resistencia a la acción de la insulina. Se inhibe la captación de glucosa por las células musculares y adiposas, aumentando la concentración de glucosa plasmática. Aparece una hiperinsulinemia compensadora ⁽⁴⁷⁾.

ESQUEMA GENERAL DE LAS ACCIONES DE LA HORMONA DEL CRECIMIENTO

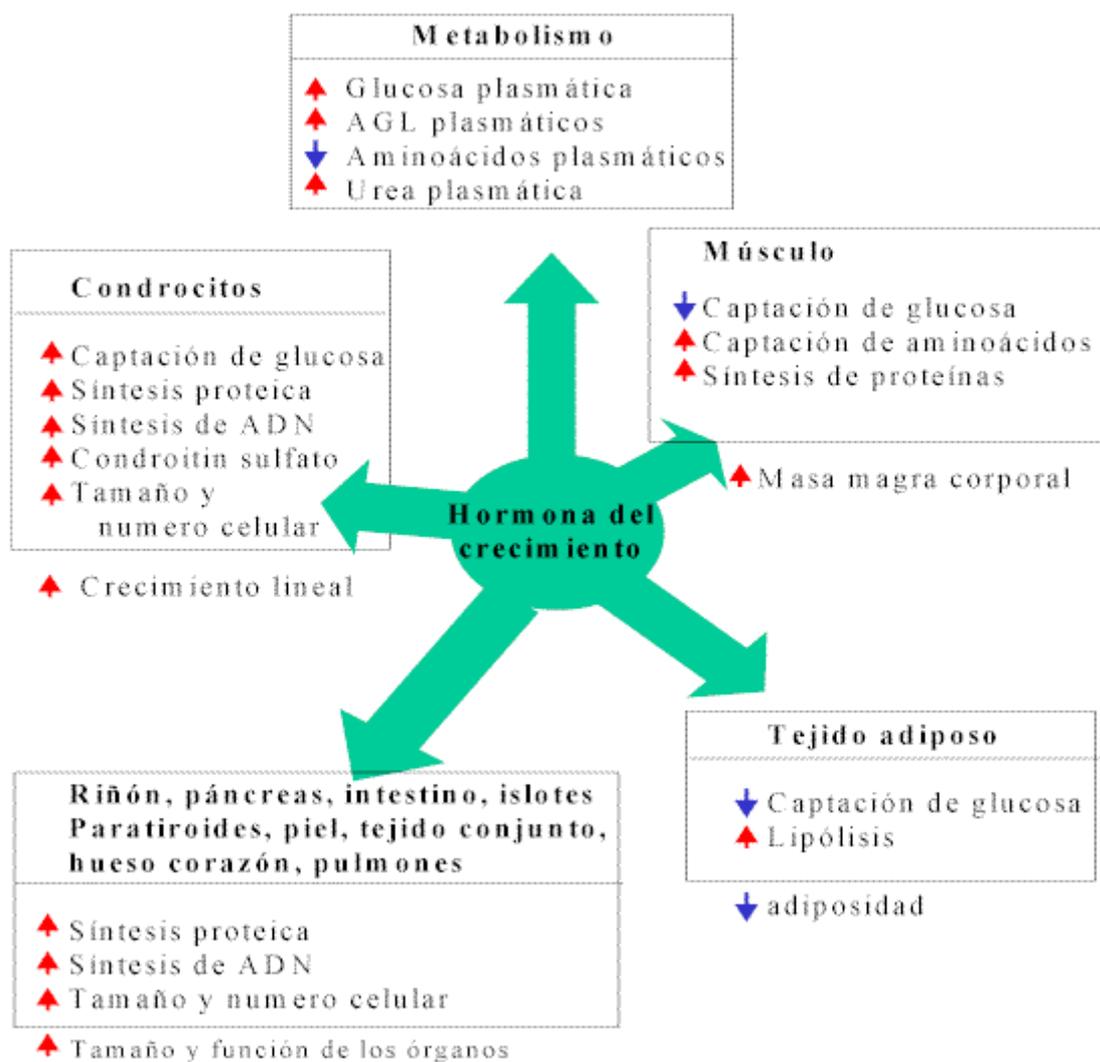


Fig. 9. Esquema general de las acciones de la GH. AGL ácidos grasos libres. Esquema tomado de: Insua MF, Fucks K. Hormona del crecimiento: fisiología y acción en el ejercicio físico. <http://www.efdeportes.com/> Revista Digital - Buenos Aires - Año 9 - N° 62 - Julio de 2003.

2.3. Somatomedinas (IGF) ^(45,47)

La acción básica de este factor es la de estimular la incorporación de sulfato a los proteoglucanos del cartílago, por lo que fue denominado factor

de sulfatación. Pronto se vio que, además, era capaz de intervenir en bastantes más actividades metabólicas, pasando entonces a ser conocido como somatomedina, término con el que se expresaba su actividad de mediador del crecimiento somático.

Actualmente, se conoce que son dos formas peptídicas estructural y funcionalmente similares a la insulina, por lo que se les denomina IGF I y II (*Insulin-like Growth Factors*) con el que se resalta su analogía con la hormona pancreática como su papel sobre el crecimiento.

ESTRUCTURA Y DISTRIBUCIÓN

Estructuralmente, el IGF-I (SmC), es un péptido básico compuesto por 70 aminoácidos que presenta una secuencia aminoacídica similar a la proinsulina. El IGF-II (SmA) está compuesto por 67 aminoácidos y es también muy similar a la proinsulina.

Los IGFs se producen en muchos tejidos en respuesta a la GH. No obstante, los circulantes proceden principalmente del hígado. Se hallan en gran concentración en la matriz osteoide ⁽⁵¹⁾. Ambos tipos de factores circulan unidos a una serie de grandes proteínas ligadoras en el hígado (IGFBP de *IGF-binding protein*), que a su vez pueden ejercer efectos estimulantes o inhibidores sobre el hueso. Los IGF están regulados por hormonas y factores de crecimiento locales; así la GH, los estrógenos y la progesterona aumentan su producción, mientras que los glucocorticoides la inhiben. Por otro lado, median en la interacción osteoblasto-osteoclasto e intervienen de forma activa en el remodelado óseo ⁽⁵³⁾.

El IGF-II es el factor de crecimiento más abundante de la matriz ósea, es importante durante la embriogénesis, pero sus efectos sobre el esqueleto ya desarrollado actualmente se desconocen ⁽³⁷⁾.

De este modo, la GH ejerce una acción indirecta sobre el hueso a través del aumento de la síntesis de IGF-I y II por los osteoblastos. Estos factores

favorecen la proliferación y diferenciación de los osteoblastos, aumentando su número y función.

CONTROL DE IGF-I ⁽⁵²⁾

La GH estimula la secreción de IGF-I por el hígado y seguramente también por otros tejidos, de forma que mientras en el plasma de sujetos deficitarios en esta hormona existe una disminución de los niveles de IGF-I (que rápidamente revierte al administrar GH exógena), está sumamente aumentada en los pacientes acromegálicos.

Existe un circuito *feed-back* entre GH/IGF-I. La elevación de la SmC circulante determina una inhibición de la liberación de GH, por estímulo de la secreción de SS hipotalámica, aunque no se descarta el que también pueda tener una acción inhibitoria sobre GHRH o incluso directa sobre las células somatotropas. Hay otras hormonas, como la insulina o las hormonas tiroideas, que también contribuyen a que la biosíntesis de IGF se desarrolle normalmente. Los esteroides sexuales desempeñan al parecer un papel más importante. Durante la pubertad, los cambios en sus niveles plasmáticos parecen ser precisamente la causa del incremento de la IGF-I asociada al estirón puberal ⁽⁵³⁾.

ACCIONES BIOLÓGICAS DE LA IGF-I/GH

Las somatomedinas sirven de intermediario en las respuestas características a la GH del cartílago, el hueso, el músculo, el tejido adiposo, los fibroblastos y las células tumorales *in vitro*. Los individuos que carecen de capacidad de producir IGFs presentan un retraso del crecimiento, a pesar de sus concentraciones elevadas de GH ^(36,54).

La GH es capaz de estimular la proliferación y diferenciación de osteoblastos, que presentan receptores para la hormona, aumentando la incorporación de H³ timidina dentro de las células y también otros marcadores bioquímicos del fenotipo osteogénético, tales como el péptido carboxiterminal del procolágeno tipo I (PICP), osteocalcina y fosfatasa alcalina. Los IGFs, a su

vez, incrementan el número y función de los osteoblastos, favoreciendo la síntesis de colágeno ⁽⁵¹⁾.

2.4. Papel de la GH en el remodelado óseo

En 1969 se demostró por primera vez un incremento en la masa ósea después del tratamiento sistémico con GH en perros ⁽⁵⁵⁾, así como un incremento en la densidad mineral ósea en personas mayores de 60 años, después de seis meses en tratamiento con GH ⁽⁵⁶⁾. Brixen *et al.* demostraron que la GH era capaz de estimular el recambio óseo, aumentando los marcadores de reabsorción y formación óseas en sujetos sanos, y los valores de osteocalcina, que es una proteína cuya concentración en suero refleja la actividad osteoblástica, aumentaban durante seis meses, después de una semana de tratamiento con GH ⁽⁵⁷⁾.

La GH sistémica ha sido usada para estimular de forma experimental la reparación de fracturas óseas en ratas viejas y jóvenes, mostrando un incremento de un 400% en las propiedades biomecánicas cuando se comparó con un grupo control no tratado ^(58,59). Recientes estudios han mostrado que la GH puede también tener un efecto local, así Guicheux *et al.* observaron que la administración local de GH fue capaz de mejorar el proceso de sustitución de biomateriales por hueso a través de la aceleración del proceso de remodelado óseo, estimulando la síntesis de colágeno, osteocalcina y fosfatasa alcalina ⁽⁶⁰⁾.

3. Melatonina (MLT)

3.1. Concepto, biosíntesis y secreción

La melatonina (MLT) es la N-acetil-5-metoxitriptamina, una hormona sintetizada y secretada principalmente por la epífisis o glándula pineal, descrita inicialmente por McCord y Allen (1917) ⁽⁶¹⁾ y aislada por primera vez por Lerner y cols. (1958) ⁽⁶²⁾.

La glándula pineal es un órgano impar, de un peso aproximado de 120 mg y con forma de cono aplanado. Es una prominencia dorsal de la pared posterior del tercer ventrículo y por ello se sitúa entre los tubérculos superiores del mesencéfalo, en la fosa pineal (**Fig. 10**).

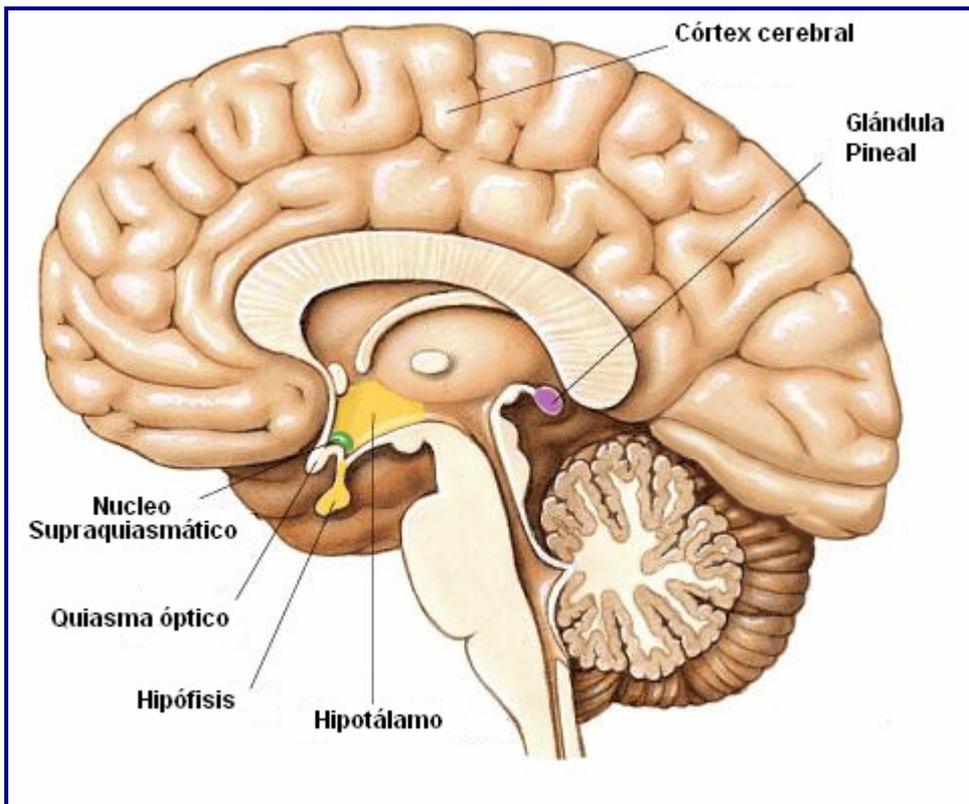


Figura 10. Corte sagital del cerebro.

Por sus características anatómicas, llamó muy pronto la atención de los médicos. La primera descripción de la glándula pineal se atribuye a Herófilo de Alejandría, en el siglo III a. C., quien la vinculó a funciones valvulares reguladoras del “flujo del pensamiento” en el sistema ventricular. Galeno (siglo II a. C.) describió su anatomía y la llamó *konarium* (cono de piña), denominación que ha perdurado hasta nuestros días junto con la de pineal (del latín *pineae*, piña). En el Renacimiento, Andrés Vesalio aportó una descripción anatómica precisa en su obra *De Humani Corporis Fabrica* (1543). René

Descartes la calificó en su póstumo *De homine* (1633) de tercer ojo, no por su papel en el control del fotoperiodo, aún desconocido, sino porque, según su concepción dualista, constituía la sede del alma. Además se encargaba de la percepción del entorno.

Es en el siglo XIX cuando se aborda la glándula pineal desde diferentes frentes: anatómico, histológico y embriológico; y se mostró su semejanza con la epífisis de vertebrados inferiores.

En el siglo XX, Heubner relacionó la glándula pineal con la reproducción, pero es en 1943, cuando Bargman sugirió que la función endocrina de la glándula estaba regulada por la luz a través del sistema nervioso central.

La era actual del conocimiento pineal se inicia en 1954. Julian Kitay y Mark Altschule atribuían a la glándula tres propiedades: su intervención en el control de la función gonadal, su participación en la respuesta cromática dérmica a los cambios de luz ambiental en vertebrados inferiores y alguna vinculación con la conducta.

Por último en 1965, dos hechos contribuyeron a consolidar el concepto de la glándula pineal como órgano neuroendocrino activo en mamíferos. Hoffman y Reiter demostraron que la oscuridad, o fotoperiodos cortos, inducían cambios gonadales en el hámster, que podían ser suprimidos por la pinealectomía. Axelrod y Wurtman acuñaron la expresión “transductor neuroendocrino” para describir la glándula como un órgano que convierte un estímulo neural proveniente de la retina y originado por la luz ambiental en una respuesta endocrina, la producción de melatonina ⁽⁶³⁾.

La melatonina se libera durante la noche a través de la activación postsináptica de receptores β -adrenérgicos. Esto es así, ya que la luz evita la activación adrenérgica de la glándula pineal, produciéndose una inhibición en la síntesis de melatonina. La célula parenquimal de la glándula pineal es el pinealocito, célula de tipo neuronal productora de melatonina con citoplasma rosado y núcleos redondeados oscuros que a menudo forman rosetas, con varias células rodeando una zona fibrilar central compuesta por prolongaciones celulares dirigidas hacia un pequeño vaso capilar. El pinealocito responde a los cambios en la luminosidad durante el ciclo luz/oscuridad, lo que hace que su actividad metabólica se sincronice a un periodo de 24 horas denominado ritmo circadiano que está mediado por el núcleo supraquiasmático del hipotálamo, de manera que en sujetos normales la mayor secreción de melatonina se produce entre las doce de la noche y las dos de la madrugada, y la mínima entre el mediodía y las dos de la tarde ⁽⁶⁴⁾.

La melatonina es sintetizada desde la serotonina, y la glándula pineal contiene todas las enzimas necesarias para sintetizar la serotonina desde el triptófano, así como dos enzimas requeridas para convertir la serotonina en melatonina. La enzima que limita la cantidad, serotonina N-acetiltransferasa, convierte la serotonina en N-acetilserotonina, que es convertido a melatonina por medio de la enzima 5-hidroxiindol-O-metiltransferasa, que utiliza como donante del grupo metil a la S-adenosil metionina ⁽⁶⁵⁾ **(Fig. 11)**.

