



Universidad de Granada  
Facultad de Odontología  
Departamento de Estomatología

*Estudio histomorfométrico sobre el  
comportamiento de la melatonina en  
los procesos de osteointegración  
implantológica*

Editor: Editorial de la Universidad de Granada  
Autor: Javier Guarda Muñoz  
D.L.: GR. 2849-2008  
ISBN: 978-84-691-8346-5



*Gracias a mis familia, compañeros y amigos  
por la ayuda brindada para poder alcanzar un gran sueño y una mayor meta*



# *Certificaciones*





ugr | Universidad  
de Granada



---

**D. Antonio Cutando Soriano**, Profesor Titular de la asignatura  
Clínica Odontológica Integrada de Pacientes Especiales

**CERTIFICA:** Que el trabajo de investigación que se expone en la siguiente tesis: “*Estudio histomorfométrico sobre el comportamiento de la melatonina en los procesos de osteointegración implantológica*” ha sido realizado bajo mi dirección en el departamento de Estomatología de la Universidad de Granada por **D. Javier Guardia Muñoz** y corresponde fielmente a los resultados obtenidos.

Una vez redactada, la presente Tesis ha sido revisada por mí y doy conformidad para que pueda ser presentada y aspirar al Grado de Doctor ante el Tribunal que en su día se designe.

Y para que conste, en cumplimiento de las disposiciones vigentes, extiendo el presente en Granada a 20 de Octubre de 2008.





ugr | Universidad  
de Granada



---

**D. Gerardo Gómez Moreno**, Profesor Contratado Doctor de la asignatura Clínica Odontológica Integrada de Pacientes Especiales

**CERTIFICA:** Que el trabajo de investigación que se expone en la siguiente tesis: “*Estudio histomorfométrico sobre el comportamiento de la melatonina en los procesos de osteointegración implantológica*” ha sido realizado bajo mi dirección en el departamento de Estomatología de la Universidad de Granada por **D. Javier Guardia Muñoz** y corresponde fielmente a los resultados obtenidos.

Una vez redactada, la presente Tesis ha sido revisada por mí y doy conformidad para que pueda ser presentada y aspirar al Grado de Doctor ante el Tribunal que en su día se designe.

Y para que conste, en cumplimiento de las disposiciones vigentes, extiendo el presente en Granada a 20 de Octubre de 2008.



---

**D. Carlos Arana Molina**, Doctor en Odontología por la Universidad de Granada

**CERTIFICA:** Que el trabajo de investigación que se expone en la siguiente tesis: “*Estudio histomorfométrico sobre el comportamiento de la melatonina en los procesos de osteointegración implantológica*” ha sido realizado bajo mi dirección en el departamento de Estomatología de la Universidad de Granada por **D. Javier Guardia Muñoz** y corresponde fielmente a los resultados obtenidos.

Una vez redactada, la presente Tesis ha sido revisada por mí y doy conformidad para que pueda ser presentada y aspirar al Grado de Doctor ante el Tribunal que en su día se designe.

Y para que conste, en cumplimiento de las disposiciones vigentes, extiendo el presente en Granada a 20 de Octubre de 2008.

---



# *Publicaciones*



## Proyectos de investigación que han financiado este estudio

Esta tesis doctoral ha sido realizada gracias al Proyecto de Investigación titulado: **“Estudio del sinergismo entre Melatonina y Hormona del Crecimiento (GH) 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.: PI041610).
- Ministerio de Educación y Ciencia (Proyecto PETRI N° 95-0885 OP).
- Instituto de Salud Carlos III (Red FIS G03/137).
- Grupos de Investigación CTS-101 y CTS- 263 (Junta de Andalucía).

## Publicaciones relacionadas con esta tesis

- 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.
- Cutando A, Galindo P, Gómez-Moreno G, Arana C, Bolaños MJ, Acuña-Castroviejo D, Hom-Lay Wang. *Relationship between salivary melatonin and severity of periodontal disease*. J Periodontol 2006; 77:1533-8.
- Arana C, Cutando A, Ferrera MJ, Gómez-Moreno G, Vander Worf C, Bolaños MJ, Escames G, Acuña-Castroviejo D. *Parameters of oxidative stress in saliva from diabetic and parenteral drug addict patients*. J Oral Pathol Med 2006; 35:554-9.
- Cutando A, Arana C, Gómez-Moreno G, Carretero M, Ferrera MJ, Reiter RJ, Escames G, Acuña-Castroviejo D. *Local application of melatonin into alveolar sockets of Beagle dogs reduces tooth removal induced oxidative stress*. J Periodontol 2007; 78:576-83.
- Cutando A, Gómez-Moreno G, Arana C, Escames G, Acuña-Castroviejo D. *Melatonin reduces oxidative stress because of tooth removal*. J Pineal Res 2007; 42: 419-20.

- Cutando A, Gómez-Moreno G, Arana C, Acuña-Castroviejo D, Reiter RJ. Melatonin: *Potencial functions in the oral cavity*. J Periodontol 2007; 78: 1094-102.
- Gómez-Moreno G, Cutando A, Arana C, Galindo P, Bolaños J, Acuña-Castroviejo D, Wang HL. *Melatonin expression in the periodontal disease*. J Periodontal Res 2007; 42: 536-40.
- Cutando A, Gómez-Moreno G, Arana C, Muñoz F, López-Peña M, Stephenson J, Reiter RJ. *Melatonin stimulates osteointegration of dental implants*. J Pineal Res 2008; 45: 174-9.

# *Agradecimientos*



A todas las personas que han hecho posible la realización de esta tesis doctoral:

Al profesor *Antonio Cutando*, por permitirme formar parte de su grupo de investigación mostrándome las satisfacciones que da la investigación científica.

Al profesor *Gerardo Gómez*, por su dedicación incondicional para hacer realidad este proyecto, enseñándome lo que existe más allá de la Odontología.

A los doctores *Carlos Arana* y *Cecilia Vander Worf*, por su labor previa, porque sin duda y en gran parte, esta tesis se la debo a ellos.

A *toda mi familia*, por tantas muestras de apoyo y de ánimo; sin ellas no hubiera conseguido llegar hasta aquí.

A *Manuel Sabio, Elena García, Vanesa Gómez y Silvia Ruiz*, por todos los buenos momentos que hemos pasado juntos.

A *Rocío Mateos*, por embarcarnos juntos en este proyecto.

A *Implant Microdent System*, por el apoyo y respaldo empresarial a este proyecto

A *mis amigos y compañeros* por la ayuda que me han prestado sin recibir nada a cambio.

A todos ellos, siempre les estaré agradecido.



*Cuanto más se ensancha el campo de la ciencia, más numerosas e irrefutables  
vienen a ser las demostraciones de la existencia eterna,  
de una inteligencia creadora y omnipotente.*

**William Herschel.**



# Abreviaturas



## ABREVIATURAS EMPLEADAS

- aFMK:** N<sup>1</sup>-acetil-N<sup>2</sup>-formil-5-metoxiquinurenamina.
- ATP:** Adenosíntrifosfato.
- BCP:** Porcentaje de integración o ratio de contacto óseo.
- BMPs:** Proteínas morfogenéticas óseas.
- BPO:** Peróxido de benzoilo.
- CBF A1:** *Core-binding factor A1*.
- CPI:** Índice Periodontal Comunitario.
- GH:** Hormona de crecimiento.
- GM-CFU:** Unidades formadoras de colonias de granulocitos-macrófagos.
- GPx:** Glutation peroxidasa.
- GRd:** Glutation reductasa.
- H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>:** Peróxido de hidrógeno.
- HO•:** Radical hidroxilo.
- IFN-γ:** Interferón gamma.
- IGF:** factor de crecimiento semejante a insulina.
- IL-2:** Interleuquina 2.
- IL-6:** Interleuquina 6.
- M-CSF:** Factor estimulador de las colonias de macrófagos.
- NO•:** Óxido nítrico.
- O<sub>2</sub><sup>-•</sup>:** Anión superóxido.
- ONOO<sup>-</sup>:** Radical peroxinitrito.
- OPG:** Osteoprotegerina.
- PDGF:** Factor de crecimiento derivado de las plaquetas.
- PG:** Prostaglandinas.
- PTH:** Parathormona.
- RANK:** Receptor activador del factor nuclear κB.
- RANK-L:** Ligando de unión al receptor activador del factor nuclear κB.



# Índice



## JUSTIFICACIÓN ..... 1

## INTRODUCCIÓN ..... 5

<b>1. Melatonina</b> .....	<b>7</b>
1.1 Definición y biosíntesis .....	7
1.2 Ritmos circadianos .....	10
1.3 Antioxidante y depurador de radicales libres .....	11
1.4 Inmunomodulador .....	13
1.5 Estimulador de la formación ósea .....	14
1.6 Melatonina y cavidad oral .....	14
<b>2. Remodelado óseo y osteointegración</b> .....	<b>16</b>
2.1 Fisiología ósea .....	16
2.1.1 Osteoblastos y osteocitos .....	17
2.1.2 Osteoclastos .....	19
2.1.2.1 Mecanismo de reabsorción ósea .....	20
2.1.2.2 Radicales libres y reabsorción ósea .....	21
2.2 Remodelado óseo .....	23
2.2.1 Factores reguladores del remodelado óseo .....	23
2.2.1.1 Parathormona .....	23
2.2.1.2 Calcitonina .....	24
2.2.1.3 Calcitriol o 1,25 (OH) <sub>2</sub> vitamina D3 .....	24
2.2.1.4 Estrógenos .....	24
2.2.1.5 Glucocorticoides .....	24
2.2.1.6 Hormona del crecimiento .....	25
2.2.1.7 IGF-I y II (Insulin like growth factor I y II) .....	25
2.2.1.8 Citoquinas .....	25
2.2.1.9 Proteínas morfogenéticas óseas .....	26
2.2.1.10 Sistema OPG/RANK/RANKL .....	26
2.3 Osteointegración y biología ósea en implantología oral .....	27

## OBJETIVOS ..... 29

## MATERIAL Y MÉTODOS ..... 33

<b>1. Animales, procedimiento quirúrgico y tratamiento</b> .....	<b>35</b>
1.1 Exodoncias .....	35
1.2 Colocación de los implantes .....	37
1.3 Sacrificio y extracción de la mandíbula .....	39
<b>2. Obtención y preparación de las muestras</b> .....	<b>40</b>
2.1 Preparación histológica de las muestras .....	40
<b>3. Evaluación histológica e histomorfométrica de las muestras</b> .....	<b>43</b>
<b>4. Análisis estadístico</b> .....	<b>46</b>

## RESULTADOS ..... 47

<b>1. Resultados</b> .....	<b>49</b>
1.1 Ratio contacto hueso-implante .....	<b>51</b>
1.2 Hueso periimplantario total .....	<b>53</b>
1.3 Tejido conjuntivo periimplantario .....	<b>55</b>
1.4 Hueso interrosca .....	<b>57</b>
1.5 Tejido conjuntivo interrosca .....	<b>59</b>
1.6 Neoformación ósea .....	<b>61</b>

## DISCUSIÓN ..... 67

## CONCLUSIONES .....75

## BIBLIOGRAFÍA ..... 79

## ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

### Tablas

Tabla 1 Principales constituyentes de la matriz ósea .....	<b>17</b>
Tabla 2 Tinción de Lévai-Laczcó .....	<b>43</b>
Tabla 3 Parámetros histomorfométricos a las cinco semanas .....	<b>49</b>
Tabla 4 Parámetros histomorfométricos a las ocho semanas .....	<b>50</b>

### Figuras

Figura 1 Corte sagital del cerebro .....	<b>7</b>
Figura 2 Biosíntesis de la melatonina a partir de la serotonina .....	<b>9</b>
Figura 3 Vías nerviosas desde la retina a la glándula pineal .....	<b>11</b>
Figura 4 Mecanismo de neutralización de radicales libres .....	<b>13</b>
Figura 5 Tejido óseo .....	<b>19</b>
Figura 6 Osteoclasto .....	<b>20</b>
Figura 7 Esquema del mecanismo de reabsorción ósea .....	<b>21</b>
Figura 8. Esquema de actuación de la triada OPG/RANK/RANKL .....	<b>28</b>
Figura 9 Colocación de los implantes en los perros Beagle .....	<b>37</b>
Figura 10 Representación de los parámetros de osteointegración .....	<b>45</b>
Figura 11 Porcentaje de contacto óseo a las cinco semanas .....	<b>51</b>
Figura 12 Porcentaje de contacto óseo a las ocho semanas .....	<b>52</b>
Figura 13 Hueso periimplantario a las cinco semanas. ....	<b>53</b>
Figura 14 Hueso periimplantario total a las ocho semanas .....	<b>54</b>
Figura 15 Tejido conjuntivo periimplantario a las cinco semanas .....	<b>55</b>
Figura 16 Tejido conjuntivo periimplantario a las ocho semanas .....	<b>56</b>
Figura 17 Hueso interrosca a las cinco semanas .....	<b>57</b>
Figura 18 Hueso interrosca a las ocho semanas .....	<b>58</b>
Figura 19 Tejido conjuntivo interrosca a las cinco semanas .....	<b>59</b>

Figura 20 Tejido conjuntivo interrosca a las ocho semanas .....	60
Figura 21 Neoformación ósea a las cinco semanas .....	61
Figura 22 Neoformación ósea a las ocho semanas .....	62
Figura 23 Visión de un implante control a las cinco semanas .....	63
Figura 24 Visión de un implante control a las ocho semanas .....	64
Figura 25 Visión de un implante con melatonina a las cinco semanas .....	65
Figura 26 Visión de un implante con melatonina a las ocho semanas .....	66



# 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 melatonina sobre la superficie de los implantes 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 melatonina. Ésta molécula aporta a la implantología un avance importante en la consecución de esta meta.



# Introducción



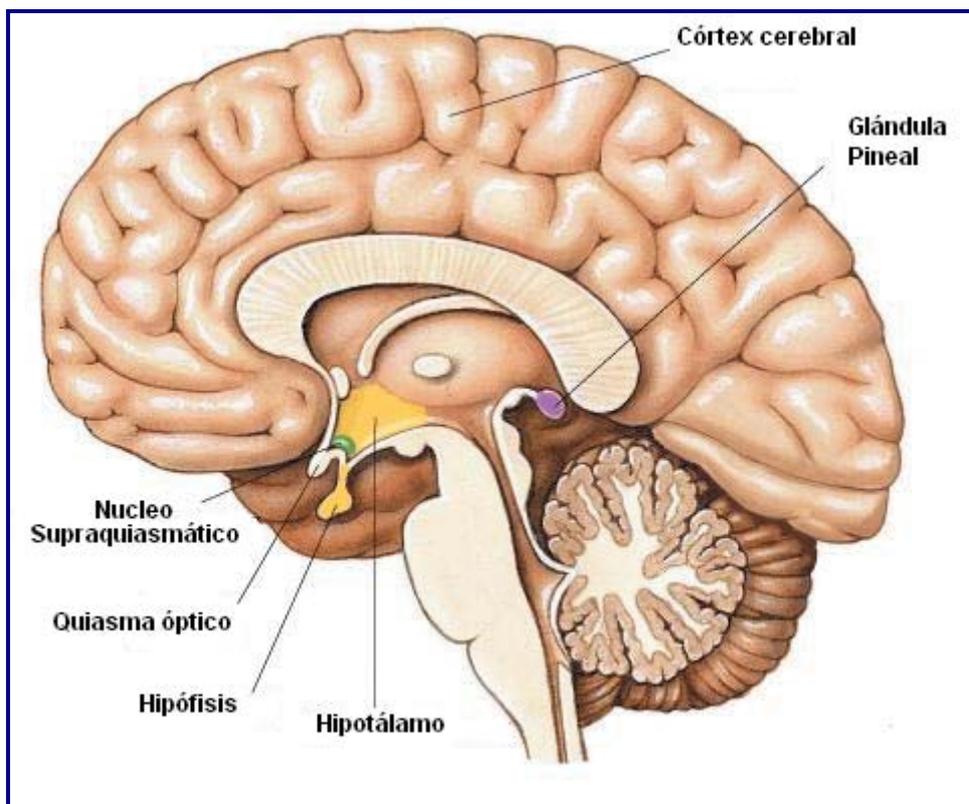
## INTRODUCCIÓN

### 1. MELATONINA

#### 1.1 Definición y biosíntesis

La melatonina es la N-acetil-5-metoxitriptamina, una hormona sintetizada y secretada por la glándula pineal, descrita inicialmente por McCord y Allen (1917)<sup>1</sup> y aislada por primera vez por Lerner y cols. (1958)<sup>2</sup>. En mamíferos, la secreción de melatonina por la glándula pineal es considerada una eferencia directa del sistema de organización circadiana del cerebro<sup>3,4</sup>

Es una molécula que tiene su origen en la glándula pineal; se trata de un órgano impar de un peso aproximado de 120 mg 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 (**Figura 1**).



