

**Tesis Doctoral**  
**Doctorado internacional**  
**Área de Medicina Clínica y Salud Pública**



**PERIODONTAL DISEASE. DIABETES  
AND MELATONIN. BONE  
RESORPTION MARKERS.**

**UNIVERSIDAD DE GRANADA**  
**FACULTAD DE MEDICINA**

**MARÍA HERRERO FERNÁNDEZ**  
**2013**

Editor: Editorial de la Universidad de Granada  
Autor: María Herrero Fernández  
D.L.: GR 714-2014  
ISBN: 978-84-9028-870-2

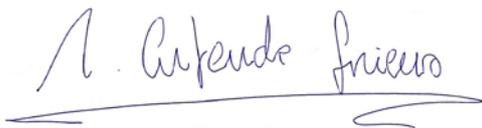
**DEDICATORIA:** A mi hija Carlota.

**CERTIFICACIONES:**

**Dr. ANTONIO CUTANDO SORIANO**, Profesor Titular del Departamento de Estomatología de la Facultad de Odontología de la Universidad de Granada, certifica que:

D<sup>a</sup>. María Herrero Fernández, Licenciada en Cirugía y Medicina, ha realizado bajo mi dirección el presente trabajo de investigación, titulado: “Periodontal disease. Diabetes and Melatonin. Bone resorption markers” que ha sido objeto de su Tesis Doctoral, reuniendo las condiciones necesarias para optar al grado de Doctor.

Granada,

A handwritten signature in blue ink that reads "A. Cutando Soriano". The signature is written in a cursive style and is underlined with a single horizontal stroke.

El director,

Fdo.: Antonio Cutando Soriano

La interesada,

Fdo.: María Herrero Fernández

**Dr. SALVADOR ARIAS SANTIAGO,** Doctor Europeus en Medicina por la Universidad de Granada y Profesor Colaborador Extraordinario de la Facultad de Medicina de la Universidad de Granada, certifica que:

D<sup>a</sup>. María Herrero Fernández, Licenciada en Cirugía y Medicina, ha realizado bajo mi dirección el presente trabajo de investigación, titulado: “Periodontal disease. Diabetes and Melatonin. Bone resorption markers” que ha sido objeto de su Tesis Doctoral, reuniendo las condiciones necesarias para optar al grado de Doctor.

Granada,



El director,

Fdo.: Salvador Arias Santiago

La interesada,

Fdo.: María Herrero Fernández

**TITULO:**

**PERIODONTAL DISEASE. DIABETES AND MELATONIN.  
BONE RESORPTION MARKERS.**

**ÍNDICE:**

A. INTRODUCCION.....	Pág.11
1. Qué es la enfermedad periodontal. Definición.....	Pág.11
1.1. Etiopatogenia.....	Pág.12
1.1.1 Flora normal.....	Pág.12
1.1.2 Flora periodontopática.....	Pág.13
1.2. Clasificación.....	Pág.18
1.3. Diagnóstico.....	Pág.21
1.4. Manejo clínico.....	Pág.22
2. Enfermedad periodontal en el paciente diabético.....	Pág.22
3. Melatonina.....	Pág.25
3.1. Estructura. Metabolismo y secreción.....	Pág.26
3.2. Receptores de melatonina.....	Pág.27
3.3. Propiedades antioxidantes de la melatonina.....	Pág.28
3.4. Propiedades sobre el sistema inmune.....	Pág.28
3.5. Melatonina y enfermedad periodontal.....	Pág.29
3.6. Farmacología de la melatonina.....	Pág.30
4. RANKL, RANK y OPG.....	Pág.32
4.1. Estructura y función.....	Pág.32
4.2. Complejo OPG/RANKL/RANK.....	Pág.34

4.3. RANKL y los inmunoreceptores.....	Pág.34
4.4. RANK/RANKL/OPG en otras enfermedades.....	Pág.36
5. Proteínas morfogenéticas óseas (BMPs).	
5.1. Definición.....	Pág.37
5.2. Estructura y clasificación.....	Pág.38
5.3. Funciones.....	Pág.39
5.3.1. Regeneración periodontal.....	Pág.41
6. Fosfatasa ácida y fosfatasa alcalina.....	Pág.43
7. Osteocalcina.....	Pág.44
B. HIPÓTESIS.....	Pág.44
C. OBJETIVOS.....	Pág.44
D. MATERIAL Y MÉTODOS.....	Pág.44
1. Medición de índices gingivales y niveles de inserción.....	Pág.46
2. Intervención de la Melatonina.....	Pág.48
3. Recolección de saliva.....	Pág.48
4. Determinación de RANKL, OPG y Melatonina salivar.....	Pág.49
5. Determinación de Melatonina en plasma.....	Pág.49
6. Determinación de Fosfatasa Ácida, Fosfatasa Alcalina, Osteocalcina y Osteopontina.....	Pág.50
7. Análisis estadístico.....	Pág.51
8. Resultados.....	Pág.52
E. DISCUSIÓN.....	Pág.64

**ABREVIATURAS:**

AANAT.....	N-Acetyltransferasa.
BAT.....	Tejido adiposo marrón.
BMPs.....	Proteínas Morfogenéticas Óseas.
cAMP.....	AMPcíclico.
CPI.....	Índice Periodontal Comunitario.
DM1.....	Diabetes Mellitus tipo 1.
DM2.....	Diabetes Mellitus tipo 2.
EDTA.....	Ácido etilendiaminotetraacético.
ELISA.....	Enzyme linked immunoabsorbent Assay.
FcR $\gamma$ .....	Factor receptor común de la Subunidad $\gamma$ .
FCG.....	Fluido Clevicular Gingival.
HIOMT.....	Hydroxy-O- Methyltransferasa.
IFCC.....	International Federation of Clinical Chemistry.
IL.....	Interleukina.
LPJ.....	Periodontitis Juvenil Localizada.
LPS.....	Antígeno proteico de superficie.
LT.....	Leucotoxina.

MIN.....	Minutos.
MSCs.....	Células madre mesenquimales.
NAS.....	N- Acetyl Serotonina.
OPG.....	Osteoprotegerina.
OSCAR.....	Osteoclast associated receptor.
PMNs.....	Polimorfo nucleares.
RANK.....	Receptor activador del factor Nuclear Kappa-B.
RANKL.....	Receptor activador del factor Nuclear Kappa-B ligando.
RIA.....	Radio inmuno assay.
ROS.....	Especies Oxígeno Reactivas.
RPM.....	Revoluciones por minuto.
TGF.....	Factor de crecimiento Transformador.
TNF.....	Factor de necrosis tumoral.
UFC.....	Unidad Formadora de colonias.
WAT.....	Tejido adiposo blanco.

**RESUMEN:**

This cross-section study was designed to assess the effect of topical application of melatonin to the gingiva on salivary RANKL, osteoprotegrin (OPG) and melatonin levels as well as plasma melatonin in 30 patients with diabetes and periodontal disease and in a control group of 30 healthy subjects. Salivary RANKL and OPG were measured by enzyme-linked immunosorbent assay and salivary and plasma melatonin by radioimmunoassay using commercial kits. Periodontograms were performed using the Florida Probe®. Diabetic patients were treated with topical application of melatonin (1% orabase cream formula) once daily for 20 days. Patients with diabetes showed significantly higher mean levels of salivary RANKL than healthy subjects as well as significantly lower values of salivary OPG and salivary and plasma melatonin. After treatment with melatonin, there was a statistically significant decrease of the gingival index, pocket depth and salivary levels of RANKL, and a significant rise in salivary values of OPG. Changes of salivary OPG levels before and after topical melatonin treatment correlated significantly with changes in the gingival index and pocket depth.

Treatment with topical melatonin was associated with an improvement in the gingival index and pocket depth, a reduction in salivary concentrations of RANKL and increase in salivary concentrations of OPG, which indicates that melatonin has a favorable effect in slowing osteoclastogenesis, improving the quality of alveolar bone and preventing the progression of periodontal disease.

## **1. QUÉ ES LA ENFERMEDAD PERIODONTAL. DEFINICIÓN**

La enfermedad periodontal es un estado complejo que puede variar desde la gingivitis a la destrucción extrema del tejido de soporte dental. Aunque la infección bacteriana y la liberación de productos bacterianos tóxicos desencadenen una serie de procesos que conllevan al daño de los tejidos sanos, se encuentran implicados un número importante de acciones de la respuesta inmune del huésped. Sin embargo la etiopatogénesis y la fisiopatología de la enfermedad todavía no están aclaradas.

El término enfermedad periodontal agrupa a una serie de procesos patológicos que afectan a los tejidos de soporte de los dientes y que incluye desde la inflamación gingival hasta la destrucción de los tejidos de soporte periodontales, dando como resultado bolsas inflamatorias, recesiones gingivales, y pérdida de inserción clínica, cuyo resultado último puede llegar a ser la caída del diente (The American Academy of Periodontology 4<sup>th</sup> Edition, 2001).

Se denomina periodonto a los tejidos que rodean al diente y que les sirve de protección y soporte a éstos.

Las respuestas inflamatorias están divididas en dos grandes grupos **gingivitis** y **periodontitis**. La **gingivitis** es frecuente y se manifiesta clínicamente como un sangrado gingival y de tejidos blandos sin evidencia de pérdida de adhesión del diente al hueso alveolar ni pérdida de hueso. La **periodontitis o enfermedad periodontal destructiva**, ocurre cuando la respuesta inflamatoria inducida en el tejido, se traduce en una pérdida

de colágeno de adhesión entre el diente y el hueso, una pérdida de hueso alveolar y una eventual pérdida del diente. La pérdida de adhesión crea un espacio o bolsa entre el diente y el epitelio gingival opuesto, que puede llegar a una profundidad de más de 10mm.



La bolsa periodontal entre el diente y el epitelio gingival actúa como un ambiente favorable para la conservación de distintos tipos de bacterias, lo que constituye el avance de la placa hacia el bolsillo. Estas comunidades bacterianas son clasificadas como placa supragingival y subgingival en relación al nivel del margen de la encía. El crecimiento de microorganismos en la placa supragingival inicia la gingivitis.

La respuesta inflamatoria a estos microorganismos en el tejido gingival se traduce en una pérdida de tejido (Meikle MC, et al 1986). Esta pérdida de tejido es una respuesta secundaria a una respuesta normal del huésped a la penetración de la bacteria, a sus antígenos y enzimas dentro del tejido.

### 1.1. Etiopatogenia:

#### 1.1.1. La flora normal:

Con la erupción de los dientes, sólo aquellos organismos que pueden adherirse a la superficie dental, tienen la oportunidad de persistir y sobrevivir en los mismos. La mayoría de los seres humanos parecen tener entre su placa dental estreptococos, actinomyces y fusobacterias. Esta placa es la que aparece en la vida temprana del ser humano, ya que posteriormente la combinación de organismos adherentes al diente

como los estreptococos y actinomyces y los microorganismos como las fusobacterias capaces de congregarse múltiples especies, permite el desarrollo de una comunidad microbiana que incluye más de 300 especies en la edad adulta (Moore WEC, 1987.)

La existencia de anaerobios en la región bajo los márgenes gingivales queda explicada por el surco de 1-2mm existente alrededor de cada diente que permite la adhesión y motilidad de microorganismos protegidos de la acción de barrido de la lengua y del cepillado dental. La topografía de este lugar permite la retención de comida y la acumulación de placa. Una vez la placa se acumula, la fermentación bacteriana ocasiona una caída del potencial de oxidación-reducción, un cambio que favorece el crecimiento de microorganismos anaerobios. Las infecciones producidas por la placa bacteriana se manifiestan cuando las condiciones del ambiente que la rodea cambian, como ocurre con una frecuente ingesta de sacarosa que permite el sobrecrecimiento del *Streptococcus mutans* y del *Lactobacillus*, con el consecuente deterioro dental que produce la caries y/o gingivitis; o cuando una higiene dental inadecuada permite la dominancia de los anaerobios y la formación de flora periodontopática (Loesche WJ, 1993).

#### 1.1.2. Flora periodontopática.

Un número limitado de especies, con capacidad de ser cultivadas, pueden estar asociadas normalmente a la enfermedad periodontal, entre ellas se encuentran las *Porphyromonas gingivalis*, *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Treponema denticola*, *Prevotella intermedia*, *Fusobacterium nucleatum*, *Bacteroides forsythus*, *Selenomonas eubacterium*, *Eikenella corrodens*, *Campylobacter recta*, *Peptoestreptococcus* y *Pseudomonas especies*. La localización externa de la placa sugiere su virulencia para un organismo y su capacidad para invadir los tejidos y crear una respuesta en el huésped. Es raro que esta respuesta se traduzca en una formación de un absceso o necrosis del tejido. Se puede detectar una respuesta serológica a muchas de las especies que componen la placa bacteriana, lo que detecta una activación del sistema inmune. El número de bacterias ubicadas a nivel de una bolsa periodontal está alrededor de 10 a 50 millones de UFC (unidades formadoras de colonias). El huésped se defiende de esta carga secretando un trasudado tisular llamado Fluido Crevicular Gingival (FCG). En el FCG existen grandes cantidades de neutrófilos polimorfos nucleares, que

encuentran y fagocitan la bacteria rápidamente, creando una reacción oxidativa (Loesche WJ, et al 1998). También se encuentran anticuerpos específicos contra las especies de la placa bacteriana, factores del complemento y moléculas antibacterianas como  $\alpha_2$  –macroglobulina, los cuales ayudan a la función de los PMNs (Polimorfos nucleares) contra la actividad bacteriana. Además, las células epiteliales gingivales presentan un alto *turn-over*, eliminando con ellas su carga bacteriana cuando entran en apoptosis. Con lo que, para que un organismo sea periodontopático, sus productos deben de atravesar el flujo de GCF, escapando así a los efectos de los PMNs y del sistema inmune del individuo. (Alaluusua S, et al 1991).

De estos mediadores, los que se han visto más asociados con la enfermedad periodontal son:

- **Interleukina 1 (IL-1):** es una citoquina pro-inflamatoria sintetizada por macrófagos, monocitos, linfocitos, células vasculares, células epidérmicas y fibroblastos. Tiene una actividad inmune, inflamatoria, de lisis y homeostasis de tejidos. Su exceso de producción local incrementa la reabsorción ósea, estimulando además al factor de necrosis tumoral alfa (TNF-  $\alpha$ ) en acción sinérgica permitiendo la llegada de células inflamatorias a los lugares de la infección.

Existen dos formas, la IL-1  $\alpha$  y la IL-1 $\beta$  siendo la segunda más potente que la primera.

- **Interleukina 6 (IL-6):** citoquina pro-inflamatoria producida por monocitos, fibroblastos, células endoteliales, macrófagos, linfocitos B, linfocitos T y queratinocitos. Una de sus funciones principales es la activación final de las células y la proliferación de células plasmáticas, dando como resultado un aumento en la producción de anticuerpos no específicos y de IL-1. También se sugiere que tiene un papel importante en la regulación local del “*turnover*” óseo, estimulando la formación de osteoblastos, y parece ser esencial en la pérdida ósea por deficiencia de estrógeno.
- **Interleukina 8 (IL-8):** mediador pro-inflamatorio producido por fibroblastos, linfocitos, células endoteliales, y por monocitos en respuesta a lipopolisacáridos bacterianos, IL-1 y TNF-  $\alpha$ . Tiene una actividad quimioatrayente y de activación

sobre los neutrófilos, induciendo su extravasación a la zona de la inflamación. También produce atracción sobre linfocitos T.

- **Factor de necrosis tumoral alfa (TNF  $\alpha$ ):** factor producido principalmente por monocitos y macrófagos tras ser activados por los lipopolisacáridos de bacterias periodontopatógenas tipo gram(-). Una de sus actividades consiste en la inducción sobre el fibroblasto para la secreción de colagenasas y activar osteoclastos promoviendo la reabsorción de hueso y cartílago. También estimula la síntesis de IL-1 y PGE2 en macrófagos latentes. Posee una acción sinérgica con la reabsorción ósea de la IL-1.
- **Factor de crecimiento transformante beta (TGF  $\beta$ ):** Mediador anti-inflamatorio, es el inhibidor de crecimiento más potente para fibroblastos, células epiteliales, células endoteliales y linfocitos. Su acción es la de estimular la síntesis de los componentes del tejido conectivo como colágeno, fibronectina, proteoglicanos, glicosaminoglicanos, osteonectina y osteopontina.

Este sistema de defensa es más que apropiado para proteger al huésped de una invasión, pero puede dar como resultado una respuesta inflamatoria. Esta respuesta, causa una pérdida de tejidos, si existe una excesiva penetración bacteriana. Bajo condiciones normales, aquellas bacterias que penetran en el epitelio gingival son destruidas, pero sus componentes celulares se encuentran disponibles como antígenos y como estímulo para la respuesta inflamatoria. Se pueden encontrar en gente muy joven anticuerpos serológicos para *P.gingivalis* y *A. actinomycetemcomitans* (Loesche WJ, 1993). La reacción de estos anticuerpos a los componentes bacterianos en el tejido conectivo del periodonto puede provocar una respuesta inflamatoria, activando monocitos, macrófagos, y PMNs. Estas células secretarán prostaglandinas, interleucinas como IL-1 y factor de necrosis tumoral  $\alpha$  ocasionando que los fibroblastos e incluso los queratinocitos destruyan algo de la matriz del tejido conectivo, que los mismos habían creado con anterioridad (Meikle MC, et al 1986).

Aunque el número de bacterias que se encuentran en relativo contacto constante con el epitelio oral es alto, el actual peso de la placa sobre los dientes es quizá sólo de 10-20mg, no es una cantidad muy grande cuando se considera que el 99% o más de esta carga antigénica nunca entrará en el tejido ni contactará con el sistema inmune. La

importancia de los antígenos de la placa en la estimulación del sistema inmune está demostrada por el hallazgo de altos títulos en el suero de anticuerpos contra el *P.gingivalis* y *A. actinomycetemcomitans*. Estos son reducidos simplemente desbridando la superficie del diente de la placa visible (Nakagawa T, et al 1990).

Los organismos periodontopáticos *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis*, y *T. denticola* tienen en común la habilidad de penetrar el epitelio gingival y de presentar sus endotoxinas, componentes activos inmunológicos, enzimas citotóxicos y moléculas directamente a las células inflamatorias del huésped. Esta habilidad podría ser la que distingue estas especies gram-negativas de otras especies que habitan la placa subgingival.

El **Actinobacillus actinomycetemdomitans** se localiza en aquellos dientes que erupcionan en la boca alrededor de los 6 años de vida, los primeros molares y los incisivos. Y ha sido presuntamente mostrado como agente etiológico de una rara entidad conocida como periodontitis juvenil localizada (LPJ), que ocurre entre adolescentes, con una prevalencia de 1 cada 1000 (Nakagawa T, et al 1990).

*A. actinomycetemcomitans* es adquirido en la edad temprana, su prevalencia en la placa disminuye con la edad y posee un amplio rango de factores con potencial virulento in vitro (Nakagawa T, et al 1990) (Alalususua S, et al 1991)

*P. gingivalis* es una de las especies más virulentas dentro del grupo de bacterias Gram Negativas y la más comúnmente asociada con la periodontitis del adulto. *P. Gingivalis* es un bacilo Gram negativo, anaerobio, ampliamente reconocido como un factor predominante en la periodontitis en humanos.

Este patógeno posee mecanismos de protección contra el medio ambiente para superar el estrés oxidativo generado por la liberación o degranulación de neutrófilos ante la presencia de toxinas generadas por especies reactivas al oxígeno.

La opsonización de *P. gingivalis* con anticuerpos específicos de alta afinidad, facilita su muerte a manos de los neutrófilos, aunque la producción de anticuerpos en la periodontitis parece ser de baja afinidad y es cuestionable su valor de protección.

Se sugiere que la *P. Gingivalis* desarrolla un sistema complejo para evadir varios puntos de control del sistema inmune innato. El patógeno a través de sus gingipainas y por las

fimbrias y otros factores que le permiten una mayor supervivencia en un medio como el surco gingival, parece ser capaz de manipular los mecanismos innatos de reconocimiento. Este germen encuentra refugio en ambientes relativamente seguros, elude los factores del complemento y en general de forma activa puede modificar la respuesta inmune de manera que favorezca su persistencia en el huésped (Alaluusua S, et al 1991).

El *Treponema denticola* es difícil aislar las espiroquetas de las muestras de placa. *T. denticola* posee muchos de los enzimas proteolíticos que generan muchos de los productos normalmente asociados a la virulencia de *P.gingivalis*. *T. denticola*, degrada fibronectina y queratina, y produce phospholipasa C y un enzima *trypsin-like*. Las espiroquetas se observan frecuentemente en el tejido gingival produciendo una actividad proteolítica que origina numerosos componentes que pueden penetrar el epitelio gingival y desencadenar una respuesta inflamatoria. Como resultado de esta actividad proteolítica, *T. denticola* produce una gran cantidad de componentes como H<sub>2</sub>S, mercaptanos, NH<sub>4</sub> y ácidos grasos volátiles.

Todo esto sugiere que entre los microorganismos periodontopatógenos, posiblemente los únicos factores de virulencia manifiestos sean la leucotoxina en *A. actinomycetemcomitans* y la enzima *trypsin-like* en *P. gingivalis* y *T. denticola*. Esta ausencia relativa de factores de virulencia es compatible con la cronicidad, la naturaleza progresiva lenta de la enfermedad periodontal y la rareza de los episodios de pérdida rápida de tejidos circundantes (Loesche WJ, 1993).

Existen determinados estados metabólicos o patologías que además de periodontitis presentan otras manifestaciones clínicas orales asociadas a esta última en su desarrollo. En esta tabla se reflejan dichas patologías y cómo afectan a la cavidad oral en conjunción con la enfermedad periodontal.

