

**Universidad de Granada  
Facultad de Odontología  
Facultad de Medicina  
Departamento de Fisiología**



# **MELATONINA, ESTRÉS OXIDATIVO Y OSTEOINTEGRACIÓN EN LA CAVIDAD ORAL**

**Carlos Arana Molina  
Granada, 2006**

Editor: Editorial de la Universidad de Granada  
Autor: Carlos Arana Molina  
D.L.: Gr. 2165 - 20056  
ISBN: 84-338-4141-6

*A mis padres, Carlos y Carmen, y a Mariela,  
por su constante apoyo, amor y comprensión*



# *Certificaciones*



**Dr. DARÍO ACUÑA CASTROVIEJO**, Catedrático del Departamento de Fisiología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Granada, certifica que:

D. Carlos Arana Molina, Licenciado en Odontología, ha realizado bajo mi dirección y en el Departamento de Fisiología (Instituto de Biotecnología) de la Facultad de Medicina de la Universidad de Granada el presente trabajo de investigación, titulado: “Melatonina, estrés oxidativo y osteointegración en la cavidad oral”, que ha sido objeto de su Tesis Doctoral, reuniendo las condiciones necesarias para optar al grado de Doctor.

Granada, 12 de Septiembre de 2006

El director,

El interesado,

Fdo.: Darío Acuña Castroviejo

Fdo.: Carlos Arana Molina





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

D. Carlos Arana Molina, Licenciado en Odontología, ha realizado bajo mi dirección y en el Departamento de Fisiología (Instituto de Biotecnología) de la Facultad de Medicina de la Universidad de Granada el presente trabajo de investigación, titulado: “Melatonina, estrés oxidativo y osteointegración en la cavidad oral”, que ha sido objeto de su Tesis Doctoral, reuniendo las condiciones necesarias para optar al grado de Doctor.

Granada, 12 de Septiembre de 2006

El director,

El interesado,

Fdo.: Antonio Cutando Soriano

Fdo.: Carlos Arana Molina



**Dr. GERARDO GÓMEZ MORENO**, Profesor Asociado del Departamento de Estomatología de la Facultad de Odontología de la Universidad de Granada, certifica que:

D. Carlos Arana Molina, Licenciado en Odontología, ha realizado bajo mi dirección y en el Departamento de Fisiología (Instituto de Biotecnología) de la Facultad de Medicina de la Universidad de Granada el presente trabajo de investigación, titulado: “Melatonina, estrés oxidativo y osteointegración en la cavidad oral”, que ha sido objeto de su Tesis Doctoral, reuniendo las condiciones necesarias para optar al grado de Doctor.

Granada, 12 de Septiembre de 2006

El director,

El interesado,

Fdo.: Gerardo Gómez Moreno

Fdo.: Carlos Arana Molina



# *Publicaciones*



## **PROYECTOS DE INVESTIGACIÓN QUE HAN FINANCIADO EL ESTUDIO:**

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

- ✚ Fondo de Investigación Sanitaria (FIS) del Ministerio de Sanidad y Consumo (Ref.: PI041610).
- ✚ Ministerio de Educación y Ciencia (Proyecto PETRI nº. 95-0885-OP).
- ✚ Instituto de Salud Carlos III (Red FIS G03/137).
- ✚ Grupos de Investigación CTS-101 y CTS-263 (Junta de Andalucía).

## **PUBLICACIONES RELACIONADAS CON ESTA TESIS DOCTORAL:**

### **TRABAJOS:**

- ✚ Cutando A, Gómez-Moreno G, Villalba J, Ferrera MJ, Escames G, Acuña-Castroviejo D. Relationship between salivary melatonin levels and periodontal status in diabetic patients. *J Pineal Res* 2003; 35:239-44.
- ✚ Cutando A, Galindo P, Gómez-Moreno G, Arana C, Bolaños MJ, Acuña-Castroviejo D, Hom-Lay Wang. Relationship between salivary melatonin and severity of periodontal disease. *J Periodontol* 2006; 77(9):1533-8.
- ✚ Arana C, Cutando A, Ferrera MJ, Gómez-Moreno G, Vander Worf C, Bolaños MJ, Escames G, Acuña-Castroviejo D. Parameters of oxidative stress in saliva from diabetic and parenteral drug addict patients. *J Oral Pathol Med* 2006; 35:554-9.
- ✚ Cutando A, Arana C, Gómez-Moreno G, Carretero M, Ferrera MJ, Reiter RJ, Escames G, Acuña-Castroviejo D. Local application of melatonin into alveolar sockets of Beagle dogs reduces tooth renoval-induced oxidative stress. *J Periodontol* 2006; In press.

- ✚ Cutando A, Arana C, Gómez-Moreno G. Melatonina: Funciones e Implicaciones en la cavidad oral. Avances en Periodoncia e Implantología Oral 2006; In press.

### **COMUNICACIONES A CONGRESOS:**

**Autores:** Gómez-Moreno G, Arana C, Cutando A, Bolaños J, Acuña-Castroviejo D  
**Título:** Comportamiento de la melatonina en pacientes con alteraciones del flujo salival  
**Tipo de participación:** Comunicación Oral  
**Congreso:** XXXVII Reunión Anual de SEPA  
**Publicación:** Actas del Congreso  
**Lugar de celebración:** Tarragona  
**Fechas de celebración:** 13-15 Noviembre 2003

**Autores:** Cutando A, Gómez-Moreno G, Arana C, Bolaños J, Acuña-Castroviejo D  
**Título:** Relación entre los niveles de melatonina y estado periodontal en diabéticos  
**Tipo de participación:** Comunicación Oral  
**Congreso:** XXXVII Reunión Anual de SEPA  
**Publicación:** Actas del Congreso  
**Lugar de celebración:** Tarragona  
**Fechas de celebración:** 13-15 Noviembre 2003

**Autores:** Cutando A, Gómez-Moreno G, Arana C, Bolaños J, Acuña-Castroviejo D.  
**Título:** Melatonin in plasma and saliva and lymphocyte subpopulations in periodontal patients.  
**Tipo de participación:** Póster.  
**Congreso:** 16<sup>th</sup> Annual International Conference on Special Care Issues in Dentistry and the 17<sup>th</sup> Congress of the International Association for Disability and Oral Health (IADH).  
**Publicación:** Special Care in Dentistry 2004, 24: 169.  
**Lugar de celebración:** Calgary, Alberta, CANADÁ.  
**Fechas de celebración:** 24-27 Agosto 2004.

**Autores:** Arana C, Cutando A, Gómez-Moreno G, Galindo P, Vander Worf C, Serrano J, Acuña-Castroviejo D.  
**Título:** Efecto de la melatonina sobre el estrés oxidativo tras exodoncias seriadas en perros *Beagle*.  
**Tipo de participación:** Comunicación oral.  
**Congreso:** IV Congreso Nacional de la Sociedad Española de Cirugía Bucal (SECIB).  
**Publicación:** Medicina Oral. IV Congreso Nacional SECIB: 81-82. 2005.  
**Lugar de celebración:** Granada.  
**Fechas de celebración:** 20-22 Octubre 2005.



**Autores:** Vander Worf C, Arana C, Cutando A, Gómez-Moreno G, Galindo P, Ferrera MJ, Acuña-Castroviejo D.

**Título:** Parámetros de estrés oxidativo en la saliva de pacientes diabéticos y adictos a drogas vía parenteral.

**Tipo de participación:** Comunicación oral.

**Congreso:** IV Congreso Nacional de la Sociedad Española de Cirugía Bucal (SECIB).

**Publicación:** Medicina Oral. IV Congreso Nacional SECIB: 78. 2005.

**Lugar de celebración:** Granada.

**Fechas de celebración:** 20-22 Octubre 2005.



# *Agradecimientos*



- Al Prof. Antonio Cutando Soriano, por darme la oportunidad de trabajar en su grupo de investigación y participar en este ilusionante proyecto. Su orientación, tanto profesionalmente en la universidad como a nivel personal, ha sido fundamental para la realización de esta tesis doctoral.
- Al Prof. Darío Acuña Castroviejo, por enseñarme el verdadero significado de la investigación científica, e inculcarme la disciplina, la constancia y la ilusión por el trabajo de laboratorio.
- Al Prof. Gerardo Gómez Moreno, por sus innumerables muestras de apoyo y su ánimo en los momentos más difíciles.
- A la Prof<sup>a</sup>. Germaine Escames, por su ayuda en el laboratorio con las técnicas de estrés oxidativo.
- Al Dr. Fernando Muñoz, a la Dra. Mónica López Peña y a todo su equipo, por su excelente trabajo en la histomorfometría y por su gran predisposición y profesionalidad investigadora, que han posibilitado la consecución de nuestros objetivos.
- A D. Jesús Martín Zúñiga y D. Juan Serrano, director y veterinario respectivamente del Servicio de Experimentación Animal de la Universidad de Granada, por su colaboración en la fase experimental de este trabajo y por iniciarme en el cuidado y manejo de los perros *Beagle*.
- A D. Rafael Olivares, siempre dispuesto a resolver mis dudas con gran rigor científico, por compartir sus conocimientos bibliográficos y documentales.