**Figura 1.** 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.

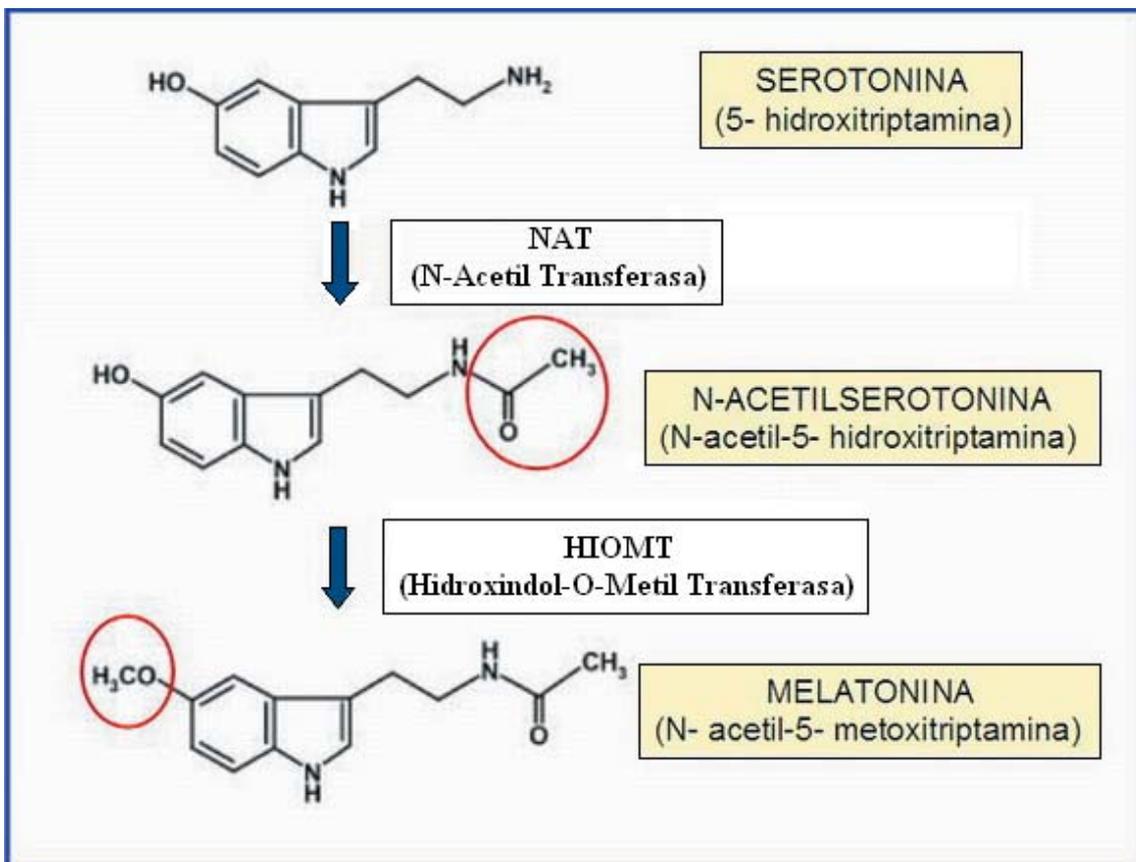
Es el en siglo XIX cuando se aborda la glándula pineal desde diferentes frentes: anatómico, histológico y embriológico; y se mostró su semejanza con la epífisis de vertebrados inferiores. En el siglo XX, Heubner relacionó la glándula pineal con la reproducción, pero es en 1943, cuando Bargman sugirió 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 hecho 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 hamster, 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 <sup>5</sup>.

Las células encargadas de sintetizar la melatonina son los pinealocitos, siendo éstas las células parenquimales de la glándula pineal. Son células que 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. 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<sup>6</sup>.

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<sup>7</sup> (Figura 2).



**Figura 2. 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<sup>8,9</sup>. 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<sup>10,11</sup> y células del sistema nervioso central<sup>12</sup>. Se ha demostrado también la capacidad de la melatonina para unirse a proteínas citosólicas como la proteína quinasa C<sup>13</sup>, la calmodulina<sup>14</sup> y la calreticulina<sup>15</sup>, probablemente, también a la quinona-reductasa-2<sup>16</sup> modulando a través de esta interacción las acciones intracelulares del calcio y la dinámica de determinados receptores nucleares, respectivamente.

Según todos estos datos, hoy 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:

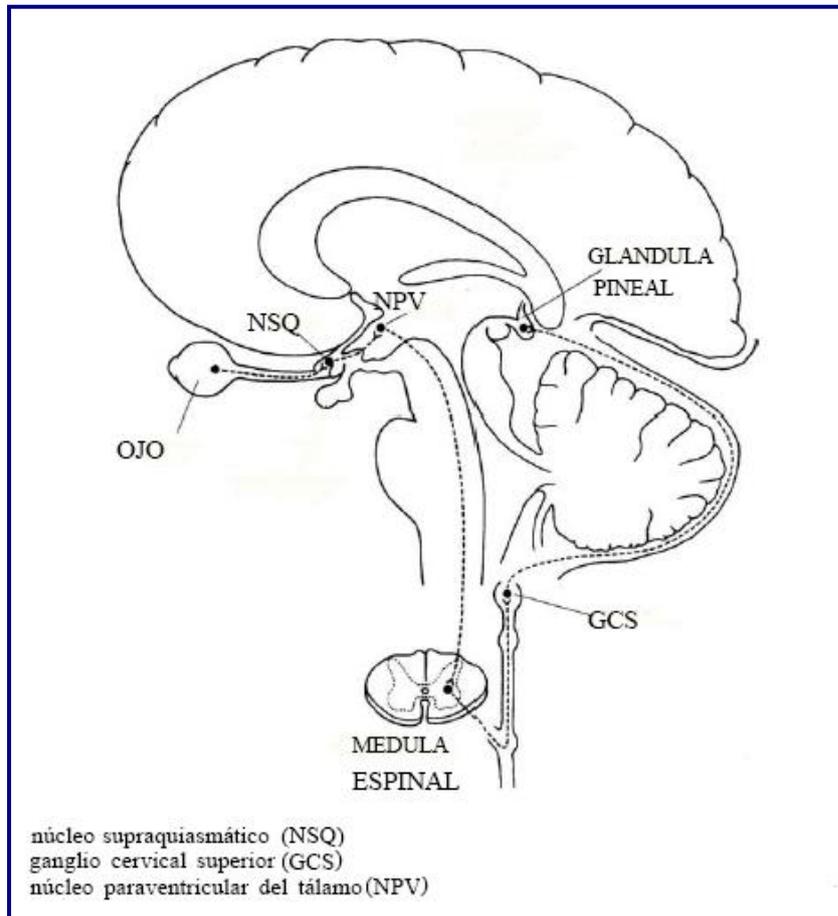
1. No se sintetiza en un órgano específico. Se sabe que las enzimas requeridas para la biosíntesis de la melatonina se encuentran en otros tejidos además de la pineal, y se sabe que diversos de estos tejidos, entre los cuales están la retina, el timo, el bazo, los linfocitos B, el ovario, el testículo 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<sup>17</sup>.
2. No actúa en un órgano diana específico. La melatonina alcanza todos los tejidos de la economía<sup>18,19</sup> 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<sup>10,20</sup>.

## **1.2 Ritmos circadianos**

La melatonina es un mensajero hormonal del núcleo supraquiasmático y regulador de la actividad de este núcleo. Una vez sintetizada, se secreta a la sangre y pasa a diversos fluidos corporales como el líquido cefalorraquídeo, ya que al ser una molécula lipofílica atraviesa la barrera hematoencefálica.

La síntesis de melatonina en la glándula pineal se produce de manera circadiana y no se almacena, sino que se libera en cuanto se sintetiza<sup>21</sup>, lo que hace que los niveles de melatonina circulantes varíen con un periodo circadiano y sean más altos durante el periodo de oscuridad. Esta producción circadiana de melatonina es el resultado de la llegada de información nerviosa a la glándula pineal desde el núcleo supraquiasmático. Este último núcleo proyecta al núcleo paraventricular, que a su vez proyecta directamente a las neuronas de la columna intermedia de la médula espinal. Éstas neuronas preganglionares inervan al ganglio cervical superior, que

inerva a la glándula pineal<sup>22</sup> (**Figura 3**). Por la noche, las neuronas postganglionares del ganglio cervical superior estimulan la síntesis de melatonina en la glándula pineal. La melatonina se libera durante la noche a través de la activación postsináptica de receptores  $\beta$ -adrenérgicos. Esto es así, ya que la luz evita la activación adrenérgica de la glándula pineal, produciéndose una inhibición en la síntesis de melatonina.



**Figura 3.** Vías nerviosas desde la retina a la glándula pineal.

### 1.3 Antioxidante y depurador de radicales libres

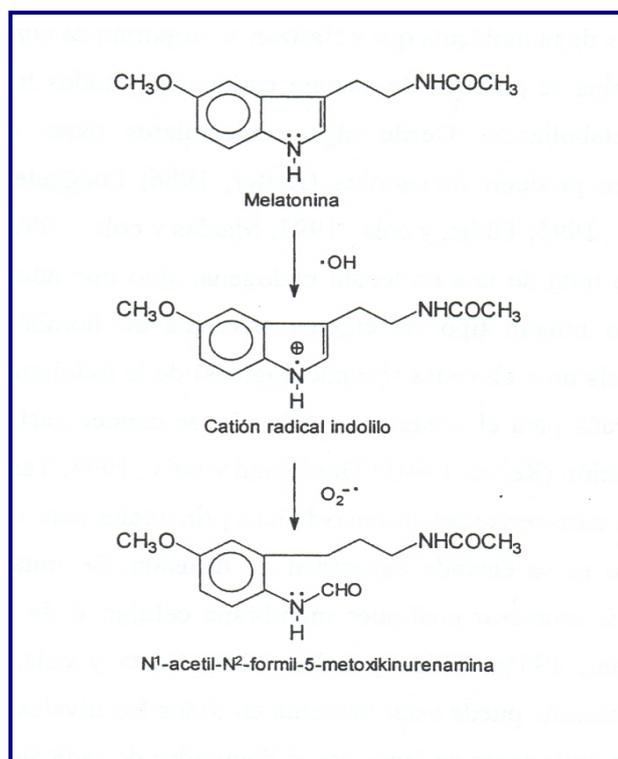
Se ha demostrado que la melatonina tiene propiedades antioxidantes. Esta característica, descrita inicialmente por Iltis y colaboradores<sup>23</sup>, ha sido posteriormente confirmada por numerosos estudios utilizando diferentes modelos experimentales. La melatonina tiene la capacidad de eliminar, depurar o neutralizar radicales libres, principalmente el radical hidroxilo ( $\text{HO}\cdot$ )<sup>24</sup>, pero también radicales peroxilo ( $\text{ROO}\cdot$ )<sup>25</sup>, peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ )<sup>26</sup>, óxido nítrico ( $\text{NO}\cdot$ ) y peroxinitritos ( $\text{ONOO}^-$ )<sup>27</sup>.

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<sup>28</sup>. 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<sup>29</sup>.

El mecanismo por el cual la melatonina puede neutralizar ROS 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*<sup>30</sup>. Éste interacciona entonces con un radical anión superóxido, precursor del HO•, para generar el metabolito no enzimático de la melatonina, la N<sup>1</sup>-acetil-N<sup>2</sup>-formil-5-metoxiquinurenamina (aFMK), que se elimina en la orina (**Figura 4**). 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.

Esta acción directa como neutralizador de radicales libres se complementa con un efecto estimulante de la actividad de algunas enzimas antioxidantes de la célula<sup>31</sup>, y de inducción de la expresión de estas enzimas, tales como la SOD, GPx y GRd<sup>32</sup>. Debido a este efecto y a su elevada lipofilia, que le permite actuar a todos los niveles celulares (membrana, citosol, núcleo, mitocondria), su actividad antioxidante es más eficaz que la de otros antioxidantes ya conocidos<sup>25</sup>.



**Figura 4. Mecanismo de neutralización de un radical hidroxilo y un radical anión superóxido por la melatonina.**

#### 1.4 Inmunomodulador

La relación entre melatonina y sistema inmune es cada vez más estrecha. En situaciones en las que se produce una inhibición en la producción de melatonina se observa un estado de inmunodepresión que desaparece cuando se administra la hormona. También ciertos efectos inmunodepresivos producidos por algunos fármacos son contrarrestados por la melatonina<sup>33</sup>.

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 citocinas en el sistema inmunitario. La relación entre IL-2 y melatonina (función de neuroinmunomodulación) se demuestra en diversas investigaciones<sup>34</sup>. En un estudio realizado por Lisoni y cols.<sup>35</sup> 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.<sup>36</sup> 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- $\gamma$ , 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.

### **1.5 Estimulador 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*<sup>37</sup>.

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<sup>38</sup>.

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 ya hemos visto que se encuentra la producción de radicales libres. La melatonina, a través de su acción antioxidante y depuradora de radicales libres comentada anteriormente, podría interferir en esta función del osteoclasto e inhibir de esta forma la reabsorción ósea<sup>39</sup>. 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  $\mu\text{M}$  disminuye de manera dosis-dependiente la expresión de mRNA de RANK y aumenta tanto los niveles de OPG como de mRNA de OPG en líneas celulares preosteoblásticas MC3T3-E<sub>1</sub><sup>40</sup>. 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<sup>39</sup>.

### **1.6 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<sup>41,42</sup>.

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, son pocas las referencias en la literatura que aluden 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<sup>43,44</sup>.

## 2. REMODELADO ÓSEO Y OSTEOINTEGRACIÓN

### 2.1 Fisiología ósea

El tejido óseo es una variedad de tejido conectivo que consiste esencialmente en una matriz extracelular mineralizada y células especializadas: osteoblastos, osteocitos y osteoclastos.

La sustancia osteoide o *componente orgánico* de la matriz, producida por los osteoblastos, está constituida en un 90% por fibras de colágeno tipo I, que representa la proteína estructural fundamental de la matriz ósea. El 10% restante lo componen una serie de proteínas no colágenas de menor tamaño que modulan la mineralización y la unión de las células a la matriz, y entre las que destacan (**Tabla 1**):

- Fosfatasa alcalina: producida por los osteoblastos, es una enzima que libera fosfato inorgánico a partir de ésteres fosfóricos con un pH óptimo de 8,6. Merced a ello, por un lado incrementa la concentración de iones fosfato necesarios para la mineralización de la matriz orgánica; por otro, bloquea la acción inhibitoria que los ésteres fosfóricos poseen sobre la mineralización.
- Glucoproteínas con secuencia RGD (Arg-Gly-Asp): osteopontina, osteonectina, fibronectina, trombospondina y las sialoproteínas óseas contienen repetida la secuencia RGD (Arg-Gly-Asp), que es reconocida específicamente por las integrinas de osteoblastos y osteoclastos. Constituye un sistema de reconocimiento que permite el anclaje de las células óseas a la matriz y su migración sobre ella, base de los procesos de mineralización, remodelado y reparación del hueso.
- Proteoglucanos: constituidos por un núcleo proteico en el que se engarzan glucosaminoglucanos, son macromoléculas sintetizadas por los osteoblastos. En la matriz osteoide existen al menos cuatro tipos de estas moléculas: *condroitín sulfato* (el proteoglucano de mayor tamaño, presente sobre todo en las áreas de formación de hueso, donde sirve para reservar espacio para el hueso maduro); *hialuronano* (que interviene en la morfogénesis ósea); *decorina* y *biglucano* (dos pequeños proteoglucanos que actúan como moduladores de factores de crecimiento).
- Proteínas con ácido  $\gamma$ -carboxiglutámico (osteocalcina y proteína del osteoide con ácido  $\gamma$ -carboxiglutámico): este aminoácido modificado se combina con dos iones  $\text{Ca}^{2+}$  entre sus dos grupos carbonilo. Los osteoblastos sintetizan *osteocalcina* (una proteína cuyas concentraciones en plasma guardan cierta correlación con la mineralización) y la

proteína del osteoide con ácido  $\gamma$ -carboxiglutámico, que inhibe la mineralización del colágeno en tejidos no óseos.

- Proteínas séricas retenidas en el mineral óseo: en el tejido óseo se hallan cantidades significativas de albúmina, inmunoglobulinas, hemoglobina,  $\alpha_1$ -antitripsina,  $\beta_2$ -microglobulina,  $\alpha_2$ -SH-glicoproteína y lipoproteína Apo A-1.

La fase *inorgánica* está compuesta por pequeños cristales de un mineral de carácter alcalino, la hidroxiapatita  $[\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2]$ . Estos cristales se incrustan entre las fibras de colágeno para formar un tejido que reúne las características adecuadas de rigidez, flexibilidad y resistencia<sup>45-47</sup>.