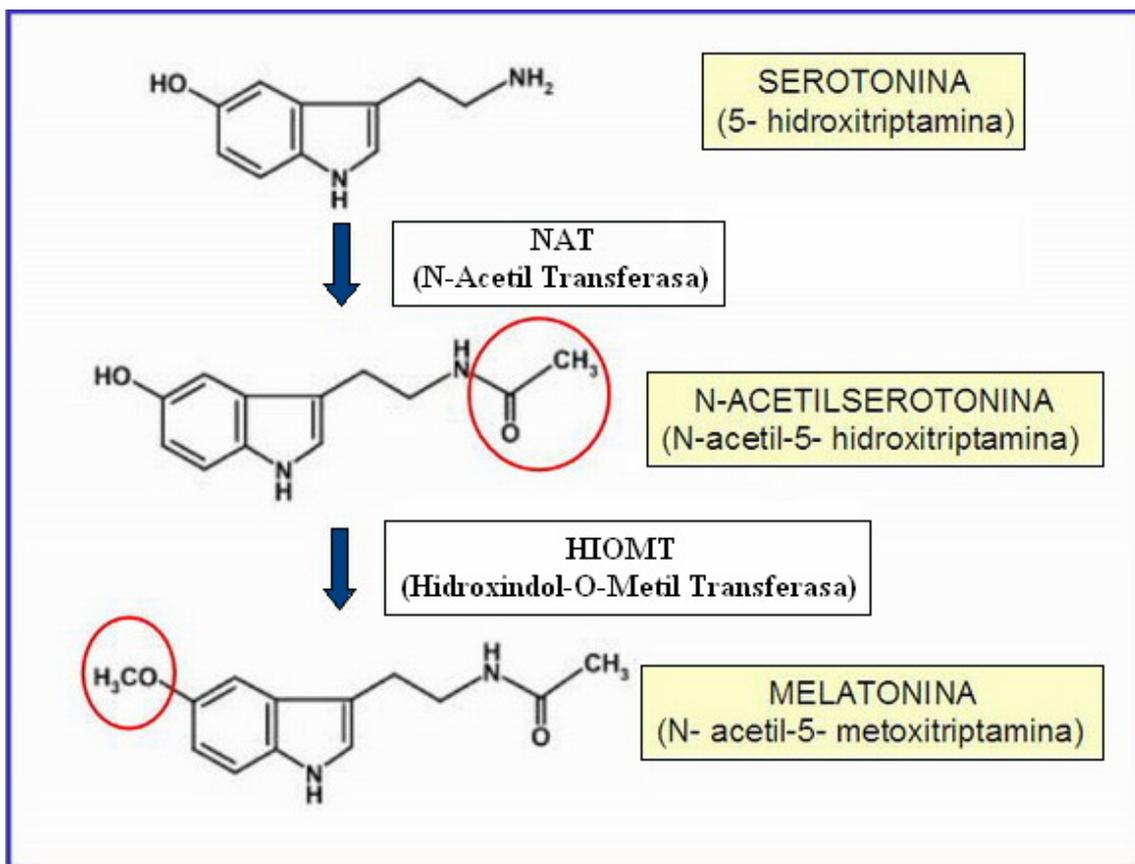


Figura 11. Biosíntesis de la melatonina a partir de la serotonina.

Inicialmente, la melatonina se definió como la hormona que mediaba las variaciones anuales en la capacidad reproductora de animales con ciclos de reproducción estacionales. Actualmente se sabe que influye en numerosos aspectos de la biología circadiana, acciones mediadas por la unión de la hormona a receptores de membrana ^(66,67). Estudios posteriores han permitido relacionar a la melatonina con aspectos de la fisiología intracelular a través de mecanismos que son independientes de la acción de la hormona sobre receptores de membrana. En este sentido, se han identificado y caracterizado receptores nucleares para la melatonina en órganos periféricos ^(68,69) y células del sistema nervioso central ⁽⁷⁰⁾. Se ha demostrado también la capacidad de la melatonina para unirse a proteínas citosólicas como la proteína kinasa C ⁽⁷¹⁾, la calmodulina ⁽⁷²⁾ y la calreticulina ⁽⁷³⁾, modulando a través de esta interacción las

acciones intracelulares del calcio y la dinámica de determinados receptores nucleares, respectivamente.

Según todos estos datos, hoy en día se empieza a considerar a la melatonina no como una hormona en el sentido clásico, sino como un ***protector celular*** conservado evolutivamente. Esta afirmación se basa en dos hechos:

1. No se sintetiza en un órgano específico. Se sabe que las enzimas requeridas para la biosíntesis de la melatonina se encuentran en otros tejidos además de la pineal, y se sabe que diversos de estos tejidos, entre los cuales están la retina, el timo, el bazo, los linfocitos B, el ovario, el testículo y el intestino, producen melatonina. De todas formas, la melatonina circulante deriva esencialmente de la producida por la pineal, que pasa tanto a la circulación cerebral y sistémica como al líquido cefalorraquídeo. La melatonina extrapineal es producida por órganos específicos para su uso y no sale a la circulación ⁽⁷⁴⁾.
2. No actúa en un órgano diana específico. La melatonina alcanza todos los tejidos de la economía ^(75,76) y, al ser muy lipofílica, puede actuar a todos los niveles de la célula. Además, diversas organelas acumulan melatonina, como el núcleo y la mitocondria ^(68,77).

3.2. Acciones biológicas

3.2.1. ANTIOXIDANTE Y DEPURADOR DE RADICALES LIBRES

Se ha demostrado que la melatonina tiene propiedades antioxidantes. Esta característica, descrita inicialmente por Ianas y colaboradores ⁽⁷⁸⁾, ha sido posteriormente confirmada por numerosos estudios utilizando diferentes

modelos experimentales. La melatonina tiene la capacidad de eliminar, depurar o neutralizar radicales libres, principalmente el radical hidroxilo (HO•) ⁽⁷⁹⁾, pero también radicales peroxilo (ROO•) ⁽⁸⁰⁾, peróxido de hidrógeno (H₂O₂) ⁽⁸¹⁾, óxido nítrico (NO•) y peroxinitritos (ONOO⁻) ⁽⁸²⁾.

Una de las principales características físico-químicas de la melatonina para entender su gran eficacia como antioxidante es su elevada capacidad de difusión. Se trata de una molécula muy lipofílica, capaz de atravesar cualquier membrana celular, o de las diferentes organelas subcelulares ⁽⁸³⁾. Esta propiedad implica una función de la melatonina en todas las partes del organismo, dado que tiene acceso a todas las células y a todos sus compartimentos. En segundo lugar, tiene un potencial redox muy alto, de alrededor de 0.74 V, lo que le confiere una alta capacidad de ceder un electrón para reducir cualquier molécula que esté a su alcance ⁽⁸⁴⁾.

El mecanismo por el cual la melatonina puede neutralizar ROS (especies reactivas del oxígeno) y fundamentalmente el radical HO• consiste en que esta indolamina cede un electrón al radical, eliminando su elevada reactividad, y por tanto, su toxicidad. De esta manera, la propia melatonina se convierte en un radical denominado *radical catión indolilo* ⁽⁸⁵⁾. Éste interacciona entonces con un radical anión superóxido (O₂⁻•), precursor del HO•, para generar el metabolito no enzimático de la melatonina, la N¹-acetil-N²-formil-5-metoxiquinurenamina (aFMK), que se elimina en la orina (**Fig. 12**). En este sistema directo de eliminación de radicales libres, la melatonina y su radical catión indolilo eliminan en realidad dos radicales libres a la vez, uno hidroxilo y otro superóxido. Por tanto, la capacidad de actuar como neutralizador de radicales HO• de la melatonina es altamente específica y depende, como hemos visto ya, de la estructura química de la molécula.

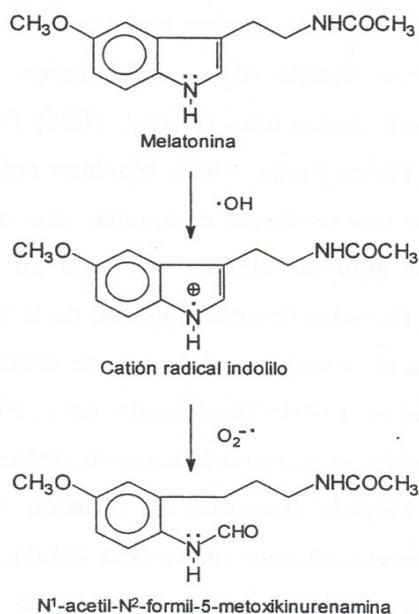


Figura 12. Mecanismo de neutralizaci3n de un radical hidroxilo y un radical an3n super3xido por la melatonina.

Esta acci3n directa como neutralizador de radicales libres se complementa con un efecto estimulante de la actividad de algunas enzimas antioxidantes de la c3lula ⁽⁸⁶⁾, y de inducci3n de la expresi3n de estas enzimas, tales como la super3xido dismutasa (SOD), glutatión peroxidasa (GPx) y glutatión reductasa (GRd) ⁽⁸⁷⁾. Debido a este efecto y a su elevada lipofilia, que le permite actuar a todos los niveles celulares (membrana, citosol, n3cleo, mitocondria), su actividad antioxidante es m3s eficaz que la de otros antioxidantes ya conocidos ⁽⁸⁰⁾.

3.2.2. INMUNOMODULADORA

La relaci3n entre melatonina y sistema inmune es estrecha. En situaciones en las que se produce una inhibici3n en la producci3n de melatonina se observa un estado de inmunodepresi3n que desaparece cuando se administra la hormona. Tambi3n ciertos efectos inmunodepresivos producidos por algunos f3rmacos son contrarrestados por la melatonina ⁽⁸⁸⁾.

Aunque está clara la relación entre la melatonina y el sistema inmune, no es así la forma en la cual se realiza esta influencia sobre la denominada cascada natural de las citoquinas en el sistema inmunitario. La relación entre IL-2 y melatonina (función de neuroinmunomodulación) se demuestra en diversas investigaciones ⁽⁸⁹⁾. En un estudio realizado por Lissoni y cols. ⁽⁹⁰⁾ muestran que la secreción de IL-2 aumenta durante la noche, de una forma concomitante a la melatonina, mientras que no existen evidencias de secreción circadiana de otras citoquinas. La glándula pineal estimula la producción endógena de IL-2. El aumento nocturno de las concentraciones sanguíneas de IL-2 podría depender, al menos en parte, de la acción promotora de la melatonina, cuya liberación aumenta durante el periodo de oscuridad.

García-Maurino y cols. ⁽⁹¹⁾ señalan en un estudio realizado *in vitro* que la melatonina es capaz de activar los linfocitos CD4+ aumentando la producción de IL-2 e IFN- γ , lo que podría sugerir que la melatonina puede estar implicada en la regulación de las funciones inmunes en humanos modulando la actividad de las células CD4 y monocitos.

3.2.3. ESTIMULADORA DE LA FORMACIÓN ÓSEA

Numerosos trabajos señalan a la melatonina como un importante mediador en la estimulación y formación de hueso. A concentraciones micromolares, la melatonina estimula la proliferación y la síntesis de fibras de colágeno tipo I en osteoblastos humanos *in vitro* ⁽⁹²⁾.

Por otra parte, en cultivos de preosteoblastos procedentes de ratas, aumenta la expresión génica de la sialoproteína ósea y de otros marcadores proteicos de hueso, incluyendo la fosfatasa alcalina, la osteopontina y la osteocalcina, de una manera dosis-dependiente, reduciendo su periodo de

diferenciación a osteoblastos de 21 días, que es lo normal, a 12 días. Esta acción parece estar mediada por los receptores de membrana de la hormona ⁽⁹³⁾.

Dentro del metabolismo óseo, otra importante acción biológica directa de la melatonina se centra en el osteoclasto, célula multinucleada encargada de la reabsorción de matriz extracelular mediante diversos mecanismos, dentro de los cuales se encuentra la producción de radicales libres. La melatonina, a través de su acción antioxidante y depuradora de radicales libres, podría interferir en esta función del osteoclasto e inhibir de esta forma la reabsorción ósea ⁽⁹⁴⁾. Esta inhibición en la reabsorción ósea se vería potenciada por otra acción de la indolamina a nivel de la osteoclastogénesis, ya que Koyama *et al.* han observado que la aplicación de melatonina en rangos de 5 a 500 μM disminuye de manera dosis-dependiente la expresión de ARNm de RANK y aumenta tanto los niveles de OPG como de ARNm de OPG en líneas celulares preosteoblásticas MC3T3-E₁ ⁽⁹⁵⁾.

Todos estos datos confirman un efecto osteogénico de la melatonina que puede ser clínicamente importante, ya que podría ser usada como potencial agente terapéutico en situaciones en las que sea deseable un aumento de la formación ósea, como cicatrización de fracturas u osteoporosis ⁽⁹⁴⁾.

3.2.4. MELATONINA Y CAVIDAD ORAL

La melatonina llega a la cavidad oral a través de las glándulas salivales, donde se filtra desde la circulación general. La proporción de melatonina salival/melatonina plasmática en un patrón de 24 horas oscila entre 0.24 y 0.33, esto quiere decir que las concentraciones de melatonina en saliva están en torno al 24-33% de las que la hormona alcanza en plasma. Los autores coinciden en que aproximadamente el 70% de la melatonina plasmática está ligada a albúmina, por lo que esta melatonina ligada no aparecerá en saliva en cantidad

apreciable. De este modo, la melatonina salival representa la porción de melatonina circulante no ligada a albúmina, es decir, melatonina libre ^(96,97).

Hoy en día la determinación de melatonina salival puede ser utilizada como técnica fiable en la investigación de ritmos circadianos y en aquellos procesos en los que esta hormona pueda tener un papel relevante. Así, todas las acciones que hemos descrito para la melatonina pueden tener aplicaciones importantes a nivel odontológico.

La evidente relación entre radicales libres y algunos procesos orales, fundamentalmente la enfermedad periodontal, sugiere que la melatonina podría actuar disminuyendo el ataque oxidativo a los tejidos periodontales, reduciendo los niveles de peroxidación lipídica y otros marcadores oxidativos a nivel de la cavidad oral. Sin embargo, no existen trabajos en la literatura que aludan al papel antioxidante de la melatonina en la cavidad oral.

La importancia de la melatonina como antioxidante a nivel oral depende de su efecto paralelo sobre el sistema inmune. En trabajos publicados previamente por nuestro grupo de investigación hemos comprobado que la melatonina ejerce también en la cavidad oral una acción reguladora sobre el sistema inmune. Así, en pacientes con CPI (Índice Periodontal Comunitario) 3 y 4, con focos infecciosos asociados, se produce un aumento en el número de linfocitos T CD4 que guarda gran similitud con la curva de concentraciones de melatonina en plasma. De la misma forma, aumentan también los linfocitos CD8 conforme empeora el estado oral. Por tanto, un estado oral deficiente (con índices CPI elevados) podría ser un factor de estimulación que actuara sobre la melatonina, la cual ejerce una acción impulsora sobre los linfocitos T CD4 ^(98,99).

Objetivos

OBJETIVOS

Los objetivos de nuestra investigación, realizada en perros de raza *Beagle* de experimentación animal, fueron:

1. Evaluar el efecto de la aplicación tópica de hormona del crecimiento y melatonina, de forma conjunta, en el proceso de osteointegración de implantes dentales a las dos, cinco y ocho semanas de su colocación, a través del estudio de diferentes parámetros histomorfométricos.
2. Valorar la posible aplicación clínica de la hormona del crecimiento y la melatonina en los procesos de osteointegración en la cavidad oral con la finalidad de reducir el tiempo de espera necesario para cargar los implantes.

Material y métodos

MATERIAL Y MÉTODOS

1. Animales, procedimiento quirúrgico y tratamiento

Tras obtener la aprobación por parte del Comité de Ética de la Universidad de Granada, nuestro estudio se realizó en 12 perros macho de raza *Beagle*, procedentes de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Córdoba (España), que se estabularon en el Servicio de Experimentación Animal de la Universidad de Granada (España) donde realizamos nuestros trabajos de experimentación. Los animales, que recibieron alimentación *ad libitum* con dieta sólida a base de pienso y agua y cuyos estabularios fueron cuidados diariamente, permanecieron en el animalario hasta la edad de estudio, que comenzó a los 14 meses.

El estudio siguió en todo momento los principios éticos en investigación y docencia con modelos animales definidos internacionalmente ⁽¹⁰⁰⁾ y aceptados por la Sociedad Española para las Ciencias del Animal de Laboratorio (SECAL), dentro de la legislación básica actual: REAL DECRETO 223/1988, de 14 de marzo, sobre protección de los animales utilizados para experimentación y otros fines científicos ⁽¹⁰¹⁾.