- Al Prof. Jorge Bolaños, por el asesoramiento estadístico.
- A todos mis compañeros de laboratorio, por su ayuda y colaboración, pero sobre todo, por su generosidad y su amistad. Con ellos he compartido momentos inolvidables durante estos tres años.
- A Implant Microdent System, por el apoyo y respaldo empresarial a este proyecto, y por su confianza en nuestro equipo investigador.
- A todas aquellas personas que, en definitiva, han hecho posible que se pueda realizar esta tesis, a todas ellas muchas gracias.

*Son vanas y están plagadas de errores las ciencias  
que no han nacido del experimento, madre de toda certidumbre.*

**Leonardo da Vinci.**





# *Abreviaturas*



## **ABREVIATURAS**

**4-HNE:** 4-hidroxinonenal

**ADN:** ácido desoxirribonucleico

**aFMK:** N<sup>1</sup>-acetil-N<sup>2</sup>-formil-5-metoxiquinurenamina

**aMT:** melatonina

**ATP:** adenosíntrifosfato

**BCP (*bone-to-implant contact ratio*):** porcentaje de integración o ratio de contacto óseo

**BMPs:** proteínas morfogenéticas óseas

**BPO:** peróxido de benzoilo

**CAT:** catalasa

**CBF A1:** *core-binding factor A1*

**cNOS:** óxido nítrico sintasa constitutiva

**COO•:** radical peroxilo

**CPI:** Índice Periodontal Comunitario

**G6P:** glucosa 6-fosfato

**G6PDH:** glucosa 6- fosfato deshidrogenasa

**GH:** hormona de crecimiento

**GM-CFU:** unidades formadoras de colonias de granulocitos-macrófagos

**GPx:** glutatión peroxidasa

**GRd:** glutatión reductasa

**GSH:** glutatión reducido

**GSSG:** glutatión oxidado

**G<sub>T</sub>:** glutatión total

**H<sub>2</sub>O:** agua

**H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>:** peróxido de hidrógeno

**Hb:** hemoglobina

**HO•:** radical hidroxilo

**ICAM 1:** molécula de adhesión intercelular 1

**IFN-γ:** interferón ganma

**IGF:** factor de crecimiento semejante a insulina

**IL-2:** interleuquina 2

**IL-6:** interleuquina 6

**iNOS:** óxido nítrico sintasa inducible

**LPO:** peroxidación lipídica

**M-CSF:** factor estimulador de las colonias de macrófagos

**MDA:** malonildialdehído

**NADPH:** dinucleótido de nicotinamida y de adenina fosfato reducido

**NEDA:** naftil-etilen-diamina

**NEM:** N-etilmaleinimida

**NFκB:** factor nuclear kappa B

**NMFI:** N-metil-2-fenilindol

**NO•:** óxido nítrico

**NO<sub>2</sub><sup>-</sup>:** nitritos

**NR:** nitrato reductasa

**O<sub>2</sub>:** oxígeno molecular

**O<sub>2</sub><sup>-•</sup>:** anión superóxido

**ONOO<sup>-</sup>:** radical peroxinitrito

**OPG:** osteoprotegerina

**OPT:** ophtaldehído

**PDGF:** factor de crecimiento derivado de las plaquetas

**PG:** prostaglandinas

**PMN:** polimorfonucleares neutrófilos

**PTH:** paratohormona

**RANK:** receptor activador del factor nuclear κB

**RANK-L:** ligando de unión al receptor activador del factor nuclear κB

**RNS:** especies reactivas de nitrógeno

**ROS:** especies reactivas de oxígeno

**SOD:** superóxido dismutasa

**TGF-β:** factor de crecimiento transformante β

**TNF-α:** factor de necrosis tumoral alfa

**TRAP:** fosfatasa ácida resistente a tartrato

**VCAM:** molécula de adhesión de las células vasculares

# ***ÍNDICE***



# ÍNDICE

<b>INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>3</b>
<b>1. RADICALES LIBRES Y ESTRÉS OXIDATIVO .....</b>	<b>3</b>
1.1. CONCEPTO DE RADICAL LIBRE .....	3
1.2. ORIGEN DE LA PRODUCCIÓN DE RADICALES LIBRES.....	3
1.3. SISTEMAS DE PROTECCIÓN FRENTE A RADICALES LIBRES.....	6
1.4. CONCEPTO DE ESTRÉS OXIDATIVO.....	12
1.5. FISIOPATOLOGÍA DEL DAÑO BIOLÓGICO MEDIADO POR ESTRÉS OXIDATIVO.....	13
1.6. RADICALES LIBRES E INFLAMACIÓN.....	16
1.7. RADICALES LIBRES Y PROCEDIMIENTOS QUIRÚRGICOS.....	20
1.8. RADICALES LIBRES Y CAVIDAD ORAL.....	22
<b>2. REMODELADO ÓSEO Y OSTEINTEGRACIÓN.....</b>	<b>24</b>
2.1. FISIOLÓGÍA ÓSEA.....	24
2.1.1. OSTEOLASTOS Y OSTEOCITOS.....	27
2.1.2. OSTEOLASTOS.....	29
2.1.2.1. MECANISMOS DE REABSORCIÓN ÓSEA.....	30
2.1.2.2. RADICALES LIBRES Y REABSORCIÓN ÓSEA.....	30
2.2. REMODELADO ÓSEO.....	32
2.2.1. FACTORES REGULADORES DEL REMODELADO ÓSEO: REGULACIÓN HORMONAL Y PARACRINA.....	33
2.2.1.1. PARATHORMONA (PTH).....	33
2.2.1.2. CALCITONINA.....	34
2.2.1.3. 1,25(OH) <sub>2</sub> VITAMINA D3 O CALCITRIOL.....	34
2.2.1.4. ESTRÓGENOS.....	34
2.2.1.5. GLUCOCORTICOIDES.....	35
2.2.1.6. HORMONA DE CRECIMIENTO (GH).....	35
2.2.1.7. IGF-I Y II (INSULIN-LIKE GROWTH FACTOR I Y II).....	36
2.2.1.8. CITOQUINAS.....	36
2.2.1.9. PROTEÍNAS MORFOGENÉTICAS ÓSEAS (BMPS: BONE MORPHOGENETIC PROTEINS).....	37
2.2.1.10. SISTEMA OPG/RANK/RANKL.....	38
2.3. OSTEINTEGRACIÓN Y BIOLOGÍA ÓSEA EN IMPLANTOLOGÍA ORAL.....	39
<b>3. MELATONINA.....</b>	<b>40</b>
3.1. ¿QUÉ ES LA MELATONINA? .....	40
3.2. ANTIOXIDANTE Y DEPURADOR DE RADICALES LIBRES.....	42
3.3. INMUNOMODULADOR.....	44
3.4. ESTIMULADOR DE LA FORMACIÓN ÓSEA.....	45
3.5. MELATONINA Y CAVIDAD ORAL.....	47
<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>51</b>

<b>MATERIAL Y MÉTODOS.....</b>	<b>55</b>
<b>1. ANIMALES, PROCEDIMIENTO QUIRÚRGICO Y TRATAMIENTO.....</b>	<b>55</b>
1.1. EXODONCIAS.....	55
1.2. COLOCACIÓN DE LOS IMPLANTES.....	58
1.3. SACRIFICIO Y EXTRACCIÓN DE LA MANDÍBULA.....	61
<b>2. OBTENCIÓN Y PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS.....</b>	<b>62</b>
2.1. MÉTODO DE OBTENCIÓN DEL PLASMA Y GLÓBULOS ROJOS.....	62
2.2. PREPARACIÓN HISTOLÓGICA DE LAS MUESTRAS DE TEJIDO ÓSEO.....	64
2.2.1. FIJACIÓN.....	64
2.2.2. DESHIDRATACIÓN.....	64
2.2.3. INFILTRACIÓN.....	65
2.2.4. INCLUSIÓN Y POLIMERIZACIÓN.....	65
2.2.5. PREPARACIÓN DEL BLOQUE PARA OBTENER UNA SUPERFICIE PARALELA.....	66
2.2.6. PREPARACIÓN DE LA SUPERFICIE DE INTERÉS.....	66
2.2.7. TINCIONES.....	68
<b>3. MÉTODOS ANALÍTICOS.....</b>	<b>69</b>
3.1. ESTRÉS OXIDATIVO.....	69
3.1.1. MÉTODO DE DETERMINACIÓN DE HEMOGLOBINA.....	69
3.1.2. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA GLUTATION PEROXIDASA (GPx).....	70
3.1.3. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA GLUTATION REDUCTASA (GRd).....	71
3.1.4. DETERMINACIÓN DE LOS NIVELES DE GLUTATION REDUCIDO (GSH) Y GLUTATION OXIDADO (GSSG).....	72
3.1.5. DETERMINACIÓN DE LA PEROXIDACIÓN LIPÍDICA (LPO).....	74
3.1.6. DETERMINACIÓN DE LOS NIVELES PLASMÁTICOS DE NITRITOS.....	75
3.2. EVALUACIÓN HISTOLÓGICA E HISTOMORFOMÉTRICA.....	77
<b>4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....</b>	<b>81</b>
<b>RESULTADOS.....</b>	<b>85</b>
<b>1. ESTRÉS OXIDATIVO.....</b>	<b>85</b>
1.1. ACTIVIDAD DE LA GLUTATION PEROXIDASA (GPx) Y GLUTATION REDUCTASA (GRd).....	86
1.2. NIVELES DE GLUTATION REDUCIDO (GSH), GLUTATION OXIDADO (GSSG), GLUTATION TOTAL (G <sub>T</sub> ) Y COCIENTE GSSG:GSH.....	88
1.3. NIVELES DE PEROXIDACIÓN LIPÍDICA (LPO) Y DE NITRITOS (NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> ).....	90
<b>2. OSTEointegración.....</b>	<b>93</b>
2.1. BCP (BONE-TO-IMPLANT CONTACT RATIO).....	93
2.2. HUESO PERIIMPLANTARIO TOTAL ( <i>PERIIMPLANT BONE AREA</i> ).....	94
2.3. HUESO INTERROSCA (INTER-THREAD BONE AREA).....	98
2.4. PORCENTAJE DE NEOFORMACIÓN ÓSEA.....	99