Proteínas de la matriz osteoide
<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Colágeno tipo I (90%)</li> <li>2. Proteínas no colágenas (10%):               <ol style="list-style-type: none"> <li>a) Glucoproteínas:                   <ul style="list-style-type: none"> <li>• Fosfatasa alcalina</li> <li>• Glucoproteínas con secuencia RGD (osteopontina, osteonectina, fibronectina, trombospondina, sialoproteínas óseas)</li> </ul> </li> <li>b) Proteoglucanos</li> <li>c) Proteínas con ácido <math>\gamma</math>-carboxiglutámico (osteocalcina, proteína del osteoide con ácido <math>\gamma</math>-carboxiglutámico)</li> <li>d) Proteínas séricas retenidas en el hueso</li> </ol> </li> </ol>

**Tabla 1. Principales proteínas constituyentes de la matriz ósea.**<sup>47</sup>

### 2.1.1 Osteoblastos y osteocitos

Al microscopio óptico, los osteoblastos maduros son células grandes de forma cuboidea, de 20-30  $\mu\text{m}$  de diámetro mayor, con un núcleo ovalado y citoplasma basófilo azulado por su abundante ARN (**Figura 5**). Con el microscopio electrónico muestran un notable retículo endoplásmico rugoso, propio de las células que desarrollan una intensa síntesis proteica.

Embriológicamente los osteoblastos derivan de células progenitoras multipotenciales del estroma medular. Estas células originan osteoblastos, además de fibroblastos, condrocitos, adipocitos y células musculares, algunas de cuyas características fenotípicas son semejantes a las del osteoblasto.

El desarrollo de los osteoblastos está controlado por dos genes:

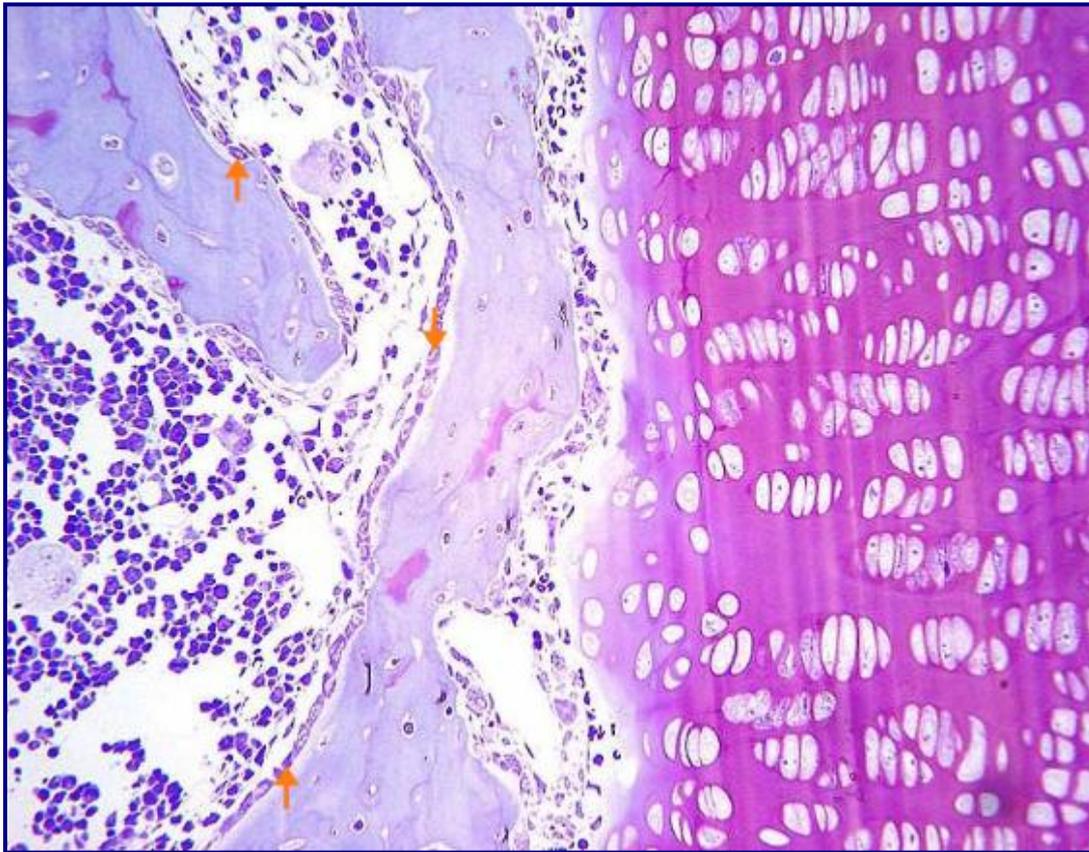
- a) El CBF A1 (*core-binding factor A1*), codificador del factor de transcripción así denominado, específico de los progenitores del osteoblasto; este factor regula la expresión de genes de proteínas específicas de esta célula, como osteopontina, osteocalcina, colágeno tipo I, sialoproteínas óseas y el *ligando del receptor-activador del factor nuclear- $\kappa$ B* (RANK-L).
- b) El gen *lhh* (*Indian hedgehog*), igualmente necesario para el desarrollo embrionario del hueso y la actividad de los osteoblastos<sup>48,49</sup>.

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- $\beta$ , 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<sup>50</sup>.

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- $\beta$ , 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)<sup>51</sup>.

En el hueso ya formado, los osteocitos incluidos en las lagunas u osteoplasmas en la matriz mineralizada, poseen forma estrellada, con numerosas y finas prolongaciones, y están comunicados entre sí por una red de canales, o conductos calcóforos, bañada por el denominado fluido óseo. Tal red de canales se forma antes de que se mineralice la matriz osteoide. Con microscopía electrónica se ha observado que en el interior de esos canales los osteocitos contactan mediante sus prolongaciones, lo que permite su comunicación con la superficie del hueso. 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<sup>47</sup>.



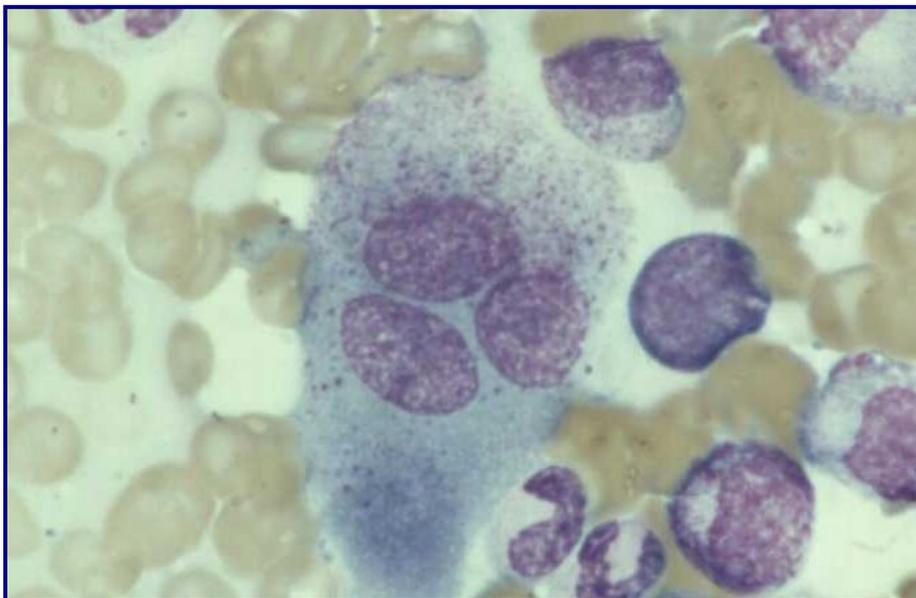
**Figura 5. Tejido óseo. Las flechas naranjas señalan los osteoblastos<sup>†</sup>.**

### 2.1.2 Osteoclastos

Los osteoclastos derivan embriológicamente de células progenitoras hematopoyéticas denominadas “unidades formadoras de colonias de granulocitos-macrófagos” (conocidas habitualmente por su acrónimo inglés, GM-CFU: granulocyte-macrophage colony-forming units), que son, además, y como su nombre indica, precursoras de granulocitos, monocitos y macrófagos. Estas células progenitoras alcanzan el hueso bien directamente, desde la médula incluida en su seno, bien desde la sangre circulante.

Las células precursoras de osteoclastos y éstos mismos expresan en su superficie el receptor de L-RANK producido por los osteoblastos, vía por la que, junto con citoquinas como las interleuquinas 1, 6 y 11, el factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), el interferón  $\gamma$  y el factor estimulador de colonias de macrófagos (M-CSF), se diferencian y activan<sup>52</sup>.

Morfológicamente, los osteoclastos son células gigantes (20-100  $\mu\text{m}$  de diámetro), multinucleadas (más de diez núcleos por célula), ricas en vacuolas y mitocondrias y, como los osteoblastos, polarizadas (sus acciones se localizan en regiones determinadas de su superficie) (**Figura 6**). Así, con el microscopio electrónico se observa que en una de sus caras poseen una serie de finísimos entrantes y salientes, el denominado borde plegado (o en cepillo), a través del que se desarrollará la reabsorción ósea. En el citoplasma próximo a dicho borde se encuentra la conocida como *área clara*, rica en proteínas y filamentos del citoesqueleto, y desde la que se proyectan integrinas que alcanzan el espacio extracelular<sup>47</sup>.

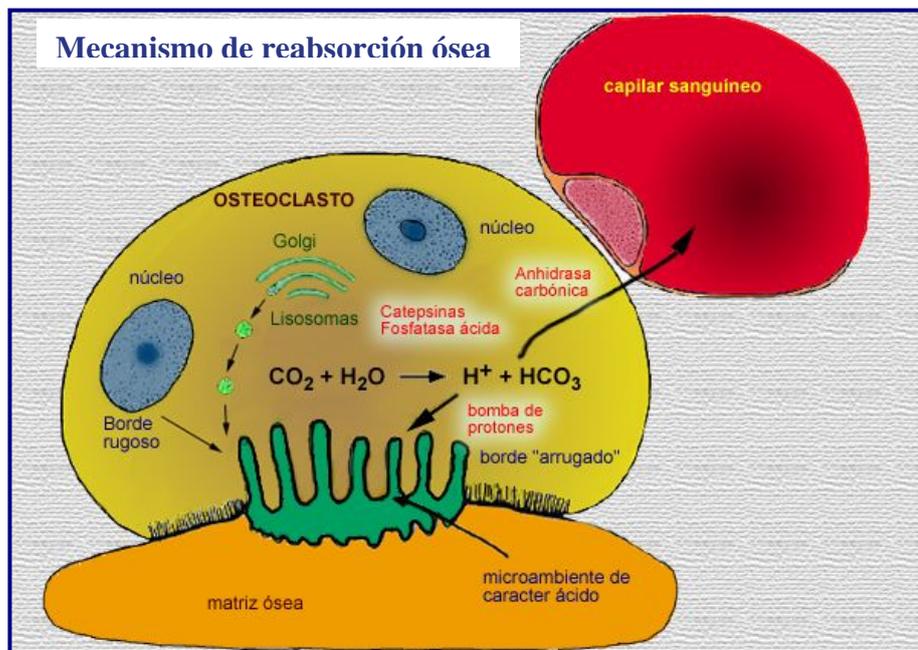


**Figura 6. Osteoclasto.**

#### **2.1.2.1. 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 señaladores 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 bombreadora de protones, un intercambiador bicarbonato/cloro, una fosfatasa ácida resistente a tartrato, catepsina K y la anhidrasa carbónica tipo II.

Los osteoclastos 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 (**Figura 7**). 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<sup>53,54</sup>.



**Figura 7. Esquema del mecanismo de reabsorción ósea.**

### 2.1.2.2 Radicales libres y reabsorción ósea

Según diversos estudios los radicales libres actúan como intermediarios importantes en la formación y activación de nuevos osteoclastos e intervienen en el proceso de reabsorción ósea. Ross *et al.* encontraron que la síntesis de ROS por el sistema xantina oxidasa/xantina causó un aumento en la reabsorción ósea en cultivos de hueso largo fetal de rata y de calotas de ratones recién nacidos. La reabsorción ósea causada por las ROS en estos cultivos se inhibe por la SOD (6  $\mu M$ ), pero no se afectó al añadir idéntica dosis de catalasa, lo que sugiere que el anión superóxido es el principal responsable de esta reabsorción de hueso. Igualmente observaron

tanto *in vivo* como *in vitro* un incremento significativo en el número de osteoclastos y en la extensión de la superficie de hueso reabsorbida después del tratamiento con xantina oxidasa/xantina<sup>55</sup>.

Cuando los osteoclastos son estimulados por factores como la parathormona (PTH), IL-1 o TNF y marcados con nitroazul de tetrazolio (NAT) se observa un aumento de células NAT+/mm<sup>2</sup> (el NAT es un marcador utilizado para investigar la producción de radicales libres ya que es reducido en presencia de especies reactivas). Este hecho coincide con observaciones hechas por otros autores según las cuales los osteoclastos poseen superóxido dismutasa y son los responsables de la producción de ROS en el microambiente óseo, lo que contribuiría a la degradación de componentes de la matriz ósea bajo el borde en cepillo, ya que moléculas estructurales de la matriz como el colágeno o el ácido hialurónico son susceptibles al daño oxidativo por radicales libres<sup>56</sup>.

Se sabe además que los osteoclastos expresan otra enzima, la fosfatasa ácida resistente a tartrato (TRAP), que se localiza en el interior de vesículas endocíticas que contienen productos de degradación orgánicos liberados de la matriz ósea durante la reabsorción. Esta enzima posee un centro binucleado con un hierro activo que es capaz de reaccionar con el peróxido de hidrógeno mediante la reacción de Fenton para producir radical hidroxilo:



El ión férrico formado en la reacción es capaz de reaccionar también con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> para formar anión superóxido e ión ferroso:



Por tanto, se establece a nivel osteoclástico una secuencia de reacciones que originan HO• y O<sub>2</sub><sup>•-</sup> mediante la continua oxidación y reducción del hierro activo de la TRAP, haciendo posible la síntesis de elevadas cantidades de ROS en la medida en que se encuentre disponible el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en el medio.

El papel fisiológico de estas ROS en el proceso de reabsorción ósea no es del todo conocido, pero sí sabemos que atacan directamente al colágeno tipo I y otras proteínas estructurales de la matriz extracelular, contribuyendo a su fragmentación. Los productos resultantes penetran mediante endocitosis en vesículas intracelulares que contienen TRAP, enzima encargada de la

degradación última de los componentes de la matriz. Por tanto, la degradación de la matriz ósea no sólo ocurriría extracelularmente a nivel de las lagunas de reabsorción, sino también intracelularmente en las vesículas endocíticas con TRAP y productos derivados de la acción de las ROS. Finalmente, estos productos de degradación son secretados al espacio extracelular a nivel de la membrana basolateral de la célula<sup>57</sup>.

## 2.2 Remodelado óseo

A lo largo de toda la vida, el tejido óseo sufre un continuo proceso de reabsorción y formación. De forma incesante, hay zonas del hueso que son destruidas para ser sustituidas por tejido óseo recién formado. Este proceso se denomina “remodelado óseo” y conduce al recambio de alrededor de un 7-10% del volumen total del esqueleto cada año.

El remodelado se lleva a cabo por grupos de células osteoblásticas y osteoclasticas que constituyen las llamadas “unidades de remodelado” o “unidades multicelulares básicas”. El proceso se inicia cuando, por mecanismos desconocidos, pero en los que pueden estar implicadas las células de revestimiento<sup>58</sup>, los precursores de los osteoclastos son atraídos a un lugar determinado del hueso, y por la acción de citoquinas (TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6, M-CSF, RANK-L), se diferencian a osteoclastos *in situ*. Éstos comienzan a reabsorber el hueso, de forma que a lo largo de unas dos semanas labran una pequeña cavidad.

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 2-4 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<sup>59</sup>.

### 2.2.1 Factores reguladores del remodelado óseo.

#### 2.2.1.1 Parathormona (PTH)

Producida en las glándulas paratiroides que responden al descenso de la calcemia, es la hormona hipercalcémica por excelencia, al favorecer la reabsorción. No obstante, en los

últimos años se ha descubierto un papel estimulador en la formación ósea, a través de la síntesis de IGF-I y TGF- $\beta$ <sup>60</sup>. Este doble efecto de reabsorción y formación se explicaría porque la PTH en administración 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.

#### **2.2.1.2 Calcitonina.**

Es inhibidora de la reabsorción ósea, al reducir el número y la actividad de los osteoclastos. Sin embargo, esta acción es transitoria, ya que los osteoclastos parecen volverse “impermeables” a la calcitonina en pocos días<sup>61</sup>.

#### **2.2.1.3 calcitriol o 1,25(OH)<sub>2</sub> vitamina D3**

Hormona esteroidea que favorece la absorción intestinal de calcio y fosfato y, por tanto, la mineralización ósea. Algunos autores piensan que puede ser producida por células linfocíticas o monocíticas del hueso, ejerciendo un papel importante como regulador local de la diferenciación de los osteoclastos<sup>62</sup>.