FACTORES CAUSALES	PATOLOGÍA MANIFIESTA JUNTO CON LA PERIODONTITIS
<p>Déficits nutricionales:</p> <p>Vit B1 (Beriberi)</p> <p>Riboflavina (Hiporiboflavinosis)</p> <p>Niacina (Pellagra)</p> <p>Ácido Fólico</p> <p>Vit C (Escorbuto)</p>	<p>Hipersensibilidad de la mucosa oral. Vesículas diminutas (simulando herpes) localizadas bajo la lengua, en el paladar, erosión de la mucosa oral.</p> <p>Glositis. Queilitis angular.</p> <p>Glositis; gingivitis; estomatitis generalizada; gingivitis ulcerativa aguda necrotizante.</p> <p>Estomatitis generalizada; glositis ulcerativa; queilitis.</p> <p>Hemorragia, encía edematosa; pérdida de dientes debido a la disminución en la formación de hueso.</p>
<p>Alteraciones endocrinas</p> <p>Hiperpituitarismo</p> <p>Hipopituitarismo</p> <p><b>Diabetes Mellitus</b></p>	<p>Markado sobrecrecimiento del proceso alveolar que origina e incrementa el tamaño de las arcadas dentarias y aumenta el espacio interdental.</p> <p>Disminuye el crecimiento de la arcada dental con la consecuente malposición dentaria.</p> <p><b>Tipo I (no controlada): queilosis con tendencia a la sequedad y agrietado; sensación de quemazón en mucosa oral; xerostomía (sequedad de la boca debido a la disminución de la salivación); alteraciones en la flora oral, con predominancia de Cándida Albicans, Streptococo y Staphilococo Hemolítico; periodontoclasia diabética (cambios degenerativos); crecimiento gingival; pólipos sésiles o pediculados (unidos débilmente a las papilas); pérdida de dientes.</b></p>
<p>Alteraciones hematológicas</p> <p>Leucemia</p> <p>Anemia</p> <p>Anemia ferropénica</p> <p>Púrpura trombocitopénica</p> <p>Alteraciones inmunológicas</p>	<p>Gingivitis bacteriana.</p> <p>Palidez gingival.</p> <p>Glositis; úlceras en mucosa oral.</p> <p>Glositis.</p> <p>Gingivitis con úlceras orales.</p>
<p>Problemas cardiovasculares</p> <p>Arterioesclerosis</p> <p>Fallo cardíaco congestivo</p>	<p>Gingivitis asociada a problemas circulatorios.</p> <p>Gingivitis marginal severa con destrucción periodontal.</p>
<p>Exposición a tóxicos</p> <p>Intoxicación por bismuto</p> <p>Intoxicación por plomo</p> <p>Intoxicación por mercurio</p> <p>Exposición a Benceno</p>	<p>Gingivostomatitis ulcerativa; decoloración negrúcea de la encía.</p> <p>Cambio en la pigmentación de la encía; ulceración marginal de la encía.</p> <p>Ulceración gingival.</p> <p>Hemorragia gingival.</p>
<p>Alteraciones psicosomáticas</p>	<p>Apretar los dientes.</p> <p>Mordida y masticación excesiva de objetos extraños.</p> <p>Mordida de uñas.</p> <p>Abuso del tabaco.</p>

## 1.2. Clasificación:

Kinane y Lindhe, 2001 dividen la etiopatogenia de la gingivitis y la periodontitis en 3 estadios siguiendo la clasificación de Armitage, en donde los dos primeros se corresponderían con la **gingivitis** y la tercera con la **periodontitis**:

- 1 **Lesión inicial:** corresponde a una respuesta inflamatoria aguda y se observa entre los 4 y 7 días tras la acumulación de placa. Se localiza en la región del surco gingival y entre los tejidos afectados se encuentran una parte del epitelio de unión y la zona más coronal del tejido conectivo. Se caracteriza por la presencia de una infiltración neutrófila atraída quimiotácticamente por los constituyentes bacterianos y la acción vasodilatadora de sus productos. También se observa un infiltrado de linfocitos, predominantemente del tipo T y macrófagos en la periferia de la lesión. A nivel mucoso se observan cambios en las células epiteliales, alteraciones citopáticas de los fibroblastos, cambios en el tamaño y permeabilidad vascular y degradación del colágeno.
- 2 **Lesión establecida:** se produce tras pasar 2-3 semanas de la acumulación de placa, en la que hay una mayor inflamación. El área afectada es mayor que en la lesión inicial, hay una gran pérdida de colágeno, y el infiltrado se caracteriza por la presencia de células plasmáticas y linfocitos en la periferia.
- 3 **Lesión avanzada:** corresponde a la periodontitis propiamente dicha. Se diferencia por la pérdida de tejido de inserción, alterándose el ligamento periodontal y su unión con el cemento y reabsorción ósea. Histopatológicamente es parecida a la lesión establecida de la gingivitis, con una predominante presencia de células plasmáticas y una variación paulatina de los linfocitos que pasan a ser predominantemente del tipo B.

La periodontitis está clasificada de acuerdo a la **progresión (lenta o rápida)** y a la **edad de aparición (periodontitis juvenil o periodontitis del adulto)**. Otras formas incluyen periodontitis ulcerativa necrotizante y periodontitis refractaria.

- a. La periodontitis de **progresión lenta** incluye inflamación crónica de la encía con formación de bolsas periodontales y pérdida de hueso. Los signos y síntomas manifiestos son el aumento de movilidad de los dientes y la migración del proceso inflamatorio patológico.
- b. La periodontitis de **progresión rápida** puede ocurrir en edades tempranas (antes del final de la pubertad) o durante el período de individuo adulto. Los signos y síntomas están normalmente asociados con marcados cambios inflamatorios; a menudo hay

escasez de placa y cálculos asociados. Conforme la enfermedad progresa, se forman bolsas profundas con una pérdida rápida de hueso.

c. La periodontitis establecida de **forma temprana** también conocida como periodontitis juvenil, incluye lesiones avanzadas y destructivas en niños y adolescentes. Las formas más prevalentes son la periodontitis prepuberal y juvenil. Los signos y síntomas asociados son muy diversos, comenzando por malestar acentuado, dolor y hemorragia gingival, hipersalivación, halitosis y ulceraciones localizadas en la encía y las papilas interdentes.

d. La periodontitis **ulcerativa necrotizante** normalmente sigue a repetidos y largos episodios de gingivitis aguda necrotizante ulcerativa, y muestra como característica cráteres óseos interdentes. Sin embargo en casos avanzados, la enfermedad puede extenderse al tejido blando con el consecuente secuestro de hueso alveolar. A menudo la clínica asociada presenta linfadenopatía regional y dolor acentuado al tragar o al hablar. Su manejo clínico implica generalmente desbridar el tejido necrótico, lavado con povidona-yodada y antibioterapia sistémica.



*Figura 1. Clasificación de las enfermedades periodontales*

1.3. Diagnóstico:

Es muy importante el examen físico realizado al paciente junto con una buena historia clínica que recoja la salud general del paciente, enfermedades crónicas asociadas (especialmente cardiovasculares, hematológicas, endocrinas, gastrointestinales, infecciosas), cirugías previas (hemorragia, anestésicos, complicaciones infecciosas), la medicación que toma en el momento actual con posible repercusión sobre los tejidos orales (como anticoagulantes o corticoesteroides), exposición ocupacional, alergias y la historia social asociada al alcohol, abuso de drogas y/o tabaco.

El examen físico incluye: examen completo de la cavidad oral (labios, membranas mucosas, encía, suelo de la boca, lengua, paladar, orofaringe y calidad y cantidad de saliva). Un examen cuidadoso de los ganglios linfáticos de cabeza y cuello, inspección del color de los dientes, forma, tamaño, caries, mordida, defectos del desarrollo, formación anormal, erosiones, abrasiones, estabilidad y movilidad que a menudo reflejan un proceso de enfermedad. La movilidad dental está graduada en la movilidad de los dientes según su extensión: **Grado I**- levemente superior a la normal. **Grado II**- moderadamente mayor que la normal. **Grado III**- movilidad severa Facio-lingual o mesiodistal, en combinación con desplazamiento vertical (Carranza 1996). Una ligera percusión sobre el diente generando dolor, indica un área asociada a un proceso inflamatorio.

El examen periodontal debe ser sistemático. El estado periodontal debe ser evaluado siguiendo el Índice Periodontal Comunitario (CPI, Community Periodontal Index), de acuerdo a la siguiente tabla.

Grado	Condición Periodontal
0	No sangrado. No cálculo. No bolsa
1	Sangrado en margen gingival. No Cálculo. No bolsa

2	Presencia de cálculo sub o supragingival con o sin sangrado. No bolsa.
3	Presencia de bolsa patológica de 4-5mm con o sin sangrado y cálculo.
4	Presencia de bolsa patológica de 6mm o más con o sin sangrado y cálculo.

#### 1.4. Manejo Clínico:

El manejo clínico de un paciente con enfermedad periodontal dependerá del tipo y la severidad de la enfermedad. La periodontitis lentamente progresiva secundaria a gingivitis crónica o a enfermedades sistémicas, es de difícil control al desarrollo de complicaciones a largo plazo. Sin embargo, si es secundaria a fármacos como inmunosupresores (ciclosporina), anticonvulsivantes (fenitoína), hipotensores (nifedipino) y anticonceptivos orales, 3 miligramos al día con ácido fólico y la limpieza de la placa, es una terapia bastante efectiva. El mecanismo de acción en estos últimos precisa de un factor local (placa bacteriana) que genere inflamación y una hipersecreción de colágeno (Woodall I.R, 1993). La periodontitis rápidamente progresiva, debe ser tratada de forma inmediata y agresiva por especialistas en periodoncia y cirugía periodontal. El mejor tratamiento para la periodontitis ulcerativa necrotizante es el desbridamiento local usando solución de peróxido de hidrógeno al 1.5% durante 2-3 días, analgesia, nutrición adecuada, aumento de ingesta de fluidos, e higiene oral usando un cepillo de cerda suave. Si aparece signos o síntomas de extensión como la fiebre, se deben prescribir penicilinas tipo G o V, eritromicina o tetraciclina. Todos los pacientes deben estar en seguimiento por un especialista en salud periodontal.

## **2. ENFERMEDAD PERIODONTAL EN PACIENTES DIABÉTICOS:**

Se considera que la relación de la diabetes y la enfermedad periodontal es evidente. De hecho en distintos estudios se demuestra como la prevalencia y la severidad de la gingivitis es claramente más elevada en individuos con diabetes. Un 40% de los

diabéticos adultos padecen periodontitis en comparación con un 15% en no diabéticos. Ello conduce a considerar la diabetes como un factor de riesgo para el desarrollo de la enfermedad periodontal.

Epidemiológicamente en la DM1 (diabetes tipo 1) y en la DM2 (diabetes tipo 2), se presenta una mayor prevalencia de gingivitis y periodontitis que en los pacientes no diabéticos. La prevalencia de enfermedad periodontal se incrementa con la edad y con el tiempo de evolución de la diabetes. (Cianciola LJ et al, 1982). La mayoría de estudios coinciden en asociar la diabetes con una mayor prevalencia y severidad de la enfermedad periodontal. Se estima que tiene el doble de riesgo de padecer periodontitis en comparación con sus homólogos no diabéticos (Collin HL et al, 1998).

Aunque algunos estudios no han sido capaces de confirmarlo, la evidencia sugiere que la severidad y extensión de la peridontitis se asocia a un peor control metabólico determinado por la HbA1c. Este peor control se ha explicado en función de niveles elevados de IL-1 beta en el líquido crevicular. (Engebreston SP et al, 2006)

Recientemente, un metaanálisis muestra como los pacientes diabéticos tiene peor higiene bucal, mayor severidad de gingivitis medida por el índice gingival y mayor severidad de periodontitis (Khader YS et al, 2006).

- Mecanismos patogénicos que predisponen a la enfermedad periodontal en la diabetes.

Son varias las causas que favorecen el desarrollo de la enfermedad periodontal en la diabetes. El ambiente hiperglucémico favorece entre otros los siguientes procesos (Calderón A et al, 2008):

- La glicosilación no enzimática de las proteínas y el colágeno afectando su estabilidad y la integridad vascular.
- Lesiones en la membrana basal vascular disminuyendo su capacidad nutritiva.
- Deterioro de la función de los polimorfonucleares, lo que predispone a la infección.
- Afectación de los monocitos y macrófagos que dificultan la respuesta a la infección aguda y predisponen a la cronificación del proceso.

- Aumento en la síntesis de sustancias pro inflamatorias.

Se ha demostrado que la excreción de melatonina en la saliva corresponde al 30-31% de la melatonina en plasma (Moore S. et al, 1994). El organismo responde a la inflamación periodontal aumentando la producción de melatonina y por lo tanto, la disponibilidad de la misma en la cavidad oral. La melatonina participa en la restauración del hueso alveolar estimulando la proliferación de células de colágeno tipo I y modulando la actividad de los osteoclastos y osteoblastos (Moore S. et al, 1994).

Se ha demostrado que los linfocitos de pacientes con Diabetes Mellitus tipo I producen bajas cantidades de IL-2, y la respuesta a la melatonina y a la IL-2 también es menor en estos pacientes, lo que sugiere que las propiedades de inmunoestimulación y antiinflamación se encuentran también deprimidas en estos pacientes. Es importante destacar que los procesos de enfermedad periodontal establecen en dichos pacientes una reabsorción alveolar y ósea prematura (Maestroni GMJ, 2001).

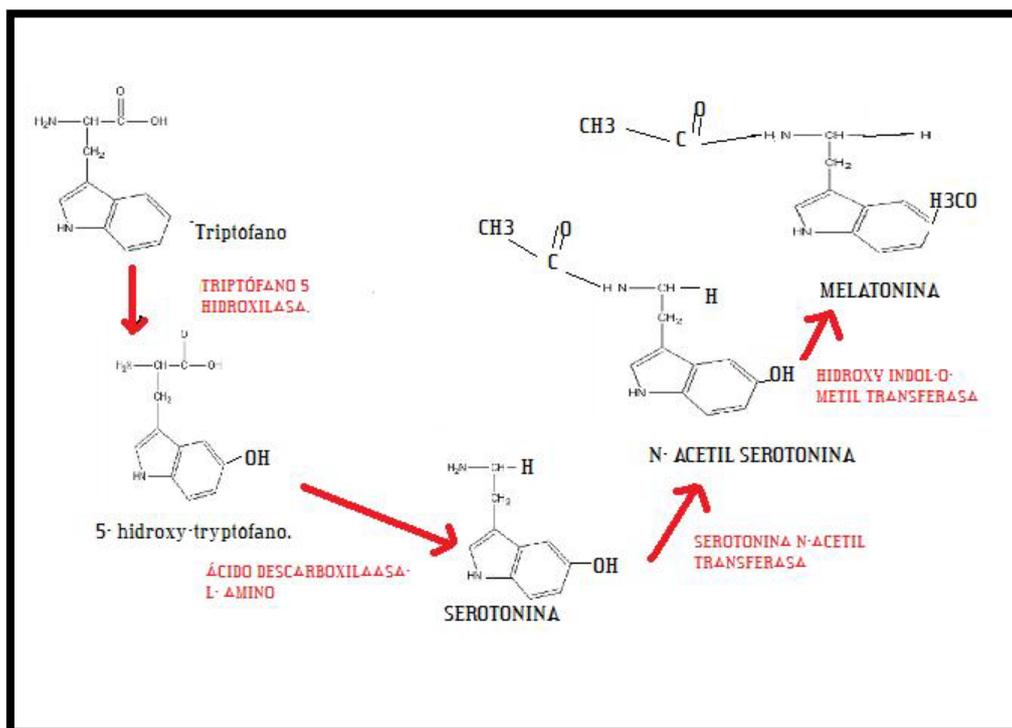
La melatonina en la cavidad oral incorpora tres grandes acciones: mejora la inmunidad, aumenta la proliferación de fibroblastos y las propiedades antioxidativas. También se ha demostrado que la melatonina ejerce un rol protector sobre el daño generado por los radicales libres en los pacientes diabéticos. Un incremento de melatonina en los pacientes diabéticos puede proteger a todos los órganos del daño oxidativo, especialmente a la cavidad oral (Cutando A, et al. 2003).

Complicaciones orales asociadas a la diabetes son pérdida de dientes, gingivitis, periodontitis, abscesos odontogénicos y lesiones de tejidos blandos como la lengua y la mucosa, sin olvidar un efecto colateral importante que es la reducción en la secreción de saliva, y la boca seca asociada, que se ve agravada por la edad y por ciertos fármacos. La diabetes puede ser considerada como un factor de riesgo para la hiposalivación, y esto podría atribuirse a cambios estructurales en las glándulas salivares consistentes en la atrofia acinar y en la infiltración adiposa. (Shrimali et al, 2011) observan que la hiposalivación es la manifestación oral más común en sujetos con elevados niveles de glucosa, seguida de la halitosis, periodontitis, síndrome de boca ardiente, candidiasis y alteraciones en el gusto. Un descenso en la secreción salivar promueve el acúmulo de la placa bacteriana, aumentando así el riesgo de la inflamación gingival y la infección. Esta xerostomía impide la llegada de la melatonina a través de la saliva, lo que agrava a su vez el problema periodontal. (Khovidhunkit SO et al, 2009).

### 3. LA MELATONINA.

La melatonina (N- acetyl-5- methoxytryptamina) se sintetiza principalmente en el pinealocito de la glándula pineal. También es sintetizada en otras localizaciones entre las que se encuentran la retina, el timo, médula ósea, epitelio respiratorio, piel, el cristalino y el intestino (Lerner AB, et al 1959) (Pandi- Perumal SR, et al 2006).

La melatonina pineal atraviesa libremente las membranas y se distribuye por todos los compartimentos corporales, a excepción de la melatonina retiniana que aparentemente actúa de forma local en los ojos (Garbarino- Pico E, et al 2006). La melatonina está implicada en la regulación de la fisiología y patología de multitud de procesos. Es considerada la hormona que regula el ritmo del ciclo circadiano día-noche y el biorritmo estacional. La melatonina modula la respuesta del sistema inmune, el peso corporal la reproducción, la inhibición del crecimiento tumoral y los efectos del *antijet-lag* entre otras acciones (Waterhouse J, et al 2007). Hay también evidencia de que la melatonina puede actuar como un potente antioxidante directo, como sustancia antienvjecimiento (Escames G, et al 2010).



1. Ciclo metabólico para la formación de melatonina.

2.1. Estructura, metabolismo y secreción:

La melatonina es una indolamina que contiene dos grupos funcionales, los que son decisivos no sólo para la unión al receptor, sino también para la plasticidad dada a la molécula para entrar en cualquier compartimento celular o fluido corporal. Gracias a su solubilidad en lípidos la melatonina pasa fácilmente por difusión desde la circulación periférica a otras células o fluidos. En suero, el 70% de la melatonina está unida a albúmina y el 30% remanente difunde en los tejidos de alrededor (Hardeland R, et al 2006).

El triptófano y la serotonina son precursores de la melatonina. Dos enzimas participan en su síntesis: **N- Acetyltransferasa (AANAT)**, la cual convierte la serotonina en N-Acetyl serotonina (NAS), y la **hydroxy- O- Methyltransferasa (HIOMT)**, la cual convierte NAS en melatonina (Figura 1). La regulación de la síntesis de la melatonina esta controlada por el ciclo día-noche, que actúa activando a través del hipotálamo anterior a los axones de las células ganglionares de la retina que se encuentran en el nervio óptico y forma el tracto retino-hipotalámico. El núcleo supraquiasmático esta conectado con la glándula pineal a través del núcleo paraventricular y las neuronas simpáticas del preganglionar.

La norepinefrina liberada de fibras del sistema simpático postganglionar a la membrana del pinealocito estimula sus adrenoceptores llevando a la formación de cAMP y de otros mensajeros secundarios, lo cual estimula la expresión y la actividad de AANAT. (Konturek SJ, et al 2007).

En vertebrados no mamíferos este enzima parece estar directamente controlado por los genes del ciclo circadiano en la glándula pineal (Hardeland R, et al 2006).

La secreción de melatonina tiene un ritmo *típicamente nocturno*. Durante la noche la síntesis y secreción de melatonina son estimuladas, alcanzando un valor pico (80-150pg/ml) entre media noche y las 3 de la madrugada, mientras que esta concentración durante el día es baja (10-20pg/ml) (Dziegiel P, et al 2008).

Una vez sintetizada en la glándula pineal, la melatonina es secretada a la sangre y al líquido cerebroespinal y alcanza otros fluidos corporales como puede ser la bilis, la

saliva, el semen, el líquido del folículo ovárico y líquido amniótico. Pequeñas cantidades de melatonina se excretan en la orina.

La vida media de la melatonina en suero ha sido calculada en el rango de 30 a 50 min (Lane EA&Moss HB, 2008). La facilidad para la síntesis de melatonina es bastante constante en una persona dada, pero existe una gran variabilidad entre los diferentes individuos. Existe evidencia de que la capacidad de secreción de melatonina disminuye con la edad en los mamíferos incluyendo a los humanos. Los niveles en suero de melatonina son muy bajos en las primeras semanas de vida, sin variaciones diurnas. A los 6 meses de vida aparece el ritmo típico de secreción diurna, alcanzando el máximo nivel entre los 3 y 6 años de vida. Durante la maduración sexual se aprecia un descenso marcado de la secreción de melatonina. A los 40-50 años, desciende la síntesis diaria de melatonina y después de los 70 años el ritmo diurno de secreción de melatonina prácticamente desaparece en la mayoría de los individuos (Dziegiel P, et al 2008). Parece existir una variación estacional en la secreción de melatonina en humanos, siendo los niveles superiores en invierno con respecto al verano (Vijayalaxmi, et al 2004).

Se pensaba que el catabolismo de la melatonina era casi exclusivo de la P-450 monooxigenasa hepática, seguida de la conjugación de la resultante 6-Hydroxi-melatonina para dar el principal metabolito urinario el 6-sulfatoxy-melatonina. Esto ocurriría con la hormona circulante (Hardeland R, 2009).

### 3.2. Receptores de Melatonina:

La mayoría de las acciones de la melatonina están mediadas por receptores de membrana y receptores nucleares que corresponden a miembros huérfanos de la superfamilia de receptores nucleares RZR/ROR. Tres subtipos de receptores de melatonina en mamíferos han sido propuestos y clonados. Dos de ellos, MT1 y el MT2, son miembros de la familia de la pareja de receptores del 7-transmembrana G-protein. (GPCR). Estos dos receptores están clasificados como únicos subtipos basados en su estructura molecular y localización cromosómica. Ambos pertenecen a la clase A del grupo de las Rodopsin-like GPCRs. El gen MTRN1A para el receptor MT1 está localizado en la posición 4q35-1 y el gen MTNR1B para la síntesis del receptor MT2

tiene un lugar potencial de glicosilación en el mismo sitio. Ambos receptores controlan señales a través de la inhibición de la formación de cAMP y de la actividad de la protein quinasa A y los efectos sobre la fosfolipasa A2 y C, en los canales de calcio y potasio (Leon J, et al 2004). El tercer receptor MT3 es un enzima identificado como una quinona reductasa 2 (QR2). Existe muy poca información sobre los receptores nucleares de melatonina. Otro receptor relacionado con la melatonina es el GPR50, ha sido encontrado en distintas especies incluida la humana. Mel1c, fue el primer receptor descubierto, es un subtipo no expresado en mamíferos. Existe alguna evidencia de que la expresión de receptores de melatonina presentan variación circadiana (Park YJ, et al 2007).

### 3.3. Propiedades antioxidantes de la melatonina:

Existen numerosas evidencias de que la melatonina es la mayor consumidora de moléculas reactivas basadas en oxígeno y nitrógeno. La melatonina provoca este efecto en concentraciones fisiológicas y farmacológicas. Muchos de sus metabolitos pueden detoxificar radicales libres y sus derivados (Tan DX, et al 2007).

Los beneficios antioxidantes de la melatonina se han visto en pacientes con artritis reumatoide (Forrest CM, et al 2007), mujeres con infertilidad (Tamura H, et al 2008) y en pacientes mayores con hipertensión primaria esencial.

### 3.4. Propiedades sobre el sistema inmune:

La relación entre la melatonina y el sistema inmune en diferentes especies, incluyendo a los humanos ha sido documentada (Karasek M, et al 2006). La actividad de las células natural killer y su producción están aparentemente aumentadas por la administración de melatonina tanto en humanos como en ratones. Aunque muchos estudios han implicado a la melatonina como un regulador positivo del sistema inmune, otros han incluso sugerido que la melatonina podría actuar como un agente antiinflamatorio a través de la inhibición de la respuesta del sistema inmune. El papel antagonista de la melatonina en la inflamación crónica induce la supervivencia de los leucocitos y bloquea sus propiedades oxidativas, por lo tanto, la oxidación (Radogna F, et al 2010).