<b>DISCUSIÓN.....</b>	<b>103</b>
1. <b>ESTRÉS OXIDATIVO Y EXODONCIAS.....</b>	<b>103</b>
2. <b>MELATONINA Y ESTRÉS OXIDATIVO POSTEXODONCIAS.....</b>	<b>107</b>
3. <b>MELATONINA Y OSTEointegración EN LA CAVIDAD ORAL.....</b>	<b>111</b>
<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>121</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>125</b>

## ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS.

<b>Tabla 1.</b> Sistemas de defensa antioxidante .....	7
<b>Tabla 2.</b> Principales proteínas constituyentes de la matriz ósea .....	26
<b>Tabla 3.</b> Tinción de Lévai Laczcó .....	68
<b>Tabla 4.</b> Parámetros de estrés oxidativo en condiciones basales y después de las exodoncias en el grupo basal y tratado con melatonina .....	92
<b>Tabla 5.</b> Parámetros histomorfométricos de osteointegración de implantes control e implantes impregnados con melatonina tópica dos semanas después de la colocación de los mismos .....	100
<hr/>	
<b>Figura 1.</b> Sistema enzimático de defensa antioxidante .....	10
<b>Figura 2.</b> Mecanismo de la peroxidación lipídica .....	15
<b>Figura 3.</b> Mecanismo de neutralización de un radical hidroxilo y un radical anión superóxido por la melatonina .....	44
<b>Figura 4.</b> Distribución de los implantes dentales en la mandíbula de los perros Beagle en función del tratamiento tópico aplicado .....	58
<b>Figura 5.</b> Procesamiento de las muestras sanguíneas .....	63
<b>Figura 6.</b> Representación de los parámetros de osteointegración determinados en el estudio histomorfométrico .....	80

<b>Figura 7.</b> Actividad de las enzimas GPx y GRd en los grupos basal, control y tratado con melatonina .....	87
<b>Figura 8.</b> Niveles de GSH, GSSG, GT y cociente GSSG/GSH en los grupos basal, control y tratado con melatonina .....	89
<b>Figura 9.</b> Niveles plasmáticos de peroxidación lipídica y nitritos en los grupos basal, control y tratado con melatonina .....	91
<b>Figura 10.</b> Porcentaje de contacto óseo (BCP) en los implantes control y tratados con melatonina tópica dos semanas después de la intervención implantológica .....	94
<b>Figura 11.</b> Porcentaje de hueso total y tejido conjuntivo en la zona periimplantaria de los implantes control y tratados con melatonina tópica dos semanas después de la intervención implantológica .....	95
<b>Figura 12.</b> Porcentaje de hueso y tejido conjuntivo en la zona interroscas de los implantes control y tratados con melatonina tópica dos semanas después de la intervención implantológica .....	98
<b>Figura 13.</b> Porcentaje de neoformación ósea en los implantes control y tratados con melatonina tópica dos semanas después de la intervención implantológica .....	99

## ÍNDICE DE IMÁGENES.

<b>Imagen 1.</b> Visión histométrica de una sección sagital de un implante control, y corte histológico a cuatro aumentos de la zona periimplantaria del mismo .....	96
<b>Imagen 2.</b> Visión histométrica de una sección sagital de un implante impregnado con melatonina tópica, y corte histológico a cuatro aumentos de la zona periimplantaria del mismo .....	97



# **INTRODUCCIÓN**



# INTRODUCCIÓN

## **1. RADICALES LIBRES Y ESTRÉS OXIDATIVO**

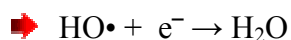
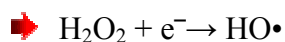
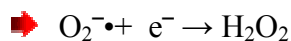
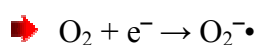
### **1.1. CONCEPTO DE RADICAL LIBRE.**

Los radicales libres son especies químicas neutras o con carga cuya cubierta externa contiene un electrón desapareado<sup>1</sup>. Para alcanzar la estabilidad molecular los radicales libres tienden a reaccionar ávidamente con otras moléculas cercanas, cediendo o captando un electrón para compensar ese orbital incompleto, pero a expensas de desestabilizar la configuración electrónica de las moléculas con las que reaccionan, convirtiéndolas a su vez en especies reactivas y pudiendo desencadenar reacciones en cadena<sup>2</sup>. Los radicales o prorradicales más abundantes y reactivos en los sistemas biológicos son el oxígeno molecular ( $O_2$ ) y los productos derivados de su reducción incompleta, como el anión superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) y el radical hidroxilo ( $HO\cdot$ ). Por lo tanto, los radicales libres derivados del oxígeno (“Reactive Oxygen Species”-ROS, o Especies Reactivas de Oxígeno) son un tipo concreto de radicales libres formados a partir del oxígeno. Pero existen otros muchos radicales libres que se forman a partir de otras moléculas distintas como el carbono, el nitrógeno, etc. De igual manera se habla por tanto de “Reactive Nitrogen Species” (RNS) o Especies Reactivas de Nitrógeno, como son el óxido nítrico ( $NO\cdot$ ) y los peroxinitritos ( $ONOO^-$ ).

### **1.2. ORIGEN DE LA PRODUCCIÓN DE RADICALES LIBRES.**

Los radicales libres pueden proceder de fuentes metabólicas endógenas o de agresiones oxidativas externas.

La **mitocondria** constituye la principal fuente endógena de radicales libres. Su formación tiene lugar a nivel de la cadena de transporte de electrones, que es la última etapa en la óxido-reducción celular que cursa con la producción de protones de alta energía, cuyo paso a través de la membrana mitocondrial interna genera un gradiente eléctrico que aporta la energía necesaria para formar adenosín trifosfato (ATP). En este proceso de fosforilación oxidativa el oxígeno actúa como aceptor final de electrones, adquiriendo en más del 95% de estas reacciones un total de 4 electrones con producción de 2 moléculas de agua. En esta reducción del oxígeno pueden ocurrir pasos intermedios con el resultado de la formación de anión superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) y radical hidroxilo ( $HO\cdot$ ). Además, entre los sustratos iniciales y la generación de energía al final del proceso, se forman varias moléculas con diferente grado de oxidación. Algunas de ellas pueden entregar 1 ó 2 electrones al oxígeno y producir intermediarios parcialmente reducidos<sup>3,4</sup>:



Otras fuentes de radicales libres son los **peroxisomas**, organelas del citosol muy ricas en oxidasas y que generan  $H_2O_2$ , el cual es depurado por enzimas específicas (catalasas) y transformado en agua<sup>5</sup>.

La síntesis de prostaglandinas tras la **activación del metabolismo del ácido araquidónico en los procesos inflamatorios** normalmente implica la producción de  $HO\cdot$  como



consecuencia de la actividad ciclooxigenasa; estos radicales participan en la cascada del ácido araquidónico, inhibiendo la propia ciclooxigenasa por una retroalimentación negativa, y favoreciendo por tanto la ruta metabólica pro-agregante del tromboxano  $A_2$  frente a la ruta antiagregante y vasodilatadora de la prostaciclina<sup>6</sup>.