#### **2.2.1.4 Estrógenos.**

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 lado, 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<sup>63</sup>, 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.

#### **2.2.1.5 Glucocorticoides.**

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, factores críticos para la

osteoblastogénesis<sup>64</sup>. Sin embargo, estudios recientes han demostrado que a dosis fisiológicas tienen capacidad osteogénica favoreciendo la diferenciación osteoblástica<sup>65</sup>.

#### **2.2.1.6 Hormona de crecimiento (GH).**

Tiene dos acciones sobre el hueso, directa e indirecta. La hormona del crecimiento actúa directamente sobre los osteoblastos, con receptores para la hormona, estimulando su actividad, lo que produce un aumento en la síntesis de colágeno, osteocalcina y fosfatasa alcalina. La acción indirecta se produce 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. Desde hace unos años se viene considerando a la hormona del crecimiento como un factor de crecimiento local, ya que no sólo se sintetiza en la adenohipófisis, sino en casi todas las células del organismo, incluidos los osteoblastos, teniendo un efecto autocrino y paracrino, además de endocrino<sup>66</sup>.

#### **2.2.1.7 IGF-I y II (Insulin-like Growth Factor I y II).**

Los factores de crecimiento análogos a la insulina son polipéptidos similares a esta hormona sintetizados por el hígado y los osteoblastos, entre otros tejidos. Se hallan en gran concentración en la matriz osteoide<sup>67</sup>. Incrementan el número y función de los osteoblastos, favoreciendo la síntesis de colágeno. 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 hormona del crecimiento, los estrógenos y la progesterona aumentan su producción, mientras que los glucocorticoides la inhiben. Asimismo, median en la interacción osteoblasto-osteoclasto e intervienen de forma activa en el remodelado óseo<sup>68</sup>. 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<sup>69</sup>.

#### **2.2.1.8 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 pre-osteoclastos así como la actividad osteoclástica e inhibiendo la apoptosis de los osteoclastos<sup>70</sup>. En realidad son 3 moléculas diferentes relacionadas: IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$  y antagonista del receptor de IL-1, siendo esta última inhibidora del efecto de las dos primeras. Su acción sobre la reabsorción es 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<sup>71</sup>. 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)<sub>2</sub>D3.
- Interleuquina 11 (IL-11): De reciente descubrimiento, se produce en la médula ósea e induce la osteoclastogénesis.
- Prostaglandinas (PG): *In vitro* favorecen la reabsorción ósea, fundamentalmente la PGE<sub>2</sub>, pero también la PGE<sub>1</sub>, PGG<sub>2</sub>, PGI<sub>2</sub> y PGH<sub>2</sub><sup>72</sup>. 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<sup>73</sup>.

#### **2.2.1.9 Proteínas morfogenéticas óseas (BMPs: Bone Morphogenetic Proteins).**

Las proteínas morfogenéticas óseas están incluidas dentro de la familia de los TGF- $\beta$ . 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, 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<sup>49</sup>. Canalis *et al.*<sup>74</sup> creen que además de estimular la osteogénesis inhiben la osteoclastogénesis.

#### **2.2.1.10 Sistema OPG/RANK/RANKL**

La acción biológica del osteoclasto se ve regulada primordialmente por la tríada molecular OPG/RANK/RANKL<sup>58</sup>. 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 al osteoclasto a reabsorber hueso y a no morir por apoptosis; se trata de una señal de activación y supervivencia para el osteoclasto. El ligando encargado de activar al receptor RANK es RANK-L (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. Existe una tercera molécula, que es la osteoprotegerina (OPG). Se llama también factor de inhibición de la osteoclastogénesis y es un nuevo miembro de la superfamilia de los receptores del factor de necrosis tumoral (TNFR) que se expresa en diversos tejidos humanos además de en hueso. En hueso inhibe la maduración y activación de los osteoclastos al unirse al RANKL e impedir la unión del RANK<sup>75</sup> (**Figura 8**).

### 2.3 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 15 años.

Un requisito imprescindible para el éxito del tratamiento implantológico es la unión firme, estable y duradera del implante bucal al sustrato óseo que lo engloba para luego poder construir sobre él una prótesis dental. En este sentido, Branemark (1965) fue el primero en definir el concepto de osteointegración como *“La conexión estructural y funcional directa entre el hueso vivo, ordenado, y la superficie de un implante sometido a carga funcional”*<sup>76</sup>.

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. 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 proteoglicanos<sup>77</sup>. 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<sup>78</sup>. 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 y rodean 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-tejidos orales es una zona dinámica sometida a una intensa actividad remodeladora por parte de las células óseas y la matriz extracelular<sup>79</sup>.

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 3 meses en mandíbula, y de 6 meses en el maxilar superior.

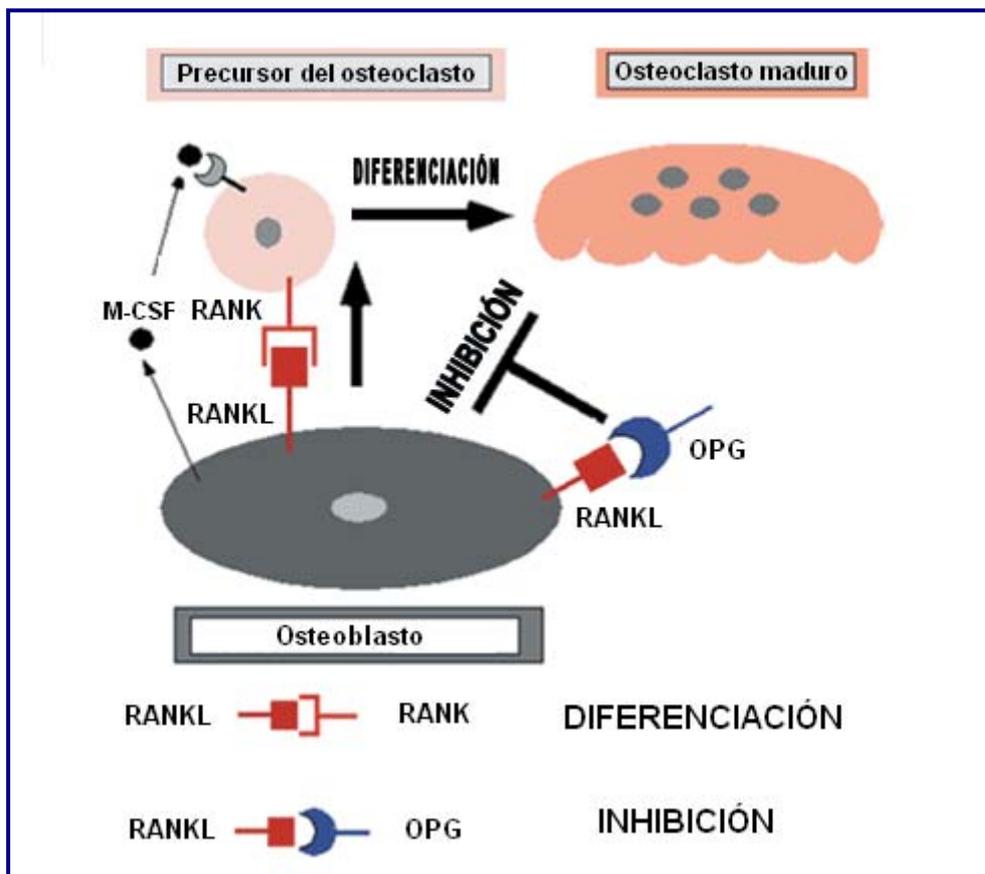


Figura 8. Esquema de actuación de la triada OPG/RANK/RANKL

# 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 la melatonina en el proceso de osteointegración de implantes dentales a las cinco y ocho semanas de su colocación.
2. Valorar la posible aplicación clínica de la melatonina en los procesos de osteointegración en la cavidad oral.



# *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 (con fecha de 19 de noviembre de 2004), el estudio se realizó en 24 perros de raza *Beagle*, procedentes del Servicio de Reproducción Animal de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Córdoba. Dichos perros fueron remitidos al Servicio de Experimentación Animal de la Universidad de Granada, centro homologado para el cuidado, crianza y manejo de estos perros, 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<sup>80</sup> 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<sup>81</sup>.

#### 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 24 perros bajo anestesia general (un total de 24 dientes por perro en una sola sesión). 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 Acepromazina): 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 a la mitad de los perros, 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 cc.) 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 trasladaban a los perros, aún bajo los efectos de la anestesia general, del quirófano a su estabulario para que, bajo la 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 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 (**Figura 9**).



**Figura 9. Colocación de los implantes en los perros Beagle.**

Técnica Quirúrgica.

El protocolo seguido correspondió a la técnica convencional de colocación de implantes oseointegrados<sup>82</sup>, 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.

- Disección 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 del tratamiento tópico. Después de labrar el lecho receptor, aplicamos a cada implante el tratamiento tópico que correspondió:

Los dos implantes más anteriores, correspondientes al grupo control, no recibieron tratamiento tópico alguno.

Los dos implantes distales de ambas hemiarcadas, correspondientes al grupo con *melatonina tópica*, fueron humedecidos con suero fisiológico y posteriormente se impregnaron con 2 mg de *melatonina en polvo* (Helsinn Advanced Synthesis SA, Via Industria 24, 6710 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 (2 mg).

- 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). 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.
- 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.

### 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 y cinco semanas de la intervención implantológica (doce perros a las dos semanas, y los otros doce a las cinco semanas) con el objetivo de valorar la osteointegración en dichos periodos de tiempo.

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

- CalmoNeosan® (maleato de acepromazina): 2,5 -3 cc. vía i.m. + Imalgene 1000® (ketamina + clorbutol): 2 cc. vía i.m., como premedicación sedante.
- Dolethal® (pentobarbital sódico): 3 cc. 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 últimos implantes colocados, 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**

### **2.1 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<sup>83</sup>, 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 hizo mezclando glicolmetacrilato (Technovit 7200<sup>®</sup>, VLC - Heraus Kulzer GMBH, Werheim, Alemania) y peróxido de benzoilo (BPO<sup>®</sup>: Heraus 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<sup>®</sup> + BPO: alcohol | **(30:70)** durante tres días.

Technovit 7200<sup>®</sup> + BPO: alcohol | **(50:50)** durante tres días.

Technovit 7200<sup>®</sup> + BPO: alcohol | **(70:30)** durante tres días.

Technovit 7200<sup>®</sup> + BPO | **(100)** durante tres días.

Technovit 7200<sup>®</sup> + 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<sup>®</sup>) 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 4 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<sup>®</sup> - Heraus 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<sup>®</sup> - Heraus 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, Hamburg, 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<sup>®</sup>, Aparatebau GMBH, Hamburg, 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 que se detalla a continuación (**Tabla 2**):

Tinción de Lévai Laczcó	
<b>Procedimiento:</b>	
<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Sumergimiento en peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) al 30% durante 5 minutos con movimiento constante.</li> <li>2. Lavado con agua corriente dos veces.</li> <li>3. Descalcificación de la superficie con ácido acético (CH<sub>3</sub>COOH) durante 1 minuto.</li> <li>4. Lavado con agua corriente dos veces.</li> <li>5. Sumergimiento en la Solución A durante 20 minutos</li> <li>6. Lavado con agua corriente dos veces</li> <li>7. Sumergimiento en “Pararosanilina” durante 5 segundos. Los cortes se deben sumergir individualmente en esta tinción.</li> <li>8. Lavado con agua corriente y secado.</li> </ol>	
Solución A	Materiales
<p>Una parte de Azur II con una parte de azul de metileno y dos partes de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (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>Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (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>

Tabla 2. Tinción de Lévai-Laczcó.

### 3. EVALUACIÓN HISTOLÓGICA E HISTOMORFOMÉTRICA 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<sup>84</sup>:

- 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<sup>85</sup>.

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® (Olympus Optical Co., Hamburgo, Alemania).

Los parámetros histomorfométricos analizados en nuestro estudio fueron los siguientes (**Figura 8**)<sup>86</sup>:

**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. Se expresa en forma de porcentaje y se calcula de la siguiente forma:

$$\text{BCP} = \frac{\text{Longitud superficie del implante en contacto directo con hueso}}{\text{Longitud total del implante}} \times 100$$

**Hueso periimplantario total (*Periimplant bone area*):**

Para determinar la densidad ósea alrededor del implante se utilizaron en la histometría 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 mm x

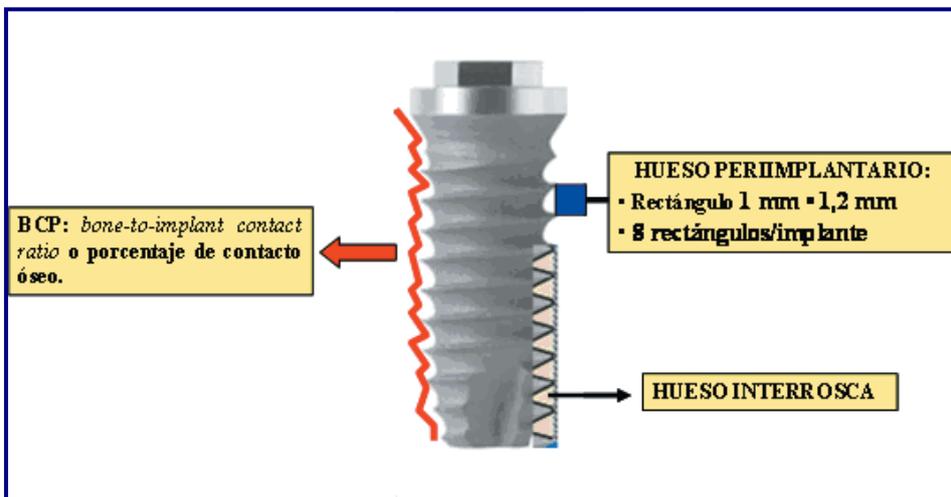


1,2 mm) (**Figura 9**); de esta manera, el hueso periimplantario total se define como el área de hueso dentro de los rectángulos dividida entre el área total de tejido en el interior de los mismos (aproximadamente 1.247.227 micras cuadradas) (x 100). En cada implante se determinaron ocho rectángulos 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 interrosca tiene aproximadamente una superficie de 155.993,40 micras cuadradas) (**Figura 10**). El resultado final se multiplica por 100 y se expresa, como en las variables anteriores, en forma de porcentaje.

Tanto en la zona interrosca como en la periimplantaria se determinó además el porcentaje de tejido conjuntivo, que resulta de restar al área total (100%) el porcentaje correspondiente de tejido óseo. Por tanto, la relación entre hueso y tejido conjuntivo es inversa, es decir, a mayor porcentaje de hueso menor porcentaje de tejido conjuntivo, y viceversa.



**Figura 10.** 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 con licencia de la Universidad de Granada (Nº Licencia: 7837432). El nivel de significación estadística se estableció en  $P < 0.05$ .

# Resultados



## RESULTADOS

### 1. RESULTADOS.

Los resultados obtenidos en los diferentes parámetros histomorfométricos vienen reflejados en la **Tabla 3** para la quinta semana, y en la **Tabla 4** para la octava semana. 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).

Los implantes control, no recibieron ningún tratamiento, mientras que los implantes empleados en el grupo con melatonina recibieron 2 mg. de melatonina pura Helssin Chemicals®.