### 3.5. Propiedades sobre la enfermedad periodontal:

La melatonina difunde pasivamente hacia la saliva vía el torrente sanguíneo, y la melatonina salivar puede ser determinada con fiabilidad. El tejido periodontal es destruido en el curso de una periodontitis por una respuesta inmunológica desproporcionada hacia el agente causal, una bacteria. Una consideración importante en la enfermedad periodontal es la creación de radicales libres, algunos de los cuales derivan de las bacterias orales en sí mismas, otras originadas por la respuesta inmune inducida. Se sugiere que el aumento de especies de nitrógeno y oxígeno reactivas en la enfermedad periodontal es el responsable de la lesión oxidativa en el tejido periodontal. El aumento de la producción de radicales libres coexiste con un descenso en la defensa antioxidativa. La melatonina en este contexto posee dos funciones: a) su capacidad para eliminar radicales libres, ejerciendo así una acción antioxidante (que sobrepasa claramente la capacidad antioxidante de las vitaminas C, E y del coenzima Q, (Baydas G, et al. 2002) y b) el efecto protector de la melatonina en situaciones de inflamación, estimulando la regeneración ósea, favoreciendo la producción de colágeno tipo I y modulando la actividad osteoblástica y osteoclástica (Otrowska Z, et al 2001).

La peroxidación lipídica es el mayor factor en la inducción y la progresión de la periodontitis crónica. En la enfermedad periodontal se producen abundantes especies oxígeno reactivas, caracterizadas por un aumento en los productos de peroxidación generados por la infiltración de la población de células polimorfonucleares, esto conduce a un aumento reactivo de los niveles de melatonina. (Gómez-Moreno G, et al 2007a). Esto no sólo estimularía al sistema inmune a través de la fracción de hormona en plasma, sino que también originaría una protección local por la fracción de melatonina salivar. Como resultado, el hueso y la población celular afectada por el proceso periodontal estarían protegidos de las especies oxigenadas reactivas originadas por el proceso inflamatorio, así como la reparación ósea estaría estimulada a través de la diferenciación de osteoblastos, la formación de hueso y la modificación de la actividad fibroblástica, siendo esta una teoría que tratamos de verificar en esta tesis. (Gómez-Moreno G, et al 2007a).

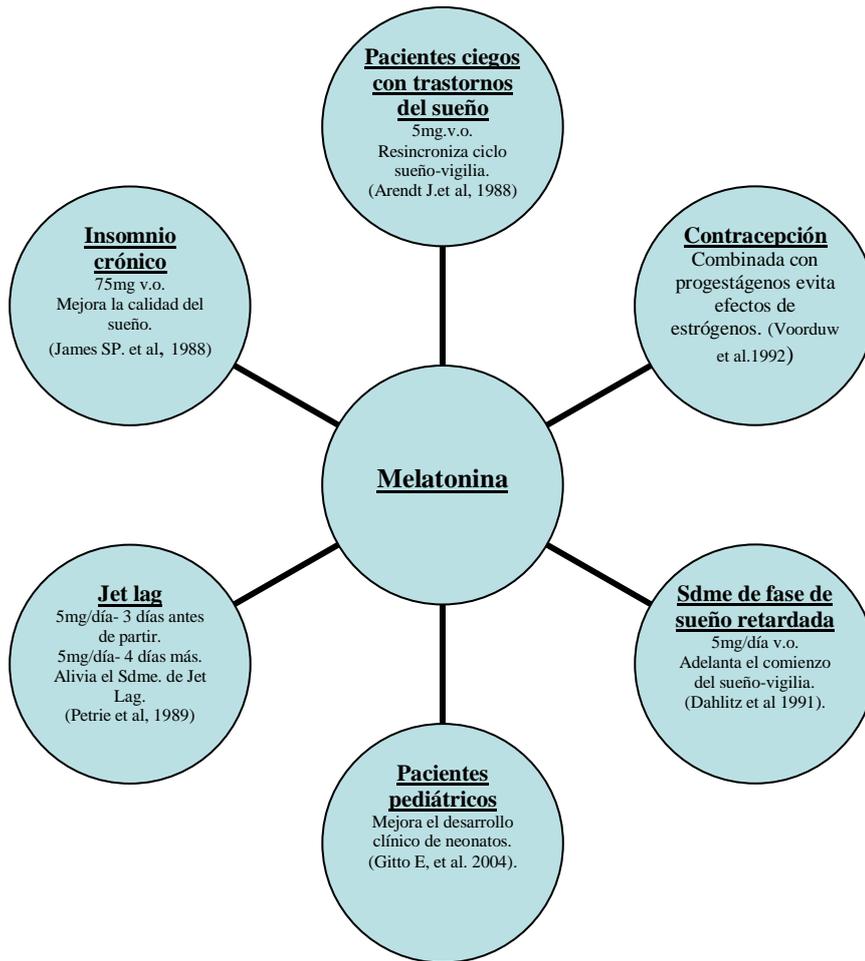
La melatonina media estos efectos a través de receptores localizados en los preosteoblastos, los cuales dirigen la producción de sialoproteína ósea, fosfatasa alcalina, osteopontina y osteocalcina en estas células, lo que acorta considerablemente el tiempo requerido para su diferenciación en osteoblastos maduros de 21 a 12 días. (Gómez-Moreno G, et al 2007a).

El receptor activador del factor nuclear-kappa B ligando (RANKL) es una proteína importante en la diferenciación y proliferación osteoclástica. La OPG, interfiere también con su potencial biológico inhibiendo a RANKL. RANKL y OPG juega un papel crítico en el desarrollo de la enfermedad periodontal, con destrucción ósea periodontal, resultado de una sobre regulación de RANKL, con baja regulación de OPG. La melatonina altera estos efectos modulando el sistema (OPG/RANKL). También, el tratamiento con melatonina estimula la proliferación, diferenciación y actividad de los osteoblastos. La melatonina actúa al nivel de los osteoclastos, inhibiendo la reabsorción ósea (Gómez Moreno G, et al. 2010).

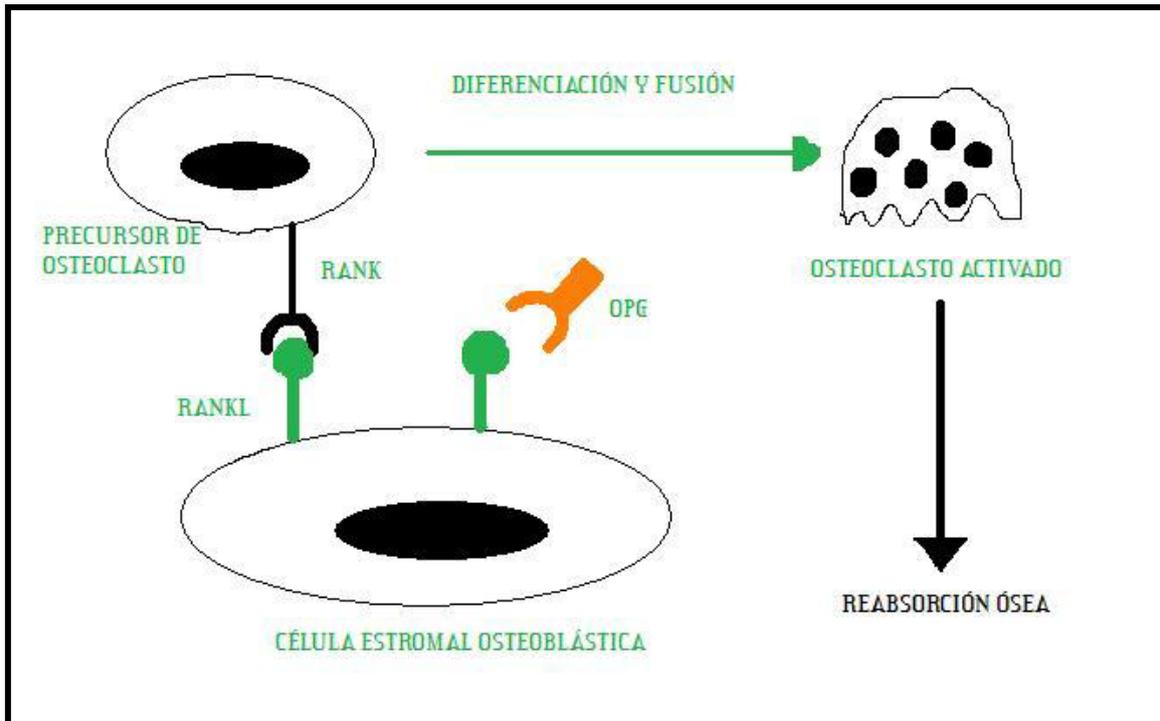
### 3.6. Farmacología de la melatonina:

La melatonina por **vía oral** ha sido utilizada en trastornos producidos por vuelos prolongados (*jet lag*), para trastornos del sueño en ciegos, en síndrome de sueño de fase retardada, en el insomnio crónico y en ancianos con insomnio. También se ha ensayado en combinación con la interleukina-2 recombinante para el tratamiento de tumores sólidos. Otras formas de administración son por vía intramuscular o intravenosa.

La melatonina se absorbe rápidamente tras la administración oral, alcanzando niveles picos a los 30 min-2 horas; aunque el metabolismo de primer paso es significativo, existe gran variabilidad interindividual con respecto a los niveles plasmáticos alcanzados. La vida media de eliminación después de una dosis oral es de 30 a 50min, tras una dosis i.v. en bolo, oscila entre 1.4 a 3 minutos. La mayor parte de una administración exógena de melatonina se excreta en la orina.



#### 4. RANKL, RANK y OPG.



##### 4.1. Estructura y función.

El sistema OPG/RANK/RANKL es el principal regulador de la acción biológica del osteoclasto.

El receptor RANK (receptor activador del factor nuclear kB) es un péptido que se expresa en osteoclastos maduros y preosteoclastos y cuya activación induce al osteoclasto a reabsorber hueso y a no morir por apoptosis. A su vez, el encargado de activar al receptor RANK es el ligando RANKL (ligando de unión al receptor activador del factor nuclear kB) que es una molécula que aparece anclada a la membrana del osteoblasto y 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.

**RANK** es un 616 péptido aminoácido, con un péptido señal 28 amino ácido y un dominio extracelular N-terminal, un dominio transmembrana pequeño de 21 amino ácidos y un dominio citoplasmático largo C-terminal. Tiene una semejanza parcial con

una porción del dominio extracelular del CD40 humano, miembro de la superfamilia de los TNFR. Es expresado en primer lugar en células del linaje de los macrófagos/ monocitos, incluyendo células preosteoclasticas, células T y B, células dendríticas y fibroblastos (Hsu H, et al 1999).

La osteoprotegerina (OPG) también llamada factor de inhibición de la osteoclastogénesis es un receptor del factor de necrosis tumoral (TNF) 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. (Kinane 2001).

Del mismo modo que RANKL, la **osteoprotegerina (OPG)** es una proteína receptora de la superfamilia de receptores de TNF, que es sintetizada fundamentalmente por los osteoblastos y las células estromales de la médula ósea. Es sintetizada como 401 péptido amino ácido, con un 21 amino ácido propéptido que se dividió, obteniendo como resultado una proteína madura de 380 amino ácidos. En contraste con todas los demás miembros de la superfamilia de receptores TNF, la OPG carece de transmembrana y dominios citoplasmáticos y es secretada como una proteína soluble. La región N-terminal contiene 4 dominios ricos en cisteína, que se encuentran relacionados de forma estrecha con el receptor 2 de TNF y CD40. Es un sustituto antagónico de RANKL, ya que se une a RANK evitando así la unión de esta con RANKL, lo que genera un descenso de osteoclastos activos y limita así la resorción ósea. (Khosla S, 2001) (Boyce BF & Xing L, 2007) (Hofbauer LC & Schopper M, 2004).

El mRNA de OPG se encuentra expresado en un número elevado de tejidos, incluyendo pulmones, corazón, hígado, estómago, intestino, cerebro y médula espinal, glándula tiroides y hueso, es producida también por células del ligamento periodontal y fibroblastos gingivales (Khosla S, 2001) (Crotti T, et al 2003). Existen dos formas diferentes de OPG, dimérica expresada por las células endoteliales y monomérica producida por las células epiteliales, todavía se desconoce si estas dos formas desarrollan una actividad biológica diferente.

Aunque la acción biológica más destacada de la OPG es la inhibición de la diferenciación y la actividad de los osteoclastos, su función en el resto de los tejidos queda aún por determinar en muchos de los casos.

Desde que la OPG y RANKL se han identificado como factores reguladores del metabolismo óseo, parece que se establecen como factores claves en la destrucción de hueso alveolar en la periodontitis (Crotti T, et al 2003).

#### 4.2. Complejo OPG/RANK/RANKL:

El sistema OPG/RANK/RANKL desarrolla un papel central en la determinación de la masa ósea.

**RANKL**, es crítico para la diferenciación, fusión en células multinucleares, activación y supervivencia de células osteoclásticas. La OPG supone un freno en el sistema al completo, ya que bloquea los efectos de RANKL. Un elevado número de citoquinas proreasortivas, como TNF $\alpha$  y la IL-1, regulan este sistema, en primer lugar, estimulando el *pool* de células preosteoclásticas y aumentando directamente la expresión de RANKL. Además, de otro gran grupo de citoquinas y hormonas, que también influyen sobre este sistema como la TGF- $\beta$  (aumenta la producción de OPG), PTH (aumenta la producción de RANKL y disminuye la producción de OPG), 1,25-dihydroxyvitamin D3 (aumenta la producción de RANKL), los glucocorticoides (aumentan la producción de RANKL y disminuyen la de OPG) y los estrógenos (aumentan la producción de OPG) (Takai H, et al 1998) (Kitazawa R, et al 1999) (Hofbauer LC, et al 1999).

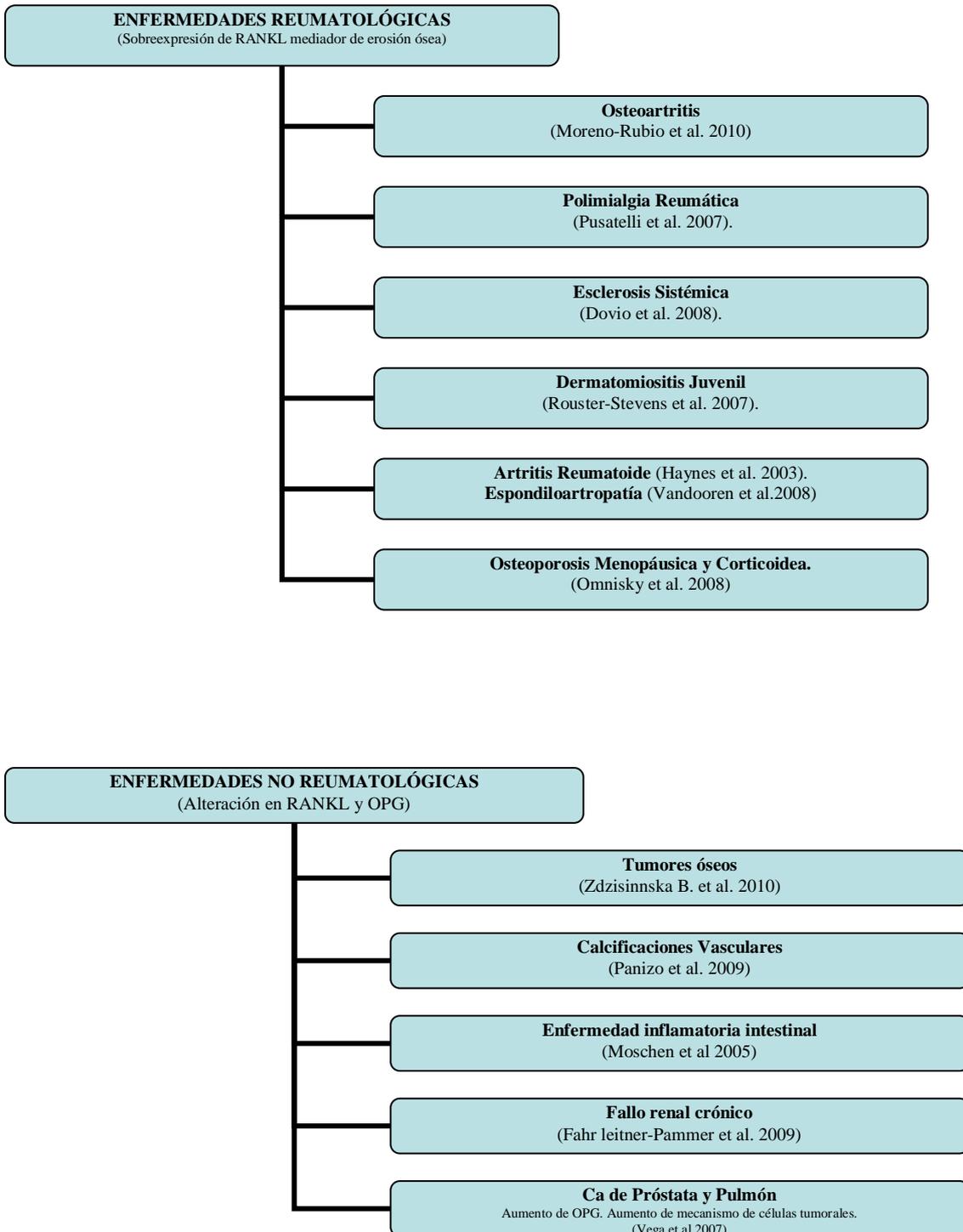
#### 4.3. RANKL y los inmunoreceptores.

Las citoquinas proinflamatorias, que median la respuesta inmune, pueden afectar a los osteoclastos y osteoblastos, tanto negativa como positivamente. Últimamente se ha descrito que alguno de los factores de transcripción, que regulan la respuesta inmune también regula la formación de osteoclastos y la función de los osteoblastos. Aún más, que los osteoblastos juegan un papel muy importante regulando las células madre hematopoyéticas, de donde derivan las células inmunes y que los osteoclastos regulan la formación y función de los osteoblastos. El mecanismo de modulación de la respuesta

inmune y el crecimiento en la formación de osteoclastos a través de la señalización cálcica es un campo amplio donde se encuentran implicados numerosos receptores.

Aparentemente el receptor asociado a osteoclastos (OSCAR, osteoclast associated receptor) y el receptor gatillo expresado en las células mieloides, TREM-2, ambos receptores inmunoglobulin-like expresados por precursores de los osteoclastos, y proteínas de adaptación, Fc receptor común de la subunidad (FcR $\gamma$ ) y la DNA - activating protein 12 (DAP12). Citoquinas proinflamatorias como el TNF también pueden favorecer este mecanismo aumentando la formación de osteoclastos en la enfermedad inflamatoria ósea (Ridgeway EE, 2000).

4.4. RANK/RANKL/OPG en otras enfermedades:



## **5. PROTEINAS MORFOGENÉTICAS ÓSEAS (BMPs):**

### 5.1. Definición de BMPs:

Las proteínas morfogenéticas óseas representan el subgrupo más grande dentro de la superfamilia de los factores transformadores del crecimiento (TGF)- $\beta$  (Transforming Growth Factor).

Estas moléculas primariamente estimulan la diferenciación de las células madre mesenquimales en condroblastos y osteoblastos (King GN & Cochran DL, 2002).

Han sido independizadas al menos 7 BMPs de fuentes humanas y bovinas. En el campo de la regeneración periodontal, la mayoría del interés de las investigaciones se ha focalizado en BMP-2 (OP-2), BMP-3(osteogenina), BMP-7 (OP-1) (Wozney JM. 1995).

Son un grupo de proteínas que pertenecen a la superfamilia de proteínas que promueven la formación ósea.

Fue el Dr. Marshall Urist quién realizando un experimento en el que implantó hueso desmineralizado en el músculo de un conejo, observó que posteriormente se había formado hueso. El Dr. Urist llamó a las proteínas responsables de este fenómeno “bone morphogenetic protein” (BMP).

Juegan un papel importante en el desarrollo embrionario incluyendo el desarrollo cerebral y la formación ósea.

### **OSTEOPONTINA:**

Es una glicoproteína multifuncional que está expresada en varios tipos celulares incluyendo hueso y tejido vascular. La osteopontina es producida por osteoclastos e inhibe la mineralización de la matriz ósea. Estudios recientes sugieren que la osteopontina es un importante regulador de la actividad osteoclástica. Se ha observado

que la osteopontina juega un papel importante en la inflamación vascular y que puede estar directamente relacionado con la aterogénesis (Isoda K, 2002). De hecho, los ratones transgénicos que sobreexpresan la osteopontina desarrollan un sobrecrecimiento de la capa íntima y la capa media vascular tras una lesión en la misma, por lo que posiblemente regule respuestas de inflamación y mineralización de forma independiente. (Yoshitake H, et al 1999).

## 5.2. Estructura y Clasificación:

El genoma humano codifica 20 BMPs. Las BMPs son moléculas diméricas dependientes críticamente de la unión intermolecular disulfido para su actividad biológica.

La familia de las BMPs puede dividirse en cuatro subfamilias diferentes:

- Primer grupo: BMP-2 y BMP-4.
- Segundo grupo: BMP-3, BMP-3B (Factor diferenciador de crecimiento 10 o GDF-10).
- Tercer grupo: BMP-5, BMP-6, BMP-7, BMP-8.
- Cuarto grupo: GDF-5, GDF-6, GDF-7 (Proteínas morfogenéticas derivadas de cartílago 1, 2, 3).
- BMP-1 no es un miembro de la familia de las BMP, sino más bien un enzima procolagénico C proteinasa envuelto en el procesamiento proteolítico del procolágeno, dirigiendo el autoensamblaje de las fibras de colágeno insoluble en la matriz extracelular.

## 5.3. Funciones de BMP:

Las BMPs regulan varias actividades mesénquima/osteoblásticas:

1. Quimiotaxis.
2. Unión dependiente de la adhesión celular (fibronectina).
3. Replicación celular (mitosis).

4. Diferenciación de osteoblastos.
5. Actividad alcalin-fosfatasa.
6. Mineralización/síntesis Osteocalcina (Hughes FJ et al, 2006).

Las BMPs también juegan un papel muy importante en la morfogénesis. BMPs 2-4 y 7 se expresan en el epitelio dental y BMPs 2 y 4 recombinantes pueden ser utilizadas como sustitutos para el epitelio dental en la inducción de la diferenciación mesenquimal. BMP-3 y BMP-7 han sido localizadas en el desarrollo del ligamento periodontal, cemento y hueso alveolar. Por otra parte BMP-2 fue localizada sólo en hueso alveolar durante la morfogénesis de las raíces (Wozney JM, 1995). Se ha sugerido el papel de las BMP-3 en el linaje del cementoblastoma por la localización de las mismas en la línea celular de las raíces.