Los **leucocitos polimorfonucleares** constituyen una fuente importante de radicales libres cuando se activan por diversas proteínas que actúan específicamente sobre ellos (complemento, interleukinas, etc.). Estas células poseen en su membrana celular la enzima *NADPH oxidasa*, que cataliza la reducción de oxígeno a  $O_2^{\cdot-}$ , lo que resulta en la producción de  $H_2O_2$ . Ambos agentes oxidantes participarán en la producción de  $HO\cdot$  y en la liberación de hipoclorito y cloraminas como mecanismo defensivo antimicrobiano frente a agentes patógenos. Esta situación se produce en todos los procesos inflamatorios<sup>7-9</sup>.

La enzima **xantina deshidrogenasa** predomina en los endotelios. Normalmente se encarga de la oxidación citosólica de hipoxantina y xantina hasta ácido úrico (isquemia, estimulación del calcio, etc.) con la consiguiente reducción de oxígeno en anión superóxido<sup>10</sup>.

Como **fuentes exógenas** de daño oxidativo destacan:

- Los ataques externos por radiaciones ionizantes (rayos X y rayos  $\gamma$ ).
- El aumento en la disponibilidad de metales de transición como ocurre en algunas enfermedades metabólicas (hemocromatosis y enfermedad de Wilson) o en los procesos inflamatorios.

- La acción de fármacos (algunos anestésicos generales, antineoplásicos) con capacidad de generar  $O_2^-•$  por acción enzimática a través de la oxidorreducción cíclica de flavoproteínas.
- El exceso en la concentración de  $O_2$ , o los procesos en los que concurran fenómenos de isquemia-reperfusión, como ocurre en ciertas cirugías.

### 1.3. SISTEMAS DE PROTECCIÓN FRENTE A RADICALES LIBRES.

Como se ha expuesto anteriormente, la formación de ROS es inherente al funcionamiento de los organismos. Este es el motivo por el cual es necesario controlar la formación de radicales libres. Las células presentan sistemas de defensa antioxidante (**Tabla 1**), cuya finalidad es proteger a las moléculas del daño producido por los radicales libres<sup>11-14</sup>.

Los **antioxidantes** son moléculas que protegen a las células de los efectos dañinos de los radicales libres tóxicos. Asimismo, ejercen su función de diferentes maneras, entre ellas metabolizando enzimáticamente los productos que pueden generar radicales libres.

El primero de estos sistemas de protección se basa en un sistema enzimático de defensa específico y variado, presente en el sitio de producción de los radicales, que los mantiene a bajas concentraciones. Este grupo de enzimas incluye la superóxido dismutasa (SOD), la catalasa (CAT), la glutatión peroxidasa (GPx), la glutatión reductasa (GRd) y la glucosa 6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH). Estas enzimas previenen el daño oxidativo metabolizando los radicales libres tóxicos producidos como consecuencia del metabolismo respiratorio normal o durante el estrés oxidativo. Estas enzimas se interrelacionan entre sí como se muestra a continuación (**Figura 1**).

TABLA 1. Sistemas de defensa antioxidante.

<b>Enzimáticos</b>	<b>No enzimáticos</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Superóxido dismutasa (SOD)</li> <li>➤ Catalasa (CAT)</li> <li>➤ Glutation peroxidasa (GPx)</li> <li>➤ Glutation reductasa (GRd)</li> <li>➤ Glucosa-6-P-deshidrogenasa (G6PDH)</li> </ul>	<p data-bbox="815 416 1286 454"><b><u>Quelantes de iones metálicos:</u></b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Ferritina</li> <li>➤ Transferrina</li> <li>➤ Lactoferrina</li> <li>➤ Ceruloplasmina</li> <li>➤ Albúmina</li> </ul> <p data-bbox="815 757 1123 795"><b><u>Depuradores ROS:</u></b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Melatonina</li> <li>➤ <math>\alpha</math>-tocoferol</li> <li>➤ <math>\beta</math>-carotenos</li> <li>➤ Ácido úrico</li> <li>➤ Ácido ascórbico</li> <li>➤ Glutation</li> </ul>

**Superóxido dismutasa (SOD).**

La SOD fue la primera enzima de la cual se conoció que actuaba sobre un radical libre. Su descubrimiento en 1968 por McCord y Fridovich, constituyó una prueba de la existencia de estos radicales en los organismos vivos<sup>15</sup>.

La SOD acelera considerablemente la dismutación del ión superóxido en peróxido de hidrógeno; su acción debe ir acoplada a la de catalasas/peroxidasa para evitar la acumulación de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Hay cuatro metaloformas de la SOD, dos contienen Cu<sup>2+</sup> y Zn<sup>2+</sup>, una contiene Mn<sup>2+</sup> y otra Fe<sup>2+</sup>. Una de las formas de CuZn-SOD es común en el citosol de las células eucariotas<sup>16</sup>, mientras que la otra se localiza en el fluido extracelular<sup>17</sup>. La forma

dependiente de  $Mn^{2+}$  se localiza en la matriz mitocondrial, mientras que las bacterias aeróbicas son la fuente de SOD dependiente de  $Fe^{2+}$ .<sup>16</sup>

### **Catalasa (CAT).**

Descrita por Loew en 1901<sup>18</sup>, cataliza la conversión del  $H_2O_2$  en  $H_2O$  y  $O_2$ . Está ampliamente distribuida en las células de los organismos aeróbicos. En mamíferos la CAT se sintetiza en la mayoría de las células. A nivel subcelular, el 80% de la actividad CAT se localiza en los peroxisomas y el 20% restante en el citosol. Las mitocondrias no poseen catalasa, lo cual juega un papel decisivo para la absoluta dependencia de esta organela de la maquinaria enzimática dependiente de glutatión (glutatión peroxidasa y glutatión reductasa).

### **Glutatión Peroxidasa (GPx).**

Se han descrito dos formas de GPx: una dependiente de selenio (Se), que se localiza tanto en el citosol (70%) como en la mitocondria (30%), y otra Se-independiente, que se localiza fundamentalmente en el citosol, aunque muchos autores describen su presencia también en la mitocondria. El  $H_2O_2$  sólo es neutralizado por la forma Se-dependiente, mientras que los peróxidos orgánicos son neutralizados por ambas formas. La GPx degrada la mayor parte del  $H_2O_2$  formado; de hecho, es la única enzima en la mitocondria capaz de eliminarlo. La GPx utiliza glutatión reducido (GSH) para convertir el  $H_2O_2$  en agua y glutatión oxidado (GSSG)<sup>19,20</sup>.

### **Glutation Reductasa (GRd).**

Descrita por primera vez en hígado de mamíferos por Hopkins y Elliot<sup>21</sup>, la GRd cataliza la reducción del GSSG, utilizando como cofactor NADPH. Esta enzima forma junto con la GPx el conjunto de la maquinaria antioxidante dependiente de glutatión. Dicho sistema trabaja de forma cíclica, es decir, el GSH que oxida la GPx para neutralizar el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, es a su vez reducido de nuevo por la GRd. Al igual que la GPx, la GRd aparece tanto en el citosol como en la mitocondria.

La regulación de este sistema es de vital importancia para el mantenimiento de la homeostasis celular, ya que el GSH constituye cuantitativamente el principal antioxidante endógeno de la célula, pero en este caso de carácter **no enzimático**. Reacciona con componentes tóxicos para formar conjugados o productos que se eliminan de la célula. Por tanto, juega un papel fundamental en la protección de la misma frente al ataque oxidativo, ya sea por radicales libres, peróxidos u otros agentes nocivos como las radiaciones. El GSH tiene además otra serie de funciones importantes como participar en la regulación de la síntesis de proteínas y de la proliferación celular, y modular la actividad de otras enzimas en la célula<sup>22-24</sup>.

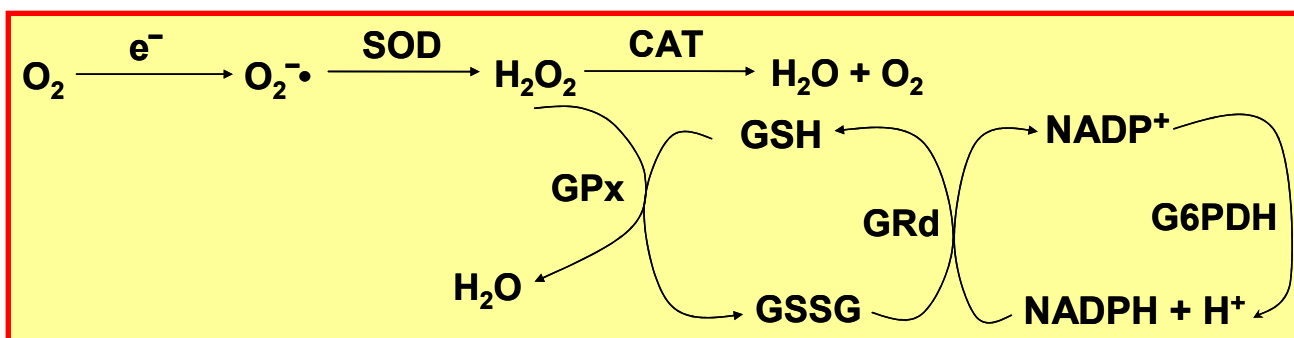
### **Glucosa-6-fosfato deshidrogenada (G6PDH).**

La oxidación directa de la glucosa-6-fosfato por esta enzima se demostró por primera vez en 1936,<sup>25</sup> aunque la enzima no fue purificada hasta 25 años después<sup>26</sup>.