**Tabla 3. Parámetros histomorfométricos en los implantes control y en los tratados con melatonina tópica cinco semanas después de su colocación.**

Parámetro histomorfométrico	Implantes Control (n=12)	Implantes - melatonina (n= 12)
BCP (% contacto óseo)	34.33 $\pm$ 2.35	38.74 $\pm$ 3.48
Hueso periimplantario total (%)	68.93 $\pm$ 3.97	70.02 $\pm$ 2.05
Tejido conjuntivo periimplantario (%)	31.07 $\pm$ 3.97	29.98 $\pm$ 2.05
Hueso interrosca (%)	64.08 $\pm$ 8.68	72.56 $\pm$ 3.62 *
Tejido conjuntivo interrosca (%)	35.92 $\pm$ 8.68	27.44 $\pm$ 3.62
Neoformación ósea (%)	72.53 $\pm$ 4.54	80.48 $\pm$ 1.99 *

\*  $P < 0.05$

**Tabla 4. Parámetros histomorfométricos en los implantes control y en los tratados con melatonina tópica ocho semanas después de su colocación.**

Parámetro histomorfométrico	Implantes Control (n=12)	Implantes - melatonina (n= 12)
BCP (% contacto óseo)	31.47 ± 3.09	34.29 ± 2.49
Hueso periimplantario total (%)	71.07 ± 1.61	71.51 ± 2.19
Tejido conjuntivo periimplantario (%)	28.93 ± 1.61	28.49 ± 2.19
Hueso interrosca (%)	80.57 ± 2.28	82.43 ± 3.87 *
Tejido conjuntivo interrosca (%)	19.43 ± 2.28	17.57 ± 3.87
Neoformación ósea (%)	88.09 ± 1.38	90.71 ± 2.25 *

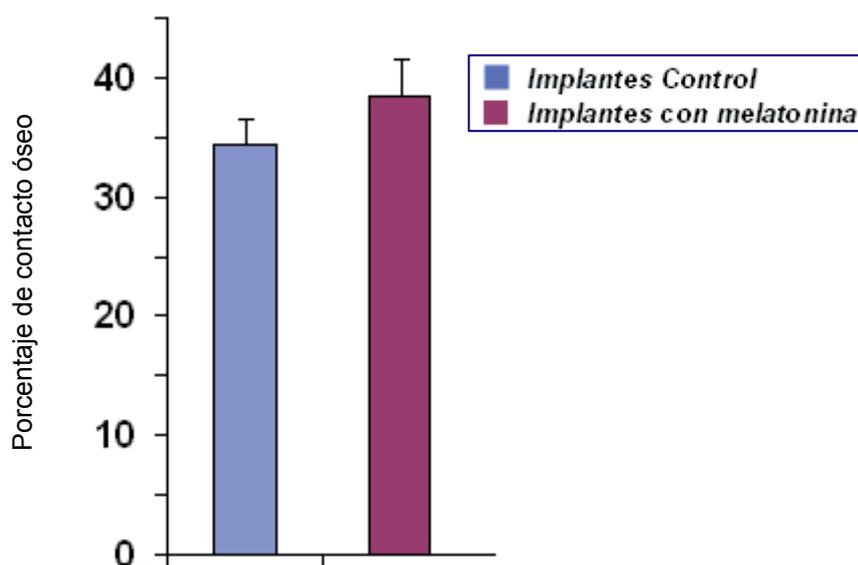
\*  $P < 0.05$

En la tabla se aprecia un aumento significativo en los parámetros de hueso interrosca y neoformación ósea en la quinta y octava semana en los implantes que fueron tratados con melatonina antes de colocarse en el lecho alveolar respecto a los implantes control que no fueron impregnados con ninguna sustancia.

A continuación se detalla gráficamente cada uno de los parámetros histomorfométricos descritos, comparando los valores obtenidos con los implantes del grupo control y los del grupo con melatonina.

### 1.1 BCP (Bone to implant contact ratio).

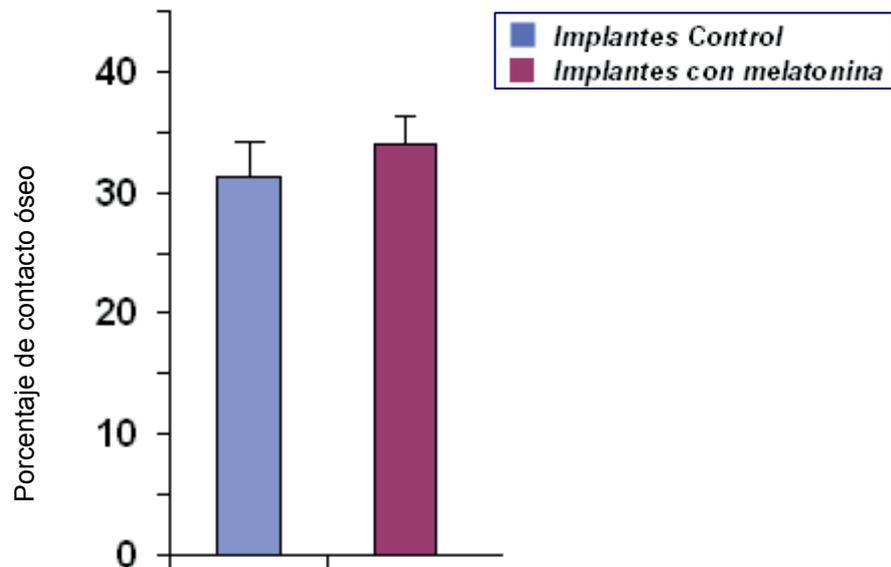
Definíamos previamente este parámetro como *el hueso en contacto directo con el implante en relación al perímetro total de éste*. En la **figura 11**, se representa con un diagrama de barras, los valores histomorfométricos en los implantes control y en los implantes tratados con melatonina a las cinco semanas.



**Figura 11. Porcentaje de contacto óseo en los implantes control y en los implantes tratados con melatonina a las cinco semanas.**

Se observa que en los implantes impregnados previamente con melatonina hay un ligero aumento (no estadísticamente significativo) del ratio de contacto entre el implante y el hueso en comparación a los implantes control que no recibieron tratamiento alguno previamente a su colocación en el lecho óseo.

La **figura 12** muestra los resultados del BCP en los implantes control y en los implantes con melatonina a las ocho semanas de su colocación.



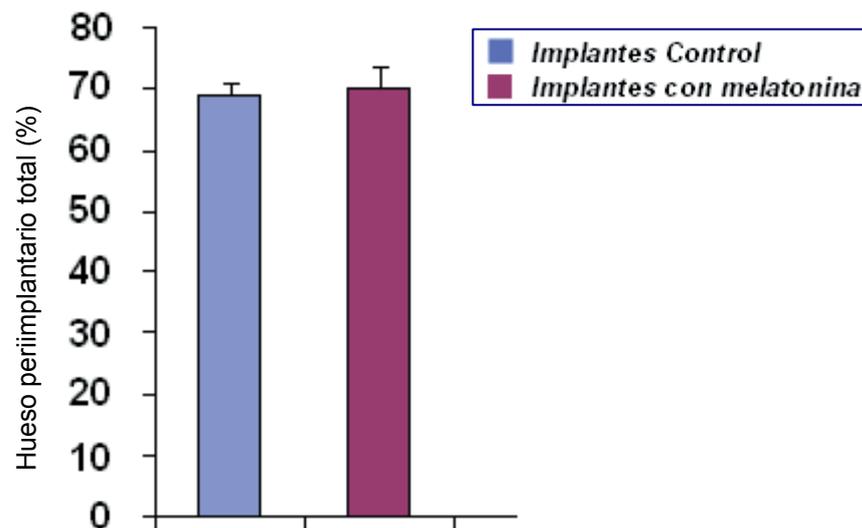
**Figura 12.** *Porcentaje de contacto óseo en los implantes control y en los implantes tratados con melatonina a las ocho semanas.*

La gráfica expresa que el BCP de los implantes con melatonina en su superficie aumenta no de una manera significativa en la octava semana, reduciéndose la diferencia con los implantes del grupo control.

## 1.2 Hueso periimplantario total.

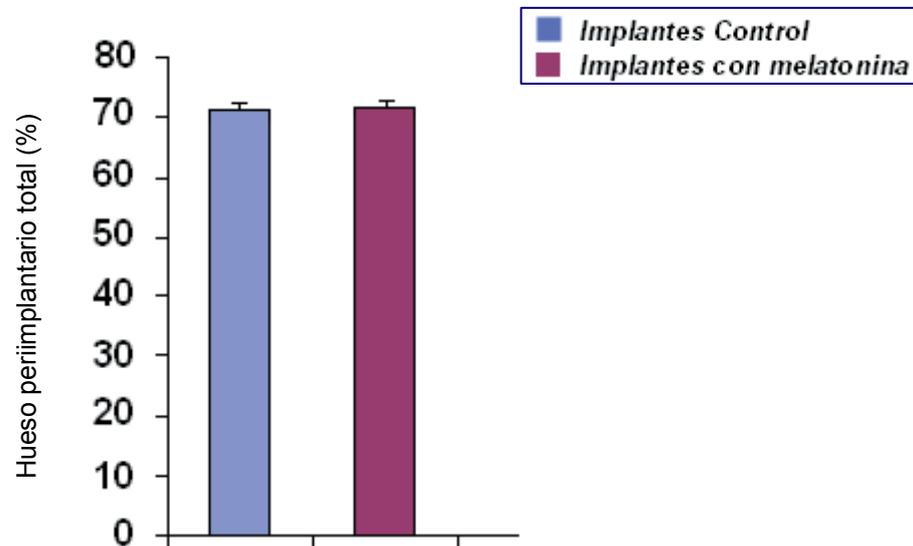
El hueso periimplantario total es, según la definición dada previamente, *el área de hueso dentro de los rectángulos de 1,2 mm<sup>2</sup> dividida entre el área total de tejido en el interior de los mismos*. Estos rectángulos se forman con una línea que une los picos de los implantes y a 1 mm de estos.

La figuras que se detallan a continuación, representan gráficamente los valores de este parámetro histomorfométrico a las cinco semanas (**Figura 13**) y a las ocho (**Figura 14**).



**Figura 13. Hueso periimplantario total en implantes control y tratados con melatonina a las cinco semanas.**

La gráfica muestra valores semejantes en este parámetro, si bien, los valores referentes a los implantes tratados con melatonina son ligeramente superiores. El aumento apreciable no es estadísticamente significativo.

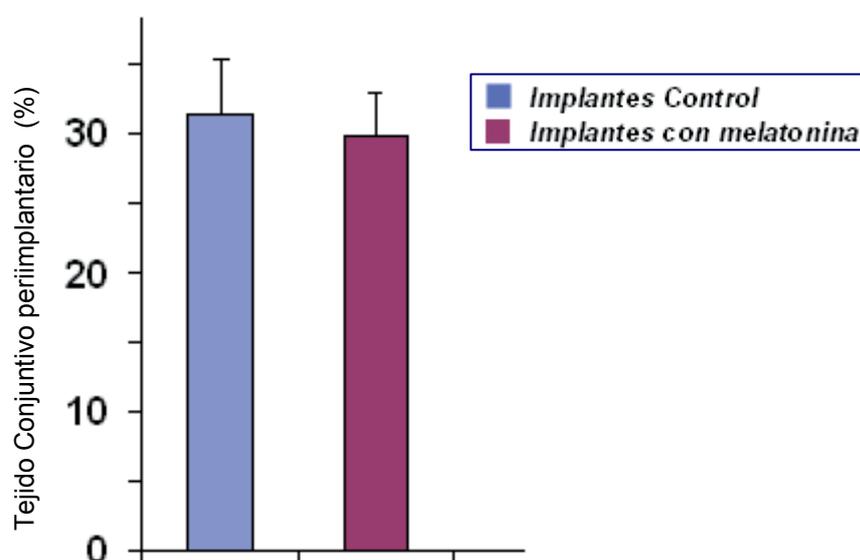


**Figura 14. Representación del hueso periimplantario total en implantes control y en implantes impregnados de melatonina las ocho semanas de su colocación.**

Ambas gráficas poseen semejantes valores, aunque sigue siendo superior en los implantes con melatonina. Esto nos indica que a partir de la octava semana, la melatonina deja de ejercer su efecto osteoinductor. El aumento en los valores de los implantes con melatonina no es significativo estadísticamente.

### 1.3 Tejido conjuntivo periimplantario.

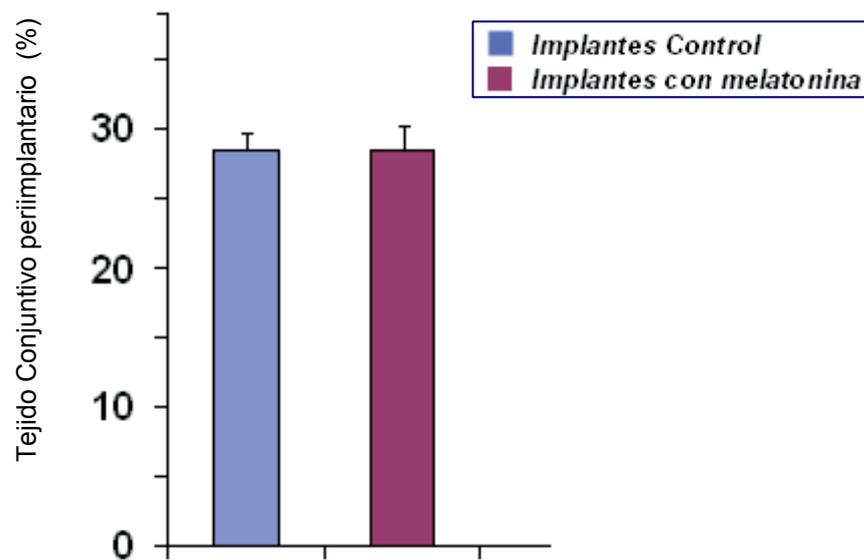
Este parámetro puede definirse como el porcentaje de tejido conjuntivo contenido en un área  $1,2 \text{ mm}^2$  resultante de unir los extremos de los implantes y a  $1 \text{ mm}$  de éstos. Una manera sencilla de obtenerlo es restando a la totalidad del área, el porcentaje de tejido óseo. Los datos de este se detallan a continuación en la **figura 15**, para los implantes del grupo control y del grupo de melatonina a las cinco semanas.



**Figura 15. Representación del tejido conjuntivo periimplantario a las cinco semanas en implantes control y con melatonina.**

Se muestra en la gráfica cómo el tejido conjuntivo en los implantes tratados con melatonina es inferior a los implantes control esto es debido al efecto osteoinductor de la melatonina, que es capaz de inducir la transformación de tejido conjuntivo a óseo en menos tiempo.

La siguiente imagen (**Figura 16**) detalla la correlación entre los valores obtenidos en el porcentaje de tejido conjuntivo en los implantes control y aquellos que se impregnaron con melatonina a las cinco semanas.

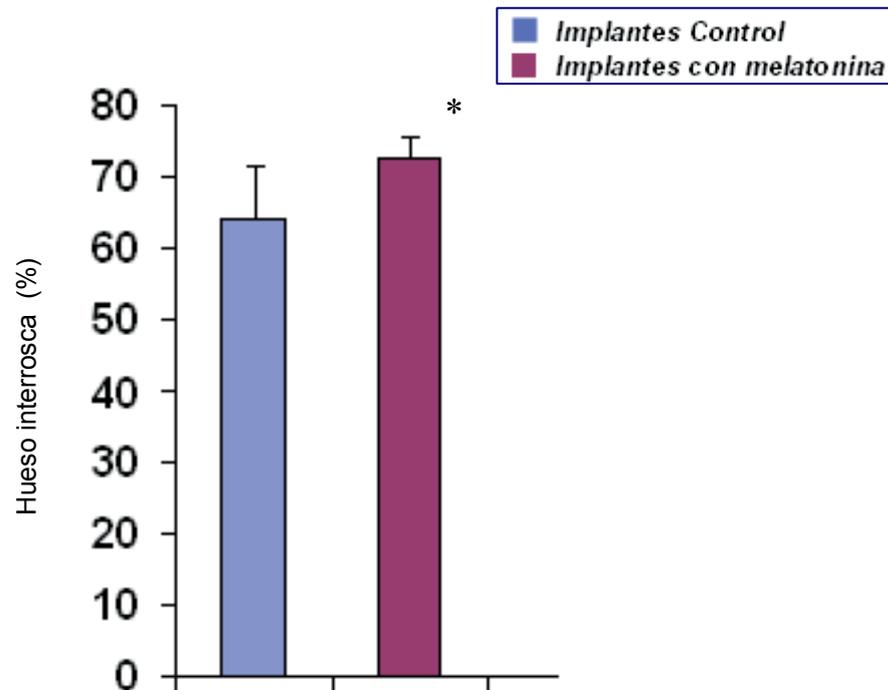


**Figura 16.** Valores obtenidos de tejido conjuntivo periimplantario a las ocho semanas en los implantes control y aquellos pertenecientes al grupo de melatonina.

Ambos valores histomorfométricos son semejantes. A las ocho semanas no hay diferencias significativas entre los dos grupos. El implante del grupo control contiene un mayor porcentaje de tejido conjuntivo.