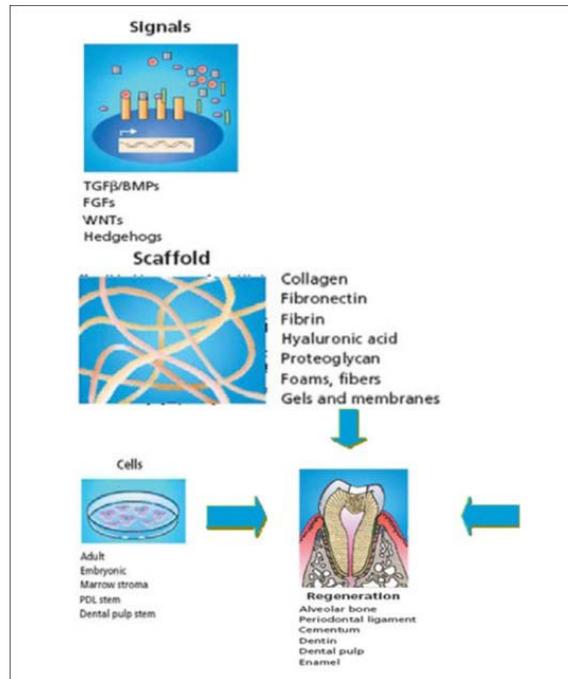
Otro de los papeles de las BMPs es la activación y formación de los osteoclastos. Las BMPs estimulan el linaje de los osteoblastos e inician también la liberación de los factores que promueven la producción rápida de osteoclastos. La formación de los osteoclastos ocurre antes que la formación de los osteoblastos. Con lo que grandes dosis de BMP podrían afectar a la ola de reabsorción que precede la aparición del efecto osteoblástico. (Kanatani M. et al 1995).

Las señales mediadas por las BMP interactúan con aquellas mediadas por RANKL en la inducción de la diferenciación, función y supervivencia de los osteoclastos. La supervivencia de los osteoclastos inducida por RANKL se ve reforzada por BMP-2. (Udagawa N. 2002).

#### Receptor de BMPs:

La comparación con otros factores de crecimiento revela que las BMPs están en un 34-38% en relación con la familia de los factores de crecimiento  $\beta$  (TGF $\beta$ ). Las BMPs y los ligandos TGF $\beta$  tienen receptores similares BMP I y II y TGF $\beta$  tipo I y II

respectivamente, los cuales funcionan como proteín- quinasas. (Fiorellini JP et al, 2005).



**Representación esquemática de la señalización molecular de las células y el andamiaje utilizado para la regeneración periodontal (Imagen tomada del artículo Yan et al, 2010).**

Normalmente se requieren altas concentraciones de BMPs localmente para producir procesos de regeneración periodontal. Aproximadamente 10kg de hueso bovino aportan sólo 2 µg de BMP. Esto consiste en una compleja mezcla de BMPs con otras proteínas. Las BMPs recombinantes parcialmente purificadas requieren 0.5-115 µg para producir la formación de cartílago en 7 días y la formación de hueso en 14 días (Yan MN et al, 2010).

### 5.3.1. BMP en regeneración periodontal

En el campo de la regeneración periodontal, la mayoría del interés en las investigaciones se ha focalizado en las BMP-2 (OP-2), BMP3 (osteogenina) y BMP-7 (OP-1).

Las BMPs, se encuentran envueltas en una variedad tan amplia de procesos que varios investigadores incluso han sugerido cambiar su nombre por “Body Morphogenetic Proteins”. Clínicamente los miembros de la familia de BMP han sido asociados con un número importante de patologías, incluyendo la obesidad, la diabetes, la enfermedad vascular y el cáncer, así como sus comorbilidades asociadas. (Meejung K. & Senyon C. 2011).

- ***BMPs y obesidad:*** Recientemente, la señalización BMP ha aparecido como una solución prometedora para resolver el problema al tratamiento de la obesidad, sugiriendo como objetivo la actuación sobre la diferenciación del adipocito en sí mismo. (Cornier MA et al, 2008).

El tejido adiposo se presenta en dos formas, tejido adiposo blanco (WAT) que sirve como reservorio de energía y el tejido adiposo marrón (BAT) que actúa como gasto de energía directo. Ambos tipos de adipocitos proceden de las células madre mesenquimales (MSCs), las cuales derivan de las células embrionarias madre. BMP-2 y BMP-4 promueven la diferenciación de WAT, mientras que BMP-7 lo hace de BAT.

De manera similar a BMP-4, BMP-2 ha demostrado estimular a las células progenitoras en la línea de WAT, además de promover la diferenciación adipogénica terminal (Sotile V. & Seuwen K, 2000). (Bowers RR et al, 2006).

El reciente descubrimiento de BMP-7 promoviendo la diferenciación y termogénesis de BAT ofrece un nuevo potencial clínico. BMP-7 se constituye como desencadenante de MSCs en la línea de diferenciación de adipocitos marrones. BMP-7 promueve las características fenotípicas y la actividad funcional de los adipocitos marrones, los cuales consumen energía y favorecen la supresión de la obesidad (Chen TL et al, 2001).

***Diabetes:*** La señalización BMP ha demostrado su participación en la homeostasis de la glucosa. La diabetes tipo II está causada por defectos en la secreción de insulina y la resistencia a la acción de la misma, lo que supone más del 90% por ciento de los casos de diabetes. Las terapias actuales para la diabetes II mejoran la acción de la insulina a nivel del hígado (Metformina) y de

tejidos periféricos (Thiazolidinedionas), o mejorando la secreción de insulina (Sulfonylureas)(Chen JW et al, 2003). El descubrimiento de BMP-9 como el primer factor hepático que regula la concentración de glucosa en sangre durante un período de tiempo prolongado, muestra un posible acercamiento a un nuevo tratamiento para los pacientes insensibles a la insulina, al mismo tiempo que reduce los efectos colaterales comúnmente asociados con los tratamientos actuales como la ganancia de peso o la hipoglicemia. BMP-9 ha sido identificado como objetivo importante en la regulación del metabolismo de la glucosa. Una sola inyección de BMP-9 ha demostrado reducir la glucemia a niveles normales en ratones diabéticos, al mismo tiempo que las ratas que recibieron administración intravenosa de BMP-9 han mejorado la tolerancia a la glucosa y han aumentado la sensibilidad a la insulina. (Chen C et al, 2003).

- Otras enfermedades:
- Calcificaciones vasculares. La expresión de BMP-2 y BMP-4 se regula en las células endoteliales en el lugar de las placas de aterosclerosis. Los moduladores extracelulares que normalmente inhiben la señal de BMP se han asociado normalmente a la lesión y enfermedad vascular. (Zebboudj AF, 2002).
- Hipertensión pulmonar: Muchos estudios sugieren que la falta de regulación en la señalización de BMP podría predisponer a la hipertensión arterial pulmonar, el reto clínico es determinar si estos nuevos descubrimientos podrían ser explotados para el tratamiento terapéutico (Baliga RS et al, 2011).

## **6. FOSFATASA ÁCIDA Y FOSFATASA ALCALINA:**

La fosfatasa alcalina y la fosfatasa ácida son enzimas intracelulares presentes en la mayoría de los tejidos y órganos, particularmente en los huesos. El aumento de su

actividad es una consecuencia de procesos destructivos que suceden en hueso alveolar en estados avanzados de la enfermedad periodontal.(Yoshie H et al, 2007).

La actividad de estas enzimas ha sido estudiada en el líquido clevicular y en saliva siendo esta última un método simple y no invasivo en su recolección para su estudio. (Numabe Y. et al, 2004).

El aumento de la actividad de estas enzimas indica que un proceso destructivo patológico ha afectado al hueso alveolar, lo que significa que la enfermedad periodontal está avanzada (Dabra S & Singh P, 2012).

La fosfatasa alcalina y la fosfatasa ácida se encuentran entre los enzimas más comúnmente asociados al metabolismo óseo. La fosfatasa alcalina está enriquecida en las membranas de las células del tejido de mineralización y también está presente en los gránulos de leucocitos polimorfonucleares (PMN).

El valor potencial de la fosfatasa alcalina como un biomarcador de la enfermedad periodontal fue identificado por Ishikawa & Cimasoni, 1970. Ellos encontraron una correlación significativa entre las concentraciones de fosfatasa alcalina y la profundidad de la bolsa periodontal.

La fosfatasa alcalina está entre las enzimas asociadas al metabolismo óseo. Se encuentra presente en los neutrófilos, las células epiteliales descamativas, macrófagos y algunas bacterias incluyendo *Actinobacillus* y *Veillonella*, también producen este enzima.

(Dabra S & Singh P, 2012). Del mismo modo los niveles de fosfatasa alcalina en saliva reflejan inflamación y destrucción de los tejidos periodontales, sugiriendo su uso como biomarcadores clínicos útiles (Dabra S & Singh P, 2012).

## **7. OSTEOCALCINA:**

La osteocalcina es una proteína abundante en hueso, que inhibe la calcificación. Se ha observado que los ratones con supresión de osteocalcina muestran mejoría en la formación ósea (Ducy P et al, 1996).

## **B. HIPÓTESIS:**

Queremos demostrar el efecto clínico y bioquímico de la melatonina en aplicación tópica en la encía de pacientes diabéticos y con enfermedad periodontal, estudiando las variaciones existentes en los marcadores de reabsorción ósea tales como RANKL, Fosfatasa alcalina, Fosfatasa ácida, Osteopontina y Osteocalcina. Así como el índice gingival y la profundidad de bolsa existente.

## **C. OBJETIVOS:**

1. Realizar un estudio comparativo del estado de salud oral: estado periodontal y marcadores óseos, entre pacientes sanos y diabéticos
2. Valorar el comportamiento de la melatonina, en su uso tópico oral, sobre la evolución clínica de pacientes diabéticos con patología periodontal: Índice gingival, y profundidad de bolsa.
3. Estudiar el comportamiento de los diferentes marcadores óseos, presentes en las patologías periodontales e indicativos de afectación ósea como son: OPG/RANKL, osteopontina, osteocalcina fosfatasas ácida y alalalina .
4. Evaluar la evolución clínica de la patología periodontal tras la aplicación tópica de la melatonina

## **D. MATERIAL Y MÉTODOS**

Se incluyeron en el estudio un total de 88 pacientes (sanos y enfermos) de los cuales, 18 pacientes dejaron el estudio durante el seguimiento, 9 por no asistir a las consultas de reevaluación, 5 por desarrollar enfermedad intercurrente de vías respiratorias altas durante el estudio e iniciar de tratamiento con antibioterapia y 4 fueron pérdidas de muestras en el laboratorio, quedando así 30 pacientes en el grupo de pacientes control y 30 en el grupo de pacientes diabéticos.

El estudio fue llevado a cabo con selección de pacientes de forma aleatoria, en el centro de Salud de Pinos Puente (Granada, España), así como en la facultad de Odontología de la Universidad de Granada. Fueron incluidos en el estudio un total de 30 pacientes sanos de ambos sexos (20 hombres y 10 mujeres), con edades entre 31 y 68 años (media 47

años) sin enfermedad periodontal y 30 pacientes de ambos sexos (14 hombres, 16 mujeres) con edades entre 24 y 58 años (media 43 años) y enfermedad periodontal. Se encontraron 17 pacientes con diabetes tipo I y 13 con diabetes tipo II. Ningún paciente estaba en tratamiento (salvo para el tratamiento de la diabetes).

Para dicho tratamiento farmacológico se disponía de insulina en sus distintas presentaciones y de antidiabéticos orales.

Entre los criterios de exclusión de nuestro estudio se encontraba estar en tratamiento con bifosfonatos, contraceptivos orales, tratamiento antibiótico los 6 meses previos, y haber recibido o estar siendo tratado (en los últimos 6 meses) de enfermedades de la cavidad oral.

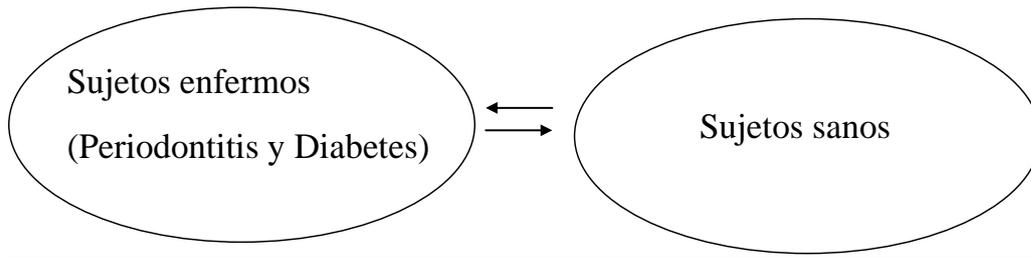
En los criterios de exclusión es evidente que se excluyeron tanto en diabéticos como en sanos los edéntulos totales. Sólo se aceptaron pacientes que tuviesen pérdidas dentales de no más de 3 dientes por arcada y que no fuesen dientes diana con la sonda Probe.

Todos los sujetos sanos gozaban de buena salud y no presentaban historia de enfermedad sistémica o signos clínicos de enfermedad periodontal. Los participantes fueron completamente informados sobre el estudio y todos ellos firmaron su consentimiento informado.

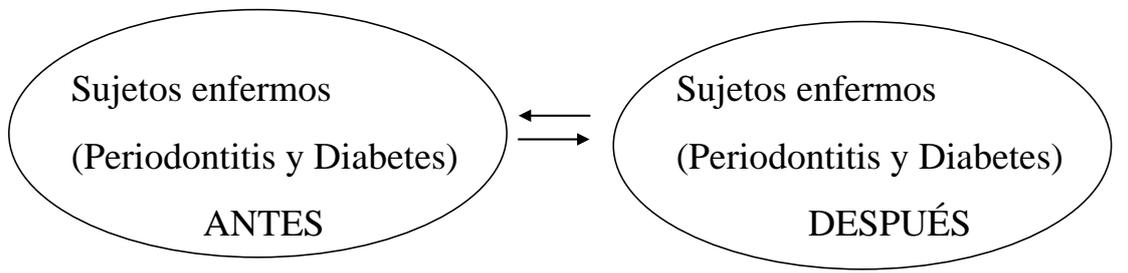
El protocolo del estudio fue aprobado por el Comité Ético de la Facultad de Odontología, en la Universidad de Granada, y siguiendo el código de Ética de la Asociación Médica Mundial.

El estudio se realizó en dos fases, una primera donde se compara el grupo de enfermos (con periodontitis y diabéticos) con el grupo control. Y una segunda fase de muestras apareadas donde se compara dentro del grupo de pacientes enfermos, estado antes y después del tratamiento con melatonina tópica.

#### PRIMERA FASE:



SEGUNDA FASE: APLICACIÓN DE MELATONINA



**1. Medición de índices gingivales y niveles de inserción.**

Todos los participantes del estudio (pacientes y controles), fueron sometidos a un examen oral, que incluía evaluación médica, y odontológica. El mismo odontólogo realizó todos los exámenes antes y después de la aplicación de la melatonina.

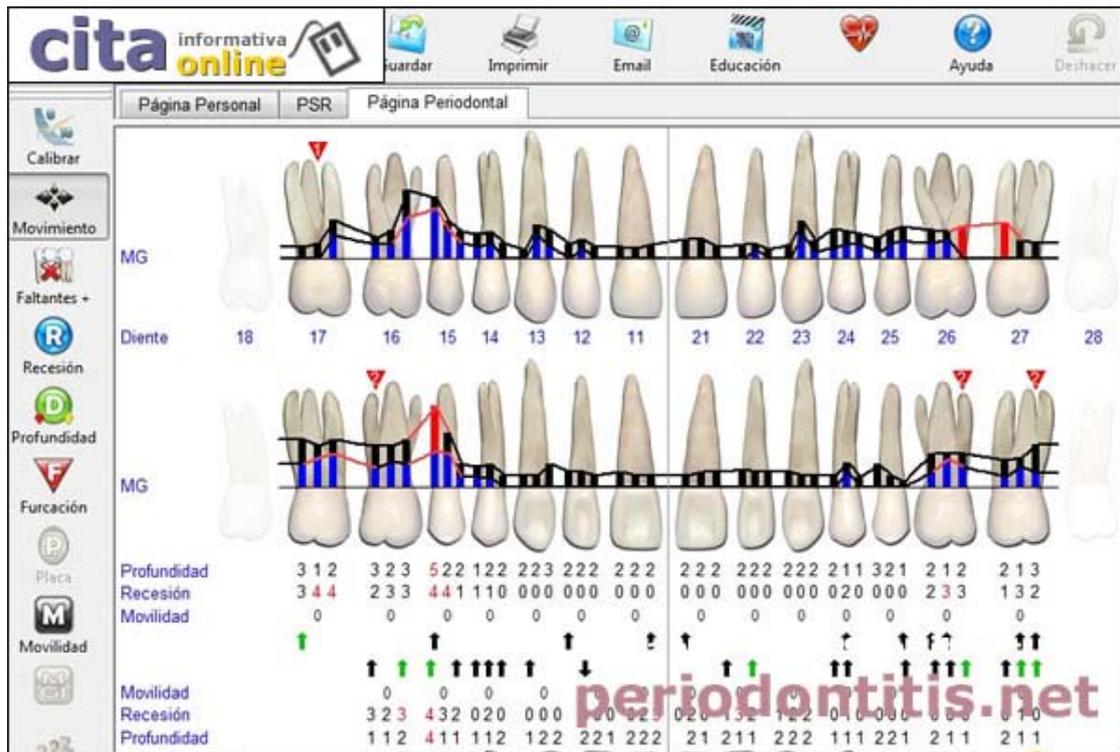
Para la obtención de los niveles de sangrado y niveles de inserción, se realizaron los peridontogramas a todos los pacientes antes y después de la aplicación de la melatonina.

Con el índice gingival pretendemos evaluar antes y después de aplicar la melatonina, el grado de inflamación.

Con la profundidad de sondaje pretendemos evaluar la reducción de bolsas antes y después de aplicar la melatonina, y los niveles de inserción obtenida en los distintos dientes, si bien este parámetro sólo lo consideramos válido como expresión de la

reducción de inflamación y no como reducción bacteriana, causa verdadera de la pérdida de soporte del diente.

El periodontograma se realiza con la sonda electrónica Florida Probe®. Se toman tres puntos de sondaje por vestibular y tres por palatino y lingual, registrando profundidad de sondaje, recesiones, sangrado, pus y movilidad. Los dientes ausentes y los terceros molares son eliminados del estudio. Se identifican los dientes con prótesis fija (implantes, coronas, puentes). Esta sonda incorpora en su software una opción en la que muestra de forma gráfica además de aspectos como grado de furcas, supuración, movilidad, recesiones, el sangrado y la profundidad de sondaje. Así el sangrado se representa con un punto rojo en la corona del diente y la profundidad con un número y con una “barrita” en la raíz. Además, calcula el índice gingival y la profundidad media de forma numérica en porcentajes y expresada en una gráfica en la parte inferior. La profundidad de sondaje analizada corresponde a las que son mayores o iguales a 3.4mm (a partir de este se considera patológico).





La sonda Florida Probe® tiene la ventaja de controlar la fuerza de inserción en 20-25 g, dicha sonda presenta una resolución in Vitro de 0'1 mm. Diversos estudios han comparado la reproductibilidad de las medidas clínicas tomadas con la sonda Florida Probe® versus sonda manual, indicando todos ellos que la desviación estandar entre las medidas es menor con la sonda Florida que con sondas manuales; por tanto las medidas parecen ser más reproducibles y menos variables. (Khoct A et al, 1998)(Villalta et al, 1996)(Bermejo, 2012).

## **2. Intervención de la Melatonina.**

Posteriormente, los pacientes diabéticos fueron tratados con melatonina en aplicación tópica (1% en fórmula crema orabase) en ambas arcadas dentales superior e inferior, sobre la superficie de la encía adherida durante 20 días. Los pacientes utilizaban, manteniendo su higiene habitual, el gel de melatonina, sólo por las noches. Utilizaban su cepillo de dientes como referencia para la cantidad a utilizar, diseminando el gel a nivel de las encías. El gel actuaba durante la noche. Por la mañana establecían su higiene habitual. Se instruyó al paciente para una aplicación adecuada.

La melatonina se compró pura en la empresa (Helsinn Advanced Synthesis SA, Via Industria 24, 6710 Biasca, Suiza. La melatonina en gel orabase para uso oral al 1% se realizó en la empresa: Perpetuo Socorro Company, Granada- Spain. El certificado de calidad lo aportó: Metapharmaceutical IND, SL. Jose Pla 163-Barcelona-España.

## **3. La recolección de saliva:**

Antes y después del tratamiento, se recolectaron muestras de saliva en los pacientes diabéticos y en los controles sanos. Los pacientes y controles acudieron a la Facultad de Odontología de la Universidad de Granada y al centro de salud de Pinos Puente, a las 9h tras las 12h de ayuno nocturno. Después de 15 minutos de reposo, se obtuvo una

muestra de saliva de cada individuo. Con la finalidad de estimular la producción de saliva, los participantes mascarón una pieza de parafina durante 7min. Se rechazó la saliva producida durante los 2 primeros minutos. Posteriormente, se recolectó la saliva durante los siguientes 5min, para evitar cualquier posible contaminación. Los pacientes mascarón la parafina durante el tiempo de la recolección de saliva. Las muestras de saliva recogidas fueron centrifugadas a 3,000 rpm, 4°C durante 15min, y luego el aclarado sobrenadante fue congelado a -80°C hasta que los ensayos fueron realizados.

#### **4. Determinación de RANKL, OPG y melatonina salivar:**

Se midieron los niveles de RANKL en la saliva usando un ensayo mediante unión enzimática inmunoabsorbente (ELISA) kit comercial (PeproTech EC, London UK), siguiendo las instrucciones de manufacturación. El kit de desarrollo de OPG ELISA (R&D Systems, Abingdon, Oxfordshire, UK) se usó para medir la cantidad de OPG en las muestras de saliva de acuerdo a las guías de manufacturación. Los resultados de los ensayos con RANKL y OPG se expresaron en pg/mL. Los niveles de melatonina en saliva fueron medidos por RIA (IBL, Hamburg GMBH, Germany).

#### **5. La determinación de melatonina en plasma:**

Los pacientes venían al laboratorio a las 9.00h tras ayuno nocturno y permanecían sentados 30min antes de la obtención de las muestras.

Para la extracción de sangre, venopunción, se utilizó una goma elástica torundas de algodón, alcohol 96°, jeringas de 10ml de capacidad para extracción sanguínea y agujas de calibre grande para evitar la hemólisis, gradillas de acero esterilizables y tubos para la centrifugación y otros tubos para la congelación.

Para la venopunción se colocaba al paciente en posición sentada, se limpiaba el sitio de punción con alcohol, se colocaba la goma elástica alrededor del antebrazo con el fin de ejercer presión y restringir el flujo sanguíneo a través de la vena, lo cual hacía que las venas bajo la banda se dilatasen. Inmediatamente después, se introducía una aguja en la vena en la parte interior del codo o en el dorso de la mano. Durante el procedimiento, se retiraba la

banda para restablecer la circulación y, una vez que se había recogido la sangre, se retiraba la aguja y se cubría el sitio de punción con una torunda para detener cualquier sangrado.

La sangre extraída se depositaba en 3 tubos con anticoagulante EDTA, de 3ml, se mueven ligeramente para favorecer la mezcla de sangre y el anticoagulante. Posteriormente se centrifugaban. Las muestras de sangre se centrifugaban durante 10 minutos a 3000 rpm.