La G6PDH está ampliamente distribuida en las células de mamíferos y juega un papel

importante en los mecanismos de defensa antioxidante, ya que se trata de una fuente de NADPH (dinucleótido de nicotinamida y de adenina fosfato reducido), el cual, es utilizado a su vez por otra enzima antioxidante, la GRd. Pero además, indirectamente, el NADPH está implicado en numerosas funciones celulares que indirectamente contribuyen al equilibrio redox celular.

**FIGURA 1. Sistema enzimático de defensa antioxidante.**



Aparte de la eliminación enzimática de ROS, hay otros mecanismos utilizados por los organismos para protegerse del daño oxidativo.

Los iones de metales de transición, principalmente hierro y cobre, participan en reacciones con diferentes ROS<sup>27</sup>, y es frecuente que estas reacciones lleven a la aparición de especies altamente reactivas a partir de otras que lo son menos.

Cuando se encuentra unido a proteínas, el  $Fe^{2+/3+}$  no está generalmente disponible para promover la generación de radicales libres. Las proteínas de almacenamiento y transporte de hierro, como son la ferritina y transferrina, se consideran generalmente como parte del mecanismo de defensa antioxidante del organismo<sup>11,28</sup>.

El cobre en plasma está también unido a proteínas, por ejemplo la ceruloplasmina<sup>29</sup>, y en menor medida a histidina, pequeños péptidos y albúmina.

Este "secuestro" de iones de metales de transición reactivos ayuda a reducir la generación de radicales altamente reactivos por diferentes reacciones. Hay ocasiones, sin embargo, en que la cantidad de iones metálicos sobrepasa la capacidad de transporte de estas moléculas para unirlos<sup>30</sup>.

Además de los sistemas enzimáticos de eliminación de ROS y el secuestro de metales de transición para frenar la producción de oxidantes, existen una serie de moléculas que eliminan los radicales libres una vez que se han producido. Estos compuestos constituyen la segunda línea de defensa endógena. Existe una gran variedad de moléculas que actúan como antioxidantes, lo que hace que tengan gran interés por su potencial utilidad, por ejemplo, para promover un envejecimiento más saludable y prevenir enfermedades asociadas al mismo. Sin la presencia de estos depuradores de radicales libres, en situaciones donde la acumulación de ROS en el organismo aumenta (estrés oxidativo, envejecimiento, etc.), el resto de sistemas antioxidantes quedaría bloqueado por un exceso o saturación de radicales libres por depurar, los cuales incluso dañan partes susceptibles a la oxidación de la estructura de la propia maquinaria antioxidante<sup>31-33</sup>.

Algunos de los depuradores de radicales libres más conocidos son el tocoferol, el ascorbato, el manitol, el glutatión y el ácido úrico. Dentro de este grupo de compuestos se encuentra también la melatonina, con unas características especiales (ver más adelante) que convierten

esta indolamina en uno de los más potentes y completos antioxidantes conocidos<sup>34,35</sup>, con importantes aplicaciones clínicas a nivel de la cavidad oral<sup>36,37</sup>.

#### **1.4. CONCEPTO DE ESTRÉS OXIDATIVO.**

A pesar del papel fisiológico que desempeñan algunos radicales libres, también pueden dar lugar a reacciones de oxidación indeseadas. La formación de cierta tasa de radicales libres es un proceso normal e inevitable, ya que son producto de infinidad de reacciones químicas imprescindibles para la vida celular<sup>38</sup>. Estas especies tan reactivas, no causan daño oxidativo en condiciones normales debido a que la célula está provista de gran cantidad de mecanismos antioxidantes<sup>39</sup>.

Cuando se produce un desequilibrio entre sustancias prooxidantes y antioxidantes a favor de las primeras, el resultado es un daño oxidativo, que puede afectar a diversas moléculas, y que puede reflejarse en sus funciones fisiológicas.

El **estrés oxidativo** se define como una alteración del equilibrio entre las especies prooxidantes y las antioxidantes, a favor de las primeras<sup>23</sup>. Por tanto, el estrés oxidativo puede originarse por:

- un exceso de sustancias prooxidantes,
- una deficiencia de agentes antioxidantes,
- o por ambos factores a la vez.

Las células pueden adaptarse a un incremento del estrés oxidativo hasta cierto punto, especialmente si este incremento se produce de forma progresiva. Sin embargo, puede llegar un momento en el que la situación oxidativa sea excesiva y conduzca al daño y la muerte



celular. No obstante, las consecuencias patológicas dependerán del tipo de constituyente celular que se vea dañado y de la progresión del ataque.

### **1.5. FISIOPATOLOGÍA DEL DAÑO BIOLÓGICO MEDIADO POR ESTRÉS OXIDATIVO.**

En 1954 una investigadora argentina, Rebeca Gerschman, sugirió por primera vez que los radicales libres eran agentes tóxicos y generadores de enfermedades<sup>40</sup>.

El mecanismo fisiopatológico nocivo que puede provocar el estrés oxidativo en los sistemas biológicos deriva de la capacidad que tienen los radicales libres de atacar y reaccionar con componentes moleculares de estructuras celulares como son los lípidos, las proteínas estructurales y enzimáticas, los carbohidratos y los ácidos nucleicos.

El daño oxidativo a las *proteínas* se produce a través de la oxidación de los aminoácidos (fenilalanina, tirosina, triptófano, histidina y metionina), y como consecuencia se forman entrecruzamientos de cadenas peptídicas, fragmentación de la proteína y formación de grupos carbonilos que impiden el normal desarrollo de sus funciones (transportadores iónicos de membranas, receptores y mensajeros celulares, enzimas que regulan el metabolismo celular, etc.)<sup>41,42</sup>.

Otra molécula que es dañada por los radicales libres es el ácido desoxirribonucleico (*ADN*); el daño a los ácidos nucleicos produce bases modificadas, lo cual tiene serias consecuencias en el desarrollo de mutaciones y carcinogénesis por una parte, o la pérdida de expresión por daño al gen específico por otra<sup>43,44</sup>.

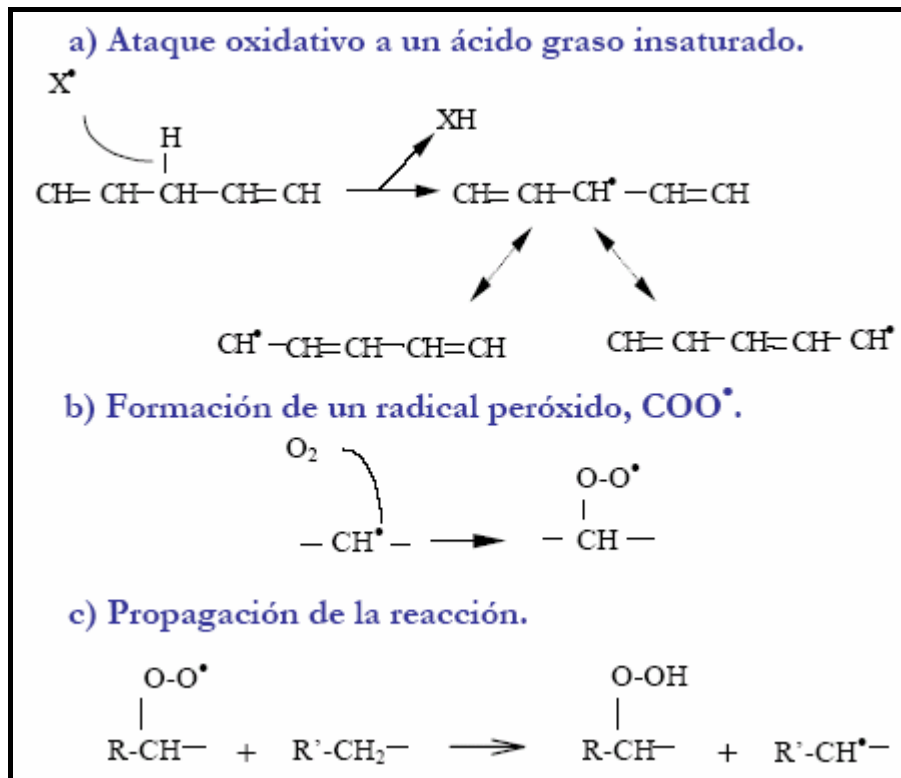
Los **glúcidos** reaccionan con facilidad con los radicales hidroxilo (HO•). Los monosacáridos y disacáridos resisten la acción de los radicales libres de oxígeno. La glucosa constituye un captador del radical superóxido, al retenerlo e impedir su acción sobre otras moléculas. La manosa y el manitol son eliminadores del HO•. Por ello, se ha observado que diversos polisacáridos actúan como agentes protectores celulares<sup>45</sup>.