1.1. Exodoncias

Con la finalidad de la colocación posterior de implantes dentales, entre los 14 y 16 meses de edad se realizaron las exodoncias de premolares y molares superiores e inferiores a los 12 perros bajo anestesia general. Se conservó el sector anterior (superior e inferior) de canino a canino para que los perros pudieran mantener una mínima función masticatoria.

Todas las intervenciones se realizaron bajo la supervisión del veterinario del Servicio de Experimentación Animal de la Universidad de Granada.

Para la inducción anestésica se utilizó la siguiente medicación (el cálculo de las dosis de los fármacos se hizo en función del peso de los perros, entre 16 y 18 Kg aproximadamente):

- Calmo Neosan® (maleato de acepromacina): 0.5-1 mg/Kg peso (1-2 ml/10 Kg peso) vía i.m., como tranquilizante 15 minutos antes de la anestesia general.
- Anestesia general, compuesta de:
 - Imalgene® (ketamina + clorbutol): 5-8 mg/Kg peso vía i.v.
 - Calmo Neosan®, como coadyuvante del anestésico a la dosis arriba indicada.
- Atropina 0.05 mg/Kg peso vía s.c., para disminuir las secreciones.

Como medicación antiinflamatoria/analgésica y antimicrobiana se utilizó:

- Voren Antiinflamatorio® (dexametasona isonicotinato): 1-2 ml vía i.m.
- Bivamox Antibiótico® (amoxicilina): 2 ml vía i.m.

El antibiótico y el antiinflamatorio se administraron al terminar la intervención quirúrgica y posteriormente cada 2 días durante un total de 4 días, para prevenir la infección e inflamación postoperatorias, como establecen los comités de ética de experimentación animal.

Tras realizar las exodoncias, se suturó cuidadosamente con seda reabsorbible (seda trenzada estéril 3/0 TB-15. Lorca Marín. Ref. 55346).

Durante todo el procedimiento quirúrgico, la vía i.v. del perro fue mantenida con un suero glucosalino (250 cm³) que permitía la administración de la medicación anteriormente referida. El suero era transfundido en su totalidad después de terminar la intervención para facilitar la hidratación y recuperación postquirúrgica del animal.

Después de la intervención quirúrgica se trasladaba a los perros, aún bajo los efectos de la anestesia general, del quirófano a su estabulario para que, bajo supervisión veterinaria, se recuperasen progresivamente de la operación.

Durante los días posteriores se revisaron periódicamente los perros, sobre todo el estado de las heridas postexodoncias, cuidado y limpieza de las mismas para evitar infecciones, así como la evolución del estado general de los animales.

1.2. Colocación de los implantes

Tras dos meses como tiempo de espera para la cicatrización y regeneración del hueso alveolar, se procedió a la colocación de los implantes dentales, aproximadamente entre los 16 y 18 meses de edad de los perros. La medicación utilizada fue similar a la descrita en la fase quirúrgica anterior.

En cada mandíbula se colocaron ocho implantes de 3,25 mm de diámetro y 10 mm de longitud. En este trabajo fueron evaluados dos implantes en cada lado de la mandíbula (cuatro implantes por perro y 48 en total). Los cuatro implantes restantes fueron utilizados para otra investigación.

Los cuatro implantes de nuestro estudio fueron asignados de forma aleatoria en localizaciones mesiales y distales de cada hemimandíbula (**fig. 13**).

Antes de la colocación del implante se aplicó al lecho óseo receptor del implante 4 UI de rhGH (*recombinant human Growth Hormone*) (Saizen®; Serono Laboratories, Madrid, España) en forma de polvo liofilizado y el implante fue humedecido con suero fisiológico y posteriormente impregnado con 1.2mg de melatonina liofilizada en polvo (*Helsinn Chemicals SA*, Biasca, Suiza) pesada en la mañana de la intervención. Una vez recubierto el implante de melatonina, la sobrante se introdujo de forma cuidadosa en la preparación. Todos los implantes recibieron siempre la misma cantidad de melatonina.

En los lechos óseos donde se colocaron los implantes control no se aplicó ningún tratamiento tópico. Tampoco se aplicó nada a la superficie de este grupo de implantes.



Fig. 13. Implantes colocados en mandíbula de perro *Beagle*.

Técnica Quirúrgica.

El protocolo seguido correspondió a la técnica convencional de colocación de implantes osteointegrados ⁽¹⁰²⁾, cuyos pasos se describen a continuación:

- Incisión crestal con un bisturí con hoja del número 15, que se extendió a lo largo del cuerpo mandibular desde distal del canino hasta 15 ó 20 mm hacia distal del punto de colocación del último implante.
- Diseción roma mediante el uso de periostotomos de Molt y Williger. Se procede a levantar un colgajo de espesor total, de amplitud suficiente para tener acceso a la cresta edéntula, incluyendo las corticales vestibular y lingual; de esta forma se verifica la integridad del reborde alveolar después de las exodoncias.

- Elaboración del lecho receptor de los implantes. Se realiza en el reborde óseo un lecho de morfología y dimensiones similares al implante a colocar. Utilizamos un micromotor (CHIROPRO 980. CA 100121. Bien Air®) con irrigación externa con suero fisiológico para evitar el sobrecalentamiento y necrosis del tejido óseo, y fresas de osteotomía de diámetros progresivamente mayores para realizar las preparaciones mediante un fresado secuencial (kit de fijación de implantes *Implant Microdent System*):
 - ✦ Fresa de marcaje o piloto, recta, de pequeño diámetro (1-1.5 mm). Es la primera fresa utilizada una vez que disponemos del campo operatorio correctamente preparado. Nos sirve para marcar el lugar de colocación e iniciar la preparación a través de la cortical y de los primeros milímetros de hueso esponjoso.
 - ✦ Fresa intermedia, de diámetro inferior al de la fresa definitiva. Se utiliza para ampliar la osteotomía, ensanchando el diámetro de la preparación iniciada con la fresa de marcaje, hasta la longitud definitiva (10 mm) preestablecida para la fijación.
 - ✦ Fresa de avellanado. Sirve para preparar los primeros milímetros del neoalveolo, en los que se alojará la porción más cervical del implante.
 - ✦ Fresa final, de longitud y diámetro definitivos.
- Aplicación tópica de GH y melatonina en el lecho óseo receptor e implante según el procedimiento descrito anteriormente.
- En los lechos óseos donde se colocaron los implantes control y a dichos implantes no se aplicó tratamiento tópico alguno.
- Colocación de los implantes. Los implantes utilizados fueron implantes roscados (*Implant Microdent System*, plataforma diámetro 5.60 mm y diámetro de núcleo 3.25 mm, longitud 10.00 mm - MK 555010. Barcelona,

España). Los implantes fueron llevados a la preparación para proceder al roscado de forma manual, y terminar de forma mecánica mediante llave de presión o carraca.

- El espacio que se dejó entre cada implante fue de al menos 5 mm para evitar la contaminación entre los distintos neoalveolos.
- Colocación del tornillo de cierre o de cicatrización.
- Sutura con seda reabsorbible (seda trenzada estéril 3/0 TB-15. Lorca Marín. Ref. 55346) y administración del remanente de suero glucosalino utilizado durante la intervención.
- Se siguió un programa de control de placa que incluyó la limpieza diaria de los dientes remanentes e implantes con cepillo y aplicación de gel de clorhexidina.
- Los 12 perros se dividieron en tres grupos (4 animales por grupo).

1.3. Sacrificio y extracción de la mandíbula

En la tercera y última fase de experimentación animal, los perros fueron sacrificados secuencialmente a las dos, cinco y ocho semanas (primer, segundo y tercer grupo respectivamente) de la intervención implantológica con el objetivo de valorar la osteointegración en dichos periodos de tiempo.

Para la eutanasia de los animales se siguió la siguiente pauta farmacológica:

- Calmo Neosan® (maleato de acepromacina): 2,5 -3 cm³ vía i.m. + Imalgene 1000® (ketamina + clorbutol): 2 cm³ vía i.m., como premedicación sedante.
- Dolethal® (pentobarbital sódico): 3 cm³ vía i.v.

Una vez constatada por el veterinario la muerte del perro, procedimos a la disección y extracción de la mandíbula para llevar a cabo el estudio histomorfométrico. Para ello, utilizando un bisturí con hoja del número 15 y un periostotomo de Molt, se diseccionaron los tejidos orales adheridos al cuerpo mandibular. Primero se diseccionó la mucosa y musculatura de la cara vestibular, y después la mucosa lingual, tejidos y músculos del suelo de la boca. Posteriormente, con la ayuda de un micromotor (Microprocesor Vmax Volvere NE 120®, Nakanishi INC.) y una fresa de osteotomía, con irrigación con suero salino, realizamos dos cortes transversales en ambos lados del cuerpo mandibular, con un margen distal de aproximadamente 10 ó 15 mm con respecto a los implantes colocados más distales, y se procedió de forma cuidadosa a la extracción de la mandíbula. Ésta se introdujo en un recipiente de plástico herméticamente cerrado con formaldehído 3.7-4.0%, tamponado a pH=7 y estabilizado con metanol DC (Panreac DC ref. 252931.1214).

Las mandíbulas en formaldehído se enviaron al Departamento de Ciencias Clínicas Veterinarias de la Universidad de Santiago de Compostela para realizar el análisis histomorfométrico.

2. Obtención y preparación de las muestras

Preparación histológica de las muestras.

Tanto la preparación como el análisis histológico de las muestras de tejido óseo fueron realizados en el Laboratorio de Implantes de la Unidad de Cirugía, Departamento de Ciencias Clínicas Veterinarias de la Universidad de Santiago de Compostela.

Las muestras fueron procesadas para su estudio utilizando las técnicas de inclusión en metacrilato descritas por Donath ⁽¹⁰³⁾, realizando los pasos que siguen:

Fijación:

Se realizó mediante inmersión de los bloques en formol al 10% durante un mínimo de dos semanas debido al gran tamaño del fragmento óseo.

Deshidratación:

Se realizó mediante pases sucesivos de los segmentos óseos por alcoholes de distinta concentración bajo agitación constante, como se indica a continuación:

- 70 % alcohol durante tres días.
- 80 % alcohol durante tres días.
- 96 % alcohol durante tres días.
- 100 % alcohol durante tres días.
- 100 % alcohol durante tres días.

Infiltración:

La infiltración plástica se realizó mezclando glicolmetacrilato (**Technovit 7200®**, VLC - Heraeus Kulzer GMBH, Werheim, Alemania) y peróxido de benzoilo (**BPO®**: Heraeus Kulzer GMBH, Werheim, Alemania) al 1% con alcohol etílico a distintas concentraciones, finalizando con dos infiltraciones de glicolmetacrilato puro, bajo agitación constante, según el siguiente procedimiento:

- Technovit 7200® + BPO: alcohol | **(30:70)** durante tres días.
- Technovit 7200® + BPO: alcohol | **(50:50)** durante tres días.
- Technovit 7200® + BPO: alcohol | **(70:30)** durante tres días.
- Technovit 7200® + BPO | **(100)** durante tres días.
- Technovit 7200® + BPO | **(100)** durante tres días en vacío.

Inclusión y polimerización:

Para llevar a cabo la inclusión se introdujeron las muestras de tejido en unos moldes de polietileno que posteriormente se llenaron con resina (Technovit 7200®) bajo el efecto del vacío.

La polimerización tuvo lugar en dos pasos:

- **Paso 1:** usando una luz de baja intensidad (manteniendo los moldes a una temperatura por debajo de 40°C, para que la resina se polimerizara extensamente). Este paso dura cuatro horas.
- **Paso 2:** usando una luz azul de gran intensidad, de forma que el metacrilato que ha sido incluido dentro del tejido también resulte completamente polimerizado. Este paso tiene una duración de doce horas, debido al gran grosor de nuestras muestras.

Por último, permanecieron en la estufa durante 24 horas para que el BPO terminara su proceso de polimerización.

Preparación del bloque para obtener una superficie paralela:

Una vez polimerizado, se extrajo el bloque del molde. El siguiente paso fue realizar un corte preliminar para aproximar el área de interés más cerca de la superficie del bloque. Esto se realizó con la ayuda de una sierra de banda (Exakt 300), e irrigando para evitar el sobrecalentamiento de la muestra, que deterioraría los tejidos que rodean al implante. Después se procede a realizar una radiografía del espécimen en dos proyecciones para hacer un corte del implante por la mitad. Una vez cortado por la mitad los bloques se montaron en una lámina acrílica con ayuda de una resina (**Technovit 4000®** - Heraeus Kulzer GMBH, Werheim, Alemania) mediante el empleo de una prensa de pegado y una bomba de vacío, que

sujeta el porta a la parte superior de la prensa. La resina se extendió por la parte de atrás del bloque, de manera que la parte que va a ser examinada contacte con la parte de debajo de la prensa de pegado. Cuando la polimerización finalizó el bloque estuvo listo para ser pulido.

Preparación de la superficie de interés:

El siguiente paso fue el pulido de la muestra por la superficie de interés con la ayuda de papeles abrasivos del número 1200. Tras realizar esta práctica, y con la ayuda de la prensa de fotopegado y una resina específica (**Technovit 7210**[®] - Heraeus Kulzer GMBH, Werheim, Alemania) la cara a estudiar se pegó en el porta definitivo. Posteriormente, utilizando una sierra de banda (Exakt 400, System, Aparatebau GMBH, Hamburgo, Alemania) y un portamuestra de vacío, se realizó un corte preliminar obteniendo una sección fina de 200 micras aproximadamente. Esta sección fue sometida a un microdesgaste (Exakt-Micro Grinding System[®], Aparatebau GMBH, Hamburgo, Alemania) y pulido con papeles de carburo de silicio de 1200 y 4000.

Como resultado final se obtuvieron secciones de aproximadamente 70 micras de espesor.

Tinciones.

Para la tinción de las muestras de procesamiento se empleó la técnica de Levai-Laczó (**Tabla 2**).

TABLA 2. Tinción de LÉVAI LACZCÓ.

TINCIÓN DE LÉVAI LACZCÓ	
<p>Procedimiento:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Sumergimiento en peróxido de hidrógeno (H₂O₂) al 30% durante 5 minutos con movimiento constante. 2. Lavado con agua corriente dos veces. 3. Descalcificación de la superficie con ácido acético (CH₃COOH) durante 1 minuto. 4. Lavado con agua corriente dos veces. 5. Sumergimiento en la Solución A durante 20 minutos. 6. Lavado con agua corriente dos veces. 7. Sumergimiento en “Pararosanilina” durante 5 segundos. Los cortes se deben sumergir individualmente en esta tinción. 8. Lavado con agua corriente y secado. 	
Solución A	Materiales
<p>Una parte de Azur II con una parte de azul de metileno y dos partes de Na₂CO₃ (1%).</p> <p>Las soluciones deben ser filtradas antes de su uso.</p>	<p>➤Solución A:</p> <p>Azur II (Merck Art. No. 9211) al 1% en agua destilada.</p> <p>Azul de metileno (Merck Art. No. 1283) a 1% en agua destilada.</p> <p>Na₂CO₃ (Merck Art. No. 6392) a 1% en agua destilada.</p> <p>➤Solución B:</p> <p>Pararosanilina (Sigma Art. No. 1528) a 1% en agua destilada.</p>

3. Evaluación de las muestras

La histomorfometría es una valoración cuantitativa que permite la medición bidimensional (anchura, longitud, perímetro y área) y tridimensional (volumen, anchura y superficie) en diferentes tejidos vivos, entre ellos el tejido óseo. La evaluación histológica del hueso se ha visto limitada durante años por las dificultades técnicas, de tal manera que antes de 1960 se realizaban únicamente técnicas de decalcificación que permitían obtener un tejido lo suficientemente blando para incluirlo en parafina. Sin embargo, esta técnica presentaba una serie de inconvenientes ⁽¹⁰⁴⁾:

- No distinguía el hueso mineralizado del no mineralizado.
- En la mayoría de los casos se producían fenómenos de retracción de la interfase hueso/médula ósea que dificultaban la evaluación de las células que intervienen en el remodelado.
- Imposibilitaba el estudio de la dinámica ósea mediante marcaje con tetraciclinas.

Con el desarrollo técnico de medios duros de inclusión (monómeros plásticos) y de microtomos especiales se ha permitido cortar el hueso sin descalcificar y de esta manera realizar nuevos estudios.

Los parámetros histomorfométricos resultan de relacionar entre sí una serie de recuentos y mediciones efectuadas en el tejido óseo, permitiéndonos definir cuantitativamente las características estructurales y funcionales del hueso en condiciones normales, patológicas o experimentales⁽¹⁰⁵⁾.