Después utilizando pipetas de 200 microlitos (para la muestras de mRNA, OPG y Nitrilos) 500 microlitos (para Peroxidación) y 100 microlitos (para el resto) se extraía el suero que se distribuía en tubos de cri congelación de 1,8ml con tapa roscada (NUNC). Las muestras se introducían en nieve carbónica suministrada por el Hospital Universitario San Cecilio de Granada para su conservación y traslado (a -20<sup>o</sup>).

## **6. Determinacion de Fosfatasa Acida, Fosfatasa Alcalina, Osteocalcina y**

### **Osteopontina:**

### **Fosfatasa Ácida y Fosfatasa Alcalina:**

Se recolectaron muestras de saliva total y se almacenaron en tubos estériles. Posteriormente, las muestras se centrifugaron a 10.000rpm durante 10min. La actividad de las enzimas se determinó de forma inmediata, espectrométricamente con el método IFCC (International Federation of Clinical Chemistry) en un analizador automático Hitachi 911.

### **Osteocalcina:**

La medida de osteocalcina en saliva fue realizada usando una técnica de electroluminiscencia (Immulite 2000, Diagnostic Products Corporation, Los Angeles, CA, USA).

### **Osteopontina:**

La concentración de osteopontina se determinó por un kit de enzima inmunométrico de osteopontina humano tipo sándwich, siguiendo las instrucciones de manufacturación (TiterZyme, Assay Designs, Ann Arbor, MI, USA).

Seguidamente, tras la apropiada dilución de las muestras salivares obtenidas, 100~~0~~l de la muestra era añadida a los pozos y la bandeja se cerraba herméticamente y era incubada durante una hora.

Tras lavarla 7 veces, se pipeteó 100~~0~~l del anticuerpo etiquetado en los pozos, y la bandeja fue incubada a 4°C durante 30 min. La bandeja se lavó después un total de 9 veces, y 100 $\mu$ l de la solución sustrato fue añadida a cada pozo seguida de la incubación de la misma a temperatura de la habitación (ambiente) durante 30 minutos en oscuridad. Después, se añadieron 100 $\mu$ l de la solución en reposo (detenida - stop) a cada pozo, y la bandeja se leyó inmediatamente colocándola en un lector de microbandejas (enzyme-linked immunosorbent assay) (ELISA).

La absorbancia de cada pozo fue leída en el lector ELISA usando 450nm como longitud de onda primaria con corrección entre 570 y 590nm. La concentración de osteopontina en las muestras testadas fue estimada usando el estándar de la curva trazada al usar los valores de densidad óptica con los estándares. Las muestras y los estándares fueron evaluados de forma duplicada con sugería el manufacturador.

## **7. Análisis estadístico:**

Las variables cuantitativas están expresadas como la media  $\pm$  desviación estándar (SD). El test de Student para muestras apareadas, fue utilizado para la comparación entre el índice gingival y de profundidad de bolsillo antes y después de la aplicación tópica de melatonina entre los pacientes diabéticos con enfermedad periodontal, y del mismo modo el test de student se usó para las muestras independientes en la comparación de los niveles salivares de RANKL, OPG y melatonina y los niveles de melatonina en plasma entre los grupos de pacientes diabéticos y los sujetos sanos. Así como en la comparación de los niveles de fosfatasa ácida, fosfatasa alcalina, osteocalcina y osteopontina entre estos mismos grupos.

La relación entre el índice gingival y la profundidad de bolsillo con RANKL y OPG en saliva así como los niveles en saliva y plasma fueron medidos con el coeficiente de

correlación de Pearson. Del mismo modo, la relación entre el índice gingival y la prueba de profundidad de bolsillo con los niveles de fosfatasa ácida, fosfatasa alcalina, osteocalcina y osteopontina en saliva fueron medidos con el coeficiente de correlación de Pearson, encontrando significación estadística para  $P < 0.05$ .

Se usó para el análisis de los datos el programa estadístico para ciencias biomédicas (SPSS) (versión 11.0).

## **8. RESULTADOS DEL ESTUDIO CLÍNICO:**

### **PRIMERA FASE**

Comparamos en el estudio un total de 30 pacientes de ambos sexos (14 hombres y 16 mujeres) con edades entre 24 y 58 años (media 43 años) diabéticos y con enfermedad periodontal crónica del adulto (donde se encontraron 17 pacientes con diabetes tipo I y 13 con diabetes tipo II) con el grupo control de 30 pacientes sanos de ambos sexos (20 hombres y 10 mujeres), con edades entre 31 y 68 años (media 47 años) sin enfermedad periodontal y valoramos niveles de RANKL, OPG, melatonina en plasma y melatonina en saliva antes del tratamiento así como los valores de Fosfatasa ácida y alcalina, osteopontina y osteocalcina salivares.

### **Prueba t de Student para valores de RANKL, OPG, MELATONINA en saliva y en sangre en pacientes sanos y pacientes enfermos.**

En este apartado comparamos los valores de RANKL, OPG, melatonina en plasma y melatonina en saliva entre los sujetos normales y los sujetos con periodontitis antes del tratamiento. Para ello hemos aplicado una prueba t de Student para dos muestras independientes.

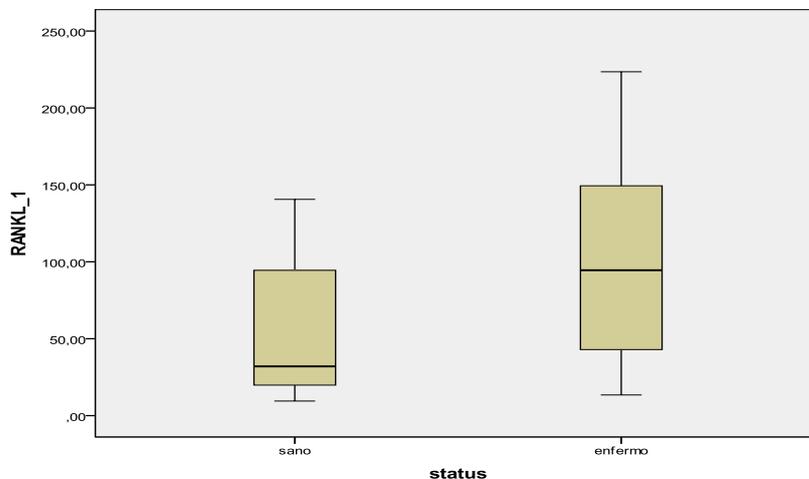
Tabla 1. Comparación de pacientes diabéticos y casos control antes de la aplicación tópica del tratamiento con melatonina.

	Sujetos sanos Media $\pm$ DS	Pacientes Diabéticos Media $\pm$ DS	Valor de P
<b>SALIVA</b>			
RANKL, pg/mL	53.6 $\pm$ 42.94	102.6 $\pm$ 66.67	<0.001
OPG, pg/mL	20.3 $\pm$ 11.13	10.4 $\pm$ 7.61	<0.001
Melatonina, pg/mL	4.5 $\pm$ 0.81	2.7 $\pm$ 0.81	<0.001
<b>PLASMA</b>			
Melatonina,pg/mL	13.9 $\pm$ 3.87	9.7 $\pm$ 3.27	<0.001

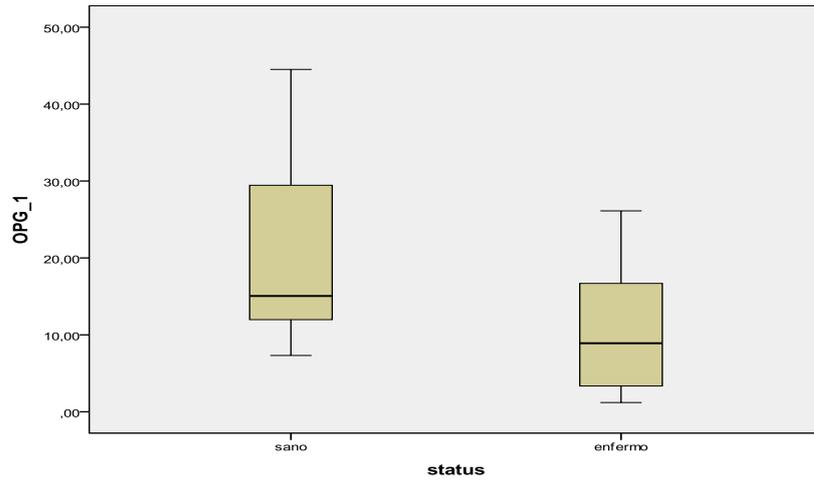
En la tabla 1 se presentan los estadísticos (media y desviación típica) de los sujetos sanos y enfermos antes del tratamiento en las cuatro variables analizadas.

Observamos como existen diferencias significativas entre sujetos sanos y enfermos antes del tratamiento en las cuatro variables, siendo los valores de los sujetos sanos superiores a los sujetos enfermos, excepto para RANKL, en la que los sujetos sanos tienen una puntuación media menor.

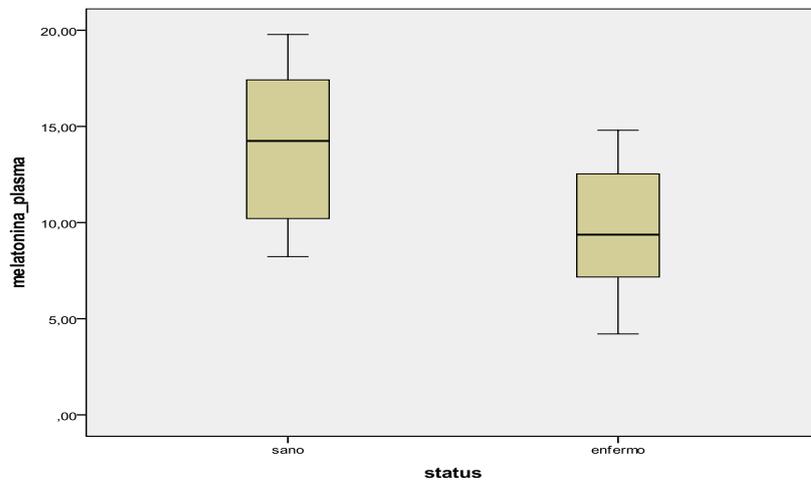
En las figuras 2 a 5 aparecen los diagramas de caja para las cuatro variables analizadas en los grupos sano y enfermo antes del tratamiento.



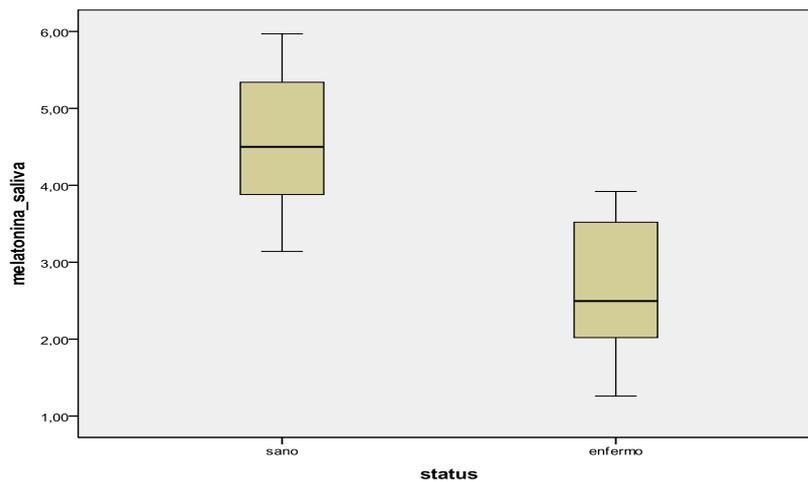
**Figura 2. Diagrama de caja: RANKL en pacientes sanos (53.6 $\pm$  42.94) y en pacientes diabéticos (102 $\pm$ 66.67) con p<0.001.**



**Figura 3. Diagrama de caja: OPG en pacientes sanos ( $20.3 \pm 11.13$ ) y en pacientes diabéticos ( $10.4 \pm 7.61$ ) con  $p < 0.001$ .**



**Figura 4. Diagrama de caja: melatonina en plasma en pacientes sanos ( $13.9 \pm 3.87$ ) y en pacientes diabéticos ( $9.7 \pm 3.27$ ) con  $p < 0.001$ .**



**Figura 5. Diagrama de caja: melatonina en saliva en pacientes sanos ( $4.5 \pm 0.81$ ) y en pacientes diabéticos ( $2.7 \pm 0.81$ ) con  $p < 0.001$ .**

En este apartado comparamos también los valores de fosfatasa alcalina, osteocalcina, fosfatasa ácida y osteopontina entre los sujetos normales y los sujetos con periodontitis diabéticos antes del tratamiento. Para ello hemos aplicado una prueba t de Student para dos muestras independientes (tabla 6).

**Tabla 6. Estadísticos de grupo**

	Sanos Media $\pm$ DS	Enfermos diabéticos Media $\pm$ DS	P
Fosfatasa alcalina	$7.34 \pm 1.28$	$40.51 \pm 4.83$	,000**
Osteocalcina	$4.97 \pm 1.35$	$5.83 \pm 1.41$	,020*
Fosfatasa ácida	$20.55 \pm 1.99$	$83.08 \pm 6.85$	,000**
Osteopontina	$2.44 \pm 0.80$	$12.49 \pm 1.78$	,000**
*n.s. 5%; **n.s. 1%			

En las figuras 7 a 10 aparecen los diagramas de caja para las cuatro variables analizadas en los grupos sano y enfermo antes del tratamiento.

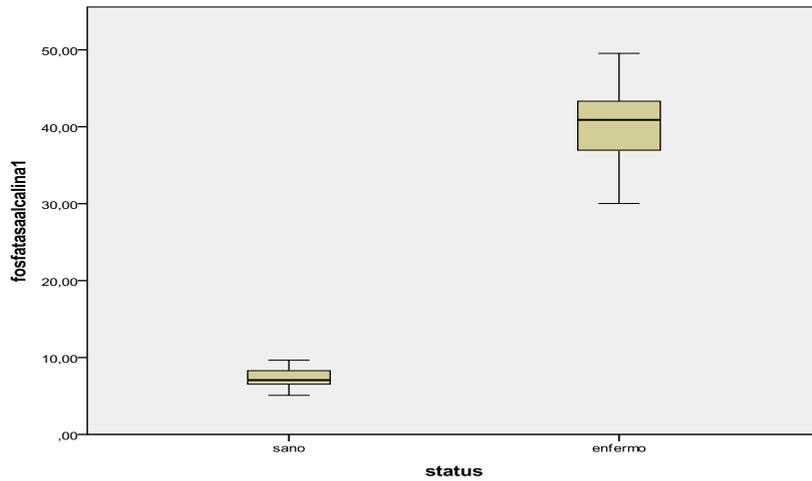


Figura 7. Diagrama de caja: fosfatasa alcalina en pacientes sanos ( $7.34 \pm 1.28$ ) y en pacientes diabéticos ( $40.51 \pm 4.83$ ) con  $p < 0.001$ .

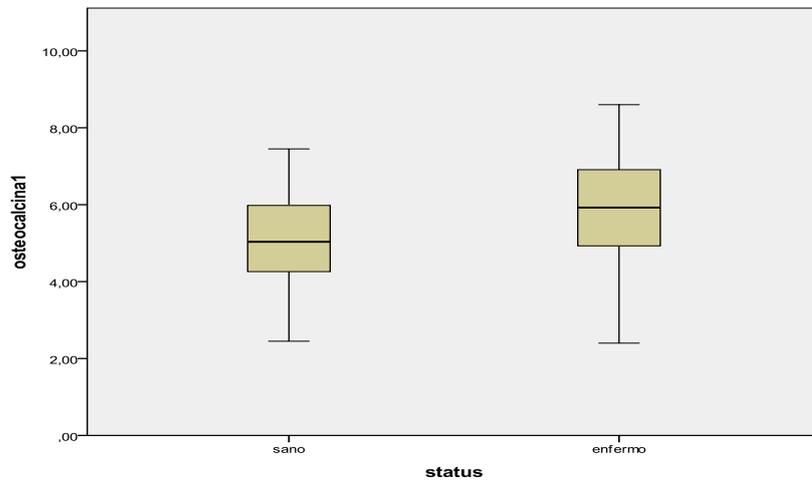


Figura 8. Diagrama de caja: osteocalcina en pacientes sanos ( $4.97 \pm 1.35$ ) y en pacientes diabéticos ( $5.83 \pm 1.41$ ) con  $p < 0.005$ .

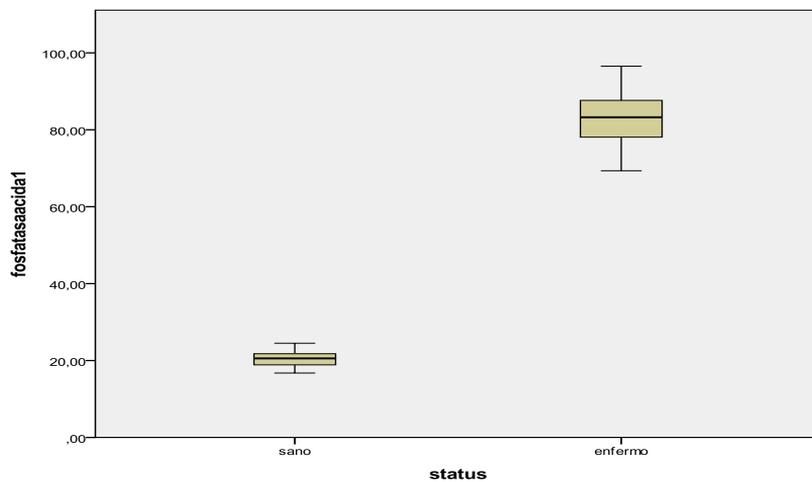
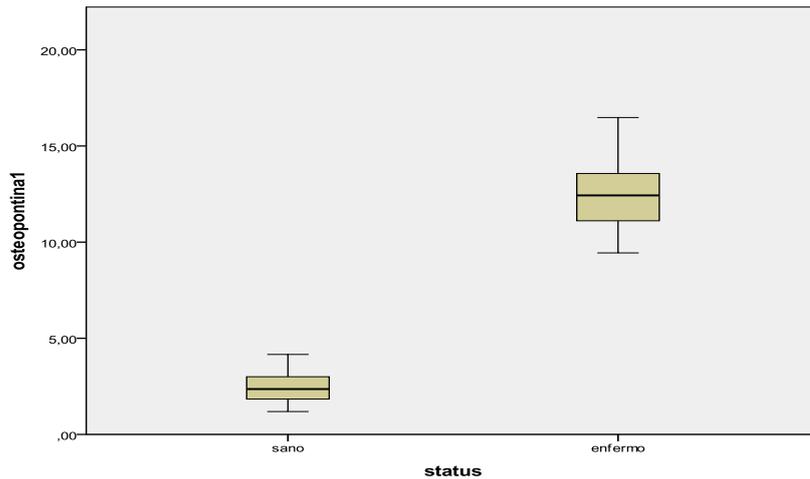


Figura 9. Diagrama de caja: fosfatasa ácida en pacientes sanos ( $20.55 \pm 1.99$ ) y en pacientes diabéticos ( $83.08 \pm 6.85$ ) para  $p < 0.001$ .



**Figura 10. Diagrama de caja: osteopontina en pacientes sanos ( $2.44 \pm 0.80$ ) y en pacientes diabéticos ( $12.49 \pm 1.78$ ) para  $p < 0.001$ .**

La comparación de valores entre pacientes diabéticos y pacientes controles de RANKL, OPG y niveles de melatonina salivar y melatonina en plasma, así como niveles de osteocalcina, osteopontina y fosfatasa ácida y fosfatasa alcalina que muestran que pacientes diabéticos tuvieron niveles salivares significativamente más elevados de RANKL ( $102.6 \pm 66.67$  vs  $53.6 \pm 42.94$  pg/mL), de fosfatasa alcalina ( $40.51 \pm 4.83$  vs  $7.34 \pm 1.28$ ), fosfatasa ácida ( $83.08 \pm 6.85$  vs  $20.55 \pm 1.99$ ), osteocalcina ( $5.83 \pm 1.41$  vs  $4.97 \pm 1.35$ ) y osteopontina ( $12.49 \pm 1.78$  vs  $2.44 \pm 0.80$ ) que los sujetos sanos, así como valores significativamente más bajos de OPG salivar ( $10.4 \pm 7.61$  vs  $20.3 \pm 11.13$  pg/mL), melatonina salivar ( $4.5 \pm 0.81$  vs  $2.7 \pm 0.81$  pg/mL) y la melatonina plasmática ( $13.9 \pm 3.87$  vs  $9.7 \pm 3.27$  pg/mL) ( $P < 0.001$ ).

## **SEGUNDA FASE:**

En este apartado comparamos dentro del grupo de pacientes diabéticos con enfermedad periodontal, las variables a considerar antes y después de la aplicación de melatonina.

Los pacientes no presentaron efectos adversos tras el tratamiento recibido y se encontraron satisfechos con la evolución clínica tras la aplicación de melatonina.

## Índice gingival

De forma descriptiva, podemos observar (*Figura 11*) como los valores de índice gingival disminuyen en todos los pacientes. La media antes de efectuar la aplicación con melatonina en los treinta pacientes estudiados ha sido de 15,89 con una desviación típica de 10,26 frente a una media de 5,59 después de aplicar la melatonina, con una desviación típica de 4,08, habiendo por tanto una diferencia de media entre antes y después de la aplicación de este medicamento de 10,20 con una desviación estándar de 7,712. (*Tabla 11*) (*Figura 11*).

Una vez calculada la media y desviación estándar, se realiza la prueba *t de Student para dos muestras relacionada*. Podemos comprobar entonces que **existen diferencias significativas en el índice de gingival antes y después de aplicar el tratamiento**, ya que la significación obtenida es menor que 0.05. Lo que indica que existe una disminución significativa en los valores de índice gingival tras la aplicación de melatonina.

En la tabla 11 y figura 11 se observa cómo tras la aplicación de melatonina se produce una disminución de los valores de índice gingival.

	Media	N	Desviación típica
Índice gingival antes	15,84	30	10,26
Índice gingival después	5,59	30	4,08

*Tabla 11. Estadísticos descriptivos de índice gingival antes y después de la aplicación de melatonina en pacientes en el grupo de pacientes diabéticos con enfermedad periodontal. Para  $p < 0.05$ .*

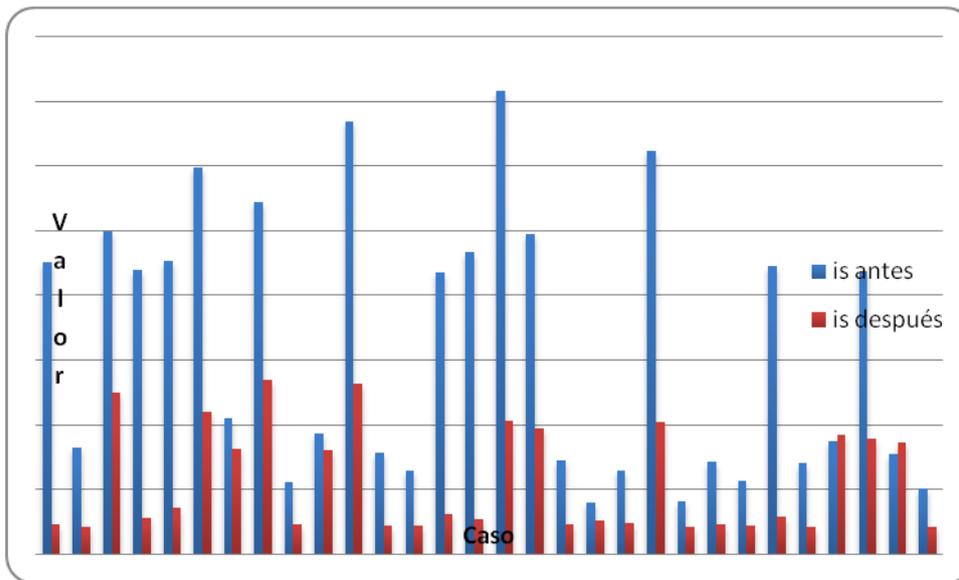


Figura 11. Gráfico de barras para los valores de índice de sangrado antes y después de la aplicación de melatonina en pacientes diabéticos con enfermedad periodontal .