El daño oxidativo a los glúcidos reviste importancia cuando se trata de polisacáridos de función estructural, ya que los polisacáridos son despolimerizados por los radicales libres dando lugar a procesos degenerativos<sup>46</sup>. Un caso especial es el del ácido hialurónico, cuya función estructural reside en mantener la viscosidad del fluido sinovial. La exposición a agentes oxidantes (sobre todo O<sub>2</sub><sup>-•</sup>) provoca su fragmentación, lo que conduce a la desestabilización del tejido conectivo y a la pérdida de viscosidad del fluido sinovial, como sucede en el caso de la artritis reumatoide<sup>47</sup>. Se ha observado que la SOD es capaz de proteger frente a la despolimerización del ácido hialurónico en el líquido sinovial<sup>48</sup>. Los proteoglicanos están sujetos a rotura oxidativa de forma similar<sup>47</sup>.

Los **lípidos**, sobre todo los ácidos grasos poliinsaturados, son las biomoléculas más susceptibles de ser atacadas por radicales libres<sup>49</sup>. El proceso de ataque oxidativo a los lípidos se denomina **peroxidación lipídica** (LPO).

La peroxidación de los lípidos que forman parte de las membranas celulares conduce al deterioro oxidativo de los ácidos grasos poliinsaturados que las componen. Cuando se extrae un átomo de hidrógeno de uno de los grupos -CH- de la cadena carbonada dejando un electrón no apareado en el átomo de carbono, este radical de carbono se convierte en una molécula altamente reactiva que se combina rápidamente con el oxígeno para dar lugar a

radicales peroxilo ( $\text{COO}^\bullet$ ). Éstos, a su vez, son capaces de combinarse con átomos de hidrógeno de otros ácidos grasos, iniciando reacciones en cadena que pueden continuar hasta que los ácidos grasos de la membrana hayan sido completamente oxidados a hidroperóxidos (Figura 2)<sup>50</sup>.



**FIGURA 2. Mecanismo de la peroxidación lipídica.**

Estas modificaciones en la estructura de la membrana celular provocan cambios en sus propiedades fisicoquímicas, con aumento de su permeabilidad y pérdida progresiva de sus funciones, que puede llevar a la consiguiente *MUERTE CELULAR*<sup>51</sup>.

La medida del grado de lipoperoxidación de las membranas celulares es considerado un parámetro muy sensible y un indicador directo del estrés oxidativo en determinados eventos. Para determinar la peroxidación lipídica cuantificamos los productos de descomposición de los peróxidos derivados de los ácidos grasos poliinsaturados y sus ésteres relacionados. Dos de estos productos son el malonildialdehído (MDA) y el 4-hidroxinonenal (4-HNE).

La relación entre los radicales libres y la modificación de los ácidos grasos poliinsaturados se ha demostrado en diversos fenómenos, y la tendencia ha sido considerar a los productos de la lipoperoxidación, como *marcadores* más que como activadores del daño oxidativo. Diversas investigaciones sobre la relevancia biológica de estos productos han demostrado que también producen potentes efectos biológicos. Sandstrom *et al.* han demostrado que los lipohidroperóxidos son capaces por sí mismos de inducir la muerte celular, en concreto cuando la actividad antioxidante intracelular está reducida<sup>52</sup>.

## **1.6. RADICALES LIBRES E INFLAMACIÓN.**

Numerosos estudios clínicos y experimentales sugieren que el estrés oxidativo juega un papel fundamental en la patogénesis de un gran número de enfermedades inflamatorias, participando también en los mecanismos moleculares que ayudan a controlar la inflamación. Además, en aquellos casos en que la inflamación sobrepasa los límites fisiológicos normales de un mecanismo defensivo, ROS y RNS actúan como mediadores del daño celular y tisular ocasionado por el proceso inflamatorio<sup>53</sup>.

En un proceso inflamatorio los leucocitos polimorfonucleares (PMN) activan la producción de especies reactivas de oxígeno a través de la enzima NADPH oxidasa asociada a su

membrana celular. Este mecanismo de activación aún no está del todo esclarecido, pero se piensa que está relacionado con la síntesis de metabolitos del ácido araquidónico y de otras moléculas que median la migración y adhesión de leucocitos polimorfonucleares al endotelio vascular<sup>54</sup>. De tal forma, los polimorfonucleares y el endotelio activado, además de generar ROS producen agentes proinflamatorios como son los leucotrienos y prostanoïdes derivados del ácido araquidónico, el factor activador de plaquetas y las interleuquinas<sup>55</sup>.

Las ROS producen a su vez la peroxidación de los lípidos de membrana, factor que es determinante en el mecanismo del daño endotelial. Asimismo, se producen modificaciones de las proteínas (enzimas, receptores de membrana, proteínas formadoras de canales) asociadas a estos lípidos, lo que provoca trastornos de los sistemas de transporte con aumento de la permeabilidad para algunos elementos que, como el calcio, producen activación de la fosfolipasa A2<sup>56</sup>. Esta última, bajo la influencia de una serie de estímulos fisiológicos o patológicos, provoca la liberación del ácido araquidónico de los fosfolípidos de la membrana celular.

El ácido araquidónico libre es precursor de la síntesis de compuestos de gran actividad biológica, dentro de los cuales se encuentran las prostaglandinas y los tromboxanos que se obtienen en la vía metabólica de la ciclooxigenasa, y los leucotrienos y lipoxinas obtenidas bajo la acción de las lipooxigenasas. Se ha demostrado recientemente un tercer mecanismo que conlleva a la peroxidación no enzimática del ácido araquidónico por radicales libres del oxígeno dando lugar a la formación de lípidos muy quimiotácticos. El anión superóxido y los radicales hidroxilo son al parecer los radicales activos de esta conversión<sup>57</sup>.

Se sabe además que existen reacciones del metabolismo del ácido araquidónico que generan aún más ROS. Por ejemplo, se conoce que los polimorfonucleares neutrófilos humanos responden a la administración de lipoxinas formando el anión superóxido, así como en la acción de la prostaglandina sintetasa, donde se producen también radicales libres<sup>58</sup>. Todos estos hechos sustentan que las acciones a nivel celular de la inflamación están mediadas por la participación de ROS, tanto en la liberación del ácido araquidónico, como en la mayor cantidad de estas especies reactivas durante su metabolismo, lo que agudiza e incrementa el daño tisular.

De manera independiente y simultánea con el proceso inflamatorio se produce un aumento en la síntesis de NO• por inducción de la *óxido nítrico sintasa inducible* (iNOS). La sobreproducción de NO• determina su reacción, mediada por difusión, con el anión superóxido, dando lugar a peroxinitritos (ONOO<sup>-</sup>), especie altamente reactiva capaz de oxidar y nitrar componentes celulares y tisulares, tales como los residuos de tirosina de las proteínas celulares y plasmáticas, ADN, lípidos o enzimas críticas del metabolismo intermediario. Así, está bien documentado el daño estructural y funcional a nivel mitocondrial, que se torna irreversible debido a oxidación y nitración de componentes mitocondriales. El ONOO<sup>-</sup> también oxida y produce deplección de antioxidantes endógenos tales como ascorbato, glutatión y superóxido dismutasa. La presencia de ONOO<sup>-</sup> y otras especies reactivas derivadas del nitrógeno nos lleva a ampliar el concepto clásico de estrés oxidativo al de **estrés nitrosativo**. En esta situación, predomina la formación de estas

especies reactivas de nitrógeno (RNS) sobre los mecanismos detoxificadores intracelulares y plasmáticos, lo que conlleva daño celular y tisular<sup>59</sup>.

El estrés oxidativo y nitrosativo perpetúan y cronifican el proceso inflamatorio por diferentes mecanismos. Las ROS y RNS tienen efectos quimiotácticos, ya que favorecen el reclutamiento de neutrófilos. Además, las moléculas mediadoras de estrés oxidativo se constituyen también en mensajeros intracelulares para la transducción de señales del proceso inflamatorio. Así, el factor nuclear kappa B (NFκB) activado por estos mensajeros secundarios migra al núcleo donde selectivamente estimula la transcripción de al menos un centenar de genes, entre los que se encuentran aquellos que codifican para proteínas específicas de la inflamación. El NFκB induce la transcripción de genes que amplifican la respuesta inflamatoria como los de la interleuquina-2 (IL-2), la interleuquina-6 (IL-6), factor de necrosis tumoral alfa (TNF-α), e iNOS<sup>60</sup>. También hay evidencias de que NFκB actúa como regulador en la transcripción de genes de moléculas de adhesión leucocitaria como E-selectina, ICAM-1 y VCAM-1, que agudizarán o perpetuarán el proceso inflamatorio<sup>61</sup>. Otros de los genes regulados por el NFκB son los que codifican para enzimas antioxidantes, como la SOD, CAT, GPx y GRd. Por tanto, al mismo tiempo que el NFκB induce proteínas proinflamatorias para luchar contra el proceso infeccioso, induce la activación del sistema endógeno de defensa antioxidante, en un intento de prevenir el efecto negativo derivado del aumento de ROS/RNS a consecuencia de su primer efecto.