En nuestro estudio, para el análisis histomorfométrico se procedió a la captura de las imágenes con un microscopio óptico (Olympus CH30, Nagano, Japón), al que se le acopló una cámara digital (Olympus DP12,

Nagano, Japón). La captura de las imágenes se realizó con un objetivo de cuatro aumentos, y utilizando filtros para polarizar la luz. El análisis de imágenes se realizó con el programa informático Microimage 4.0® (Media Cybernetics, Silver Spring, Maryland, Estados Unidos).

El análisis histomorfométrico fue realizado por el mismo investigador, que desconocía a qué grupo (experimental o control) pertenecía cada muestra.

Los parámetros histomorfométricos analizados en nuestro estudio fueron los siguientes (**Fig. 14**) ⁽¹⁰⁶⁾:

➡ **BCP (*Bone-to-implant contact ratio*):**

El parámetro BCP corresponde al porcentaje de integración o ratio de contacto óseo, y se define como el hueso en contacto directo con el implante en relación al perímetro total de éste. Se empieza la medida en el hombro de un lado del implante hasta el hombro del lado contrario (**Fig. 14**). Se expresa en forma de porcentaje y se calcula de la siguiente forma:

$$\text{BCP} = \left(\frac{\text{longitud superficie del implante en contacto directo con hueso}}{\text{longitud total del implante}} \right) \times 100$$

➡ **HUESO PERIIMPLANTARIO TOTAL (*Periimplant bone area*):**

Para determinar la densidad ósea alrededor del implante se utilizaron en la histomorfometría pequeños rectángulos formados por una línea que une los picos de las roscas de los implantes, y a una distancia de un milímetro de éstas (dimensiones aproximadas del rectángulo: 1 x 1,2 mm) (**Fig.14**); de esta manera, el hueso periimplantario total se define como el área de hueso dentro de los rectángulos dividida entre el área total de tejido en el interior de los mismos (aproximadamente 1.247.227 micras cuadradas) (x 100). En cada implante se determinaron ocho rectángulos y se calcularon

la media y el total de las áreas. El resultado final es la media de los porcentajes de hueso de todos los rectángulos alrededor del implante.

➡ **HUESO INTERROSCA (*Inter-thread bone area*):**

Se define como el área de hueso dentro de las roscas del implante dividida entre el área total de tejido comprendida en las mismas (el área de cada triángulo interroscas tiene aproximadamente una superficie de 155.993,40 micras cuadradas) (**Fig. 14**). El resultado final se multiplica por 100 y se expresa, como en las variables anteriores, en forma de porcentaje.

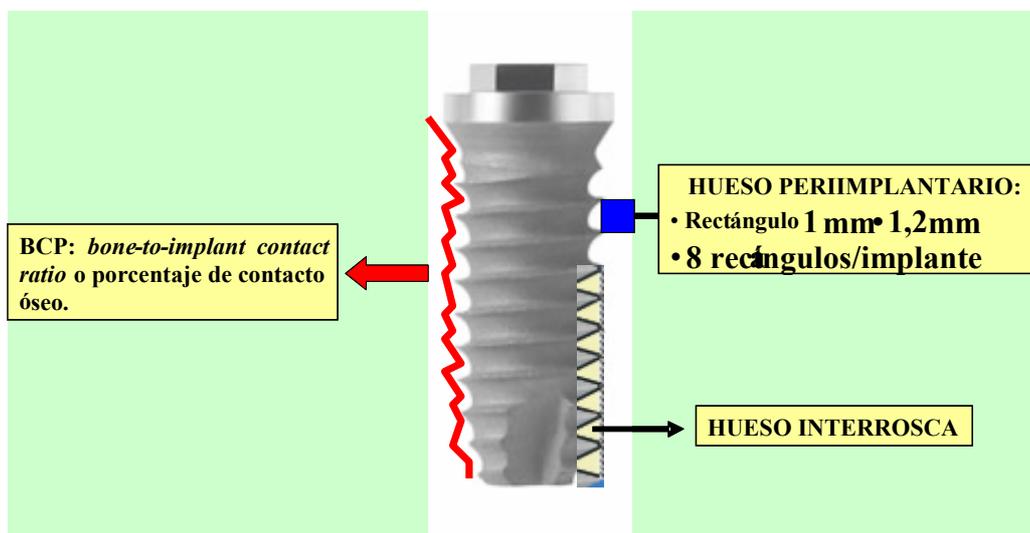


Fig. 14. Representación de los parámetros de osteointegración determinados en el estudio histomorfométrico.

➡ **PORCENTAJE DE NEOFORMACIÓN ÓSEA.**

Se define como el área de hueso nuevo formado tras la colocación del implante. Puede ser consecuencia del proceso de remodelado del hueso ya existente, o de la formación de nueva matriz osteoide tras la diferenciación de células preosteoblásticas, que llegan a través de los vasos sanguíneos al lecho alveolar. El hueso neoformado se localiza fundamentalmente entre las roscas de los implantes, aunque también lo encontramos en la zona periimplantaria.

4. Análisis estadístico

Todos los datos se expresan como valor medio \pm error estándar de la media (SEM). Para analizar las diferencias entre las distintas variables se utilizó el test de la *t de Student* (y en su caso el test aproximado de Welch) para muestras apareadas o independientes según procedió. Los cálculos se realizaron con la versión 11.0 del programa SPSS (Chicago, Illinois, Estados Unidos) con licencia de la Universidad de Granada (Nº Licencia: 7837432). El nivel de significación estadística se estableció en $P < 0.05$.

Resultados

RESULTADOS

Los resultados obtenidos en los diferentes parámetros histomorfométricos de osteointegración en los implantes control y los tratados con hormona del crecimiento y melatonina se reflejan en la **tabla 3** para la segunda semana, **tabla 4** para la quinta semana y **tabla 5** para la octava semana desde la colocación. La muestra experimental considerada en el estudio es de 12 perros *Beagle*. Los datos se expresan como valor medio \pm error estándar de la media (SEM).

Antes de la colocación del implante se aplicó al lecho óseo receptor del implante 4 UI de rhGH (*recombinant human GH*) en forma de polvo liofilizado y el implante fue humedecido con suero fisiológico y posteriormente impregnado con 1.2mg de melatonina liofilizada en polvo.

En los lechos óseos donde se colocaron los implantes control no se aplicó ningún tratamiento tópico. Tampoco se aplicó nada a la superficie de este grupo de implantes.

Tabla 3. Valores histomorfométricos a las dos semanas.

Parámetro histomorfométrico	Implantes Control	Implantes GH-MLT
BCP (% contacto óseo)	25.05 \pm 11.90	34.20 \pm 11.02*
Hueso periimplantario total (%)	53.40 \pm 22.41	64.72 \pm 16.45*
Hueso interrosca (%)	25.08 \pm 3.47	35.62 \pm 2.25*
Neoformación ósea (%)	3.89 \pm 1.56	4.21 \pm 1.27

* El nivel de significación estadística se estableció para $P < 0,05$

Tabla 4. Valores histomorfométricos a las cinco semanas.

Parámetro histomorfométrico	Implantes Control	Implantes GH-MLT
BCP (% contacto óseo)	34.33 ± 8.13	36.43 ± 6.02
Hueso periimplantario total (%)	68.93 ± 13.76	63.83 ± 11.08
Hueso interrosca (%)	72.56 ± 12.54	80.76 ± 11.80*
Neoformación ósea (%)	8.45 ± 1.41	8.01 ± 1.42

* El nivel de significación estadística se estableció para $P < 0,05$

Tabla 5. Valores histomorfométricos a las ocho semanas.

Parámetro histomorfométrico	Implantes Control	Implantes GH-MLT
BCP (% contacto óseo)	33.15 ± 11.35	31.47 ± 10.69
Hueso periimplantario total (%)	71.07 ± 5.57	71.51 ± 6.47
Hueso interrosca (%)	82.43 ± 13.41	83.50 ± 14.51
Neoformación ósea (%)	7.53 ± 1.69	9.04 ± 1.71*

* El nivel de significación estadística se estableció para $P < 0,05$

A las dos semanas, El BCP (*Bone-to-implant contact ratio*) fue significativamente mayor en el grupo tratado con hormona del crecimiento(GH)/melatonina(MLT) que en el control (34.20 vs. 25.05%; $p = 0.010$). En el grupo tratado también se incrementó de forma significativa el hueso periimplantario (64.72 vs. 53.20%; $p = 0.038$) y el hueso interrosca (35.62 vs. 25.08%; $p = 0.02$). A la quinta y octava semana, el BCP y la densidad ósea alrededor de los implantes fueron similares en ambos grupos (tratado y

control). El hueso interrosca si aumentó a la quinta semana en el grupo tratado en comparación al control. Hubo diferencias significativas a las ocho semanas en la neoformación ósea del grupo tratado (9.04 vs. 7.53%; $p = 0.05$).

A continuación se detalla gráficamente cada uno de los parámetros histomorfométricos descritos, comparando los valores obtenidos en el grupo control con los implantes del grupo tratado con GH/MLT.

1. BCP (*Bone-to-implant contact ratio*)

Definíamos previamente este parámetro como *el hueso en contacto directo con el implante en relación al perímetro total de éste*. La figura que se detalla a continuación (**figura 15**) representa, mediante diagramas de barras, los valores de este parámetro histomorfométrico en los implantes control y en los implantes tratados a las dos, cinco y ocho semanas.

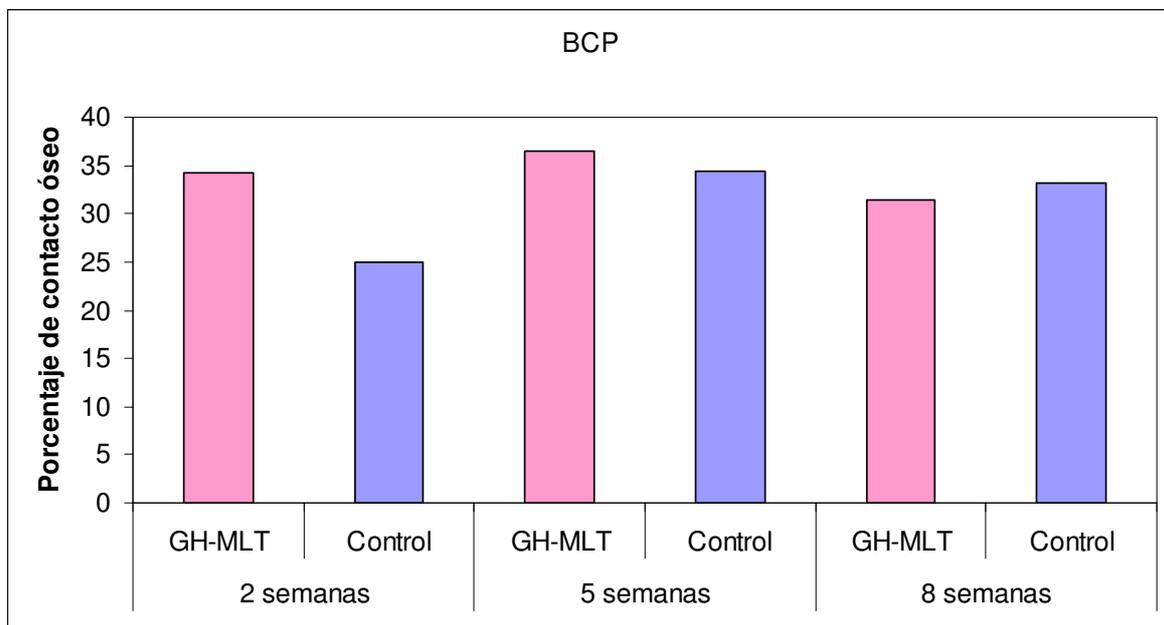


Fig. 15. BCP a las 2, 5 y 8 semanas.

2. Hueso periimplantario total

El hueso periimplantario total es, según la definición dada previamente, *el área de hueso dentro de los rectángulos de 1,2 mm² dividida entre el área total de tejido en el interior de los mismos*. Estos rectángulos se forman con una línea que une los picos de los implantes y a 1 mm de estos. La figura que se detalla a continuación (**figura 16**) representa gráficamente los valores de este parámetro histomorfométrico en los implantes control y en los implantes tratados a las dos, cinco y ocho semanas.

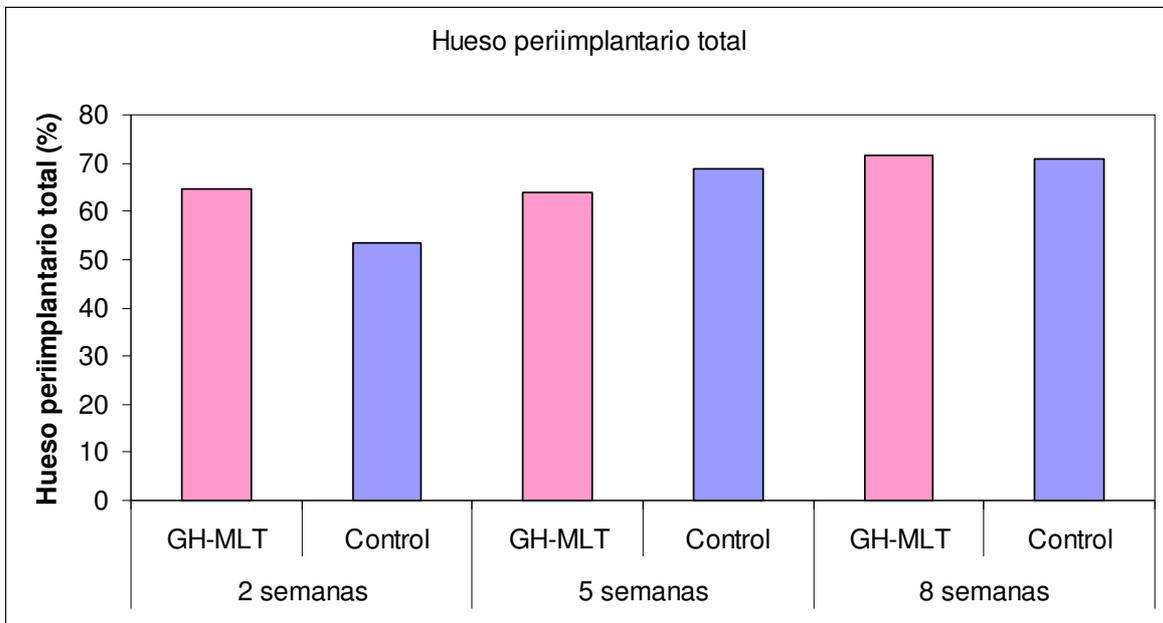


Fig. 16. Hueso periimplantario total a las 2, 5 y 8 semanas.

3. Hueso interrosca

Ya definido, es el cociente entre el área de hueso entre las roscas del implante y el área total de tejido contenido en las mismas. En la siguiente figura (**figura 17**) se comparan los valores de este parámetro a las dos, cinco y ocho semanas en los dos grupos: control y GH/MLT.

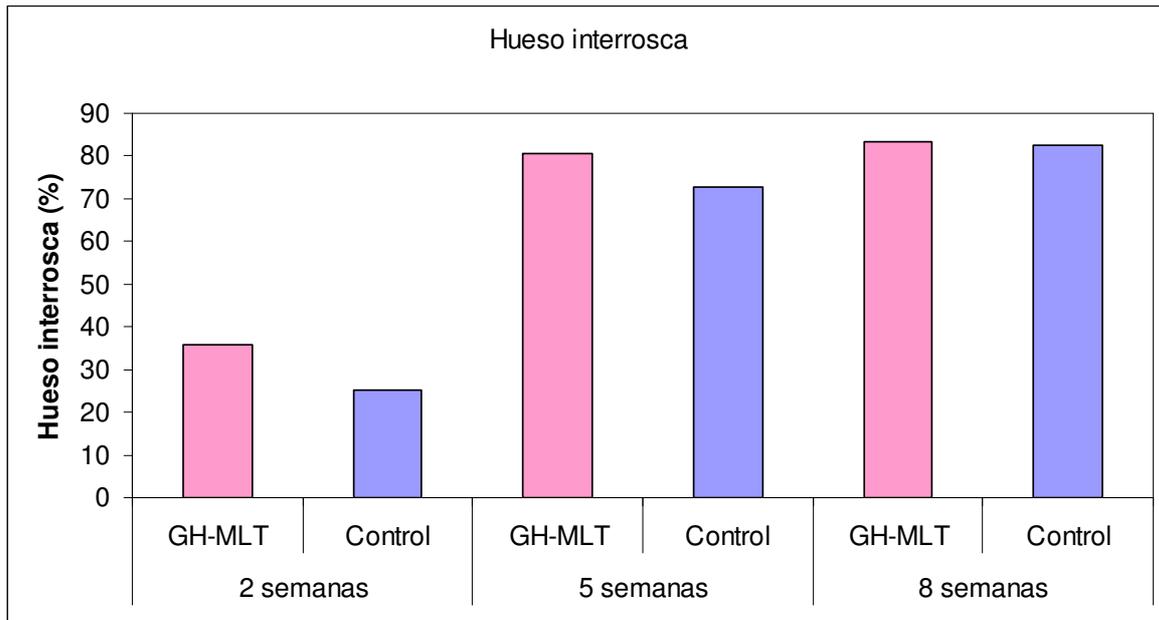


Fig. 17. Hueso interrosca a las 2, 5 y 8 semanas.