### Profundidad de bolsa

De igual forma que hemos hecho con el índice gingival, desde el punto de vista descriptivo, vemos que hay un descenso notable en la profundidad de sondaje antes y después de aplicar la melatonina (Figura 12). Así, la media antes de efectuar la aplicación con melatonina ha sido de 28,3 con una desviación típica de 19,48, frente a una media de 11,90 después de aplicar la melatonina, con una desviación típica de 9,01, habiendo por tanto una diferencia de media entre antes y después de la aplicación de este medicamento de 16,4. (Figura 12) (Tabla 12).

Una vez calculada la media y desviación estándar, se realiza la prueba *t de Student para dos muestras relacionadas*. Podemos comprobar entonces que **existen diferencias significativas en la profundidad de sondaje antes y después de aplicar el tratamiento**, ya que la significación obtenida es menor que 0,05. La media de las diferencias es de 16,4.

En la tabla 12 y figura 12 se observa cómo tras la aplicación de melatonina se produce una disminución de los valores de profundidad de bolsa.

Tabla 12. Comparación de profundidad de la bolsa antes y después de la aplicación tópica de melatonina en pacientes diabéticos con periodontitis.

	Media	N	Desviación típica
Profundidad de bolsa antes	28.3	30	19.48
Profundidad de bolsa después.	11.9	30	9.01

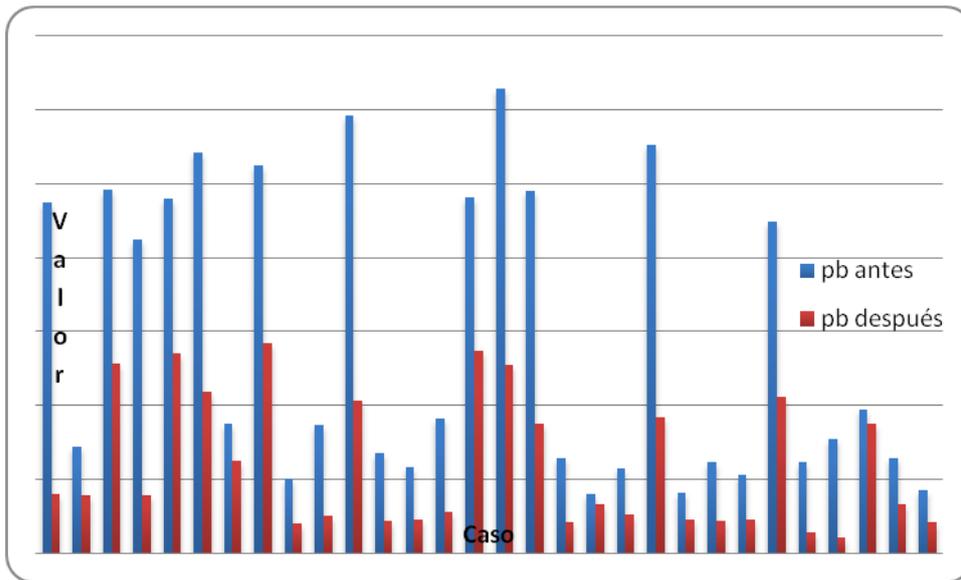


Figura 12. . Gráfico de barras para los valores de profundidad de bolsa antes y después de la aplicación de melatonina.

**1b.Resultados pruebas t para dos muestras relacionadas**

Previamente en la fase 1, hemos mostrado que los pacientes diabéticos con enfermedad periodontal presentaban niveles de RANKL mayores que el grupo control así como niveles de OPG disminuidos con respecto a los mismos.

En este nuevo apartado hemos realizado una prueba t para analizar si existe un cambio en los valores de RANKL, OPG antes y después de la administración del tratamiento.

En la tabla 13 se encuentran los estadísticos descriptivos (media, desviación típica) de las cuatro variables analizadas para el grupo de sujetos con periodontitis antes y después del tratamiento.

Tabla 13. Estadísticos de muestras relacionadas

	Media	N	Desviación típica	p
RANKL antes	102,63	30	66,67	,000**
RANKL después	73,54	30	47,39	,000**
OPG antes	10,39	30	7,61	,000**
OPG después	16,98	30	7,20	,000**

Las pruebas t de Student para muestras relacionadas (tabla 13) indican que existen diferencias significativas entre los valores de las variables estudiadas antes y después del tratamiento. Tras la aplicación del tratamiento se observa una disminución significativa de los valores medios de RANKL que pasan de 102,63 a 73,54, que se corresponde con la disminución del índice gingival y disminución de la profundidad de bolsa, así como un incremento de los valores de OPG que pasan de 10,39 a 16,98.

#### Correlaciones con índice gingival y profundidad de bolsa

Tabla 14. Relación entre los cambios en el índice gingival y en la profundidad de la bolsa y los cambios en los niveles de RANKL salivar, OPG salivar, melatonina salivar y melatonina plasmática antes y después del tratamiento con melatonina en pacientes diabéticos con enfermedad periodontal.

	Coeficiente de Correlación con índice gingival	Valor de P	Coeficiente de Correlación con la profundidad de bolsa	Valor de P
<b>Saliva</b>				
Diferencia RANKL	r= - 0.039	0.838	r= - 0.024	0.901
Diferencia OPG	r= - 0.366	0.047	r= - 0.432	0.017
Diferencia Melatonina	r= 0.023	0.904	r= - 0.032	0.866
<b>Plasma</b>				

Melatonina	r=- 0.022	0.907	r= - 0.33	0.863
------------	-----------	-------	-----------	-------

Las correlaciones indican que existe una asociación significativa del cambio en los valores de OPG antes y después del tratamiento con el cambio en los valores de índice gingival ( $r = -0,366$ ;  $p = 0,047$ ) y profundidad de bolsa ( $r = -0,432$ ;  $p = 0,017$ ). De esta forma, observamos que una disminución en los valores de índice gingival y profundidad de bolsa se asocia con un aumento de los valores de OPG.

***Resultados pruebas t para fosfatasa alcalina, fosfatasa ácida, osteocalcina y osteopontina en dos muestras relacionadas.***

En este apartado hemos realizado una prueba t para analizar si existe un cambio en los valores de fosfatasa alcalina, osteocalcina, fosfatasa ácida y osteopontina antes y después de la administración del tratamiento.

En la tabla 15 se encuentran los estadísticos descriptivos (media, desviación típica) de las cuatro variables analizadas para el grupo de sujetos con periodontitis antes y después del tratamiento.

***Tabla 15. Estadísticos de muestras relacionadas***

	Media	N	Desv.típ.	p
Fosfatasa alcalina antes	40,51	30	4,83	,000**
Fosfatasa alcalina después	26,88	30	4,03	
Osteocalcina antes	5,83	30	1,41	,028*
Osteocalcina después	5,78	30	1,39	
Fosfatasa acida antes	83,08	30	6,85	,000**
Fosfatasa acida después	43,52	30	5,52	
Osteopontina antes	12,49	30	1,78	,000**
Osteopontina después	8,34	30	1,45	

Las pruebas t de Student para muestras relacionadas indican que existen diferencias significativas entre los valores de las variables estudiadas antes y después del tratamiento. Tras la aplicación del tratamiento se observa una disminución significativa de los valores de fosfatasa alcalina, cuya media pasa de 40,81 a 26,88; osteocalcina, cuya media pasa de 5,83 a 5,78; fosfatasa ácida cuya media disminuye de 83,08 a 43,52; y osteopontina cuya media pasa de 12,49 a 8,34. Todos estos valores indican que estas BMPs y enzimas marcadores de destrucción ósea disminuyen en su concentración tras la aplicación de melatonina con  $p < 0.05$  siendo esta asociación estadísticamente significativa.

### Correlaciones con índice gingival y profundidad de sangrado

Tabla 12. Correlaciones de índice gingival y profundidad de sangrado con fosfatasa alcalina, osteocalcina fosfatasa ácida y osteopontina.

		Diferencia_índice gingival	Diferencia_profundidad de sangrado
Diferencia_fosfatasa alcalina	r	,129	,366*
	p	,496	,047
	N	30	30
Diferencia_osteocalcina	r	,105	,138
	p	,580	,466
	N	30	30
Diferencia_fosfatasa ácida	r	,499**	,443*
	p	,005	,014
	N	30	30
Diferencia_osteopontina	r	,578**	,739**
	p	,001	,000
	N	30	30

\*n.s. 5%; \*\*n.s. 1%

Se han encontrado correlaciones estadísticamente significativas del cambio entre antes y después del tratamiento del índice gingival con el cambio en los valores de fosfatasa ácida ( $r = 0,499$ ;  $p = 0,005$ ) y en osteopontina ( $r = 0,578$ ;  $p = 0,001$ ). El cambio en la profundidad de bolsa está correlacionado con el cambio en la fosfatasa alcalina ( $r =$

0,366;  $p = 0,047$ ), con el cambio en fosfatasa ácida ( $r = 0,443$ ;  $p = 0,014$ ) y con el cambio en osteopontina ( $r = 0,739$ ;  $p = 0,000$ ) (Tabla 16).

### E. Discusión:

En esta tesis doctoral se ha demostrado a través del análisis de 30 pacientes con diabetes y enfermedad periodontal el efecto de la aplicación tópica de melatonina en la región gingival en los niveles de RANKL, osteoprotegerina y melatonina, al igual que sobre los niveles de melatonina en plasma. Y sobre los niveles de osteocalcina, osteopontina, fosfatasa ácida y alcalina.

Consideramos que la medición de melatonina salivar es un método no invasivo y fácilmente medible representando además una forma indirecta e inocua de la medida de los niveles de melatonina en plasma.

Tras el análisis de los datos encontramos como existen diferencias significativas entre ambos grupos, siendo los valores medios de los sujetos sanos superiores a los sujetos enfermos, excepto para RANKL, fosfatasa alcalina y ácida, osteocalcina y osteopontina en la que los sujetos sanos tiene un valor inferior. Estos últimos son todos marcadores de reabsorción ósea, de lo que se deduce que el fenómeno de reabsorción ósea periodontal es menor en sujetos sanos que en sujetos enfermos (diabéticos).

Posteriormente en una segunda fase iniciamos el tratamiento con melatonina.

En esta fase analizamos como se modifican los valores antes referidos encontrados en los sujetos enfermos antes y después de la aplicación del tratamiento con melatonina desde el punto de vista clínico y bioquímico.

Tras la aplicación de melatonina tópica hubo una reducción estadísticamente significativa de niveles salivares de RANKL. Hubo también una asociación significativa entre cambios de niveles salivares de OPG (incrementándose estos tras la aplicación de la misma). En cuanto a los valores de fosfatasa ácida, fosfatasa alcalina, osteopontina y osteocalcina se observó una disminución de los valores de los mismos tras la aplicación del tratamiento. Por la acción de la melatonina sobre la disminución de la reabsorción ósea periodontal y la disminución bioquímica de los marcadores de dicha reabsorción.

También se midió la profundidad de la bolsa y el índice gingival en los pacientes enfermos antes y después de la aplicación de la melatonina observándose que tras la

aplicación de melatonina en sujetos enfermos hubo un descenso en el índice gingival y en la profundidad de bolsillo. Lo que probablemente no se justifique en un período de tiempo tan corto (20 días) con una regeneración ósea propiamente dicha, sino que este más relacionado con la actividad antiinflamatoria periodontal que ejerce la melatonina. Disminuyendo así la profundidad de bolsillo y descendiendo el índice gingival.

### 1.1 MEDICIÓN DE NIVELES DE MELATONINA Y MARCADORES ÓSEOS:

En este estudio se ha comprobado una reducción significativa de los niveles plasmáticos y salivares de melatonina en pacientes con periodontitis en relación al grupo control.

La estimación de melatonina en plasma y saliva ya viene estudiada desde 1987 (Miles A et al, 1987). Trabajos como los de (Shirakawa S et al, 1998) estudian en 7 pacientes la relación entre los niveles de melatonina en suero y melatonina salival .Demostrando así que la medida de los niveles de melatonina salival podrían considerarse un buen indicador de la secreción en la circulación general de melatonina.

Factores como el tabaco, la exposición a la luz, consumición de alcohol y la edad, disminuyen los niveles de melatonina salivar, sin variabilidad en consideraciones de género (Burgess HJ & Fogg LF, 2008).

Tras su secreción la melatonina difunde pasivamente en la saliva y la mucosa oral para entrar en la cavidad oral (Reiter R. J. 1986). Así pues, la melatonina salivar representa un porcentaje de la melatonina libre.

La variación de los niveles salivares de melatonina en relación con el grado de enfermedad periodontal (Cutando A. et al, 2006), así como la relación entre la melatonina salivar y la salud oral en pacientes diabéticos (Cutando A. et al, 2003) ya han sido demostrados en otros trabajos, donde se refleja que el grado de enfermedad periodontal aumenta proporcionalmente a la disminución de los niveles de melatonina salivar, indicando que la melatonina podría actuar protegiendo a la cavidad oral de la actuación bacteriana externa.

La melatonina gracias a sus propiedades **antiinflamatorias y antioxidativas** ha sido usada en pacientes diabéticos con enfermedad periodontal donde se ha demostrado que

ejerce un rol protector sobre el daño generado por los radicales libres. Un incremento de melatonina en pacientes diabéticos favorece la protección frente al daño oxidativo, especialmente en cavidad oral (Cutando A et al, 2003).

Una de las causas mayoritarias de pérdida de dientes en el humano es la destrucción ósea. La periodontitis crónica como ya hemos comentado con anterioridad genera una destrucción progresiva del ligamento periodontal y del hueso alveolar, con la formación de bolsa periodontal, recesión gingival o ambas.

Debemos recordar que el paciente diabético es de especial interés en su relación con la enfermedad periodontal hoy día, ya que se ha podido comprobar que cuando un enfermo diabético empeora su estado metabólico, también empeora su estado periodontal y viceversa, de ahí que algunos autores consideren a estas enfermedades como “bidireccionales”. Por otra parte tratar los signos y síntomas que produce la enfermedad periodontal en este tipo de pacientes diabéticos es difícil, pues a su menor resistencia inmunológica al ataque de las bacterias propias del proceso periodontal, se une la mayor parte de los fármacos antiinflamatorios que puede empeorar el cuadro metabólico de estos pacientes, de ahí el interés de experimentar con fármacos menos agresivos y de utilización local como es el objeto de este estudio con melatonina.

A este hecho se une que los niveles de melatonina salivar son menores en sujetos diabéticos que en sujetos sanos, siendo uno de los responsables directos la hiposilalia y xerostomía que sufren estos pacientes a causa de la enfermedad (Bajaj S. et al, 2012).

En el metabolismo óseo, una pieza fundamental es el osteoclasto célula multinucleada encargada de la reabsorción de matriz extracelular mediante diversos mecanismos, entre los cuales se encuentra la producción de radicales libres.

La melatonina, a través de su acción antioxidante y depuradora de radicales libres, podría interferir en esta función del osteoclasto e inhibir de esta forma la reabsorción ósea (Haffajee AD & Socransky SS. 2000)

Se ha sugerido que el organismo responde a la inflamación periodontal aumentando la producción de melatonina, y por lo tanto la disponibilidad de melatonina en la cavidad oral.

Se demostró que los linfocitos de los pacientes con DM tipo I producen bajas cantidades de IL-2. Cutando A, et al 2003, muestran que los niveles de IL-2 no están relacionados con el tipo de diabetes pero que cambian significativamente con el estado de enfermedad periodontal, alcanzando niveles más bajos en índices de enfermedad periodontal altos. Quizá el aumento significativo que sufre la melatonina en grado 4 de índice de enfermedad periodontal podría ser responsable de la suave elevación de la IL-2. Los pacientes con DM muestran una respuesta menor en ambas, melatonina e IL-2, sugiriendo que las propiedades de inmunoestimulación y antiinflamatorias de la melatonina están también deprimidas en estos pacientes (Cardinalli DP et al, 2003).

El grupo de Paola Secchiero en 2006 estudió si la elevación de OPG en el suero sanguíneo representa un evento temprano o tardío en la historia natural de la diabetes mellitus e investigó la correlación entre la producción y liberación de OPG y los niveles de glucosa ambos in vivo e in Vitro encontrando que se trataba de un evento de evolución tardía en el desarrollo de la diabetes. Y que en esta evolución los niveles séricos de OPG estaban aumentados en los pacientes diabéticos y se correlacionaba con un aumento en la disfunción vascular de los mismos.

En la misma línea en un estudio de 2001 Browner WS, et al. descubrieron que los niveles de OPG en suero eran un 30% más elevado en mujeres con diabetes que en mujeres no diabéticas pero de avanzada edad, (en contraposición con nuestros resultados en los que los diabéticos tenían una disminución significativa de OPG con respecto al grupo control) se estudió una correlación significativa entre los niveles elevados de OPG en suero y la prevalencia aumentada de la mortalidad por enfermedad cardiovascular. De manera llamativa en estudios realizados por Bucay N et al. 1998, el déficit de OPG en ratones, mostraba ambas, un descenso de la densidad ósea y una calcificación de los vasos sanguíneos. OPG y RANKL podrían estar implicados no sólo en la regulación de la osteoclastogénesis sino también de la aterosclerosis.

En la primera fase de nuestro estudio observamos que los pacientes diabéticos reflejan niveles medios de OPG y Melatonina en saliva inferiores a los sujetos sanos. Así como niveles medios de RANKL superiores al grupo control. Determinadas características basales clínico- metabólicas del paciente diabético como la xerostomía que acompaña a esta enfermedad pueden condicionar el estado de estos valores bioquímicos, además el

descenso de OPG favorece que RANKL se una a RANK y que se active así la destrucción ósea. Del mismo modo en el paciente diabético encontramos niveles medios más elevados en la fosfatasa ácida y alcalina, la osteocalcina y la osteopontina, elementos marcadores de la destrucción ósea, que se corresponde clínicamente con una mayor profundidad de bolsa y de índice gingival.

Es interesante señalar que otros autores refuerzan con sus investigaciones estos datos, donde en la comparación entre pacientes diabéticos y pacientes controles de OPG, RANKL, y niveles de melatonina salivar y melatonina en plasma; los pacientes diabéticos tuvieron niveles salivares significativamente más elevados de RANKL que los sujetos sanos, así como valores significativamente más bajos de OPG salivar, melatonina salivar y melatonina plasmática (Galluzi F, et al 2005).

La inhibición de RANK-L puede ofrecer un acercamiento racional al tratamiento de la enfermedad periodontal. Recordamos que RANK-L es una molécula recientemente descubierta que se expresa altamente en tejido linfoide, hueso trabecular, particularmente en áreas asociadas con remodelación activa de hueso u osteolisis inflamatoria. (Yasuda H et al, 1998).

Existen pocos estudios relacionando RANK-L y su papel potencial en la enfermedad periodontal. Recientemente Lossdörfer S et al, 2002 han encontrado RANK y RANK-L en tejidos dentales y dientes deciduales humanos. RANK-L también ha sido asociada con la destrucción de tejido alveolar óseo durante la infección periodontal en modelos de estudio animal. Estos resultados indican que la destrucción alveolar ósea observada en la periodontitis es debida, al menos en parte, a la acción de los osteoclastos y es mediada por RANK-L.

Otrowska Z. et al en 2010 estudiaron en 57 chicas entre 13 y 18 años de edad con anorexia nerviosa la relación existente entre la melatonina y la pérdida de su estado óseo mediado por el sistema OPG/RANKL, obteniendo como resultado que la reducción de la proporción OPG/RANKL en las chicas con anorexia nerviosa explicaba en parte el aumento en la pérdida de hueso observada en estos pacientes. Estudios realizados por Teng et al, 2000 incluían a RANKL y OPG en la patogénesis de la enfermedad periodontal, demostrando que la estimulación de células T-CD4 por *A. actinomycetemcomitans* inducían la producción de RANKL y la activación de

osteoclastos y que in vivo la inhibición de RANKL con aumento de OPG disminuía la destrucción de hueso alveolar y reducía el número de osteoclastos periodontales.

Recordamos que el líquido clevicular gingival presenta propiedades como atravesar el tejido inflamado y transportar moléculas envueltas en el proceso destructivo, ofreciendo así una elevada fuente de factores que pueden asociarse a la actividad osteoclástica con potencial de ser detectados con anterioridad a la pérdida irreversible de hueso. (Mc Cauley LK & Nohutcu RM, 2002)

Por estas características la mayoría de los estudios de los mediadores de la enfermedad periodontal relacionados con el sistema OPG/RANKL se realizan analizando el líquido clevicular gingival.

La presencia de RANK-L en líquido clevicular gingival de los sitios con pérdida episódica de tejido conectivo implica un papel potencial en el mecanismo de la destrucción de tejido asociada a periodontitis.

En el líquido clevicular gingival de pacientes con periodontitis se han localizado varias citoquinas proinflamatorias y proreabsortivas. Interesantemente el factor de necrosis tumoral $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 y la prostaglandina E<sub>2</sub> han demostrado aumentar los niveles de RANKL y niveles de proteínas, e inhibir RNAm de OPG en los osteoblastos (Hofbauer et al, 2000).

Fue el grupo de Mogi M, et al 2004 quienes tras el análisis de los indicadores de la respuesta inmune y analizando el líquido clevicular gingival con el test ELISA establecen sobre una muestra de 132 pacientes la hipótesis de que el desequilibrio entre el sistema RANKL/OPG está relacionado con la patogénesis de la periodontitis. En su estudio las concentraciones de RANKL fueron significativamente mayores en pacientes con periodontitis que en pacientes sanos al mismo tiempo que se demostró un descenso en las concentraciones de OPG. Resultados nuevamente similares a los encontrados en nuestro estudio.

Así como el de Vernal R et al, 2004 donde se demuestra igualmente que la cantidad total de RANK-L en líquido clevicular gingival está significativamente aumentado en la enfermedad periodontal, apoyando así su papel en la pérdida de hueso alveolar en esta enfermedad. Partiendo que los linfocitos T predominan en las lesiones crónicas, reflejan en su muestra de 20 sujetos que la cantidad total presente de RANK-L en el líquido

clevicular gingival en pacientes con periodontitis era mayor que en los pacientes control.