#### 1.4 Hueso interrosca.

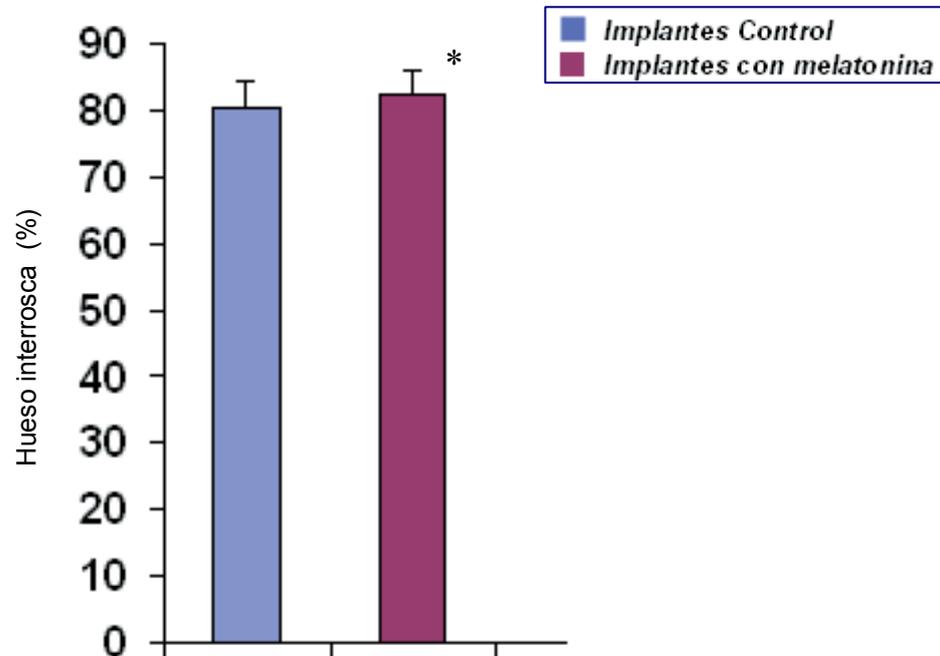
Es el cociente entre el hueso definido entre las roscas del implantes y el área total de tejido contenido en las mismas. En la **figura 17** se comparan estos valores a las cinco semanas en los dos grupos: control y melatonina.



**Figura 17. Formación de hueso interrosca a las cinco semanas en implantes del grupo control y del grupo melatonina.**

El aumento del hueso interrosca en los implantes con melatonina es estadísticamente significativo a las cinco semanas si lo comparamos con el grupo control. Se puede afirmar que la aplicación de melatonina incrementa significativamente la formación de hueso entre las roscas de los implantes.

La representación de los valores histomorfométricos de hueso interrosca a las ocho semanas se detallan en la siguiente gráfica (**Figura 18**).

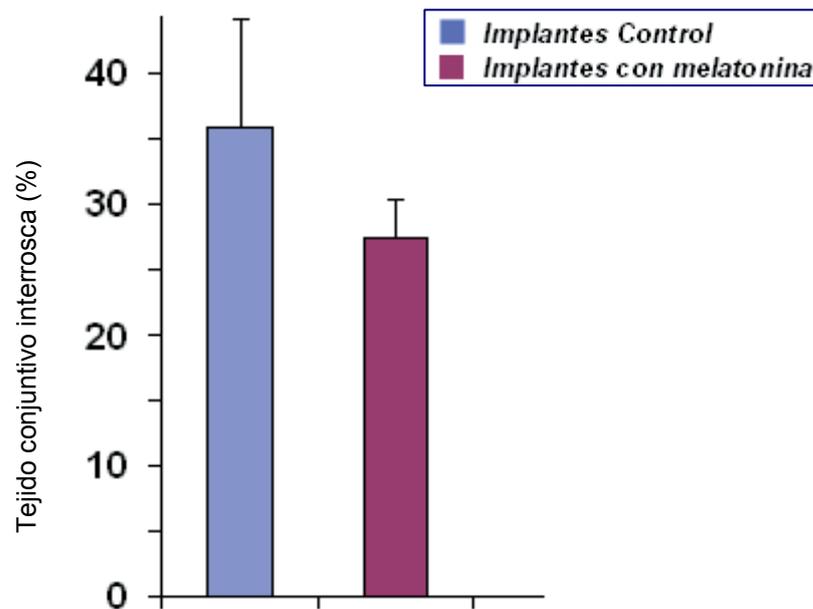


**Figura 18.** Diagrama donde se representan los valores obtenidos a las ocho semanas de hueso interrosca en los 2 grupos analizados.

El hueso interrosca es superior en los implantes con melatonina, es un aumento estadísticamente significativo que indica que a las ocho semanas después de su aplicación, la melatonina aún sigue ejerciendo su efecto osteoinductor.

### 1.5 Tejido conjuntivo interrosca.

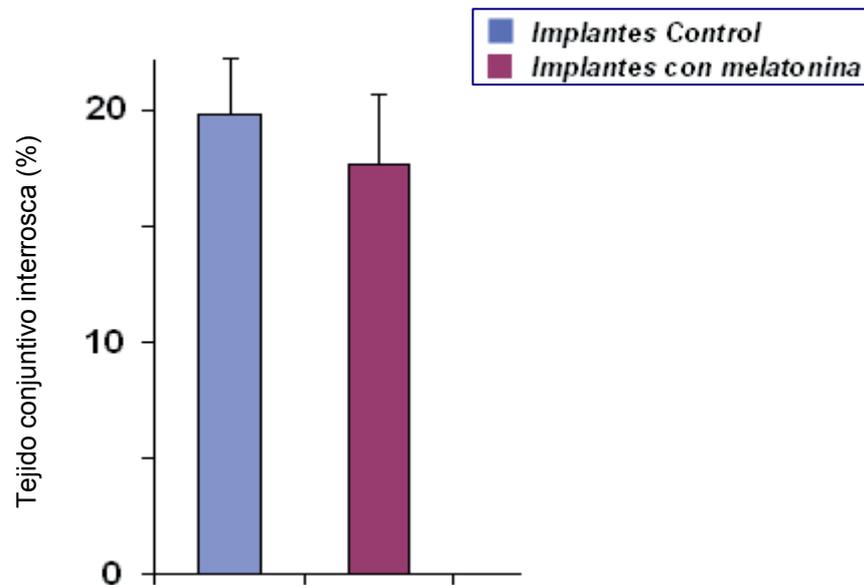
Es la diferencia que existe de restar a la totalidad del área de 1,2 mm<sup>2</sup> (100%), el porcentaje de tejido óseo. Los valores obtenidos de esta sustracción a las cinco semanas en los 2 grupos analizados se representan en la **figura 19**.



**Figura 19.** Valores de tejido conjuntivo interrosca obtenidos a las cinco semanas en los implantes control y en los implantes tratados con melatonina.

Como el tejido conjuntivo es inversamente proporcional al tejido óseo, se aprecia que éste parámetro es inferior en los implantes con melatonina. Esto indica que la cantidad de tejido óseo en la zona interrosca es superior en los implantes con melatonina.

La siguiente gráfica representa el porcentaje de tejido conjuntivo que se obtuvo a las ocho semanas después de la colocación de los implantes, comparados en ese mismo tiempo con otros implantes que no fueron tratados previamente (**Figura 20**).

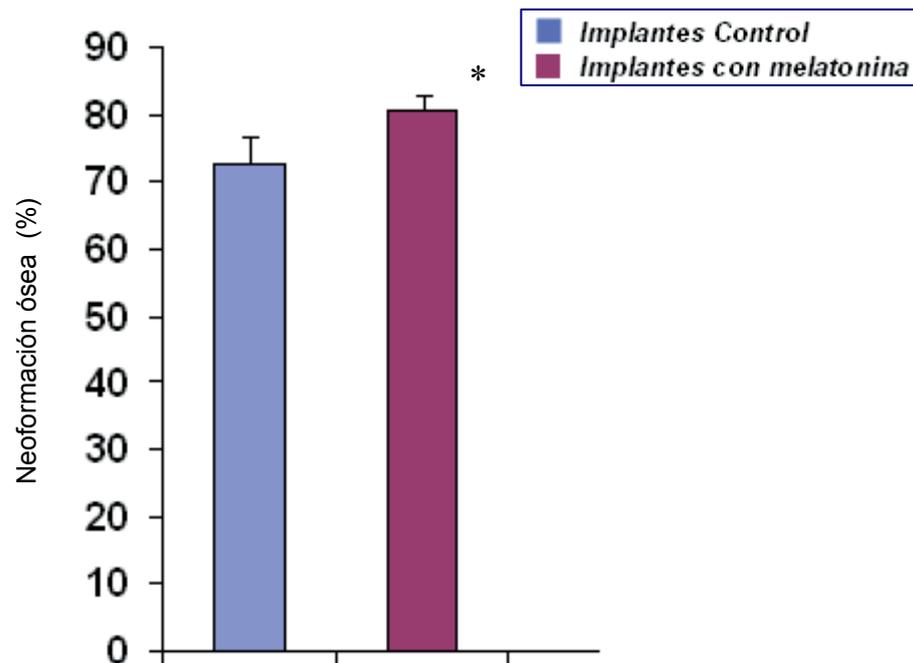


**Figura 20.** Valores obtenidos a las ocho semanas de tejido conjuntivo interrosca.

El porcentaje de tejido conjuntivo interrosca es un valor inversamente proporcional al porcentaje de tejido óseo. A las ocho semanas, en los implantes a los que se les aplicó melatonina se obtuvieron valores inferiores a los implantes control, demostrando que a las ocho semanas, la melatonina sigue actuando sobre este parámetro.

### 1.6 Neoformación ósea.

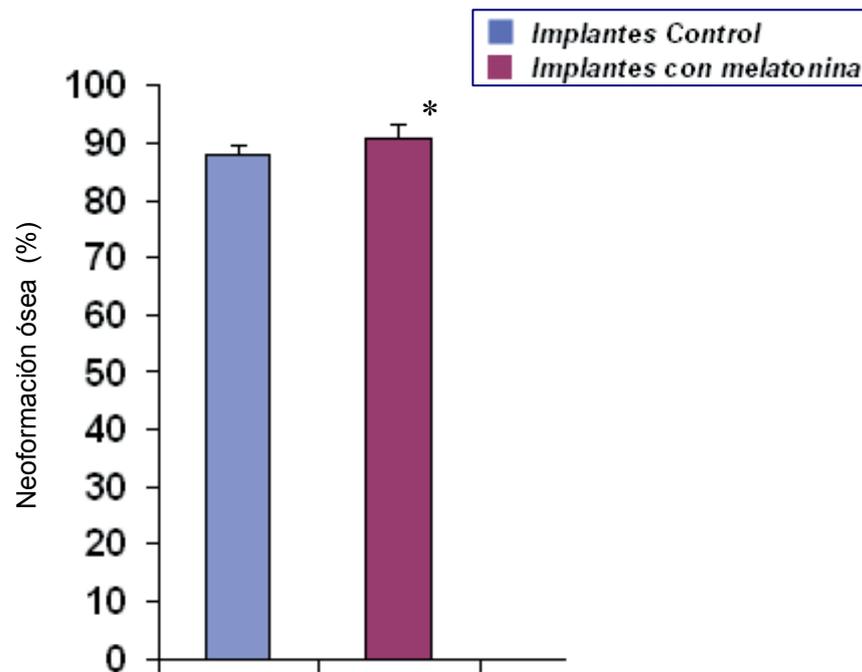
El hueso neoformado se puede localizar fundamentalmente entre las roscas de los implantes, o en la zona periimplantaria. Los datos que se obtuvieron a las cinco semanas aparecen representados gráficamente en la **figura 21**.



**Figura 21. Valores obtenidos en la neoformación ósea a las cinco semanas en implantes control e implantes con melatonina.**

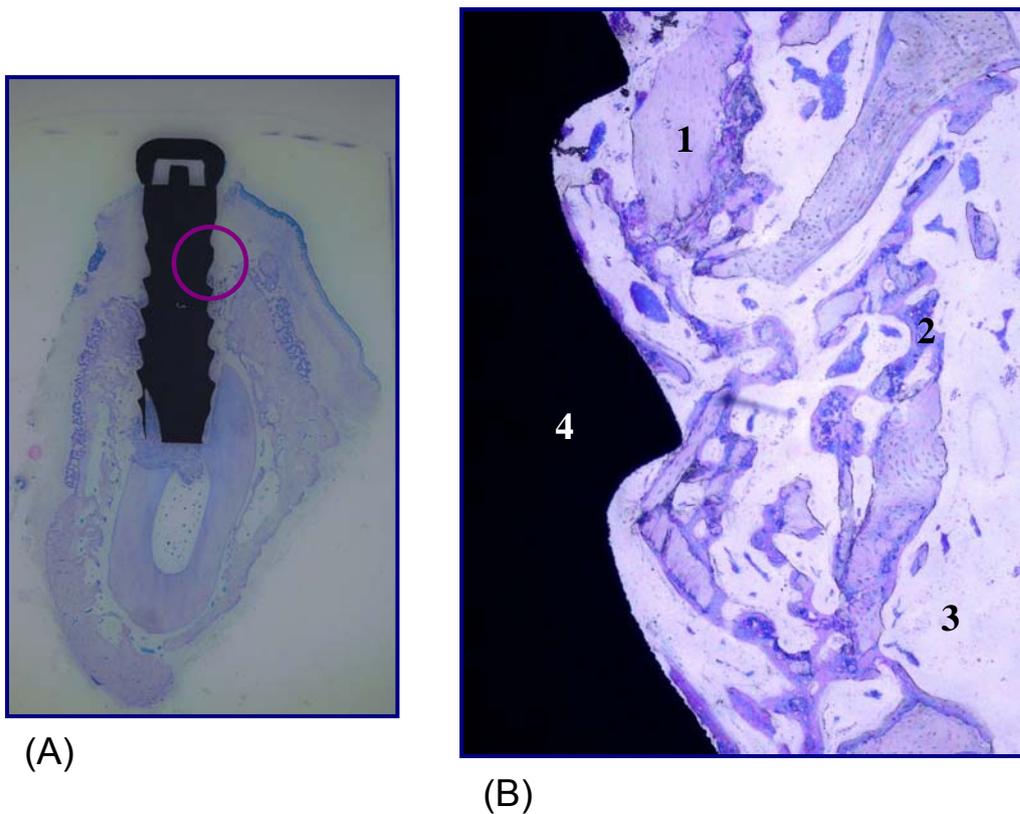
Se aprecia como la formación de hueso nuevo es superior en los implantes con melatonina en comparación a los implantes control. La neoformación ósea es estadísticamente significativa. La melatonina es efectiva en la formación de hueso nuevo.

La **figura 22** representa los valores que se obtuvieron para la neoformación ósea después de ocho semanas de la colocación de los implantes control y de los implantes que fueron tratados con melatonina.



**Figura 22.** Valores de neoformación ósea que se obtuvieron a las ocho semanas. En azul, los implantes control y en granate, los implantes con melatonina.

A las ocho semanas de su colocación, los implantes con melatonina obtuvieron unos valores más altos de neoformación ósea; este aumento es estadísticamente significativo. En este período de tiempo, se recorta la distancia en los valores que se expresaron en la quinta semana.



**Figura 23.** *Visión histométrica de una sección sagital de un implante control sin melatonina (A), y corte histológico a cuatro aumentos de la zona periimplantaria del mismo (B) a las cinco semanas de su colocación.*

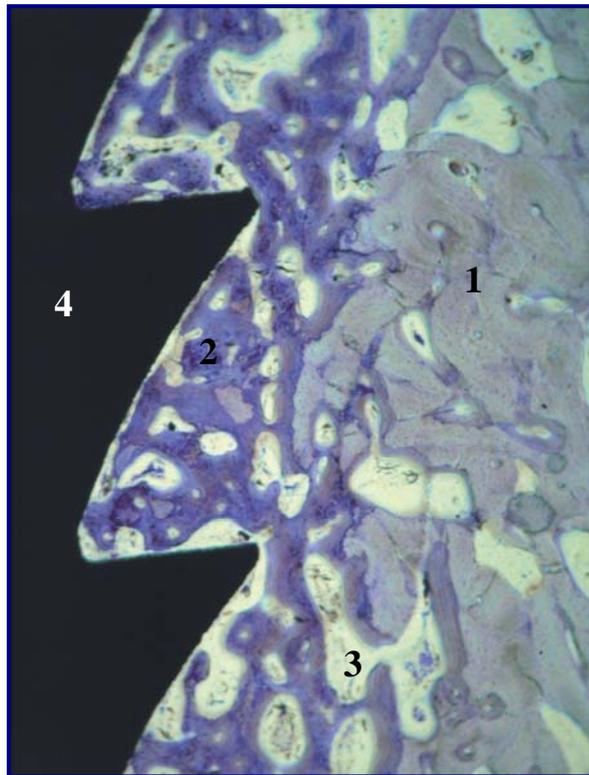
Las zonas de color blanco corresponden a tejido vascular y conjuntivo (3), las de azul más oscuro a hueso nuevo (2), y las de azul más claro a hueso más maduro (1).

La zona oscura (4) se corresponde con la sección sagital del implante.

Esta imagen refleja los resultados obtenidos en los implantes del grupo control cinco 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.