4. Neoformación ósea

Definido previamente, es el área de hueso nuevo formado tras la colocación del implante. Este hueso neoformado se puede localizar fundamentalmente entre las roscas de los implantes, o en la zona periimplantaria. Los datos que se obtuvieron a las dos, cinco y ocho semanas aparecen representados gráficamente en la siguiente figura (**figura 18**).

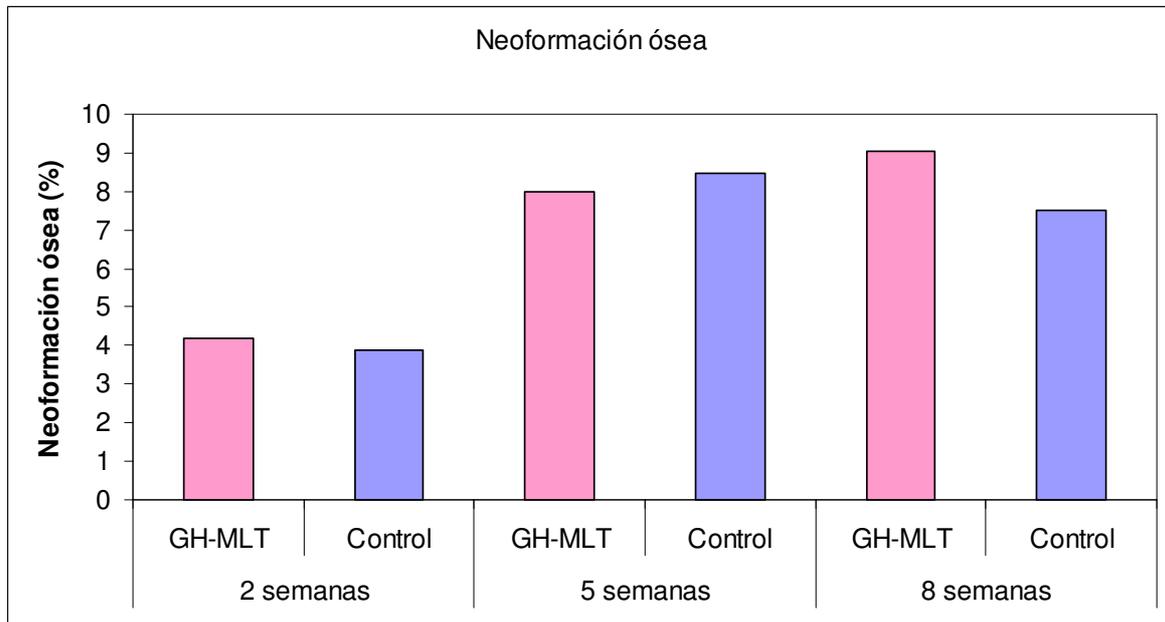


Fig. 18. Neoformación ósea a las 2, 5 y 8 semanas.

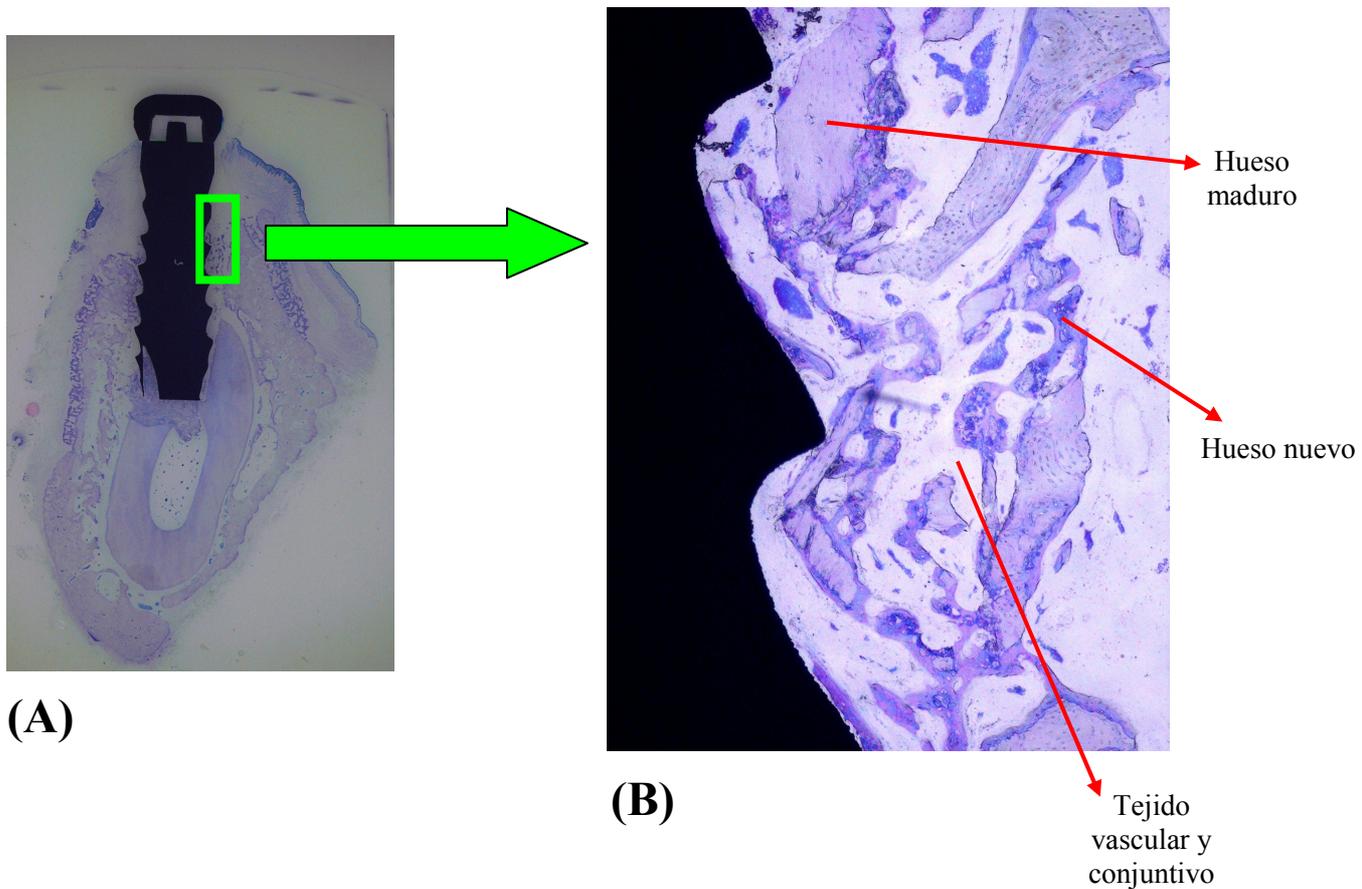


Imagen 1. Visión histométrica de una sección sagital de un implante del grupo control (A) y corte histológico a cuatro aumentos de la zona periimplantaria del mismo (B). Las zonas de color blanco corresponden a tejido vascular y conjuntivo, las de azul más oscuro a hueso nuevo, y las de azul más claro a hueso más maduro.

Esta imagen refleja los resultados obtenidos en los implantes del grupo control dos semanas después de la intervención. Podemos apreciar un bajo porcentaje de tejido óseo en contacto con el implante, y una gran cantidad de tejido vascular y conjuntivo, con poca formación de hueso, en la zona periimplantaria.

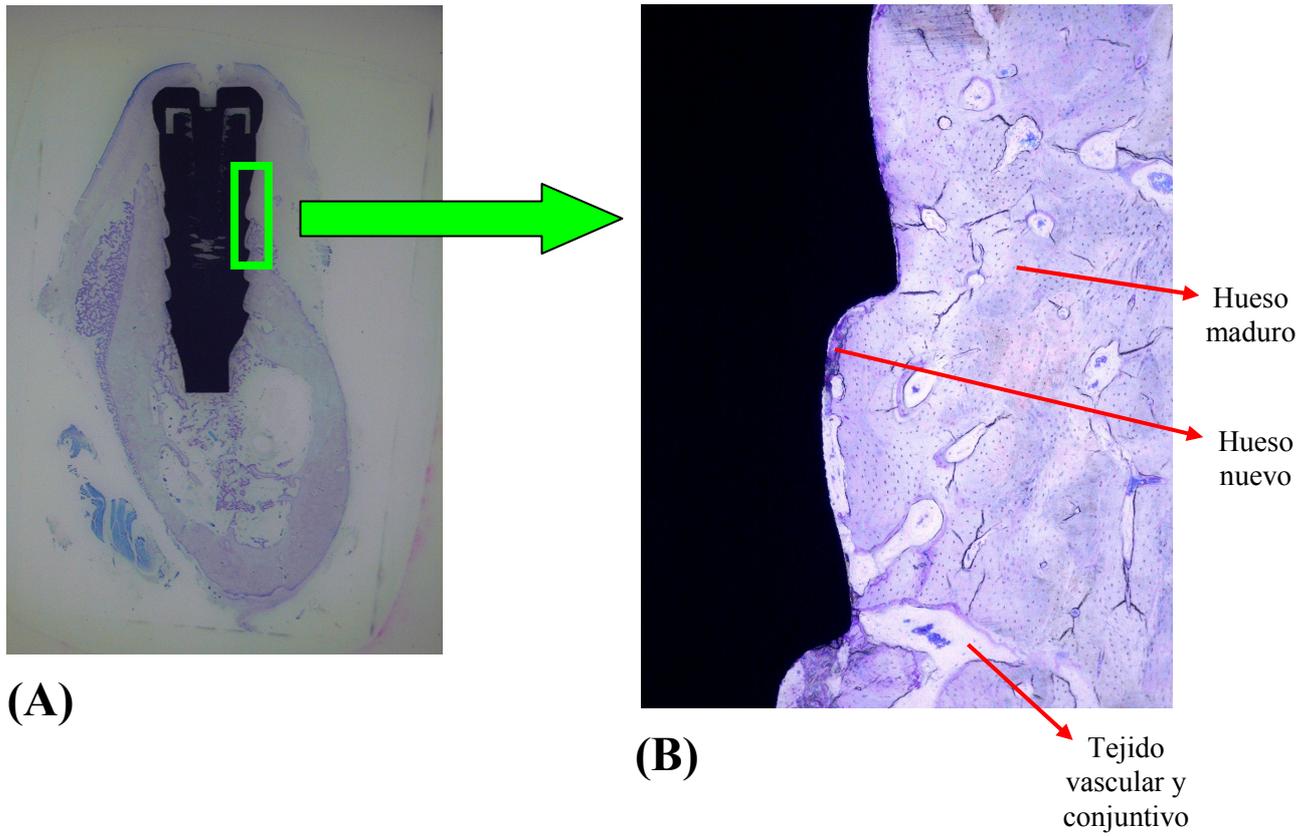


Imagen 2. Visión histométrica de una sección sagital de un implante del grupo tratado con GH/MLT (A) y corte histológico a cuatro aumentos de la zona periimplantaria del mismo (B). Podemos apreciar, en relación al grupo control, un mayor porcentaje de tejido óseo en contacto con el implante, con una mayor formación de hueso y escasa aparición de tejido vascular y conjuntivo en la zona periimplantaria.

Discusión

DISCUSIÓN

Nos propusimos evaluar la acción conjunta de la hormona del crecimiento (GH) y la melatonina (MLT) sobre el proceso de osteointegración de implantes dentales, colocados en mandíbula de perros *Beagle*, a las dos, cinco y ocho semanas de la intervención quirúrgica. Decidimos optar por el perro de esta raza por la capacidad que presenta para imitar la cresta alveolar humana, siendo su manejo más sencillo y su coste menor que los otros tres biomodelos más evolucionados en la escala filogenética (oveja, minipig y primate). Además, este modelo experimental proporciona un volumen óseo adecuado para la colocación de los implantes, similar al del humano, lo cual sería inviable en otras especies más pequeñas (rata o conejo). Todos los perros de nuestro estudio fueron macho porque las hembras podían producir alteraciones en los resultados debido a los estrógenos, ya que éstos influyen en el remodelado óseo. Los estrógenos tienen un doble efecto sobre el metabolismo óseo: por un lado favorecen la formación ósea al aumentar el número y función de los osteoblastos y por otro, disminuyen la reabsorción.

Al igual que en nuestro estudio, se ha observado en otros trabajos con perros ^(107,108), que un periodo de curación de al menos ocho semanas tras las exodoncias se hace indispensable para obtener una cresta alveolar edéntula que presente un hueso organizado y unos tejidos blandos cicatrizados y estables para colocar los implantes.

En los últimos años se están utilizando diversos compuestos para mejorar la respuesta ósea periimplantaria como factores de crecimiento (GFs) ⁽¹⁰⁹⁾, plasma rico en plaquetas (PRP) ⁽¹¹⁰⁾ y proteínas morfogenéticas (BMPs) ⁽¹¹¹⁾. La GH y la MLT forman parte de este grupo de sustancias que tienen un papel importante en la neoformación y remodelación ósea.

Las BMPs son capaces de conseguir la transformación de tejido conjuntivo en tejido óseo, por lo que se consideran osteoinductivas. Asimismo, son capaces de estimular la diferenciación de células pluripotenciales hacia

diferentes líneas celulares (tejido adiposo, cartílago y hueso). Son muy abundantes en el tejido óseo y durante la embriogénesis participan en la formación de hueso y cartílago. Actualmente se las considera como los factores más potentes de la diferenciación osteoblástica ⁽⁶⁾. Canalis *et al.* ⁽³³⁾ creen que además de estimular la osteogénesis inhiben la osteoclastogénesis.

La GH estimula la producción de colágeno y proteínas no colágenas por los osteoblastos; y, además, al estimular la síntesis de los factores de crecimiento semejantes a la insulina (IGFs) por el hígado y los propios osteoblastos, favorece la diferenciación de los preosteoblastos y la proliferación de osteoblastos ⁽³⁴⁾. En los años 80, la hipótesis de la somatomedina, que decía que la GH estimula la producción, a nivel del hígado, de somatomedina, y ésta, a su vez, estimula el crecimiento longitudinal óseo de manera endocrina, fue cuestionada por un estudio [Isaksson *et al.* 1982] ⁽¹¹²⁾, demostrando que inyectando GH directamente en la tibia de ratas, se producía crecimiento longitudinal óseo en el sitio de la inyección. Esto demuestra que la GH regula y estimula el crecimiento óseo, actuando sobre las células óseas, tanto de manera directa, como indirecta (vía IGF-I).

La MLT se puede sintetizar a elevadas concentraciones en la médula ósea. En este sentido, Tan y cols. ⁽⁷⁶⁾ detectaron concentraciones muy altas de MLT en médula ósea, alrededor de 100 veces más que en suero. Haldar y cols.⁽¹¹³⁾ han descrito efectos de la MLT sobre precursores de células óseas en médula ósea de ratas. Adicionalmente, se sabe también que la indolamina es un importante modulador del metabolismo del calcio, y es capaz de prevenir ciertas situaciones de osteoporosis e hipocalcemia, probablemente debido a su interacción con otros factores de regulación óseos como la parathormona, calcitonina o prostaglandinas ^(114,115).

Las acciones de la MLT sobre el tejido óseo, que avalan y dan coherencia a nuestros resultados, son ejercidas a diferentes niveles:

- A nivel de la formación ósea, estimulando la proliferación y diferenciación osteoblástica, y aumentando la expresión génica

de diversas proteínas de la matriz osteoide (sialoproteína ósea, fosfatasa alcalina, osteocalcina).

- A nivel de la reabsorción ósea, contribuyendo a disminuir la degradación de la matriz gracias a su capacidad antioxidante y depuradora de radicales libres, e inhibiendo por otra parte el proceso de osteoclastogénesis.

La relación entre GH, MLT y metabolismo óseo ha sido puesta de manifiesto por numerosos estudios ^(92,93,94,95). Según algunos autores, tanto la GH como la MLT actuarían a nivel óseo como factores de crecimiento locales, con efectos paracrinos sobre las células contiguas ^(116,117,118).