## 1.7. RADICALES LIBRES Y PROCEDIMIENTOS QUIRÚRGICOS.

Numerosas investigaciones han puesto de manifiesto que los procedimientos quirúrgicos están asociados con un incremento del estrés oxidativo como consecuencia fundamentalmente de un aumento en la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS)<sup>62</sup>.

Aunque los conocimientos bibliográficos actuales no establecen una clara conexión entre estrés quirúrgico y estrés oxidativo, sí existen varios hechos que conviene destacar:

- El acto quirúrgico *per se* es responsable de una serie de cambios tanto locales como generales en el organismo. Ante una intervención quirúrgica se pone en marcha una respuesta neurohormonal en donde diversas hormonas y mediadores celulares aumentan la glicolisis, gluconeogénesis, proteolisis y lipólisis, lo que determina un estado hipercatabólico como respuesta a la agresión quirúrgica. Como resultado de todas estas reacciones metabólicas se produce una estimulación de la cadena de transporte electrónico mitocondrial y un aumento en la síntesis de especies reactivas de oxígeno derivadas del metabolismo<sup>63</sup>.
- La activación de los leucocitos y la liberación de citocinas proinflamatorias originan una respuesta inflamatoria local y sistémica con importantes estímulos generadores de radicales libres<sup>64</sup>.
- La reperfusión de tejidos isquémicos en determinadas cirugías (aórtica, cardiaca, trasplantes) provoca una serie de cambios bioquímicos y celulares en el endotelio vascular que culminan en la adhesión y el secuestro de neutrófilos en el tejido reperfundido. La activación de estos neutrófilos, la producción de radicales libres, la liberación de proteasas y la lipoperoxidación de las membranas celulares produce un



importante daño tisular que se puede mantener hasta 48 horas después del inicio del denominado síndrome de isquemia / reperfusión<sup>65</sup>.

- La translocación de metales de transición de sus lugares de depósito, particularmente hierro y cobre, que veíamos anteriormente que participaban en reacciones con diferentes ROS, también conduce a un aumento en la producción de radicales libres. Otros elementos como el zinc, cuya disminución se ha documentado reiteradamente en ciertas cirugías, son cofactores de un gran número de enzimas antioxidantes como la superóxido dismutasa (SOD) y son necesarios en el periodo de recuperación postquirúrgica, pues interviene en los procesos de mitosis y proliferación celular<sup>66</sup>.

Diversas investigaciones han constatado un aumento en la producción de radicales libres como consecuencia de la realización de intervenciones quirúrgicas. Así, algunos autores han observado un aumento del estrés oxidativo con valores aumentados de MDA, junto con un descenso en la actividad de la SOD, en pacientes que han sido sometidos a trasplante cardíaco o a cirugía de bypass coronario<sup>69,70</sup>. Varios estudios han referido igualmente un incremento en los productos derivados de la peroxidación lipídica en el periodo postoperatorio inmediato tras una cirugía oncológica<sup>71</sup>.

Dentro del campo de la odontología existen pocas referencias expresas en la literatura científica que aludan al papel de los radicales libres y el estrés oxidativo específicamente en los procedimientos quirúrgicos orales. Aghabeigi *et al.* encontraron elevados niveles de nitritos ( $\text{NO}_2^-$ ) (estimación indirecta de la producción de óxido nítrico) tras una cirugía aspirativa de ATM, tanto en pacientes sintomáticos como asintomáticos<sup>72</sup>. Minczykowski *et al.* refieren una disminución de los niveles de  $\text{H}_2\text{O}_2$  y  $\text{O}_2^- \cdot$  tras la remoción quirúrgica de un

granuloma crónico periapical con un importante infiltrado inflamatorio con predominio de polimorfonucleares neutrófilos<sup>73</sup>.

## **1.8. RADICALES LIBRES Y CAVIDAD ORAL.**

Los radicales libres han sido relacionados con la fisiopatología de diversos procesos que afectan a la cavidad oral<sup>74,75</sup>.

Especialmente notable es la participación de las especies reactivas de oxígeno en la etiopatogenia de la enfermedad periodontal<sup>76</sup>. Se ha demostrado que en pacientes con periodontitis rápidamente progresiva, los polimorfonucleares neutrófilos (PMN) están activados funcionalmente y producen elevados niveles de  $O_2\bullet^-$ .<sup>77</sup> A su vez, se ha observado un aumento de la respuesta oxidativa de los PMN periféricos en pacientes con periodontitis juvenil localizada y generalizada, así como en pacientes con periodontitis del adulto. Este incremento de la respuesta oxidativa se ha relacionado con el estatus clínico periodontal del paciente<sup>78</sup>. De la misma forma, estudios en células epiteliales gingivales en cultivo han mostrado que los PMN pueden provocar la lisis de éstas a través de la acción de la mieloperoxidasa, una enzima leucocitaria generadora de especies reactivas de oxígeno<sup>79</sup>. Su actividad se ha visto aumentada en el fluido gingival crevicular de dientes con gingivitis y periodontitis con respecto a los dientes sanos.

Todos estos datos sugieren que en la enfermedad periodontal, los factores etiológicos generales rebasan la capacidad de acción de los sistemas fisiológicos de inhibición del estrés oxidativo, creando un bajo nivel de protección antioxidante de los tejidos periodontales. En estas condiciones, los factores locales conducen a la migración de neutrófilos hacia el tejido y

el fluido gingival. La activación de estos leucocitos durante la fagocitosis provoca la liberación de ROS, lo que conduce al desencadenamiento de la peroxidación lipídica de los tejidos blandos del periodonto y a la activación de proteasas. Esta peroxidación lipídica constituye el mecanismo que desencadena el desarrollo de cambios morfofuncionales en el periodonto y sus vasos, lo cual resulta en destrucción del colágeno y reabsorción ósea<sup>80</sup>. Por todo esto, se ha planteado que los factores que promueven una ruptura del sistema fisiológico antioxidante en la cavidad oral, contribuyen al desarrollo de mecanismos peroxidativos que inician la periodontitis.

Las RNS juegan también un papel importante en la fisiopatología de los procesos orales. Varios estudios señalan al óxido nítrico y otras RNS como mediadores fisiológicos y protectores de la mucosa oral en condiciones normales, ya que tanto la óxido nítrico sintasa constitutiva (cNOS) como la inducible (iNOS) se expresan basalmente en las células del tejido gingival, del epitelio de la mucosa oral, y en los conductos de las glándulas salivales<sup>74,81</sup>. En este sentido, Slomiany *et al.* encontraron una reducción en la actividad de la cNOS en pacientes con ulceraciones de la mucosa oral inducidas por AINES en comparación con sujetos normales control<sup>82</sup>. Lohinai *et al.* defienden también el papel protector de una cierta tasa basal de RNS, ya que pacientes con enfermedad granulomatosa crónica con una deficiencia de NADPH oxidasa asociada exhibieron formas más agresivas de periodontitis y estomatitis debido a una insuficiente producción de anión superóxido y por tanto de peroxinitritos con función antibacteriana<sup>81</sup>.

Dado que la barrera epitelial constituye la primera línea de defensa contra la flora oral, la producción por parte de las células gingivales y de la mucosa oral de pequeñas cantidades de NO• y RNS vía expresión de la iNOS puede actuar como una barrera química para limitar la invasión bacteriana a nivel local<sup>81</sup>. Pero cuando la estimulación de la iNOS por parte de ciertas bacterias periodontopatógenas (*P.gingivalis*, *A.actinomycescomitans*) o de citoquinas proinflamatorias sobrepasa la tasa basal fisiológica de NO• y ONOO<sup>-</sup>, la sobreproducción de RNS conlleva citotoxicidad y daño tisular a nivel de las células gingivales y de la mucosa oral<sup>84,85</sup>. Así, Lohinai *et al.* encontraron elevados niveles de 3-nitrotirosina (compuesto resultante de la nitración de la tirosina por parte de los peroxinitritos) en pacientes afectados de periodontitis<sup>81</sup>. Del mismo modo, se han relacionado los niveles elevados de NO• y ONOO<sup>-</sup> con otros procesos fisiopatológicos en la cavidad oral como la aftosis oral recidivante<sup>86</sup>, infecciones periapicales<sup>73</sup>, quistes odontogénicos<sup>87</sup>, trastornos de la articulación temporomandibular<sup>88,89</sup> y cáncer oral<sup>74,90</sup>.