Los niveles de melatonina en el líquido clevicular gingival son 60% más bajos que en suero, y 30% más bajos que los niveles salivares. La medida de los niveles salivares de melatonina es un técnica fiable para monitorizar el ritmo circadiano de la misma. (Cutando A. et al, 2007). En nuestro estudio el análisis de los datos lo realizamos sobre la recolección de saliva a las 9.00h, tras la masticación de parafina durante 7min estimulando así a la misma previamente. Obteniendo en nuestros resultados que pacientes con diabetes y enfermedad periodontal tenían niveles más altos de RANKL que los sujetos sanos, así como valores significativamente más bajos de OPG salivar, melatonina salivar y melatonina en plasma. Alrededor del 24-33% de la melatonina plasmática aparece en la saliva, donde puede ser fácilmente medida por radioinmunoensayo (RIA). (McIntyre IM. et al, 1987)(Vakkuri O. 1985).

Nuestros resultados en este modelo de enfermedad periodontal en pacientes diabéticos con un descenso de niveles de RANKL salivares asociados con un aumento de niveles de OPG confirma los datos obtenidos en otros estudios experimentales previos (Koyama H. et al, 2002) (Satomura K et al, 2007) (Roth JA et al, 1999). La medida de la melatonina salivar provee una forma accesible a la obtención de datos sobre la excreción de la melatonina a través de esta ruta. Existe una correlación significativa positiva entre la melatonina salivar y plasmática, siendo la primera un indicador fiable de los niveles de melatonina en plasma. Midiendo la melatonina salivar, se pueden estudiar patologías orales en relación al comportamiento de la melatonina en plasma y saliva. (Cutando A. et al, 2003).

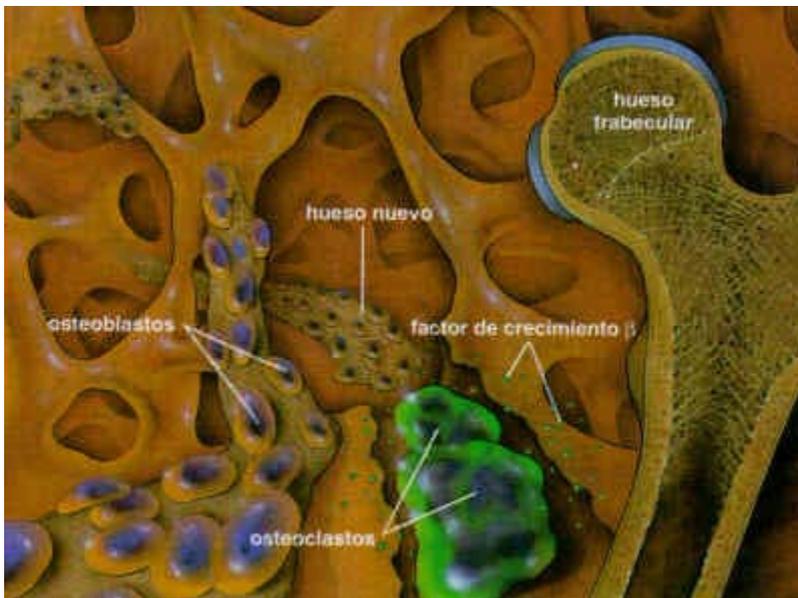
## 1.2. LA MELATONINA Y EL HUESO:

En este trabajo hemos comprobado como se modificaban los marcadores de remodelado óseo tras el tratamiento con melatonina tópica.

Diversos trabajos científicos han relacionado el efecto favorable que la melatonina tiene sobre el metabolismo óseo, por ejemplo la osteoporosis, al actuar sobre diferentes moléculas que están implicadas en dicho metabolismo como son las BMP, diferentes citoquinas y moléculas como RANKL u OPG. Pero no se había evaluado el

comportamiento que podría tener la melatonina sobre la enfermedad periodontal en donde hay una destrucción de hueso alveolar en mayor o menor medida. Nuestro estudio como ya hemos comentado con anterioridad, se centra en valorar el comportamiento que tiene la aplicación tópica de melatonina en pacientes periodontales diabéticos, estudiando la evolución clínica del paciente y valorando los cambios que se producen en las concentraciones de los marcadores bioquímicos relacionados con la formación y destrucción ósea.

La formación ósea se origina a través de procesos de remodelado que se suceden continuamente, incluyendo la resorción ósea por parte de los osteoclastos del hueso viejo, y la subsecuente formación de hueso nuevo por los osteoblastos. La posible influencia de la melatonina sobre el metabolismo del hueso ha sido repetidamente propuesta por diferentes autores durante las últimas 4 décadas.



Una consecuencia importante de la actividad osteoclástica es la generación de radicales libres, que contribuye a un proceso de degradación y reabsorción. Las acciones de la melatonina sobre la función ósea incluyen la promoción y diferenciación de osteoblastos, actividad y expresión de osteoprotegerina lo que previene la diferenciación de osteoclastos y la eliminación de radicales libres generados por la actividad osteoclástica y responsables de la reabsorción ósea.

Estudios como los realizados por Roth J.A et al, en 1999 defienden que la melatonina es capaz de inducir la diferenciación y mineralización de las células osteoblásticas

cultivadas. Esta es la primera demostración de que la melatonina tiene el potencial para jugar un papel esencial en la regulación del crecimiento óseo, lo que la situaría en alta colaboración con otros agentes como glucocorticoides, proteínas óseas morfogénicas y vitamina D<sub>3</sub> que son conocidas por potenciar la estimulación de la mineralización estimulando a los osteoblastos.

La literatura recoge estudios como los de Koyama et al, 2002 donde se demuestra que la melatonina inducía la expresión de OPG y suprimía la expresión de RANKL in Vitro, resultados que se traducen en que la melatonina participa en la inhibición de la reabsorción ósea, al menos en parte, a través de la regulación de la formación y activación de los osteoclastos mediados por RANKL. Resultados nuevamente similares a los obtenidos en la segunda fase de nuestro estudio, donde encontramos una asociación significativa entre cambios de niveles salivares de OPG antes y después de la aplicación tópica de melatonina. Siendo estas concentraciones salivares de OPG mayores tras la aplicación de melatonina tópica durante 20 días. Del mismo modo, se recogen una disminución en las concentraciones de RANKL tras la aplicación del tratamiento, que a su vez se corresponden con la disminución en los niveles de fosfatasa alcalina, ácida, osteocalcina y osteopontina.

Existen sin embargo datos en contra de la hipótesis del efecto de la melatonina sobre la formación ósea de osteoblastos, donde Ostrowska (Ostrowska et al, 2003) encontró que en las ratas Wistar macho, con altas concentraciones de melatonina en plasma se correlacionaban con bajos niveles de marcadores formadores de hueso y que la pinealectomía elevaba los niveles de biomarcadores de metabolismo óseo, alterando así la fase y amplitud de su ciclo circadiano. En otro estudio de 2002 Suzuki y Hatorri, cultivaron osteoblastos en la presencia de osteoclastos y analizaron así el efecto de la melatonina sobre ambos. Estos autores señalan la importancia de la interacción célula con célula. Es importante destacar que en nuestro trabajo existe una asociación significativa en los valores de OPG antes y después del tratamiento con melatonina en los pacientes diabéticos y con enfermedad periodontal con los valores antes y después de índice gingival y profundidad de bolsa. Lo que demuestra que una disminución en los valores de índice gingival y profundidad de bolsa se asocia con un aumento de los valores de OPG. Lo que se relaciona con una mejora en el estado clínico de la enfermedad periodontal. Por lo que la aplicación de melatonina en el grupo de pacientes

diabéticos con enfermedad periodontal no sólo mejora la clínica, sino que aumenta los valores de OPG, y disminuye los niveles de RANKL, fosfatasa ácida y alcalina, osteopontina y osteocalcina. Existiendo correlaciones estadísticamente significativas del cambio de estos valores bioquímicos con los valores clínicos de profundidad de bolsa e índice gingival.

En el momento actual no hay ensayos clínicos focalizados en el posible valor terapéutico de la melatonina en el tratamiento de la osteoporosis. Aunque algunos estudios epidemiológicos refuerzan el posible rol etiológico en la alteración de secreción de melatonina en la misma. Este es el caso de un reciente estudio de Feskanich et al, 2009; que estableció en una muestra de más de 38,000 mujeres postmenopáusicas que el trabajo nocturno causaba alteraciones en los patrones de secreción de melatonina así como interrupciones severas en el ritmo del ciclo circadiano, al analizar un aumento de riesgo de fracturas de cadera y muñeca en 8 años de período de seguimiento.

Otros estudios experimentales como el de Oktem (Oktem et al, 2006) demostraron que la mayoría de las ratas ooforectomizadas (como modelo de menopausia) sugieren, en general, un rol protector de la melatonina en la prevención de la degradación ósea y la promoción de la formación ósea.

En nuestro estudio obtenemos resultados similares a los referidos con anterioridad en moléculas que directamente están involucradas en el metabolismo óseo, y que se ven directamente afectadas de manera positiva con la utilización de la melatonina en cortos períodos de tiempo. Ya que se refleja un aumento de los niveles de OPG tras la aplicación de melatonina tópica, que asociamos al aumento de la actividad osteoblástica, y acción protectora frente a la acción destructiva ósea y una disminución de los niveles de RANKL, que asociamos a la actividad osteoclástica. Así como una disminución significativa de los valores de fosfatasa alcalina, osteocalcina, fosfatasa ácida y osteopontina, proteínas asociadas a la destrucción ósea. Al mismo tiempo en nuestro estudio analizamos otras variables clínicas, asociadas específicamente a cavidad oral, tras el tratamiento con melatonina tópica. Mejorando el índice gingival en nuestros pacientes, con la disminución del mismo estadísticamente significativa y una disminución de la profundidad de bolsa periodontal.

Sin embargo, a pesar del cambio observado en los marcadores bioquímicos que apoyan la teoría de una regeneración ósea ocurrida en el alveolo dental tras la aplicación tópica de melatonina durante un período de 20 días, que se corresponde con una aparente asociación clínica en la mejora en la profundidad de bolsa y del índice gingival, no debemos de olvidar las características antiinflamatorias que se le atribuyen a la acción de la melatonina, y que probablemente sean las responsables directas de esta disminución en la profundidad de bolsa y el índice gingival. Ya que el período de tiempo evaluado, se consideraría corto para una regeneración ósea valorable, que probablemente no plasmaría una afectación positiva del hueso alveolar. Un estudio radiológico que apoyara estos hechos sólo tendría valor en la comparativa durante un tiempo más prolongado, de seis meses a un año, viendo la evolución de la enfermedad periodontal junto a radiografías seriadas. Estudio que sería interesante plantear en un futuro.

Numerosos estudios proponen a la melatonina como molécula antiinflamatoria que reduce con sus propiedades antioxidantes los daños causados por los agentes oxidativos generados por las células inmunes, así como a los mediadores de la pro-inflamación, rompiendo el círculo vicioso del reclutamiento oxidación/leucocito, y promoviendo la apoptosis de los mismos (Radogna F et al, 2010). Esto se traduce en la inhibición de las fases tardías y crónicas de la respuesta inflamatoria, como ocurriría en la enfermedad periodontal.

Nuestro estudio señala niveles bajos de melatonina salival y plasmática en los pacientes diabéticos seleccionados, lo que se asocia un aumento en el índice de enfermedad periodontal gingival y en la profundidad del bolsillo periodontal. Otros estudios recientes han demostrado que un derivado de la melatonina 1-benzyl-2,4,6 tribromomelatonin, tiene una actividad más potente que la melatonina en sí misma, y que podría tener un uso potencial en el tratamiento de la enfermedad ósea de la cavidad oral, así como en la osteoporosis (Suzuki et al, 2008).

Los niveles de melatonina salivar en nuestros pacientes fueron medidos por RIA (IBL, Hamburg GmbH, Germany) en la primera fase, donde comparamos al grupo de pacientes diabéticos con periodontitis con el grupo control, obteniendo resultados significativamente más bajos en pacientes diabéticos con periodontitis que en pacientes

sanos, en las variables analizadas de melatonina salivar y melatonina plasmática. Lo que podría reforzar la asociación entre la melatonina y el efecto protector que ejerce la misma frente a la inflamación.

La melatonina tiene como hemos señalado anteriormente una relación con el sistema inmune, modulando su respuesta a los diferentes tipos de enfermedades, incluyendo la patología oral como la periodontitis. La inhibición de la producción de melatonina por la luz o el propanolol o un bloqueador de receptor B-adrenérgico, produce una supresión de la respuesta humoral y celular del sistema inmune. Esta observación puede extenderse a la cavidad oral, desde que la presencia de la enfermedad periodontal ha estado cercanamente relacionada con la disminución de las concentraciones de plasma y melatonina salivar, aumentando la producción de citocinas y la respuesta humoral y celular. (Cutando A, et al. 2003).

Los efectos positivos de la melatonina y sus derivados sobre los mediadores inflamatorios y las células óseas son beneficiosos mejorando la salud periodontal. Evidencias recientes prueban que los niveles de melatonina salivar podrían variar de acuerdo al grado de enfermedad periodontal (Cutando A. et al, 2006). En algunos estudios se encontró una relación negativa entre los niveles de melatonina salivar y la severidad de la enfermedad periodontal. Lo que consecuentemente asoció que una disminución en la producción de saliva y melatonina con la edad predispone a individuos mayores a aumentar el riesgo de enfermedad oral y periodontal. Los procedimientos dentales, incluyendo la extracción dental, podrían dar como resultado una inflamación y estrés oxidativo en la cavidad oral. Tras la administración local, la acción antioxidativa de la melatonina podría ser beneficiosa contrarrestando este estrés oxidativo (Cutando A. et al, 2007).

Estudios recientes de Cevik-Aras H. et al, 2011 proponen que la melatonina induce la síntesis proteica en la glándula parótida de la rata y por lo tanto afecta a la actividad glandular. Esta novedosa acción de la melatonina podría incrementar sus implicaciones clínicas en el tratamiento de la xerostomía, caries, periodontitis, infecciones de la mucosa oral, inflamación de la glándula salivar, y cura de heridas.

(Aras H.C. & Ekström J, 2008).

Todo ello apoya la acción favorable de la melatonina sobre la patología en la cavidad oral, que encontramos a su vez en la segunda fase de nuestros resultados.

Dentro de las limitaciones de nuestro trabajo encontramos un escaso tamaño muestral, lo que limita trasladar las conclusiones a la población general. La posibilidad de haber medido otros parámetros como glucemias en los pacientes diabéticos, melatonina salivar y plasmática tras el tratamiento o la regeneración ósea a los 20 días de la aplicación de melatonina. Otra de las limitaciones que encontramos es la pérdida de pacientes en el seguimiento de los mismos desde el inicio del estudio.

Por tanto, la enfermedad periodontal es una enfermedad crónica inflamatoria de los tejidos de soporte dentales que se constituye como una de las causas más importantes de pérdida de dientes en el hombre. La periodontitis crónica genera debilidad en los tejidos de soporte dentales, resultando una destrucción progresiva del ligamento periodontal y del hueso alveolar, con la formación de bolsa periodontal, recesión gingival o ambas.

Por la importancia de esta enfermedad en la población general y de su asociación con la población diabética, así como por el aumento de la prevalencia de la misma en los pacientes diabéticos y la relación entre la hiperglicemia y la disminución de síntesis ósea se ha establecido el interés de este estudio.

Obteniendo que aquellos factores favorecedores de la acción osteoclástica, por lo tanto destrucción ósea, RANKL, osteocalcina, osteopontina, fosfatasa alcalina y fosfatasa ácida están aumentados en los pacientes diabéticos con enfermedad periodontal. mientras que los valores de OPG y RANK están disminuidos. Tal y como se corresponde con otros trabajos en la literatura. Tras la aplicación de melatonina en pacientes enfermos se observa que tras la aplicación de melatonina los niveles de OPG han aumentado mientras que los de RANKL, osteocalcina, osteopontina, fosfatasa alcalina y fosfatasa ácida han disminuido, lo que defiende y se corresponde con otros datos en la literatura, al mismo tiempo que señala las propiedades antiinflamatorias y antireasortivas de la melatonina.

Conclusiones finales:

1. El estado de salud periodontal se encuentra disminuido en pacientes diabéticos con respecto a los pacientes sanos control. Y encontramos marcadores como RANKL, Fosfatasa ácida, Fosfatasa alcalina, osteopontina y calcitonina, indicadores de reabsorción ósea, aumentados.
2. Evolución en la disminución del índice gingival y la profundidad de bolsa tras la aplicación de melatonina tópica en el paciente diabético.
3. Los marcadores óseos indicadores de la afectación ósea como RANKL, Fosfatasa ácida, Fosfatasa alcalina, osteopontina y osteocalcina están aumentados en pacientes diabéticos con enfermedad periodontal. Tras la aplicación de melatonina tópica se produce una disminución de los mismos.
4. La evolución clínica de la patología periodontal tras la aplicación de melatonina muestra una disminución en la inflamación periodontal, mejorando el índice gingival y disminuyendo la profundidad de bolsa.

**BIBLIOGRAFÍA:**

1. Alaluusua S, Asikainen S, Lai CH. Intrafamilial transmission of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *J Periodontol* 1991; 62: 207-10. *Rev Cubana Estomatol* 2010; 47: 404-416.
2. Aneiros-Fernández J, et al. MT1 Melatonin Receptor Expression in Warthin's Tumor. *Pathol Oncol Res.* 2012.
3. Arendt J, Aldhous J and Marks V. Alleviation of jet lag by melatonin: preliminary results of controlled double blind trial. *BMJ* 1986; 292:1970.
4. Baliga RS, MacAllister RJ and Hobbs AJ. New perspectives for the treatment of pulmonary hypertension. *BR J. Pharmacol.* 2011; 163:125-140.
5. Baydas G, Canatan H, Turkoglu A. Comparative analysis of the protective effects of melatonin and vitamin E on streptozoin-induced diabetes mellitus. *J Pineal Res* 2002; 32: 225-230.
6. Belibasakis GN, Bostanci N. The RANKL-OPG system in clinical periodontology. *J Clin Periodontol* 2011, doi: 10.1111/j.1600-051X.2011.01810.x.
7. Bermejo C. Sondaje Florida Probe. *Revistahigienistas* 2012; 24.
8. Boyce BF, Xing L. The RANKL/RANK/OPG pathway. *Curr Osteoporos Rep* 2007; 5:98-104.
9. Bowers G, et al. Histologic comparison of regeneration in human intrabony defects when osteogenin is combined with demineralised freeze-dried bone allograft and with purified bovine collagen. *J Periodontol.* 1991; 62: 690-702.
10. Bowers RR, Kim JW, Otto TC and Lane MD. Stable stem cell commitment to the adipocyte lineage by inhibition of DNA methylation: role of the BMP-4 gene. *Proc. Natl. Acad.Sci.U.S.A.* 2006;103:13022-12027.
11. Browner WS, Lui LY, Cummings SR. Associations of serum osteoprotegerin levels with diabetes, stroke, bone density, fractures, and mortality in elderly women. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; 86: 631-637.
12. Bucay N, Sarosi I, Dunstan CR et al. Osteoprotegerin- deficient mice develop early onset osteoporosis and arterial calcification. *Genes Dev* 1998; 12: 1260-1268.
13. Burgess HJ & Fogg LF. Individual differences in the amount and timing of salivary melatonin secretion. *PLoS ONE* 2008; 3 Article ID e3055.
14. Calderón A, et al. Diabetes y Enfermedad periodontal. 2008.

15. Cevik-Aras H, Godoy T, and Ekstrom J. Melatonin induced protein synthesis in the rat parotid gland. *Journal of Physiology and Pharmacology* 2011; 62(1): 95-99.
16. Chen C, et al. An integrated functional genomics screening program reveals a role for BMP-9 in glucose homeostasis. *Nat. Biotechnol.* 2003; 21:294-301.
17. Chen JW, Christiansen JS, Lauritzen T. Limitations to subcutaneous insulin administration in type 1 diabetes. *Diabetes Obes. Metab.* 2003;5: 223-233.
18. Chen TL, Shen WJ and Kraemer FB. Human BMP-7/OP-1 induces the growth and differentiation of adipocytes and osteoblast in bone marrow stromal cell cultures. *J.Cell Biochem.* 2001; 82:187-199.
19. Chiu-Jo W & Hsein-Kun L. Smad signal pathway in BMP-2 induced osteogenesis a mini review. *J Dent Sci* 2008; 3 (1): 13-21.
20. Cornier MA, et al. The metabolic syndrome. *Endocr. Rev.* 2008;29: 777-822.
21. Crotti T, Smith MD, Hirsch R et al. Receptor activator NF kappaB ligand (RANKL) and osteoprotegerin (OPG) protein expression in periodontitis. *J Periodontal Res* 2003;38: 380-387.
22. Cubero J, Narciso D, Aparicio S, et al. Improved circadian sleep-wake cycle in infants fed a day/night dissociated formula milk. *Neuroendocrinology Letters* 2006; 27: 373-380.
23. Cutando A, Arana C, Gómez- Moreno G et al. Local application of melatonin into alveolar sockets of Beagle dogs reduces tooth removal-induced oxidative stress. *J Periodontol* 2007; 78 (3): 576-583.
24. Cutando A, Galindo P, Gómez-Moreno G et al. Relationship between salivary melatonin and severity of periodontal disease. *J Periodontol* 2006; 77: 1533-1538.
25. Cutando A, Gómez- Moreno G, Arana C, Escames G and Acuña-Castroviejo D. Melatonin reduces oxidative stress because of tooth removal. *Journal of Pineal Research* 2007; 42(4): 419-420.
26. Cutando A, Gómez- Moreno G, Arana C, Acuña- Castroviejo D, and Reiter RJ. Melatonin potential functions in the oral cavity. *Journal of Periodontology* 2007; 78: 1094-1102.
27. 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: 239-244.

28. Dabra S & Singh P. Evaluating the levels of salivary alkaline and acid phosphatase activities as biochemical markers for periodontal disease: A case series. *Dent Res J.* 2012 ; 9(1): 41-45.
29. Dahlitz M, Alvarez B, Vignau J et al. Delayed sleep phase syndrome response to melatonin. *Lancet* 1991; 337:1121-1124.
30. Dovio A, Data V, Carignola R et al. Circulating osteoprotegerin and soluble RANK ligand in systemic sclerosis. *J Rheumatol* 2008; 35: 2206-2213.
31. Ducy P et al. Increased bone formation in osteocalcin-deficient mice. *Nature* 1996; 382: 448-452.
32. Dziegiel P, Podhorska-okolow M, Zabel M. Melatonin: adjuvant therapy of malignant tumor. *Med Sci Moni* 2008; 14: RA64-70.
33. Escames G, López A, García JA, García L, Acuña Castroviejo d, García JJ, et al. The role of mitochondria in brain aging and the effects of melatonin. *Curr Neuropharmacol* 2010; 8: 182-93.
34. Fahrleitner-Pammer A, Dobnig H, Dimai HP et al. The effect of RANKL and OPG on bone mineral density in predialysis chronic renal failure. *Clin Nephrol* 2009;71:652-659.
35. Feskanich D, Hankinson SE, Schernhammer ES. Nightshift work and fracture risk. The Nurses's Health Study. *Osteoporosis International.* 2009; 20: 537-542.
36. Fiorellini JP et al. Randomized study evaluating recombinant human bone morphogenetic protein.2 for extraction socket augmentation. *J Periodontl.* 2005; 76:605-13.
37. Forrest CM, Mackay GM, Stoy N, Stone TW, Darlington LG. Inflammatory status and kynurenine metabolism in rheumatoid arthritis treated with melatonin. *Br J. Clin Pharmacol* 2007; 64:517-26.
38. Galluzzi F, et al. Osteoprotegerin serum levels in children with type 1 diabetes: a potential modulating role in bone status. *Eur J Endocrinol.* 2005; 153: 879-885.
39. Garbarino- Pico E, Carpentieri AR, Vaqué AM, Macchione AF, Vermouth NT. Pup circadian Rhythm entretainment-effect of maternal ganglionectomy or pinealectomy. *Physiol Behav*2006; 40:318-25.
40. Gitto E, Romeo C, Reiter R.J. et al. Melatonin reduces oxidative stress in surgical neonatos. *Journal of Pediatric Surgery* 2004; 39: 184-189.