La administración de GH se ha usado para incrementar la masa ósea y favorecer los procesos de reparación de fracturas de tibia en ratas ^(119,58). Asimismo, se han investigado los efectos estimuladores de la GH aplicada localmente sobre la formación de hueso en mandíbulas de rata ⁽¹²⁰⁾, usando una matriz de fosfato/calcio ⁽¹²¹⁾ y alrededor de láminas de titanio en tibias de conejo osteoporótico ⁽³⁴⁾.

Se ha demostrado que la MLT administrada de forma oral modifica la remodelación ósea después de la ovariectomía en ratas ⁽¹²²⁾, incrementando la densidad mineral del hueso. Este efecto se produce al liberarse GH y cortisol estimulado por la MLT o por la supresión de la reabsorción ósea, inhibiendo la osteoclastogénesis, bloqueando la unión RANK/RANKL ⁽¹²³⁾. Este efecto se acentúa más a concentraciones adecuadas de estradiol ⁽¹²²⁾.

Por otra parte, varios estudios han demostrado que la GH y la MLT por separado pueden estimular la diferenciación de osteoblastos primarios o preosteoblastos *in vitro*, así como la síntesis de colágeno tipo I y otras proteínas de la matriz ósea, tales como la sialoproteína (BSP), la fosfatasa alcalina (ALP), la osteopontina (OP) y la osteocalcina (OC) ^(54,92,93) y la producción de IGF-I (*Type I Insulin-like Growth Factor*), que estimula a los osteoblastos y el remodelado óseo ⁽¹²⁴⁾.

Es un hecho que los osteoclastos generan niveles altos de aniones superóxido durante la reabsorción ósea que contribuye al proceso degenerativo. Se ha demostrado que la administración de GH y MLT estimula varias enzimas antioxidativas que reducen el stress oxidativo y mejora las defensas antioxidantes ^(94,125). Por consiguiente, el efecto de ambas sustancias en la prevención de la actividad osteoclástica en el hueso, puede depender en parte de sus propiedades depuradoras de radicales libres.

En nuestro estudio, se han analizado los efectos de la administración local de GH y MLT en la osteointegración de implantes dentales. Hemos hecho conjeturas sobre el hecho de que ambas sustancias trabajaran sinérgicamente para incrementar la ratio de aposición ósea alrededor de los implantes dentales y para acelerar la cicatrización del hueso.

Los datos obtenidos en nuestro estudio, relacionados con la administración local de GH-MLT, han mostrado diferencias histomorfométricas extremadamente significativas entre los implantes tratados y los implantes control dos semanas después de la colocación de los implantes. La GH-MLT tópicas incrementaron de forma significativa los parámetros de osteointegración: BCP (porcentaje de contacto óseo), hueso periimplantario total y hueso interrosca. De forma general, podemos decir que a los catorce días existe una mayor densidad ósea en los implantes tratados en relación a los control. La mayor cantidad de tejido óseo en contacto directo con los implantes (BCP) que recibieron tratamiento, sería reflejo de una mayor síntesis de matriz ósea en la zona periimplantaria, bien por un aumento en el número o en la actividad de células osteoblásticas, bien por una inhibición en la actividad osteoclástica (este último efecto sería causa de las propiedades de la MLT) a este nivel. En efecto, una importante acción de la GH ⁽¹²⁶⁾/MLT a nivel óseo se centra sobre las células formadoras de hueso. En este sentido, distintos estudios señalan que la MLT estimula la proliferación y diferenciación de osteoblastos humanos *in vitro*, así como la síntesis de colágeno tipo I y otras proteínas de la matriz ósea ^(92,93,127). Nakade y cols. observaron como la MLT, a concentraciones micromolares, aumentó la proliferación de células óseas humanas obtenidas de muestras mandibulares (HOB-M cells), y de una línea celular osteoblástica

humana (SV-HFO), y lo hizo de una forma dosis-dependiente, con un máximo efecto a 50 μM de concentración ⁽⁹²⁾. Roth y cols. observaron que la MLT estimulaba la diferenciación de líneas preosteoblásticas, de forma que las células tratadas con MLT maduraron a osteoblastos en un plazo de 12 días, frente a los 21 días de los preosteoblastos del grupo control ⁽⁹³⁾. En nuestro trabajo, el aumento en la proliferación de los osteoblastos llevado a cabo por la MLT, se traduciría en un mayor número de estas células a nivel periimplantario, y la temprana diferenciación celular aceleraría notablemente la síntesis y mineralización del osteoide. Todo ello originaría una mayor cantidad de matriz ósea mineralizada alrededor de los implantes con MLT; de ahí el aumento tan significativo a las dos semanas en el BCP y hueso periimplantario total.

El hueso de la zona periimplantaria está sometido a un intenso proceso de remodelado tras la colocación del implante, por lo que gran parte de este hueso se encuentra en una fase más avanzada en su formación, en forma de matriz ósea ya mineralizada, mientras que existirá también hueso periimplantario en fase de osteoide aún no mineralizado ^(41,128). Por tanto, el proceso de osteointegración incluye también, además de la remodelación del hueso ya existente, la formación de hueso nuevo alrededor del implante y en la zona interrosca ^(129,130).

En relación al mayor porcentaje de hueso periimplantario que se ha observado en el hueso tratado con GH/MLT, nuestros datos podrían interpretarse como un efecto directo de la GH sobre las células progenitoras mesenquimales, que estimularían líneas de osteoblastos y condroblastos. Este hecho vendría reforzado al haberse demostrado la presencia de receptores para la GH en osteoblastos ⁽¹²⁶⁾, fibroblastos ^(131,132) y condroblastos ^(133,134), así como los osteoclastos ⁽¹³⁵⁾, condroclastos ⁽¹³⁶⁾, macrófagos ⁽¹³⁵⁾, cementoblastos y odontoblastos ⁽⁵⁸⁾.

Por tanto, la GH contribuye a aumentar la reacción ósea periimplantaria. En este sentido, coincidimos con los datos obtenidos por Tresguerres *et al.* ⁽³⁴⁾, en un trabajo realizado en tibia de conejos a los que se indujo osteoporosis, y con Mori *et al.* ⁽¹³⁷⁾ en los que la osteointegración fue posible en animales

osteoporóticos a los que se aplicó GH de forma local. El aumento en la proliferación de los osteoblastos llevado a cabo por la GH, se traduciría en un mayor número de estas células a nivel periimplantario, y la temprana diferenciación celular aceleraría notablemente la síntesis y mineralización de la matriz osteoide. Todo ello originaría una mayor cantidad de matriz ósea mineralizada alrededor de los implantes; de ahí el aumento a las dos semanas en el BCP y hueso periimplantario total. La administración local de GH durante el procedimiento quirúrgico puede producir un efecto estimulador sobre el número y función de condroblastos y osteoblastos en las primeras etapas del proceso de reparación ósea, que se podría denominar “efecto impulsor”. La GH puede ejercer un efecto positivo sobre la mineralización incluso en las más bajas condiciones de calcio ^(138,139). La GH no sólo aumenta la absorción de calcio en el tubo digestivo ⁽¹⁴⁰⁾, sino que también podría estimular la biodisponibilidad del calcio local al incrementar la mineralización del nuevo tejido osteoide formado. La MLT contribuiría notablemente a la neoformación ósea alrededor de los implantes al estimular la diferenciación de nuevos preosteoblastos, que llegan desde la médula ósea al lecho alveolar a través de los vasos sanguíneos. Otra acción de la MLT a nivel preosteoblástico, que contribuiría a aumentar la formación de nuevo tejido óseo, es la estimulación de la expresión génica de ciertas proteínas de la matriz ósea ⁽¹²⁷⁾. Roth y cols. observaron como la MLT estimulaba, tras un periodo de tiempo de cinco a nueve días, la expresión de los genes de la sialoproteína ósea, fosfatasa alcalina y osteocalcina ⁽⁹³⁾. Dado que el hueso periimplantario está sometido a un proceso de remodelado tras la colocación del implante, si la MLT estimulara la formación de tejido óseo por un lado, pero por otro éste se reabsorbiera durante dicho proceso, el aumento en los parámetros de osteointegración probablemente no habría sido tan notable en tan corto periodo de tiempo (dos semanas). Este incremento tan rápido en la formación de hueso sugiere que la MLT estaría actuando simultáneamente a distintos niveles dentro del proceso de remodelado óseo. Para explicar este hecho hemos de considerar las acciones de esta indolamina a nivel de la reabsorción ósea.

Se sabe que los osteoclastos, células multinucleadas encargadas de la reabsorción ósea, poseen superóxido dismutasa (SOD) y son responsables de la

producción de especies reactivas del oxígeno (ROS) en el microambiente óseo, lo que contribuiría a la degradación de componentes de la matriz ósea bajo el borde en cepillo, ya que las moléculas estructurales de la matriz como el colágeno o el ácido hialurónico son susceptibles al daño oxidativo por radicales libres ^(141,142). La MLT actuaría a nivel de la laguna osteoclástica, gracias a su capacidad antioxidante y depuradora de especies reactivas, inhibiendo la reabsorción ósea ^(94,117). Además, por cuidadosa que sea la técnica quirúrgica de colocación de implantes, se produce una zona de necrosis ósea alrededor de éste y existe una reacción inflamatoria como consecuencia directa del acto quirúrgico ^(41,143). Los macrófagos y leucocitos procedentes de los vasos periimplantarios aumentarían la producción de radicales libres ^(143,144), los cuales pueden estimular la reabsorción ósea por parte de los osteoclastos ^(145,146). Las propiedades antioxidante y antiinflamatoria de la MLT contribuirían a atenuar esta reacción y a frenar la producción de especies reactivas y, por tanto, la reabsorción ósea tras la intervención implantológica.

Esta inhibición en la reabsorción ósea se vería reforzada por otra acción que ejerce la MLT sobre el proceso de osteoclastogénesis. Según distintos autores, la aplicación de la indolamina en rangos de 5 a 500 μM disminuye de manera dosis-dependiente la expresión de ARNm de RANK y aumenta tanto los niveles de OPG como de ARNm de OPG en líneas celulares preosteoblásticas MC3T3-E₁ ⁽⁹⁵⁾. Esto implicaría que la MLT, a dosis farmacológicas, puede causar una inhibición de la reabsorción ósea y un incremento en la masa ósea por inhibición de la activación osteoclástica mediada por RANK ⁽⁹⁴⁾.

Estos resultados concuerdan con los datos de los estudios hechos por Treguerres *et al.* ^(34,147) después de la administración local de GH alrededor de implantes o láminas de titanio insertadas en tibia de conejos con y sin osteoporosis, pero sólo en relación con valores de BCP. Observaron una respuesta mayor de hueso periostal y endostal, pero sólo una tendencia. En nuestros resultados, las diferencias en densidad ósea fueron significativas. Cutando *et al.* ⁽¹⁴⁸⁾ detectaron también diferencias relacionadas con el BCP y la densidad ósea en implantes tratados de forma tópica con MLT a las dos semanas.

En cuanto a las diferencias histométricas a las 5 y 8 semanas después de la colocación del implante, nuestros resultados concuerdan con los de Tresguerres *et al.* ⁽¹⁴⁷⁾, los cuales mostraban diferencias entre el tratamiento con GH y el control a las 6 semanas en el BCP. Sin embargo, Tresguerres usó conejos jóvenes, que quizás no constituyan el mejor modelo experimental (como argumentó el propio autor). Las diferencias pueden deberse a las diferencias entre el metabolismo de los perros y el de los conejos.

De todos modos, la vida media de la MLT ⁽¹⁴⁹⁾ y GH ⁽¹⁵⁰⁾ circulantes es de 23 y 20 minutos respectivamente, y a las 5 semanas el proceso de remodelación del hueso alrededor de un implante dental en la mandíbula de un perro está cercano a la cicatrización. Nos parece interesante liberarlo gradualmente e incrementar la vida media en la interfase implante-hueso.

En trabajos anteriores de nuestro grupo de investigación, que siguieron la misma metodología, se obtuvieron incrementos en la osteointegración a las dos semanas usando de forma separada GH y MLT en comparación a los grupos control, concluyendo que ambas moléculas tienen efectos similares sobre la osteogénesis.

Estos hallazgos sugieren claramente que estas dos moléculas tienen el potencial de favorecer la osteointegración, principalmente en los estadios iniciales del proceso. La GH podría actuar sinérgicamente con la MLT en la inducción de la formación ósea. Aunque los papeles exactos de estas moléculas durante la osteogénesis no se comprenden bien, es probable que la GH y la MLT funcionen a través de mecanismos relacionados pero, por separado, cada una desempeña un papel importante y diferente. Los efectos estimulantes de estas dos moléculas no son idénticos. Se cree que la GH controla la proliferación de células osteoprogenitoras mientras que la MLT es más importante en la diferenciación osteoblástica y en la inhibición osteoclástica.

El interés de las acciones de estas dos moléculas sobre el tejido óseo a nivel de la cavidad oral radica en la posibilidad de su aplicación en el acto de

colocación de implantes dentales endoóseos, como agente biomimético ⁽¹⁵¹⁾, de modo que pueda mejorar la predictibilidad de los mismos y las condiciones tisulares iniciales del tejido receptor del implante.

De esta forma, nuestro trabajo se enmarca dentro de las actuales investigaciones y tendencias en el campo de la implantología oral, dirigidas hacia la búsqueda de nuevas moléculas y tratamientos de superficie que influyan sobre el metabolismo óseo, y consigan reducir de esta forma el período de osteointegración y carga de los implantes ^(152,147).

En cualquier caso, las posibilidades terapéuticas derivadas de las acciones de la terapia GH-MLT a nivel óseo en la cavidad oral no sólo serían aplicables en el campo de la implantología, sino también en otros procesos como la enfermedad periodontal, que cursa con una progresiva pérdida ósea en sus fases más avanzadas. Además, estudios recientes han relacionado la enfermedad periodontal con alteraciones en el complejo OPG/RANK/RANKL. Liu *et al.* ⁽¹⁵³⁾ han demostrado que el ratio RANKL con respecto a OPG está incrementado a favor del primero en pacientes con periodontitis, encontrándose valores de ARNm de RANKL muy elevados en pacientes con enfermedad periodontal avanzada, a la vez que la expresión del ARNm de OPG está muy disminuida con respecto a sujetos sanos. De esta forma, la inhibición en el proceso de osteoclastogénesis ejercida por la MLT podría complementar su acción antioxidante a nivel periodontal.

En definitiva, los resultados presentados en este trabajo de investigación sitúan a la GH y MLT como potenciales agentes terapéuticos a nivel odontológico, debido a las propiedades osteogénica y antioxidante que sinérgicamente ejercen en la cavidad oral, acciones constatadas en el resto del organismo ^(35,56,154,155,156,75,117).

Conclusiones

CONCLUSIONES

De los resultados obtenidos en nuestro estudio se deducen las siguientes conclusiones:

1. La administración conjunta de hormona del crecimiento y melatonina tópica aumenta significativamente la osteointegración de implantes dentales a las dos, cinco y ocho semanas de su colocación en perros *Beagle*.
2. La aplicación tópica de hormona del crecimiento y melatonina actúa sinérgicamente, como agente biomimético, en la colocación de implantes dentales endoóseos, de forma que reduce los períodos de osteointegración y carga de los mismos.
3. La hormona del crecimiento y la melatonina se pueden considerar como potenciales agentes terapéuticos a nivel odontológico debido a la propiedad osteogénica que tienen dentro de la cavidad oral, acción ya constatada en el resto del organismo, ejerciendo un efecto beneficioso no sólo en implantología, sino también en periodoncia.

Bibliografía

BIBLIOGRAFÍA

- 1.** Anitua E. Introducción a la biología ósea. En: Anitua E, editor. Un nuevo enfoque en la regeneración ósea. Plasma rico en factores de crecimiento. Vitoria: Puesta al día publicaciones, S.L. ; 2000. 17-31.
- 2.** Prieto S. Fisiología del hueso. En: Tresguerres J.A.F, editor. Fisiología humana. 3ª edición. Madrid: McGraw-Hill; 2005. 981-994.
- 3.** Arnett, TR. Estructura y remodelado del hueso. En: J. A. Riancho Moral and J. Gonzales Macías, editors. Manual Práctico de Osteoporosis y Enfermedades del Metabolismo Mineral. Madrid: Jarpyo Editores; 2004. 1-6.
- 4.** Gehron Robey P. Bone matrix proteoglycans and glycoproteins. In: Bilezikian JP, Raisz LG and Rodan GA, editors. Principles of bone biology. 2º edition. Volume 1. San Diego, California: Academic Press; 2002. p. 225-238.
- 5.** Anderson, H.C. Mechanism of mineral formation in bone. Lab invest 1989; 60: 320-330.
- 6.** Yamaguchi A, Komori T, Suda T. Regulation of osteoblast differentiation mediated by bone morphogenetic proteins, hedgehogs, and Cbfa1. Endocr Rev 2000; 21(4):393-411.
- 7.** Otto F, Thornell AP, Crompton T, Denzel A, Gilmour KC, Rosewell IR et al. Cbfa1, a candidate gene for cleidocranial dysplasia syndrome, is essential for osteoblast differentiation and bone development. Cell 1997; 89:765-71.
- 8.** McCarthy TL, Ji C, Centrella M. Links among growth factors, hormones, and nuclear factors with essential roles in bone formation. Crit Rev Oral Biol Med 2000; 11(4):409-22.
- 9.** Grzesik, W. J. y Robey, P.G. Bone matrix RGD glycoproteins: immunolocalization and interaction with human primary osteoblastic bone cells in vitro. J Bone Miner Res 1994; 9: 487-496.
- 10.** Lean JM, Mackay AG, Chow JW, Chambers TJ. Osteocytic expression of mRNA for c-fos and IGF-I: an immediate early gene response to an osteogenic stimulus. Am J Physiol 1996; 270(6):937-45.
- 11.** Nijweide, P.J. y cols. Cells of bone: proliferation, differentiation and hormonal regulation. Physiol Rev 1986; 66: 855-886.