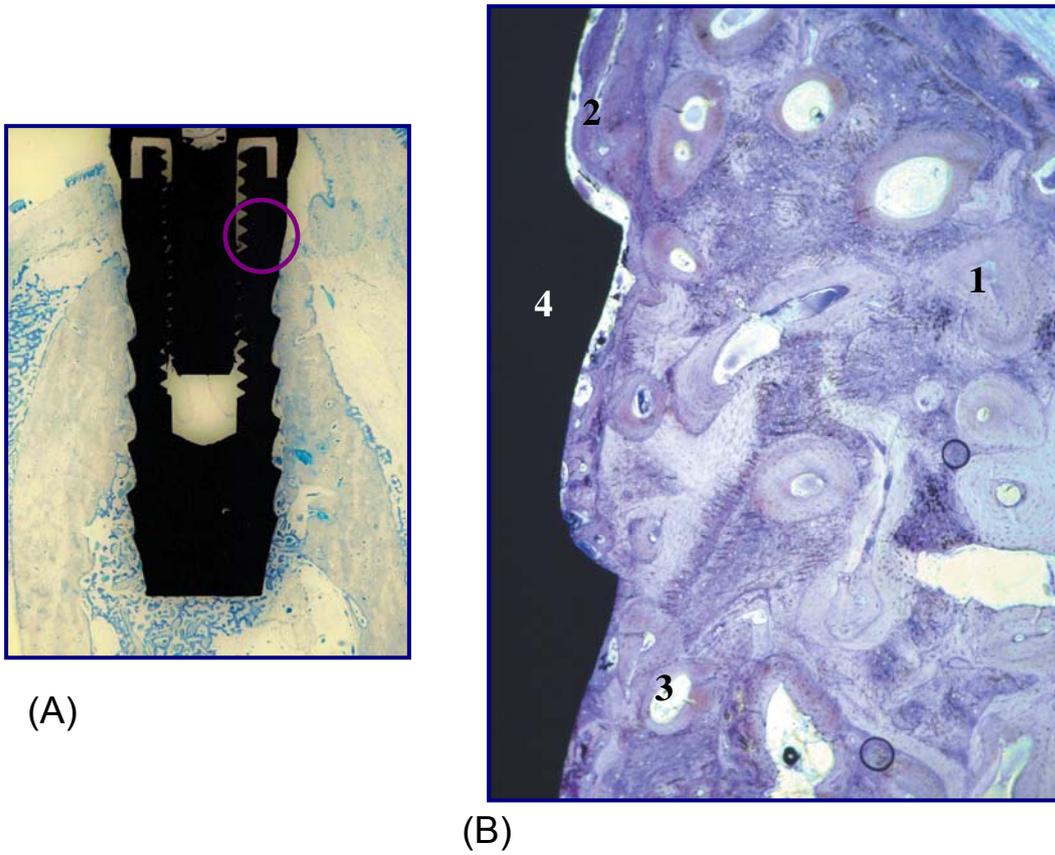


(A)

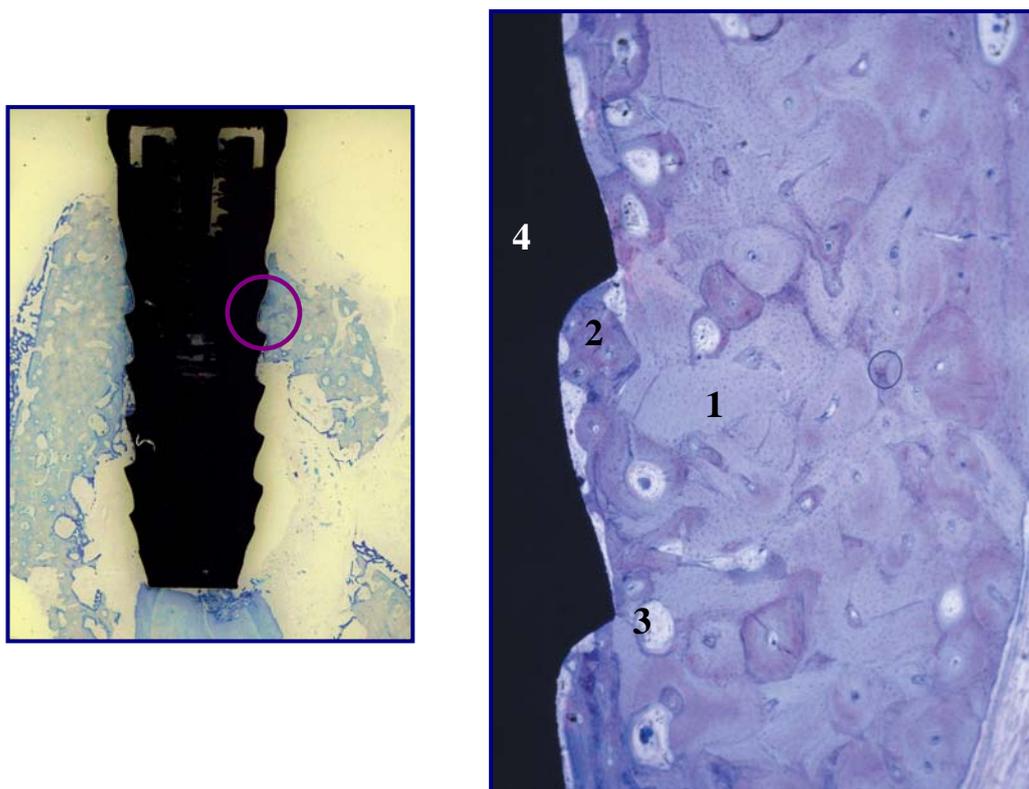


(B)

**Figura 24. Visión histométrica de una sección sagital de un implante control sin melatonina (A), y corte histológico a cuatro aumentos de la zona periimplantaria del mismo (B) a las ocho semanas de su colocación.**



**Figura 25.** *Visión histométrica de una sección sagital de un implante tratado con melatonina (A), y corte histológico a cuatro aumentos de la zona periimplantaria del mismo (B) a las cinco semanas de su colocación.*



**Figura 26.** *Visión histométrica de una sección sagital de un implante tratado con melatonina (A), y corte histológico a cuatro aumentos de la zona periimplantaria del mismo (B) a las ocho semanas de su colocación.*

## Discusión



## DISCUSIÓN

Nos propusimos evaluar los efectos de la melatonina sobre los procesos de osteointegración en implantes dentales en perros de la raza Beagle a las cinco y ocho semanas de su colocación en mandíbula. La elección de perros Beagle como animal de experimentación esta basada en los siguientes hechos:

1. La cresta alveolar de los perros Beagle es muy semejante a la de los humanos.
2. Su manejo es más sencillo y el costo es menor que otras especies de experimentación como primates, ovejas o cerdos de la raza minipig.
3. Este modelo de experimentación puede proporcionar un volumen óseo muy semejante al del humano, permitiéndonos colocar los implantes para estudio. Esto sería inviable en animales de experimentación más pequeños como la rata o el conejo.

Decidimos usar sólo perros Beagle macho porque las hembras podían alterar los valores histomorfométricos óseos como consecuencia de la secreción de estrógenos, ya que estos tienen una doble función, por un lado, favorecen la osteogénesis al aumentar el número y función de osteoblastos, y por otro lado, inhiben la reabsorción ósea.

Se ha demostrado en otros estudios con perros, que después de las exodoncias, y antes de colocar los implantes, hace falta que pasen aproximadamente ocho semanas de curación con el fin de obtener una correcta cicatrización de los tejidos blandos y una organización estable de los tejidos óseos, obteniendo así una mandíbula edéntula perfecta para la colocación de implantes dentales<sup>87,88</sup>.

La melatonina es una indolamina cuyos receptores se relacionaban exclusivamente con el sistema nervioso central; sin embargo, actualmente se han descubierto nuevos receptores en estructuras muy distantes de las originarias<sup>89</sup>. Junto a su capacidad propia como hormona, encontramos otras propiedades como las oncoestáticas y antioxidantes que se pueden emplear para el tratamiento de patologías tan diferentes como la depresión<sup>90</sup>, el cáncer de próstata y mama<sup>91,92</sup> y las enfermedades de Parkinson y Alzheimer<sup>92,93</sup>. En este sentido, la administración de melatonina podría reducir la incidencia de enfermedades tan prevalentes como el cáncer o las enfermedades neurodegenerativas<sup>91,92</sup>.

En la cavidad oral, la aplicación de melatonina ha demostrado tener efectos beneficiosos en el tratamiento de la patología periodontal, como coadyuvante de los procesos regenerativos postexodoncia<sup>94,95</sup> y como cariostático<sup>96</sup>. Recientemente se ha publicado un hallazgo que relaciona la melatonina y un aumento de la secreción de amilasa por parte de la glándula parotídea, ampliando de esta forma, la acción terapéutica de esta hormona en la cavidad oral<sup>97</sup>. Ya que los ritmos circanales son capaces de modificar algunos componentes de la saliva, cabe la posibilidad de que la melatonina pueda actuar en varios componentes de la saliva<sup>98</sup>.

La implantología puede incluirse como una especialidad dentro de la odontología y de la cirugía oral. Es un tratamiento odontológico conocido por la gran mayoría de la población para sustituir dientes ausentes<sup>99</sup>. Con un millón de implantes colocados anualmente en todo el mundo, se ha convertido en una parte totalmente integrada dentro de la práctica convencional, y que aumenta continuamente el número de profesionales que se dedican a ella<sup>100</sup>. Podemos decir, basándonos en estudios previos, que el grado de satisfacción en pacientes que han recibido tratamiento con implantes dentales está cercano al 80%, tanto estética como funcionalmente<sup>101</sup>. Si hablamos de los implantes dentales, tenemos que referirnos también al concepto de osteointegración, entendiéndolo como una unión bioquímica directa que se establece entre la superficie del implante y el hueso en contacto con él, en ausencia de cualquier otro tipo de unión mecánica. La osteointegración de los implantes dentales es el resultado de la interacción entre la superficie de titanio del implante y los constituyentes celulares y de la matriz del tejido óseo que lo rodea<sup>102</sup>. Como se comentó previamente en la introducción, una vez colocado el implante comienza una intensa actividad de remodelado donde los componentes del tejido óseo comienzan a interactuar con el óxido de titanio del implante, las trabéculas óseas van aproximándose al implante al igual que los osteocitos y fibroblastos hasta que se fusionan con la capa más externa de la superficie, estableciéndose de esta forma, la unión directa entre ambos componentes. Existen varios trabajos en los que se han evaluado los efectos de las características topográficas y químicas del implante en los procesos de osteointegración; concretamente, las microrrugosidades, que se mejoraban con el arenado<sup>103</sup>, el grabado ácido<sup>104</sup>, también con la administración de plasma rico en factores de crecimiento<sup>105</sup>.

La tendencia actual en el estudio de los implantes es la de administrar de forma tópica sustancias que favorezcan la unión entre implante y hueso, tales como factores de

crecimiento<sup>102</sup>, proteínas morfogenéticas óseas<sup>106</sup> y hormonas como la melatonina y la hormona de crecimiento<sup>107</sup>. El futuro de este tratamiento está en la combinación de ambas modalidades; modificar la estructura del implante y acompañarlo de sustancias biológicas que promuevan una formación ósea más rápida y de mayor calidad.

Recientemente se ha visto la posibilidad de combinar dos sustancias que de manera independiente mejoran significativamente los valores histomorfométricos, son la melatonina y el factor II de crecimiento de los fibroblastos<sup>108</sup>. El factor II facilita la proliferación de osteoblastos *in vitro* y la reparación ósea *in vivo*. Los valores que se obtuvieron demuestran que la melatonina de manera independiente induce la formación de hueso, avalando de esta manera nuestros resultados. En el estudio de Takechi y cols. realizado en tibias de ratas, el ratio de contacto entre el implante y en hueso a las cuatro semanas es superior a los valores que obtuvimos; en él, el ratio de contacto implante-hueso es de  $57,4 \pm 7,4$ . La aplicación de ambas sustancias simultáneamente es más efectiva que la administración de cualquiera de las dos sustancias mencionadas independientes.<sup>109,110</sup>

La diferencia entre los resultados obtenidos puede radicar en el metabolismo óseo, y tenemos que tener en cuenta que en cada especie la formación ósea puede verse modificada por las características intrínsecas de ésta. Por otro lado, el lugar de colocación de los implantes es distinta, tenemos por ello, que la morfología, la cantidad de tejido esponjoso o la cortical difiere de la tibia a la mandíbula. Finalmente, hay estructuras óseas que se afectan con mayor frecuencia en los procesos de reabsorción ósea.

Los resultados obtenidos, demostraron como a las cinco y ocho semanas después de la aplicación de melatonina sobre los implantes dentales se obtuvieron cambios que fueron estadísticamente significativos; de entre todos los parámetros, los más significativos fueron el hueso interosca y la neoformación ósea, estrechamente relacionados con la formación de hueso nuevo. El resto de parámetros aumentó no de manera significativa, esto se debe a dos razones principalmente:

1. La melatonina es muy efectiva las dos primeras semanas después de su colocación, mejora de manera significativa aquellos valores que no necesitan una formación de hueso nuevo, sino que estimula al hueso existente<sup>89</sup>.
2. La capacidad osteoinductora de la melatonina es limitada, comienza a decrecer a partir de la quinta semana, excepto para los parámetros que están relacionados con la formación de hueso

Si permaneciese de manera continuada esta acción, no habría un efecto terapéutico, sino un efecto oncogénico.

En el estudio de Koyama y *cols.* realizado en ratones, se evalúa la capacidad de la melatonina para aumentar la masa ósea. Los resultados obtenidos expresan que la melatonina es capaz de aumentar la masa ósea, sin embargo; no hay un aumento apreciable de los valores histomorfométricos. Este aumento de la masa ósea se debe a la supresión de la reabsorción<sup>111</sup>.

Una de las aplicaciones de la epidemiología es el estudio de la posible relación causal entre una exposición y un efecto. En este ámbito, encontramos los criterios de causalidad de Bradford-Hill<sup>112</sup>, el más interesante ante esta situación es el de consistencia y trata de conocer si la asociación entre las dos variables a las que investigamos una posible relación causa-efecto ha sido confirmada por más de un estudio, en poblaciones y circunstancias distintas por autores diferentes. En nuestra situación se ha demostrado en diferentes estudios que la aplicación de melatonina sí es capaz de modificar los parámetros histomorfométricos óseos.

Numerosos trabajos publicados hasta el momento describen el efecto protector de la melatonina en diferentes modelos experimentales de estrés oxidativo<sup>23-32</sup>

En el grupo de perros al que se le aplicó melatonina tópica en las heridas alveolares, se apreció cómo la melatonina redujo significativamente los elevados niveles de peroxidación lipídica del grupo control un día después de las exodoncias, incluso ligeramente por debajo de los valores basales. Otros autores que demuestran que la melatonina es capaz de reducir eficazmente *in vivo* la peroxidación de los lípidos<sup>113</sup>. Yamamoto y Tang<sup>114</sup> refieren que la melatonina previene la peroxidación lipídica inducida por cianuro en ratones. Del mismo modo, el pretratamiento con esta indolamina redujo la formación de malonildialdehído, un indicador de peroxidación lipídica, en animales con otitis media, donde existía, como en nuestro trabajo, una respuesta inflamatoria de base<sup>115</sup>. Además, según Gitto y *cols.* la melatonina aumenta la acción protectora de otros antioxidantes como vitamina E, vitamina C y GSH contra la oxidación de las grasas poliinsaturadas mediada por radicales libres, incrementando claramente su eficacia<sup>116</sup>. Cuando se comparan bajo condiciones de alto estrés oxidativo *in vivo*, la melatonina resulta superior a las vitaminas C y E en la reducción del daño oxidativo<sup>29</sup>, algo que también ha sido demostrado *in vitro*<sup>117</sup>.

Las acciones de la melatonina a nivel óseo no sólo serían aplicables en el campo de la implantología oral, sino también en otros procesos odontológicos como la enfermedad periodontal, que sabemos 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 y *co/s.*<sup>118</sup> han demostrado que el ratio RANKL con respecto a OPG está incrementado a favor del primero en pacientes con periodontitis, encontrándose valores de mRNA de RANKL muy elevados en pacientes con enfermedad periodontal avanzada, a la vez que la expresión del mRNA de OPG está muy disminuida con respecto a sujetos sanos. De esta forma, la inhibición en el proceso de osteoclastogénesis ejercida por la melatonina, podría complementar su acción antioxidante a nivel periodontal.

Por todo lo mencionado anteriormente, podemos concluir diciendo que el tratamiento implantológico se ha convertido en una opción terapéutica muy demandada y con muy buenos resultados. La aplicación de melatonina, sola o combinada con otras sustancias mejora la osteointegración.



# Conclusiones



## CONCLUSIONES

Una vez formulados los objetivos y analizados los resultados de la investigación procedemos a exponer cuáles han sido las conclusiones obtenidas:

1. La administración de melatonina sobre los implantes dentales favorece la osteointegración de éstos, a las cinco y ocho semanas de su colocación en perros Beagle.
2. La melatonina ejerce un efecto osteogénico a las cinco y ocho semanas de su aplicación, mejorando aquellos parámetros histomorfométricos en áreas donde se necesita la formación de hueso nuevo, como son la zona periimplantaria y la porción interrosca del implante.
3. La melatonina, es una hormona que se ha empleado para el tratamiento de patologías muy diferentes de las odontológicas. Hoy podemos afirmar, que la melatonina puede emplearse como agente terapéutico también, a nivel de la cavidad oral; esto es debido a sus excelentes propiedades osteoinductoras y antioxidantes que hacen de esta hormona un agente perfecto para usarse en los tratamientos implantológicos y dentales.