41. Gómez-Moreno G, Cutando-Soriano A, Arana C, Galindo P, Bolaños J, Acuña Castroviejo D, et al. Melatonin expresión in periodontal disease. *J Periodont Res* 2007; 42: 536-540.
42. Gómez-Moreno G, Guardia J, Ferrera MJ, Cutando A, Reiter RJ. Melatonin in diseases of the oral cavity. *Oral Diseases* 2010; 16: 242-247.
43. Gómez-Moreno G, Cutando-Soriano A, Arana C, Galindo P, Bolaños J, Acuña Castroviejo D, et al. Melatonin expresión in periodontal disease. *J Periodont Res* 2007; 42: 536-540.
44. Gómez- Moreno G, Guardia J, Ferrera MJ, Cutando A, Reiter RJ. Melatonin in disease of the oral cavity. *Oral Dis* 2009; doi: 10.1111/j.1601-0825.2009.01610.x.
45. Haffajee AD, Socransky SS. Microbial etiological agents of destructive periodontal diseases. *Periodontol* 2000 1994;5:78-111.
46. Hardeland R. New approaches in the management of insomnia: weighing the advantages of prolonged-release melatonin and synthetic melatonergic agonists. *Neuropsychiatr Dis Treat* 2009; 5: 341-54.
47. Haynes DR, BArg E, Crotti TN et al. Osteoprotegerin expresión in synovial tissue from patients with rheumatoid arthritis, spondyloarthropathies and osteoarthritis and normal controls. *Rheumatology* 2003;42:123-134.
48. Heymann MF, Riet A, Le Goff B et al. OPG, RANK and RANK ligand expression in thyroid lesions. *Regul Pept* 2008; 148:46-53.
49. Hofbauer LC, Gori F, Riggs BL, Lacey DL, Cunstán CR, Spelsberg TC et al. Stimulation of osteoprotegerin ligand and inhibition of osteoprotegerin production by glucocorticoids in human osteoblastic lineage cells: potential paracrine mechanisms of glucocorticoid-induced osteoporosis. *1999 Endocrinology* 140: 4382-4389.
50. Hofbauer LC, Schopper M. Clinical implications of the ostoprotegerin/RANKL/RANK system for bone and vascular disease. *JAMA* 2004; 292-295.
51. Hsu H, Lacey DL, Dunstan CR, Solovyev I, Colombero A, Timms E, et al. Tumor necrosis factor receptor family member RANK mediates osteoclast differentiation and activation induced by osteoprotegerin ligand. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96: 3540-3545.

52. Hughes FJ, Turner W, Belibasakis G, Martuscelli G. Effect of growth factors and cytokines on osteoblast differentiation. *Periodontol* 2000.2006; 41: 48-72.
53. Ianas O, Olnescu R, Badescu I. Melatonin involvement in oxidative stress. *Rom J Endocrinol* 1991; 29:147-53.
54. Ishikawa I & Cimasoni G. Alkaline phosphatase in human gingival fluid and its relation to periodontitis. *Arch Oral Biol.* 1970; 15: 1401-1404.
55. Isoda K, et al. Osteopontin plays an important role in the development of medial thickening and neointimal formation. *Circ Res* 2002; 91(1): 77-82.
56. James SP, Mendelson WB, Sack DA et al. The effect of melatonin on normal sleep. *Neuropsychopharmacology* 1988; 1:41-44.
57. Kanatani M, et al. Stimulatory effect of bone morphogenetic protein-2 on osteoclast-like cell formation and bone-resorbing activity. *J. Bone Miner. Res.* 1995; 10: 1681-90.
58. Kajiya M, Giro G, Taubman MA, Han X, Mayer MP, Kawai T. Role of periodontal pathogenic bacteria in RANKL-mediated bone destruction in periodontal disease. *J Oral Microbiol* 2010; 2, doi:10.3402/jom.v20.5532.
59. Karasek M, Winczyk K. Melatonin in Humans. *J Physiol Pharmacol* 2006; 57:19-39.
60. Khocht A, Knang-Ming Ch. Clinical evaluation of electronic and manual constant force probes. *J Periodontol*, 1998; 69:10-25.
61. Khosla S. Minireview: The OPG/RANKL/RANK system. *Endocrinology* 2001; 142:5050-5055.
62. Khovidhunkit SO, Suwantuntula T, Thameboon S, Mitriratranakul S, Chomkhakhai U, Khovidhunkit W. Xerostomia, hyposalivation and oral microbiota in type 2 diabetic patients: a preliminary study. *J Med Assoc Thai* 2009; 92: 1220-1228.
63. King GN, Cochran DL. Factors that moderate the effects of bone morphogenetic protein induced periodontal regeneration: A critical review. *J Periodontol*, 2002; 73:925-36.
64. Kiss J, Banhegyi D, Csaba G. Endocrine regulation of blood calcium level. Relationship between the pineal body and the parathyroid glands. *Acta Med Acad Sci Hung* 1969; 26:363-370.
65. Kitazawa R, Kitazawa S, Maeda S. Promotor structure of mouse RANKL/TRANSC/OPGL/ODF gen. 1999 *Biochim Biophys Acta* 1445:134-141.

66. 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 Mineral Res* 2002; 17: 1219-1229.
67. Laakso ML, Porkka-Heiskanen T, Alila A, Stenberg D, Johansson G. Correlation between salivary and serum melatonin: dependence on serum melatonin levels. *J Pineal Res* 1990; 9:39-50.
68. Lane EA, Moss HB. Pharmacokinetics of melatonin in man: first pass hepatic metabolism. *J Clin Endocrinol Met Sci Monit* 2008; 14: RA64-70.
69. Lerner AB, Case Jd, Heinzelman RV. Structure of melatonin. *J Am Chem Soc* 1959; 81: 6084-5.
70. Liu D, Xu JK, Figliomeni L et al. Expression of RANKL and OPG mRNA in periodontal disease: possible involvement in bone destruction. *Int J Mol Med* 2003; 11:17-21.
71. Loesche WJ. Bacterial mediators in periodontal disease. *Clin Infect Dis* 1993; 16 Suppl 4: S203-S210.
72. Loesche WJ, Robinson JP, Flynn, Hudson JL, Duque RE. Reduced oxidative function in gingival crevicular neutrophils in periodontal disease. *Infect Immun* 1998; 56:156-60.
73. Lossdörfer S, Götz W, Jäger A. Immunohistochemical localization of receptor activator of nuclear factor kappa (RANK) and its ligand (RANKL) in human deciduous teeth. *Calcif Tissue Int* 2002; 71: 45-52.
74. Lu HK, Chen YL, Chang HC, LI CL, Kuo MY. Identification of the osteoprotegerin/receptor activator of nuclear factor-kappa B ligand system in gingival crevicular fluid and tissue of patients with chronic periodontitis. *J Periodontal Res* 2006; 41:354-360.
75. Maestroni GMJ. The immunotherapeutic potential of melatonin. *Expert Opin Investig Drugs* 2001; 10: 467-476.
76. MacHida M, Dubousset J, Yamada T, and Kimura J. Serum Melatonin levels in adolescent idiopathic scoliosis prediction and prevention for curve progression- a prospective study. *Journal of Pineal Research* 2009 ; 46: 344-348.

77. McCauley LK, Nohutcu RM. Mediators of periodontal osseous destruction and remodelling: Principles and implications for diagnosis and therapy. *J Periodontol* 2002; 73: 1377-1391.
78. McIntyre IM, et al. Melatonin rhythm in human plasma and saliva. *J Pineal Res* 1987;4:177-183.
79. Margolin MD, et al. Maxillary sinus augmentation in the non-human primate: A comparative radiographic and histologic study between recombinant Human Osteogenic Protein-1 and Natural Bone Mineral. *J. Periodontol.* 1998; 69:911-9.
80. Meejun K. & Senyon C. BMPs and their clinical potentials. *BMP Rep.* 2011; 44(10): 619-634.
81. Meikle MC, Heath JK, Reynolds JJ. Advances in understanding cell interactions in tissue resorption: relevance to the pathogenesis of periodontal diseases and a new hypothesis. *J Oral Pathol* 1986; 15:239-50.
82. Miles A & Philbrick DRS. Melatonin: current perspectives in laboratory medicine and clinical research. *Crit Rev Clin Lab Sci*, 1987; in press.
83. Miles A, Philbrick DRS, Thomas DR, Grey JE. Diagnostic and clinical implications of plasma and salivary melatonin estimation in laboratory medicine. *Clin Chem* 1987; 33:1295-7.
84. Miles A, Thomas DR, Grey JE, Pugh AJ. Salivary melatonin assay in laboratory medicine-longitudinal profiles of secretion in healthy men. *Clin Chem* 1987, 33: 1957-1959.
85. Mogi M, Otogoto J, Ota N, Togari A. Differential expresión of RANKL and osteoprotegerin in gingival crevicular fluid of patients with periodontitis. *J Dent Res* 2004; 83:166-169.
86. Moreno-Rubio J, Herrero-Beaumont G, Tardio L, Alvarez-Soria MA, Largo R. Nonsteroidal antiinflammatory drugs and prostaglandin E(2) modulate the síntesis of osteoprotegerin and RANKL in the cartilage of patients with Sever knee osteoarthritis. *Arthritis Rheum* 2010;62:478-488.
87. Moore S. et al. Antioxidant activity of saliva and periodontal disease. *Free Radic Res* 1994, 21: 417-425.
92. Moore WEC. Microbiology off periodontal disease. *J Periodontol Res* 1987; 22: 335-41.

88. Moreau A, Wang DS, Forget S, et al. Melatonin signaling dysfunction in adolescent idiopathic scoliosis. *Spine* 2006; 31: 1131-1136.
89. Moschen AR, Kaser A, Enrich B et al. The RANKL/OPG system is activated in inflammatory bowel disease and relates to the state of bone loss. *Gut* 2005;54: 479-487.
90. Nakagawa T, Yamada S, Tsunoda M, et al. Clinical, microbiological, and immunological Studies following inicial preparation in adult periodontitis. *Bull Tokyo Dent Univ* 1990; 31: 321-31.
91. Nakashima T, Kobayashi Y, Yamasaki S et al. Protein expresi3n and functional difference of membrana-bound and soluble receptor activator of NF-kB ligand: Modulation of the expresi3n by osteotropic factors and cytokines. *Biochem Biophys Res Commun* 2000; 275: 768-775.
92. Numabe Y et al. Analy-sis of saliva for periodontal diagnosis and monitoring. *Periodontology*. 2004; 40: 115-9.
93. Oktem G, Uslu S, Vatansever H, Aktug H, Yurtseven ME and Uysal A. Evaluation of the relationship between inducible nitric oxide synthase (iNOs) activity and effects of melatonin in experimental osteoporosis in the rat. *Surgical and Radiologic Anatomy* 2006; 28: 157-162.
94. Ominsky MS, Li X, Asuncion FJ et al. RANKL inhibition with osteoprotegerin increases bone strength by improving cortical and trabecular bone architecture in ovariectomized rats. *Journal of Bone and Mineral Research* 2008;23:672-682.
95. Ostrowska Z, Kos-Kudla B, Marek B, Swietochowska E, Gorki J. Assessment of the relationship between circadian variations of salivary melatonin levels and type I collagen metabolism in postmenopausal obese women. *Neuroendocrinology* 2001; 22:121-127.
96. Ostrowska Z, Ziora K, Kos-Kuda B et al. Melatonin, the RANKL/RANK/OPG system, and bone metabolismo in girls with anorexia nervosa. *Endokrynol Pol* 2010; 61: 117-123.
97. Page RC. The role of inflammatory mediators in the pathogenesis of periodontal disease. *J Periodont Res* 1991; 26: 230-42.
98. Pandi- Perumal SR, Srinivasan V, Maestroni GJ, Cardinali DP, Poeggeler B, Hardeland R, Melatonin: Nature's most versatile biological signal. *FEBS J* 2006; 273: 2813-38.

99. Panizo S, Cardus A, Encinas M et al. RANKL increases vascular smooth muscle cell calcification through a RANK-BMP dependent pathway. *Journal of the American Heart Association-Circulation Research* 2009;104:1041-1048.
100. Park KH, Kang JW, Lee EM et al. Melatonin promotes osteoblastic differentiation through the BMP/ERK/Wnt signaling pathways. *J Pineal Res* 2011; 49: 364-372.
101. Park YJ, Park JG, Hiyakawa N, Lee YD, Kim SJ, Takemura A. Diurnal and circadian regulation of a melatonin receptor, MT1, in the golden rabbitfish, *Siganus guttatus*. *Gen Comp Endocrinol* 2007; 150:253-62.
102. Petri K, Conaglen JV, Thompson L et al. Effect of melatonin on jet lag after long haul flights. *Br Med J* 1989; 298: 705-707.
103. Pulsatelli L, Dolzani P, Silvestri T et al. Circulating RANKL/OPG in polymyalgia rheumatic. *Clin Exp Rheumatol* 2007;25 621-623.
104. Radogna F, Diederich M, Ghibelli L. Melatonin: a pleiotropic molecule regulating inflammation. *Biochem Pharmacol* 2010; 80:1844-52.
105. Reiter RJ. Normal patterns of melatonin levels in the pineal gland and body fluids of humans and experimental animals. *Journal of neural transmission. Supplementum* 1986; 21: 35-54.
106. Reiter RJ, Tan DX, Manchester LC, Qi W. Biochemical reactivity of melatonin with reactive oxygen and nitrogen species: a review of the evidence. *Cell Biochem Biophys* 2001; 34:237-256.
107. Reiter RJ, Calvo JR, Karbownik M, Qi W, Tan DX. Melatonin and its relation to the immune system and inflammation. *Ann NY Acad Sci* 2000; 917:376-386.
108. Reppert Sm, Weaver DR, Ebisawa T. Cloning and Characterization of a mammalian melatonin receptor that mediates reproductive and circadian response. *Neuron* 1994; 13:1177-85.
109. Ridgeway EE. Periodontal disease: diagnosis and management. *J Am Acad Nurse Pract* 2000;12: 79-84.
110. Ripamonti U. & Renton L. Bone morphogenetic protein and the induction of periodontal tissue regeneration. *Periodontol* 2000-2006; 41:73-87.
111. Roth JA, Kim BG, Lin WL, Cho MI. Melatonin promotes osteoblast differentiation and bone formation. *J Biol Chem* 1999; 274: 22041-22047.

112. Rouster-Stevens KA, Langman CB, Price HE et al. RANKL: Osteoprotegerin ratio and bone mineral density in children with untreated juvenile dermatomyositis. *Arthritis and Rheumatism* 2007; 56: 977-983.
113. Rutherford RB, Sampath TK, Rueger DC, Taylor TD. The use of bovine osteogenic protein to promote rapid osseointegration of endosseous dental implants. *Int J Oral Maxillofac Implants* 1992; 7: 297-301.
114. Sadat-Ali M, Ai-Habdan I, and Al-Othman A. Adolescent idiopathic scoliosis. Is low melatonin a cause? *Joint Bone Spine* 2000; 67: 62-64.
115. Saito A, Saito E, Handa R, Honma Y, Kawanami M. Influence of residual bone on recombinant human bone morphogenetic protein-2 induced periodontal regeneration in experimental periodontitis in dogs. *J.Periodontol* 2009; 80: 961-8.
116. Sánchez-Barceló EJ, Mediavilla MD, Tan DX, Reiter RJ. Scientific basis for the potencial use of melatonin in bone disease: osteoporosis and adolescente idiopathic scoliosis. *J Osteoporosis* 2010, doi: 10.4061/2010/830231.
117. Satomura K, Tobiume S, Tokuyama R et al. Melatonin at pharmacological doses enhances human osteoblastic differentiation in vitro and promotes mouse cortical bone formation in vivo. *J Pineal Res* 2007; 42:231-239.
118. Secchiero P, Corallini F, Pandolfi A et al. An increased osteoprotegerin serum release characterizes the early onset of diabetes mellitus and may contribute to endothelial cell dysfunction. *Am J Pathol* 2006; 169: 2236-2244.
119. Shirakawa S, Tsuchiya S, Tsutsumi Y et al. Time course of saliva and serum melatonin levels after ingestion of melatonin. *Psychiatry Clin Neurosci* 1998; 52:266-267.
120. Shrimali L, Astekar M, Sowmya GV. Correlation of oral manifestations in diabetes mellitus. *Max Pathol.* 2011; 27.
121. Sotile V& Seuwen K. Bone morphogenetic protein-2 stimulates adipogenic differentiation of mesenchymal precursor cells in synergy with BRL 49653 (rosiglitazone) *FEBS Lett* 2000; 475:201-204.
122. Stehle JH, Saade A, Rawashdeh O et al. A Surrey of molecular details in the human pineal gland in the Light of phylogeny, structure, function and chronobiological disease. *J Pineal Res* 2011; 51:17-43.

123. Suzuki N & Hattori. Melatonin suppresses osteoclastic and osteoblastic activities in the sacs of goldfish. *Journal of Pineal Research*. 2003, 33: 253-258.
124. Takai H, Kanematsu M, Yano K, Tsuda E, Higashio K, Ikeda K, et al. Transforming growth factor- $\beta$  stimulates the production of osteoprotegerin/osteoclastogenesis inhibitory factor by bone marrow stromal cells. 1998 *J Biol Chem* 273: 27091-27096.
125. Takayanagi H. Mechanistic insight into osteoclast differentiation in osteoimmunology. *J Mol Med* 2005, 83:170-179.
126. Tamura H, Takasaki A, Miwa I, Taniguchi K, Maekawa R, Asada H, et al. Oxidative stress impairs oocyte quality and melatonin protects oocytes from free radical damage and improves fertilization rate. *J Pineal Res* 2008; 44:280-7.
127. Tan DX, Manchester LC, Terron MP, Flores, Reiter RJ. One molecule, many derivatives: a never ending interaction of melatonin with reactive oxygen and nitrogen species. *J Pineal Res* 2007; 42:28-42.
128. Tan DX, Chen LD, Poeggeler B et al. Melatonin: a potent endogenous hydroxyl radical scavenger. *Endocr J* 1993; 1:56-60.
129. Teng YT, et al. Functional human T-cell immunity and osteoprotegerin ligand control alveolar bone destruction in periodontal infection. *J Clin Invest* 2000; 106: R59-R67.
130. The American Academy of Periodontology. Glossary of Periodontal Terms. The American Academy of Periodontology. Chicago II 2001 4<sup>th</sup> edition.
131. Udagawa N. Mechanism involved in bone resorption. *Biogerontology* 2002;3: 79-83.
132. Uslu S, Uysal A, Oktem G, Yurtseven M, Tanyalcin T and Basdemir G. Constructive effect of exogenous melatonin against osteoporosis after ovariectomy in rats” *Analytical and Quantitative Cytology and Histology* 2007; 29: 317-325.
133. Vadooren B, Cantaert T, Noordenbos T, Tak PP, Baeten D. The abundant synovial expression of the RANK/RANKL/Osteoprotegerin system in peripheral spondylarthritis is partially disconnected from inflammation. *Arthritis and Rheumatism* 2008;58:718-729.
134. Vakkuri O. Diurnal rhythm of melatonin in human saliva. *Acta Physiol Scand* 1985; 124: 409-412.

135. Vega D, Maalouf NM, Sakhaee K. The role of receptor activator of nuclear factor- $\kappa$ B (RANK)/RANK ligand/Osteoprotegerin:clinical implication. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 2007; 92: 4514-4521.
136. Vernal R, Chaparro A, Graumann R, Puente J, Valenzuela MA, Gamonal J. Levels of cytokine receptor activator or nuclear factor kappa B ligand in gingival crevicular fluid in untreated chronic periodontitis patients. *J Periodontol* 2004;75: 1586-1591.
137. Vijayalaxmi Reiter RJ, Tan D, Herman Ts, Thomas Jr CR. Melatonin as a radioprotective agent: a review. *Int J Radiat Oncol Biol Physiol* 2004; 59:639-53.
138. Villata L, Baelum V. Reproducibility of attachment level recordings using an electronic and convencional probe. *J Periodontol*, 1996; 67:1292-1300.
139. Wang X et al. The effect of bone morphogenetic protein on osseointegration of titanium implants. *J Oral Maxillofac Surg.* 1993; 51: 647-51.
140. Waterhouse J, Reilly T, Atkinson G, Edwards B. Jet lag: trends and coping strategies. *Lancet* 2007; 369:1117-29.
141. Winiarska K, Fraczyk T, Malinska D, Drozak J, Bryla J. Melatonin attenuates diabetes-induced oxidative stress in rabbits. *J Pineal Res* 2006;40:168-76.
142. World Health Organization. *Oral Health Surveys: Basic Methods*, 4<sup>th</sup> edition. Geneva: World Health Organization 1987: 31-32.
143. Wozney JM. Bone morphogenetic proteins. *Prog Growth Factor Res* 1989; 1:267-80.
144. Wozney JM. The bone morphogenetic protein family and osteogenesis. *Mol Reprod Dev* 1992; 32:160-7.
145. Wozney JM. The potential role of bone morphogenetic protein in periodontal reconstruction. *J Periodontol.* 1995; 66: 506-10.
146. Yan MN, et al. Reconstruction of peri-implant bone defects using impacted bone allograft and BMP-2 gene modified bone marrow stromal cells. *J Biomed Mater Res A.* 2010; 93: 304-13.
147. Yasuda H, Shima N, Nakagawa N, et al. Osteoclast differentiation factor is a ligand for osteoprotegerin/osteoclastogenesis-inhibitory factor and is identical to TRANCE/RANKL. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 3597-3602.
148. Yoshie H et al. Salivary enzyme levels after scaling and interleukin 1 genotypes in Japanese patients with chronic periodontitis. *J Periodontol.* 2007; 78: 498-503.

149. Yoshitake H, et al. Osteopontin- deficiente mice are resistant to ovariectomy-induced bone resorption. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1999; 6:96 (14): 8156-60.
150. Zdzisinska B, Bjoarska-Junak A, Walter-Croneck A, Kandfer-Szerszen M. Dysregulation of the receptor activator of NF-kappaB ligand and osteoprotegerin production influence the apoptosis of multiple myeloma patients bone marrow stromal cells co-cultured with myeloma cells. *Arch Immunol Ther Exp* 2010; 58:153-163.
151. Zebboudj AF, Imura M and Bostrom K. Matrix GLA protein, a regulatory protein for bone morphogenetic protein-2. *J Biol. Chem*. 2002; 277:4388-4394.
152. Zhang L, Su P, Xu C et al. Melatonin inhibits adipogenesis and enhances osteogenesis of human mesenchymal stem cells by suppressing PPAR $\gamma$  expression and enhancing Runx2 expression. *J Pineal Res* 2011; 49:364-372.