- 12.** Prieto S. Control del metabolismo del calcio, fósforo y magnesio. En: Tresguerres JAF, editor. Fisiología Humana. 2ª edición. Madrid: McGraw-Hill-Interamericana; 1999. p. 979-993.
- 13.** Rodman, G. D. Advances in bone biology: the osteoclast. *Endocr Rev* 1996; 17: 308-332.
- 14.** Takahashi N, Udagawa N, Takami M, Suda T. Cells of bone: osteoclast generation. In: Bilezikian JP, Raisz LG and Rodan GA, editors. Principles of bone biology. 2º edition. Volume 1. San Diego, California: Academic Press; 2002. p. 109-126.
- 15.** Väänänen K, Zhao H. Osteoclast function: biology and mechanisms. In: Bilezikian JP, Raisz LG and Rodan GA, editors. Principles of bone biology. 2º edition. Volume 1. San Diego, California: Academic Press; 2002. p. 127-140.
- 16.** Teitelbaum SL. Bone resorption by osteoclasts. *Science* 2000; 289(5484):1504-8.
- 17.** Khosla S. The OPG/RANKL/RANK system. *Endocrinology* 2001; 142: 5050-5055.
- 18.** Lawrence G, Raisz MD, Gideon A, Roldan. Pathogenesis of osteoporosis. *Endocrinol Metab Clin N Am* 2003; 32: 15-24.
- 19.** Riggs BL, Sundeeep K, Melton III J. Sex steroids and the construction and conservation of the adult skeleton. *Endocr Rev* 2002; 23: 279-302.
- 20.** Genuth S. Sistema endocrino: Regulación endocrina del metabolismo del calcio y del fosfato. En: Berne R.M and Levy M.N, editores. Fisiología. 3ª edición. Madrid: Hacourt; 2001. 519-530.
- 21.** Salo J. y cols. Removal of osteoclast bone resorption products by transeytosis. *Science* 1997; 276: 270-273.
- 22.** Riancho JA, Gutiérrez GE. Factores Reguladores de la Resorción Ósea. *Rev Metab Oseo Min* 2003; 1(2):51-66.
- 23.** Fernández-Tresguerres Hernández-Gil I, Alobera García MA, Del Canto Pingarrón M, Blanco Jerez L. Bases fisiológicas de la regeneración ósea II. El proceso de remodelado. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 2006; 11:151-7.
- 24.** Canalis E, McCarthy TL, Centrella M. The role of growth factors in skeletal remodelling. *Endocrinol Metab Clin North Am* 1989; 18:903-18.

- 25.** Raisz LG. Bone cell biology: New approaches and unanswered questions. *J Bone Miner Res* 1993; 8:457-65.
- 26.** Hofbauer LC, Khosla S, Dunstan CR, Lacey DL, Spelsberg TC, Riggs BL. Estrogen stimulates gene expression and protein production of osteoprotegerin in human osteoblastic cells. *Endocrinology* 1999; 140:4367-70.
- 27.** Manolagas SC. Birth and death of bone cells: Basic regulatory mechanisms and implications for the pathogenesis and treatment of osteoporosis. *Endocr Rev* 2000; 21:115-37.
- 28.** Lukert BP, Kream BE. Clinical and basic aspects of glucocorticoid action in bone. En: Bilezikian JP, Raisz LG, Rodan GA, eds. *Principles of Bone Biology*. San Diego, California: Academic Press; 1996.p.533-48.
- 29.** Horowitz MC and Lorenzo JA. Local regulators of bone: IL-1, TNF, lymphotoxin, Interferon-g, IL-8, IL-10, IL-4, the LIF/IL-6 family, and additional cytokines. In: Bilezikian JP, Raisz LG and Rodan GA, editors. *Principles of bone biology*. 2^o edition. Volume 2. San Diego, California: Academic Press; 2002. p. 961-978.
- 30.** Roodman GD, Kurihara N, Ohsaki Y, Kukita A, Hosking D, Demulder A. Interleukin-6: A potential autocrine/paracrine agent in Paget's disease of bone. *J Clin Invest* 1992; 89:46-52.
- 31.** Kawaguchi H, Pilbean CC, Harrison JR, Raisz LG. The role of prostaglandins in the regulation of bone metabolism. *Clin Orthop* 1995; 313:36-46.
- 32.** Offenbacher S, Heasman PA, Collins JG. Modulation of host PGE₂ secretion as a determinant of periodontal disease expression. *J Periodontol* 1993; 64:432-44.
- 33.** Canalis E, Economides AN, Gazzerro E. Bone morphogenetic proteins, their antagonists, and the skeleton. *Endocr Rev* 2003; 24:218-35.
- 34.** Tresguerres IF, Clemente C, Donado M, Gómez-Pellico L, Blanco L, Alobera MA et al. Local administration of growth hormone enhances periimplant bone reaction in an osteoporotic rabbit model. *Clin Oral Implants Res* 2002; 13(6):631-6.
- 35.** Ohlsson C, Bengtsson BA, Isaksson OG, Andreassen TT, Slootweg MC. Growth hormone and bone. *Endocr Rev* 1998; 19(1):55-79.
- 36.** Hill PA, Reynolds JJ, Meikle MC. Osteoblasts mediate insulin-like growth factor-I and -II stimulation of osteoclasts formation and function. *Endocrinology* 1995; 136:124-31.

- 37.** Mohan S, Baylink DJ. Bone growth factors. *Clin Orthop* 1991; 263:30-48.
- 38.** Branemark PI, Zarb GA, Albrektsson T. Prótesis Tejido-Integrada. La oseointegración en la Odontología Clínica. Barcelona: Quintessence; 1999. p.11-13.
- 39.** Kasemo B, Gold J. Implant surfaces and interface processes. *Adv Dent Res.* 1999; 13-21.
- 40.** Schoeder A, Van der Zipen E, Stich H, Sutter F. The reaction of bone, connective tissue and epithelium to endosteal implants with sprayed titanium surfaces. *J Maxillofac Surg* 1981; 9:15-25.
- 41.** Peñarrocha Diago M, Oltra Moscardó MJ, Sanchís Bielsa JM. Conceptos generales de implantología. En: Peñarrocha Diago M, editor. *Implantología oral.* Barcelona: Ars Médica; 2005. p. 3-17.
- 42.** Steflík DE, Parr GR, Sisk AL, Lake FT, Hanes PJ, Berkery DJ. Osteoblast activity at the dental implant-bone interface: transmission electron microscopic and high voltage electron microscopic observations. *J Periodontol* 1994; 65:404-13.
- 43.** Puleo DA, Thomas MV. Implants surfaces. *Dent Clin North Am* 2006; 50:323-38.
- 44.** Glauser Schupbach P, Gottlow J, et al. Periimplant soft tissue barrier at experimental one-piece mini-implants with different surface topography in humans: a light-microscopic overview and histometric analysis. *Clin Implant Dent Relat Res* 2005; 7: 44-51.
- 45.** Devesa J, Esquifino A, Tresguerres J.A.F. Fisiología del sistema endocrino. En: Tresguerres JAF, editor. *Fisiología humana.* 2ª edición. Madrid: McGraw-Hill; 1999. 889-905.
- 46.** Barinaga M, Yamamoto G, Rivier C et al. Transcriptional regulation of GH gene expression by growth hormone-releasing factor. *Nature*, 1983; 306.
- 47.** Genuth S. Sistema endocrino: El hipotálamo y la glándula hipofisaria. En: Berne R.M and Levy M.N, editores. *Fisiología.* 3ª edición. Madrid: Hacourt; 2001. 533-547.
- 48.** Müller EE. Role of neurotransmitters and neuromodulators in the control of anterior pituitary hormone secretion. En: De Groot LJ, editor. *Endocrinology.* 3ª edición. Philadelphia: WB Saunders; 1995. 345-354.
- 49.** Devesa J, Lima L, y Tresguerres J.A.F. Neuroendocrine control of GH secretion. *Trends, Endocrinology Metabolism*, 1992; 3: 175-183.

- 50.** Tresguerres J.A.F. Somatomedinas. En: Moreno B and Tresguerres J.A.F, editores. Retrasos del crecimiento. Madrid: Díaz de Santos, 1996.
- 51.** Cohick WS, Clemmons DR. The insulin-like growth factors. *Ann Rev Physiol* 1993; 55:131-53.
- 52.** Langdahl B.L, Kassem M, Moller M.K. and Eriksen E.F. The effects of IGF-I and IGF-II on proliferation and differentiation of human osteoblasts and interactions with growth hormone. *Eur J Clin Invest* 1998; 28:176-183.
- 53.** Hunziker E.B, Wagner J, Zapf J. differential effects of insulin-like growth factor I and growth hormone on developmental stages of rat growth plate chondrocytes *in vivo*. *J Clin Invest* 1994; 93: 1078-1086.
- 54.** Ohlsson C, Vidal O. Effects of growth hormone and insulin-like growth factors on human osteoblasts. *Eur J Clin Invest* 1998; 28(3):184-6.
- 55.** Harris WH, Heaney RP. Effect of growth hormone on skeletal mass in adult dogs. *Nature* 1969; 223(204):403-4.
- 56.** Rudman D, Feller AG, Nagraj HS, Gergans GA, Lalitha PY, Goldberg AF, Schlenker RA, Cohn L, Rudman IW, Mattson DE. Effects of human growth hormone in men over 60 years old. *N Engl J Med* 1990; 323(1):1-6.
- 57.** Brixen K, Kassem M, Nielsen HK, Loft AG, Flyvbjerg A, Mosekilde L. Short-term treatment with growth hormone stimulates osteoblastic and osteoclastic activity in osteopenic postmenopausal women: a dose response study. *J Bone Miner Res* 1995; 10(12):1865-74.
- 58.** Bak B, Jorgensen PH, Andreassen TT. Increased mechanical strength of healing rat tibial fractures treated with biosynthetic human growth hormone. *Bone* 1990; 11:233-9.
- 59.** Andreassen TT, Jorgensen PH, Flyvbjerg A, Orskov H, Oxlund H. Growth hormone stimulates bone formation and strength of cortical bone in aged rats. *J Bone Miner Res* 1995; 10:1057-67.
- 60.** Guicheux J, Gauthier O, Aguado E, Pilet P, Couillaud S, Jegou D, Daculsi G, Heymann D. Human growth hormone locally released in bone sites by calcium-phosphate biomaterial stimulates ceramic bone substitution without systemic effects: a rabbit study. *J Bone Miner Res* 1998; 13(4):739-48.

- 61.** McCord CP, Allen FB. Evidences associating pineal gland function with alterations in pigmentation. *J Exp Zool* 1917; 23:207-24.
- 62.** Lerner AB, Case JD, Takahashi Y, Lee TH, Mori W. Isolation of melatonin, the pineal gland factor that lightens melanocytes. *J Am Chem Soc* 1958; 80:2587.
- 63.** Guerrero J, Carrillo-Vico A, Lardone P. La melatonina. *Investigación y Ciencia* 2007; 373: 30-30.
- 64.** Simonneaux V, Ribelayga C. Generation of the Melatonin Endocrine Message in mammals: a review of the complex regulation of melatonin synthesis by norepinephrine, peptides, and other pineal transmitters. *Pharmacol Rev* 2003; 55:325-95.
- 65.** Konturek SJ, Konturek PC, Brzozowski T, Bubenik GA. Role of melatonin in upper gastrointestinal tract. *J Physiol Pharmacol* 2007;58:23-52.
- 66.** Vanecek J. Melatonin binding sites. *J Neurochem* 1988; 51:1436-40.
- 67.** Cajochen C, Kräuchi K, Wirz-Justice A. Role of Melatonin in the regulation of Human Circadian Rhythms and Sleep. *J Neuroendocrinol* 2003; 15:432-7.
- 68.** Acuña-Castroviejo D, Pablos MI, Menéndez-Peláez A, Reiter RJ. Melatonin receptors in purified cell nuclei of liver. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol* 1993; 82:253-6.
- 69.** Hirose T, Smith RJ, Jetten AM. The third member of RZR/ROR orphan receptor subfamily that is highly expressed in skeletal muscle. *Biochem Biophys Res Commun* 1994; 205:1976-83.
- 70.** Carlberg C, Hooft van Huijsduijnen R, Staple J, DeLamater JF, Becker-André M. RZR_s, a novel class of retinoid related orphan receptors that function as both monomers and homodimers. *Mol Endocrinol* 1994; 8:757-70.
- 71.** Anton-Tay F, Ramirez G, Martinez I, Benitez-King G. In vitro stimulation of protein kinase C by melatonin. *Neurochem Res* 1998; 23:601-6.
- 72.** Huerto-Delgado L, Antón-Tay F, Benitez-King G. Effects of melatonin on microtubule assembly depend on hormone concentration: Role of melatonin as a calmodulin antagonist. *J Pineal Res* 1994; 17:55-62.

- 73.** Macías M, Escames G, Leon J, Coto A, Sbihi Y, Osuna A et al. Calreticulin-melatonin. An unexpected relationship. *Eur J Biochem* 2003; 270(5):832-40.
- 74.** Reiter RJ. Pineal melatonin: cell biology of its synthesis and of its physiological interactions. *Endocrine Rev* 1991; 12:151-80.
- 75.** Acuña-Castroviejo D, Escames G, Macías M, Muñoz-Hoyos A, Molina-Carvalho A, Arauzo M et al. Cell protective role of melatonin in the brain. *J Pineal Res* 1995; 19:57-63.
- 76.** Tan DX, Manchester LC, Reiter RJ, Qi WB, Zhang M, Weintraub ST et al. Identification of highly elevated levels of melatonin in bone marrow: Its origin and significance. *Biochim Biophys Acta* 1999; 1472:206-14.
- 77.** Acuña-Castroviejo D, Escames G, Carazo A, Leon J, Khaldy H, Reiter RJ. Melatonin, mitochondrial homeostasis and mitochondrial-related diseases. *Curr Topics Med Chem* 2002; 2(2):133-51.
- 78.** Ianas O, Olnescu R, Badescu I. Melatonin involvement in oxidative stress. *Rom J Endocrinol* 1991; 29:147-53.
- 79.** Tan DX, Chen LD, Poeggeler B, Manchester LC, Reiter RJ. Melatonin: A potent, endogenous hydroxyl radical scavenger. *Endocr J* 1993; 1:57-60.
- 80.** Pieri C, Marra M, Moroni F, Recchioni R, Marcheselli F. Melatonin: A peroxy radical scavenger more potent than vitamin E. *Life Sci* 1994; 55:271-6.
- 81.** Barlow-Walden LR, Reiter RJ, Abe M, Pablos MI, Menéndez-Peláez A, Chen LD et al. Melatonin stimulates brain glutathione peroxidase activity. *Neurochem Int* 1995; 26:497-502.
- 82.** Reiter RJ, Tan DX, Manchester LC, Lopez-Burillo S, Sainz RM, Mayo JC. Melatonin: detoxification of oxygen and nitrogen-based toxic reactants. *Adv Exp Med Biol* 2003; 527:539-48.
- 83.** Costa EJX, Lopes RH, Lamy-Freund MT. Permeability of pure lipid bilayers to melatonin. *J Pineal Res* 1995; 19:123-6.