# *Bibliografía*



## BIBLIOGRAFÍA

- <sup>1</sup> McCord CP, Allen FB. Evidences associating pineal gland function with alterations in pigmentation. *J Exp Zool* 1917; 23:207-24.
- <sup>2</sup> 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.
- <sup>3</sup> Cassone VM. Effects of melatonin on vertebrate circadian systems. *Trends Neurosci* 1990; 13:457-64.
- <sup>4</sup> Redman J, Armstrong S, Ng KT. Free-running activity rhythms in the rat: entrainment by melatonin. *Science* 1983; 219:1089-91.
- <sup>5</sup> Guerrero J, Carrillo-Vlco A, Lardone P. La melatonina. *Investigación y Ciencia* 2007; 373: 30-30.
- <sup>6</sup> 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.
- <sup>7</sup> Konturek SJ, Konturek PC, Brzozowski T, Bubenik GA. Role of melatonin in upper gastrointestinal tract. *J Physiol Pharmacol* 2007;58:23-52.
- <sup>8</sup> Vanecek J. Melatonin binding sites. *J Neurochem* 1988; 51:1436-40.
- <sup>9</sup> 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.
- <sup>10</sup> 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.
- <sup>11</sup> 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.
- <sup>12</sup> Carlberg C, Hooft van Huijsduijnen R, Staple J, DeLamater JF, Becker-André M. RZR, a novel class of retinoid related orphan receptors that function as both monomers and homodimers. *Mol Endocrinol* 1994; 8:757-70.
- <sup>13</sup> 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.
- <sup>14</sup> Huerto-Delgadillo 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.
- <sup>15</sup> Macías M, Escames G, Leon J, Coto A, Sbihi Y, Osuna A *et al.* Calreticulin-melatonin. An unexpected relationship. *Eur J Biochem* 2003; 270:832-40.
- <sup>16</sup> Tan DX, Manchester LC, Terron MP, Flores LJ, Tamura H, Reiter RJ. Melatonin as a naturally occurring co-substrate of quinone reductase-2, the putative MT3 melatonin membrane receptor: hypothesis and significance. *J Pineal Res* 2007; 43:317-20.
- <sup>17</sup> Reiter RJ. Pineal melatonin: cell biology of its synthesis and of its physiological interactions. *Endocrine Rev* 1991; 12:151-80.
- <sup>18</sup> 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.

- <sup>19</sup> 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.
- <sup>20</sup> 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; 2:133-51.
- <sup>21</sup> Reiter RJ. The melatonin rhythm: both a clock and a calendar. *Experientia* 1993; 49:654-64.
- <sup>22</sup> Moore RY. Suprachiasmatic nucleus in sleep-wake regulation. *Sleep Med* 2007; 8:27-33.
- <sup>23</sup> Ianas O, Olnescu R, Badescu I. Melatonin involvement in oxidative stress. *Rom J Endocrinol* 1991; 29:147-53.
- <sup>24</sup> Tan DX, Chen LD, Poeggeler B, Manchester LC, Reiter RJ. Melatonin: A potent, endogenous hydroxyl radical scavenger. *Endocr J* 1993; 1:57-60.
- <sup>25</sup> 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.
- <sup>26</sup> 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.
- <sup>27</sup> 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.
- <sup>28</sup> Costa EJX, Lopes RH, Lamy-Freund MT. Permeability of pure lipid bilayers to melatonin. *J Pineal Res* 1995; 19:123-6.
- <sup>29</sup> Tan DX, Reiter RJ, Manchester CL, 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.
- <sup>30</sup> 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.
- <sup>31</sup> 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.
- <sup>32</sup> 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.
- <sup>33</sup> Guerrero JM, Reiter RJ. Melatonin - Immune System Relationships. *Curr Topics Med Chem* 2002; 2:167-79.
- <sup>34</sup> García-Maurino S, González-Haba MG, Calvo JR, Goberna R, Guerrero JM. Involvement of nuclear binding sites for melatonin in the regulation of IL-2 and IL-6 production by human blood mononuclear cells. *J Neuroimmunol* 1998; 92:76-84.
- <sup>35</sup> 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.
- <sup>36</sup> 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.

- <sup>37</sup> Nakade O, Koyama H, Arijji 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.
- <sup>38</sup> Roth JA, Kim BG, Lin WL, Cho MI. Melatonin promotes osteoblast differentiation and bone formation. *J Biol Chem* 1999; 274:22041-7.
- <sup>39</sup> 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.
- <sup>40</sup> 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.
- <sup>41</sup> McIntyre IM, Norman TR, Burrows GD, Armstrong SM. Melatonin rhythm in human plasma and saliva. *J Pineal Res* 1987; 4:177-83.
- <sup>42</sup> Vakkuri O. Diurnal rhythm of melatonin in human saliva. *Acta Physiol Scand* 2004; 124:409-12.
- <sup>43</sup> 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.
- <sup>44</sup> 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; 77:1533-8.
- <sup>45</sup> 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: Jarpuyo Editores; 2004. p. 1-6.
- <sup>46</sup> Gehron Robey P. Bone matrix proteoglycans and glycoproteins. In: Bilezikian JP, Raisz LG and Rodan GA, editors. *Principles of bone biology*. 2<sup>o</sup> edition. Volume 1. San Diego, California: Academic Press; 2002. p. 225-238.
- <sup>47</sup> Prieto S. Fisiología del hueso. En: Tresguerres JAF, editor. *Fisiología Humana*. 3<sup>a</sup> edición. Madrid: McGraw-Hill; 2005. p. 981-994.
- <sup>48</sup> 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.
- <sup>49</sup> Yamaguchi A, Komori T, Suda T. Regulation of osteoblast differentiation mediated by bone morphogenetic proteins, hedgehogs, and *Cbfa1*. *Endocr Rev* 2000; 21:393-411.
- <sup>50</sup> 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; 11:409-22.
- <sup>51</sup> 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; 270:937-45.
- <sup>52</sup> 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*. 2<sup>o</sup> edition. Volume 1. San Diego, California: Academic Press; 2002. p. 109-126.
- <sup>53</sup> Väänänen K, Zhao H. Osteoclast function: biology and mechanisms. In: Bilezikian JP, Raisz LG and Rodan GA, editors. *Principles of bone biology*. 2<sup>o</sup> edition. Volume 1. San Diego, California: Academic Press; 2002. p. 127-140.

- <sup>54</sup> Teitelbaum SL. Bone resorption by osteoclasts. *Science* 2000; 289:1504-8.
- <sup>55</sup> 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.
- <sup>56</sup> 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).
- <sup>57</sup> Halleen JM, Raisanen S, Salo JJ, Reddy SV, Roodman GD, Hentunen TA *et al*. Intracellular fragmentation of bone resorption products by reactive oxygen species generated by osteoclastic tartrate-resistant acid phosphatase. *J Biol Chem* 1999; 274:22907-10.
- <sup>58</sup> Riancho JA, Gutiérrez GE. Factores Reguladores de la Resorción Ósea. *Rev Metab Oseo Min* 2003; 1:51-66.
- <sup>59</sup> 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.
- <sup>60</sup> Canalis E, McCarthy TL, Centrella M. The role of growth factors in skeletal remodelling. *Endocrinol Metab Clin North Am* 1989; 18:903-18.
- <sup>61</sup> 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.
- <sup>62</sup> Raisz LG. Bone cell biology: New approaches and unanswered questions. *J Bone Miner Res* 1993; 8:457-65.
- <sup>63</sup> 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.
- <sup>64</sup> 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.
- <sup>65</sup> 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.
- <sup>66</sup> 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; 13:631-6.
- <sup>67</sup> Cochick WS, Clemmons DR. The insulin-like growth factors. *Ann Rev Physiol* 1993; 55:131-53.
- <sup>68</sup> 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.
- <sup>69</sup> Mohan S, Baylink DJ. Bone growth factors. *Clin Orthop* 1991; 263:30-48.
- <sup>70</sup> Horowitz MC, Lorenzo JA. Local regulators of bone: IL-1, TNF, lymphotoxin, Interferon- $\gamma$ , 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*. 2º edition. Volume 2. San Diego, California: Academic Press; 2002. p. 961-978.
- <sup>71</sup> 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.
- <sup>72</sup> Kawaguchi H, Pilbeam CC, Harrison JR, Raisz LG. The role of prostaglandins in the regulation of bone metabolism. *Clin Orthop* 1995; 313:36-46.

- <sup>73</sup> Offenbacher S, Heasman PA, Collins JG. Modulation of host PGE2 secretion as a determinant of periodontal disease expression. *J Periodontol* 1993; 64:432-44.
- <sup>74</sup> Canalis E, Economides AN, Gaggero E. Bone morphogenetic proteins, their antagonists, and the skeleton. *Endocr Rev* 2003; 24:218-35.
- <sup>75</sup> Hofbauer LC, Heufelder AE. Role of receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand and osteoprotegerin in bone cell biology. *J Mol Med* 2001; 79:243-53.
- <sup>76</sup> Branemark PI, Zarb GA, Albrektsson T. Prótesis Tejido-Integrada. La oseointegración en la Odontología Clínica. Barcelona: Quintessence; 1999. p.11-13.
- <sup>77</sup> 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.
- <sup>78</sup> 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.
- <sup>79</sup> Stefflik 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.
- <sup>80</sup> Institute of Laboratory Animal Resources, Commission on Life Sciences. Guide for the care and use of laboratory animals. Washington DC: National Academy Press; 1996.
- <sup>81</sup> 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).
- <sup>82</sup> Herrero Climent M, Herrero Climent F. Atlas de procedimientos clínicos en implantología oral. Madrid: TRP Ediciones; 1995.
- <sup>83</sup> 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.
- <sup>84</sup> 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.
- <sup>85</sup> Eriksen EF, Axelrod DW, Melsen F (eds.). *Bone histomorphometry*. New York: Raven Press; 1994.
- <sup>86</sup> 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; 14:312-21.
- <sup>87</sup> Block MS, Gardiner D, Almerico B, Neal C. Loaded Hydroxylapatite-coated implants and uncoated titanium-treated implants in distracted dog alveolar ridges. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol End* 2000; 89:676-85.
- <sup>88</sup> 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.
- <sup>89</sup> Cutando A, Gómez-Moreno G, Arana C, Muñoz F, López-Peña M, Stephenson J, Reiter RJ. Melatonin stimulates osteointegration of dental implants. *J Pineal Res* 2008; 45: 174-9

- <sup>90</sup> Pandi-Perumal SR, Trakht I, Srinivasan V, Spence DW, Poeggeler B, *et al.* The effect of melatonergic and non-melatonergic antidepressants on sleep: weighing the alternatives. *World J Biol Psychiatry* 2008; 4:1-13.
- <sup>91</sup> Korkmaz A, Sanchez-Barcelo EJ, Tan DX, Reiter RJ. Role of melatonin in the epigenetic regulation of breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 2008; Jul.
- <sup>92</sup> Pandi-Perumal SR, Trakht I, Srinivasan V, Spence DW, Maestroni GJ, *et al.* Physiological effects of melatonin: Role of melatonin receptors and signal transduction pathways. *Prog Neurobiol* 2008; 85:335-53.
- <sup>93</sup> Srinivasan V, Pandi-Perumal SR, Maestroni GJ, Esquifino AI, Hardeland R, Cardinali DP. Role of melatonin in neurodegenerative diseases. *Neurotox Res* 2005; 7:293-318.
- <sup>94</sup> Cutando A, Gomez-Moreno G, Arana C, Escames G, Acuña-Castroviejo D. Melatonin reduces oxidative stress because of tooth removal. *J Pineal Res* 2007;42:419-20.
- <sup>95</sup> Cutando A, Arana C, Gómez-Moreno G, Escames G, López A, Ferrera MJ, Reiter RJ, Acuña-Castroviejo D. Local application of melatonin into alveolar sockets of beagle dogs reduces tooth removal-induced oxidative stress. *J Periodontol.* 2007;78:576-83.
- <sup>96</sup> Mechin JA, Toury C. Action of melatonin on caries development in rats. *J Dent Res* 1976; 55:555.
- <sup>97</sup> Aras HC, Ekström J. Melatonin-evoked *in vivo* secretion of protein and amylase from the parotid gland of the anaesthetised rat. *J Pineal Res* 2008; Jul:1-9
- <sup>98</sup> Ferguson DB, Fort A. Circadian variations in calcium and phosphate secretion from human parotid and submandibular salivary glands. *Caries Res* 1973; 7:19-29.
- <sup>99</sup> Tepper G, Haas R, Milath G, Teller C, Zechner W *et al.* Representative marketing-oriented study on implants in the Austrian population. I. Level of information, sources of information and need for patient information. *Clin Oral Impl Res* 2003; 14:621-33.
- <sup>100</sup> Brunski JB. *In vivo* bone response to biomechanical loading at bone/dental implant interface. *Adv Dent Res* 1999;13: 99-119.
- <sup>101</sup> Tepper G, Haas R, Milath G, Teller C, Zechner W *et al.* Representative marketing-oriented study on implants in the Austrian population. II. Implant acceptance, patient-perceived cost and patient satisfaction. *Clin Oral Impl Res* 2003; 14:634-42.
- <sup>102</sup> 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; 81:206-12.
- <sup>103</sup> Mangano C, Perrotti V, Iezzi G, Scarano A, Mangano F, Piattelli A.. Bone response to modified titanium surface implants in nonhuman primates (*Papio ursinus*) and humans: histological evaluation. *J Oral Implantol.* 2008;34:17-24.
- <sup>104</sup> Cochran D, Oates T, Morton D, Jones A, Buser D, Peters F. Clinical field trial examining an implant with a sand-blasted, acid-etched surface. *J Periodontol.* 2007;78:974-82.
- <sup>105</sup> Anitua E, Orive G, Aguirre JJ, Andía I. Clinical outcome of immediately loaded dental implants bioactivated with plasma rich in growth factors: a 5-year retrospective study. *J Periodontol.* 2008;79:1168-76.
- <sup>106</sup> Gazzo 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.
- <sup>107</sup> Tresguerres IF, Clemente C, Donado M, Gómez-Pellico L, Blanco L, *et al.* Local administration of growth hormone enhances periimplant bone reaction in a osteoporotic rabbit model. *Clin Oral Implants Res* 2002; 13:631-6.

- <sup>108</sup> Takechi M, Tatehara S, Satomura K, Fujisawa K, Nagayama M. Effect of FGF-2 and melatonin on implant bone healing: a histomorphometric study. *J Mater Sci Mater Med* 2008; 19: 2949-52.
- <sup>109</sup> Canalis E, Centrella M, McCarthy T. Effects of basic fibroblast growth factor on bone formation *in vitro*. *J Clin Invest* 1988; 81:1572-7.
- <sup>110</sup> Kawaguchi H, Nakamura K, Tabata Y, Ikada Y, Aoyama I, Anzai J *et al*. Acceleration of fracture healing in nonhuman primates by fibroblast growth factor-2. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; 86:875-80.
- <sup>111</sup> Koyama H, Nakade O, Takada Y, Kaku T *et al*. 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.
- <sup>112</sup> Bradford Hill A. The environment and disease: Association or causation? *Proc R Soc Med* 1965;58:295-300.
- <sup>113</sup> Reiter RJ, Tan DX, Kim SJ, Qi W. Melatonin as a pharmacological agent against damage to lipids and DNA. *West Pharmacol Soc* 1998; 41:229-36.
- <sup>114</sup> Yamamoto HA, Tang HW. Preventive effect of melatonin against cyanide-induced seizures and lipid peroxidation in mice. *Neurosci Lett* 1996; 207(2):89-92.
- <sup>115</sup> Taysi S, Ucuncu H, Elmastas M, Aktan B, Buyukokuroglu ME. Effect of melatonin on lipid peroxidation, glutathione and glutathione-dependent enzyme activities in experimental otitis media with effusion in guinea pigs. *J Pineal Res* 2005; 39:283-6
- <sup>116</sup> Gitto E, Tan DX, Reiter RJ, Karbownik M, Manchester LC, Cuzzocrea S *et al*. Individual and synergistic actions of melatonin: Studies with vitamin E, vitamin C, glutathione and desferoxamine in liver homogenates. *J Pharm Pharmacol* 2001; 53:1393-1401.
- <sup>117</sup> Martin M, Macías M, Escames G, León J, Acuña-Castroviejo D. Melatonin but not vitamins C and E maintains glutathione homeostasis in t-butyl hydroperoxide-induced mitochondrial oxidative stress. *FASEB J* 2000; 14:1677-9.
- <sup>118</sup> 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; 11:17-21.

† Imagen cedida con autorización expresa de los autores.