- 84.** Tan DX, Reiter RJ, Manchester LC, Yan M, El-Sawi M, Sainz RM et al. Chemical and Physical Properties and Potential Mechanisms: Melatonin as a broad spectrum antioxidant and free radical scavenger. *Curr Topics Med Chem* 2002; 2:181-97.
- 85.** Poeggeler B, Saarela S, Reiter RJ, Tan DX, Chen LD, Manchester LC et al. Melatonin a highly potent endogenous radical scavenger and electron donor: New aspects of the oxidation chemistry of this indole assessed *in vitro*. *Ann N Y Acad Sci* 1994; 738:419-20.
- 86.** Pablos MI, Agapito MT, Gutierrez I, Recio JM, Reiter RJ, Barlow-Walden LR et al. Melatonin stimulates the activity of the detoxifying enzyme glutathione peroxidase in several tissues of chicks. *J Pineal Res* 1995; 19:111-5.
- 87.** Antolín A, Rodríguez C, Sáinz RM, Mayo JC, Uria H, Kotler ML et al. Neurohormone melatonin prevents cell damage: Effect on gene expression of antioxidative enzymes. *FASEB J* 1996; 10:882-90.
- 88.** Guerrero JM, Reiter RJ. Melatonin - Immune System Relationships. *Curr Topics Med Chem* 2002; 2:167-79.
- 89.** García-Maurino S, González-Haba MG, Calvo JR, Goberna R, Guerrero JM. Involvement of nuclear bindings sites for melatonin in the regulation of IL-2 and IL-6 production by human blood mononuclear cells. *J Neuroimmunol* 1998; 92:76-84.
- 90.** Lissoni P, Rovelli F, Brivio F, Brivio O, Fumagalli L. Circadian secretions of IL-2, IL-12, IL-6 and IL-10 in relation to the light/dark rhythm of the pineal hormone melatonin in healthy humans. *Nat Immun* 1998; 16:1-5.
- 91.** García-Maurino S, González-Haba MG, Calvo JR, Rafii El Idrissi M, Sánchez-Margalet V, Goberna R et al. Melatonin enhances IL-2, IL-6, and IFN-gamma production by human circulating CD4+ cells: a possible nuclear receptor-mediated mechanism involving T helper type 1 lymphocytes and monocytes. *J Immunol* 1997; 159:574-81.
- 92.** Nakade O, Koyama H, Ariji H, Yajima A, Kaku T. Melatonin stimulates proliferation and type I collagen synthesis in human bone cells *in vitro*. *J Pineal Res* 1999; 27:106-10.
- 93.** Roth JA, Kim BG, Lin WL, Cho MI. Melatonin promotes osteoblast differentiation and bone formation. *J Biol Chem* 1999; 274:22041-7.
- 94.** Cardinali DP, Ladizesky MG, Boggio V, Cutrera RA, Mautalen C. Melatonin effects on bone: experimental facts and clinical perspectives. *J Pineal Res* 2003; 34:81-7.

- 95.** Koyama H, Nakade O, Takada Y, Kaku T, Lau KH. Melatonin at pharmacologic doses increases bone mass by suppressing resorption through down-regulation of the RANKL-mediated osteoclast formation and activation. *J Bone Miner Res* 2002; 17:1219-29.
- 96.** McIntyre IM, Norman TR, Burrows GD, Armstrong SM. Melatonin rhythm in human plasma and saliva. *J Pineal Res* 1987; 4:177-83.
- 97.** Vakkuri O. Diurnal rhythm of melatonin in human saliva. *Acta Physiol Scand* 2004; 124:409-12.
- 98.** Cutando A, Gómez-Moreno G, Villalba J, Ferrera MJ, Escames G, Acuña-Castroviejo D. Relationship between salivary melatonin levels and periodontal status in diabetic patients. *J Pineal Res* 2003; 35:239-44.
- 99.** Cutando A, Gómez-Moreno G, Galindo P, Arana C, Bolaños MJ, Acuña-Castroviejo D et al. Relationship between salivary melatonin and severity of periodontal disease. *J Periodontol* 2006; 77(9):1533-8.
- 100.** Institute of Laboratory Animal Resources, Commission on Life Sciences. Guide for the care and use of laboratory animals. Washington DC: National Academy Press; 1996.
- 101.** Real Decreto 223/1988, de 14 de marzo, sobre protección de los animales utilizados para la experimentación y otros fines científicos. (Nº 7026, B.O.E. nº 67, 18 de marzo de 1988, pag. 8509-8511).
- 102.** Herrero Climent M, Herrero Climent F. Atlas de procedimientos clínicos en implantología oral. Madrid: TRP Ediciones; 1995.
- 103.** Donath K. Preparation of histologic sections by the cutting-grinding technique for hard tissue and other material not suitable to be sectioned by routine methods. Equipment and methodical performance. Norderstedt: Exakt-Kulzer-Publication; 1995.
- 104.** Baron R, Vignery A, Neff L, Silverglate A, Santa María A. Processing of undecalcified bone specimens for bone histomorphometry. In: Becker RR, editor. Bone histomorphometry: techniques and interpretation. Boca Raton, FL: CRC Press; 1993. p.13-37.
- 105.** Eriksen EF, Axelrod DW, Melsen F (eds.). Bone histomorphometry. New York: Raven Press; 1994.

- 106.** Nkenke E, Lehner B, Weinzierl K, Thams U, Neugebauer J, Steveling H et al. Bone contact, growth, and density around immediately loaded implants in the mandible of mini pigs. *Clin Oral Impl Res* 2003; 14(3):312-21.
- 107.** Block MS, Gardiner D, Almerico B, Neal C. Loaded Hydroxylapatite-coated implants and uncoated titanium-threaded implants in distracted dog alveolar ridges. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol End* 2000; 89:676-85.
- 108.** Oda T, Sawaki Y, Ueda M. Experimental alveolar ridge augmentation by distraction osteogenesis using a simple device that permits secondary implant placement. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2000; 15:95-102.
- 109.** Lynch SE, Buser D, Hernandez RA, Weber HP, Stich H, Fox CH, Williams RC. Effects of the platelet-derived growth factor/insulin-like growth factor-I combination on bone regeneration around titanium dental implants. Results of a pilot study in beagle dogs. *J Periodontol* 1991; 62(11):710-6.
- 110.** Zechner W, Tangl S, Tepper G, et al. Influence of Platelet-rich Plasma on Osseous Healing of Dental Implants: A Histologic and Histomorphometric Study in Minipigs. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2003; 18: 15–22.
- 111.** Gazzero E, Gangji V, Canalis E. Bone morphogenetic proteins induce the expresión of noggin, whic limits their activity in cultured rat osteoblast. *J Clin Invest* 1998; 102:2106-14.
- 112.** Isaksson OG, Jansson JO, Gause IA. Growth hormone stimulates longitudinal bone growth directly. *Science* 1982; 216(4551):1237-9.
- 113.** Haldar C, Haussler D, Gupta D. Effect of the pineal gland on circadian rhythmicity of colony forming units for granulocytes and macrophages (CFU-GM) from rat bone marrow cell cultures. *J Pineal Res* 1992; 12(2):79-83.
- 114.** Hakanson DO, Penny R, Berstrom WH. Calcemic responses to photic and pharmacologic manipulation of serum melatonin. *Pediatr Res* 1987; 22(4):414-6.
- 115.** Ostrowska Z, Kos-Kudla B, Nowak M, Swietochowska E, Marek B, Gorski J et al. The relationship between bone metabolism, melatonin and other hormones in sham-operated and pinealectomized rats. *Endocr Regul* 2003; 37(4):211-24.

- 116.** Harvey S, Kull KL. Growth hormone, a paracrine growth factor?. *Endocrine* 1998; 7:267-79.
- 117.** Pandi-Perumal SR, Srinivasan V, Maestroni GJ, Cardinali DP, Poeggeler B, Hardeland R. Melatonin. Nature's most versatile biological signal? *FEBS J* 2006; 273(13):2813-38.
- 118.** Conti A, Conconi S, Hertens E, Skwarlo-Sonta K. Evidence for melatonin synthesis in mouse and human bone marrow cells. *J Pineal Res* 2000; 28:193-202.
- 119.** Bak B, Andreassen TT. The effect of growth hormone on fracture healing in old rats. *Bone* 1991; 12:151-4.
- 120.** Hedner E, Linde A, Nilsson A. Systemically and locally administered growth hormone stimulates bone healing in combination with osteopromotive membranas: An experimental study in rats. *J Bone Miner Res* 1996; 11:1952-60.
- 121.** Guicheux J, Gauthier O, Aguado E, Pilet P, Couillaud S, Jegou D, Daculsi G, Heymann D. Human growth hormone locally released in bone sites by calcium-phosphate biomaterial stimulates ceramic bone substitution without systemic effects: a rabbit study. *J Bone Miner Res* 1998; 13(4):739-48.
- 122.** Ladizesky MG, Cutrera RA, Boggio V, et al. Effect of melatonin on bone metabolism in ovariectomized rats. *Life Sci* 2001; 70: 557-65.
- 123.** Satomura K, Tobiume S, Tokuyama R, et al. Melatonin at pharmacological doses enhances human osteoblastic differentiation in vitro and promotes mouse cortical bone formation in vivo. *J Pineal Res* 2007; 42: 231-39.
- 124.** Kassem M, Blum W, Ristelli J, Mosekilde L, Eriksen EF. Growth hormone stimulates proliferation and differentiation of normal human osteoblast-like cells in vitro. *Calcif Tissue Int* 1993; 52(3):222-6.
- 125.** Kireev RA, Tresguerres ACF, Castillo C, et al. Effect of exogenous administration of melatonin and growth hormone on pro-antioxidant functions of the liver in aging male rats. *J Pineal Res* 2007; 42:64-70.

- 126.** Stracke H, Schulz A, Moeller D, Rossol S, Schatz H. Effect of growth hormone on osteoblasts and demonstration of somatomedin-C/IGF I in bone organ culture. *Acta Endocrinol* 1984; 107(1):16-24.
- 127.** Radio NM, Doctor JS, Witt-Enderby PA. Melatonin enhances alkaline phosphatase activity in differentiating human adult mesenchymal stem cells grown in osteogenic medium via MT₂ melatonin receptors and the MEK/ERK (1/2) signaling cascade. *J Pineal Res* 2006; 40(4):332-42.
- 128.** Lopes Cde C, Konig Junior B. Histological findings of bone remodeling around smooth dental titanium implants inserted in rabbit's tibias. *Ann Anat* 2002; 184(4):359-62.
- 129.** Berglundh T, Abrahamsson I, Lang NP, Lindhe J. De novo alveolar bone formation adjacent to endosseous implants. *Clin Oral Impl Res* 2003; 14(3):251-62.
- 130.** Dahlin C, Sennerby L, Lekholm U, Linde A, Nyman S. Generation of new bone around titanium implants using a membrane technique: an experimental study in rabbits. *Int J Oral Maxillofac Implants* 1989; 4(1):19-25.
- 131.** Cook JJ, Haynes KM, Werther GA. Mitogenic effects of growth hormone in cultured human fibroblasts. Evidence for action via local insulin-like growth factor I production. *J Clin Invest* 1988; 81(1):206-12.
- 132.** Slootweg MC, van Buul-Offers SC, Herrmann-Erlee MP, van der Meer JM, Duursma SA. Growth hormone is mitogenic for fetal mouse osteoblasts but not for undifferentiated bone cells. *J Endocrinol* 1988;116(3):11-3.
- 133.** Maor G, Hochberg Z, von der Mark K, Heinegard D, Silbermann M. Human growth hormone enhances chondrogenesis and osteogenesis in a tissue culture system of chondroprogenitor cells. *Endocrinology* 1989; 125(3):1239-45.

- 134.** Lewinson D, Shenzer P, Hochberg Z. Growth hormone involvement in the regulation of tartrate-resistant acid phosphatase-positive cells that are active in cartilage and bone resorption. *Calcif Tissue Int* 1993; 52(3):216-21.
- 135.** Chihara K, Sugimoto T. The action of GH/IGF-I/IGFBP in osteoblasts and osteoclasts. *Hormone Res* 1997; 48:45-9.
- 136.** Zhang CZ, Young WG, Li H, Rolinson S, Waters MJ. Growth hormone regulates nucleolar organizer regions during odontogenesis in the rat. *J Oral Pathol Med* 1992; 21(9):395-400.
- 137.** Mori H, Manabe M, Kurachi Y, Nagumo M. Osseointegration of dental implants in rabbit bone with low mineral density. *J Oral Maxillofac Surg* 1997; 55(4):351-61.
- 138.** Eschen C, Andreassen TT. Growth hormone normalizes vertebral strength in ovariectomized rats. *Calcif Tissue Int* 1995; 57(5):392-6.
- 139.** Kidder LS, Schmidt IU, Evans GL, Turner RT. Effects of growth hormone and low dose estrogen on bone growth and turnover in long bones of hypophysectomized rats. *Calcif Tissue Int* 1997; 61(4):327-35.
- 140.** Chipman JJ, Zerwekh J, Nicar M, Marks J, Pak CY. Effect of growth hormone administration: reciprocal changes in serum 1 alpha,25-dihydroxyvitamin D and intestinal calcium absorption. *J Clin Endocrinol Metab* 1980; 51(2):321-4.
- 141.** Ross Garret I, Boyce BF, Oreffo RO, Bonewald L, Poser J, Mundy GR. Oxygen-derived free radicals stimulate osteoclastic bone resorption in rodent bone in vitro and in vivo. *J Clin Invest* 1990; 85:632-9.
- 142.** Fallon M, Silverton S, Smith P, Moskal T, Constantinescu C, Feldman R et al. The oxidative metabolism of isolated osteoclasts is regulated by calcitropic agents. *J Bone Miner Res* 1986; Abstr.1(Suppl.1).

- 143.** Lee MC, Yoshino F, Shoji H, Takahashi S, Todoki K, Shimada S et al. Characterization by electron spin resonance spectroscopy of reactive oxygen species generated by titanium dioxide and hydrogen peroxide. *J Dent Res* 2005; 84(2):178-82.
- 144.** Taylor GC, Waddington RJ, Moseley R, Williams KR, Embery G. Influence of titanium oxide and titanium peroxy gel on the breakdown of hyaluronan by reactive oxygen species. *Biomaterials* 1996; 17:1313-9.
- 145.** Bai XC, Lu D, Liu AL, Zhang ZM, Li XM, Zou ZP et al. Reactive Oxygen Species Stimulates Receptor Activator of NF- κ B Ligand Expression in Osteoblast. *J Biol Chem* 2005; 280(17):17497-506.
- 146.** Lee NK, Choi YG, Baik JY, Han SY, Jeong DW, Bae YS et al. A crucial role for reactive oxygen species in RANKL-induced osteoclast differentiation. *Blood* 2005; 106(3):852-9.
- 147.** Tresguerres IF, Alobera MA, Baca R, Tresguerres JAF. Histologic, morphometric, and densitometric study of peri-implant bone in rabbits with local administration of growth hormone. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2005; 20:193-202.
- 148.** Cutando A, Gómez-Moreno G, Arana C, Muñoz F, López-Peña M, Stephenson J, Reiter R. Melatonin stimulates osteointegration of dental implants. *J Pineal Res* 2008; 45: 174-179.
- 149.** Gibbs FP, Vriend J. The half-life of melatonin elimination from rat plasma. *Endocrinology* 1981; 109: 1796-1798.
- 150.** Drange MR, Melmed S. IGFs in evaluation of acromegaly. In: Roberts CT, Rosenfeld RG, eds. *The IGF System: molecular biology, physiology and clinical applications*. Totowa, NJ: Humana Press, 1999:702.

- 151.** Simon Z, Watson PA. Biomimetic dental implants - New ways to enhance osseointegration. *J Can Dent Assoc* 2002; 68:286-8.
- 152.** Tresguerres IF, Blanco L, Clemente C, Tresguerres JA. Effects of local administration of growth hormone in peri-implant bone: an experimental study with implants in rabbit tibiae. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2003; 18(6):807-11.
- 153.** Liu D, Xu JK, Figliomeni L, Huang L, Pavlos NJ, Rogers M et al. Expression of RANKL and OPG mRNA in periodontal disease: possible involvement in bone destruction. *Int J Mol Med* 2003; 11(1):17-21.
- 154.** Mosekilde L, Thomsen JS, Orhii PB, Kalu DN. Growth hormone increases vertebral and femoral bone strength in osteopenic, ovariectomized, aged rats in a dose-dependent and site-specific manner. *Bone* 1998; 23(4):343-52.
- 155.** Brixen K, Kassem M, Eriksen EF, Nielsen HK, Flyvbjerg A, Mosekilde L. Growth hormone (GH) and adult bone remodeling: the potential use of GH in treatment of osteoporosis. *J Pediatr Endocrinol* 1993; 6(1):65-71.
- 156.** Reiter RJ. Oxidative damage in the central nervous system: protection by melatonin. *Prog Neurobiol* 1998; 56:359-84.