## **2. REMODELADO ÓSEO Y OSTEointegración**

### **2.1. Fisiología Ósea**

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

La sustancia osteoide o **componente orgánico** de la matriz, producida por los osteoblastos, está constituida en un 90% por fibras de colágeno tipo I, que representa la proteína estructural fundamental de la matriz ósea. El 10% restante lo componen una serie de proteínas no

colágenas de menor tamaño que modulan la mineralización y la unión de las células a la matriz, y entre las que destacan (**Tabla 2**):

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

sus dos grupos carbonilo. Los osteoblastos sintetizan *osteocalcina* (una proteína cuyas concentraciones en plasma guardan cierta correlación con la mineralización) y la *proteína del osteoide con ácido  $\gamma$ -carboxiglutámico*, que inhibe la mineralización del colágeno en tejidos no óseos.

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

La *fase inorgánica* está compuesta por pequeños cristales de un mineral de carácter alcalino, la hidroxiapatita  $[\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2]$ . Estos cristales se incrustan entre las fibras de colágeno para formar un tejido que reúne las características adecuadas de rigidez, flexibilidad y resistencia<sup>91-93</sup>.

**TABLA 2. Principales proteínas constituyentes de la matriz ósea.**<sup>93</sup>

Proteínas de la matriz osteoide
1. Colágeno tipo I (90%)
2. Proteínas no colágenas (10%):
a) Glucoproteínas:
• Fosfatasa alcalina
• Glucoproteínas con secuencia RGD (osteopontina, osteonectina, fibronectina, trombospondina, sialoproteínas óseas)
b) Proteoglucanos
c) Proteínas con ácido $\gamma$ -carboxiglutámico (osteocalcina, proteína del osteoide con ácido $\gamma$ -carboxiglutámico)
d) Proteínas séricas retenidas en el hueso

### 2.1.1. OSTEOLASTOS Y OSTEOCITOS

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

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

El desarrollo de los osteoblastos está controlado por dos genes:

- a) El CBF A1 (*core-binding factor A1*), codificador del factor de transcripción así denominado, específico de los progenitores del osteoblasto; este factor regula la expresión de genes de proteínas específicas de esta célula, como osteopontina, osteocalcina, colágeno tipo I, sialoproteínas óseas y el *ligando del receptor-activador del factor nuclear- $\kappa\text{B}$*  (RANK-L).
- b) El gen *Ihh* (*Indian hedgehog*), igualmente necesario para el desarrollo embrionario del hueso y la actividad de los osteoblastos<sup>94,95</sup>.

Los osteoblastos son células secretoras metabólicamente activas que expresan proteínas como la osteocalcina y osteopontina, la osteonectina y otros proteoglicanos y factores señalizadores solubles (BMPs, TGF- $\beta$ , IGF I y II, IL-1 y PDGF). La expresión de estos productos por parte de los osteoblastos ocurre durante la embriogénesis ósea y durante su mantenimiento (remodelación) y reparación. Las señales que dirigen la mineralización osteoide todavía no

han sido identificadas. Es probable que la acumulación de proteínas a las cuales se una el calcio, sea el inicio del proceso de mineralización<sup>96</sup>.

Aunque los osteoblastos están polarizados hacia el hueso, la liberación de las proteínas de la matriz osteoide no se limita a su polo basal, sino que muchos de ellos van quedando envueltos en tal matriz, convirtiéndose en osteocitos incluidos en las lagunas que se forman en ella. Junto con ese destino, los osteoblastos pueden derivar a osteocitos de superficie, también conocidos como células limitantes o de revestimiento. Ambos tipos de osteocitos poseen receptores para paratohormona (PTH) y expresan in vivo ARNm de: actina- $\beta$ , factores de transcripción c-fos y c-jun, colágeno y proteínas no colágenas, así como el ARNm del factor de crecimiento semejante a insulina I (IGF-I)<sup>97</sup>.

En el hueso ya formado, los osteocitos incluidos en las lagunas u osteoplasmas en la matriz mineralizada, poseen forma estrellada, con numerosas y finas prolongaciones, y están comunicados entre sí por una red de canales, o conductos calcóforos, bañada por el denominado fluido óseo. Tal red de canales se forma antes de que se mineralice la matriz osteoide. Con microscopía electrónica se ha observado que en el interior de esos canales los osteocitos contactan mediante sus prolongaciones, lo que permite su comunicación con la superficie del hueso. Precisamente, un papel fisiológico primordial de los osteocitos es la detección de estímulos mecánicos y variaciones de tensión y morfología del hueso producidas por las cargas que soportan en su superficie, así como su traducción en el remodelado óseo.

Cuando se produce la reabsorción del hueso por los osteoclastos, los osteocitos quedan fuera de las lagunas como células de revestimiento en reposo<sup>93</sup>.



### 2.1.2. OSTEOCLASTOS

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

Las células precursoras de osteoclastos y éstos mismos expresan en su superficie el receptor de L-RANK producido por los osteoblastos, vía por la que, junto con citoquinas como las interleuquinas 1, 6 y 11, el factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), el interferón  $\gamma$  y el factor estimulador de colonias de macrófagos (M-CSF), se diferencian y activan<sup>98</sup>.

Morfológicamente, los osteoclastos son células gigantes (20-100  $\mu\text{m}$  de diámetro), multinucleadas (más de diez núcleos por célula), ricas en vacuolas y mitocondrias y, como los osteoblastos, polarizadas (sus acciones se localizan en regiones determinadas de su superficie). Así, con el microscopio electrónico se observa que en una de sus caras poseen una serie de finísimos entrantes y salientes, el denominado borde plegado (o en cepillo), a través del que se desarrollará la reabsorción ósea. En el citoplasma próximo a dicho borde se encuentra la conocida como *área clara*, rica en proteínas y filamentos del citoesqueleto, y desde la que se proyectan integrinas que alcanzan el espacio extracelular<sup>93</sup>.

### 2.1.2.1. MECANISMOS DE REABSORCIÓN ÓSEA

La reabsorción ósea es un proceso complejo que incluye la disolución de la fase mineral o inorgánica y la posterior degradación de las proteínas de la matriz ósea. Los mecanismos señalizadores responsables de la formación y activación de los osteoclastos no son del todo conocidos. Sí sabemos que estas células sintetizan enzimas necesarias para la reabsorción ósea y expresan una ATPasa bombeadora de protones, un intercambiador bicarbonato/cloro, una fosfatasa ácida resistente a tartrato, catepsina K y la anhidrasa carbónica tipo II.

Los osteoclastos se adhieren a la superficie ósea mediante integrinas que reconocen específicamente a proteínas de la matriz osteoide. El área de sellado delimita un microespacio entre los osteoclastos y la superficie ósea. La desmineralización se produce mediante la acidificación de ese microespacio gracias a la acción de una ATPasa de  $H^+$  localizada en la membrana del borde en cepillo. Para mantener el pH fisiológico en su seno, el osteoclasto dispone de un intercambiador  $Cl^-/HCO_3^-$  en la cara opuesta al borde en cepillo y, en este borde, un canal de  $Cl^-$  acoplado a la ATPasa de  $H^+$ . Como consecuencia de todo lo anterior, el osteoclasto secreta HCl en el microespacio subosteoclástico, con el consiguiente descenso del pH hasta 4.4 y la disolución del mineral. Esta disolución precede a la degradación de la matriz orgánica, llevada a cabo, a su vez, por proteasas como la catepsina K, secretada por los osteoclastos, y colagenasa por los osteoblastos<sup>99,100</sup>.

### 2.1.2.2. RADICALES LIBRES Y REABSORCIÓN ÓSEA

Según diversos estudios los radicales libres actúan como intermediarios importantes en la formación y activación de nuevos osteoclastos e intervienen en el proceso de reabsorción ósea. Ross *et al.* encontraron que la síntesis de ROS por el sistema xantina oxidasa/xantina

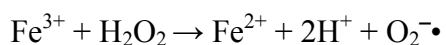
causó un aumento en la reabsorción ósea en cultivos de hueso largo fetal de rata y de calotas de ratones recién nacidos. La reabsorción ósea causada por las ROS en estos cultivos se inhibe por la SOD (6  $\mu\text{M}$ ), pero no se afectó al añadir idéntica dosis de catalasa, lo que sugiere que el anión superóxido es el principal responsable de esta reabsorción de hueso. Igualmente observaron tanto *in vivo* como *in vitro* un incremento significativo en el número de osteoclastos y en la extensión de la superficie de hueso reabsorbida después del tratamiento con xantina oxidasa/xantina<sup>101</sup>.

Cuando los osteoclastos son estimulados por factores como la parathormona (PTH), IL-1 o TNF y marcados con nitroazul de tetrazolio (NAT) se observa un aumento de células NAT+/mm<sup>2</sup> (el NAT es un marcador utilizado para investigar la producción de radicales libres ya que es reducido en presencia de especies reactivas). Este hecho coincide con observaciones hechas por otros autores según las cuales los osteoclastos poseen superóxido dismutasa y son los responsables de la producción de ROS en el microambiente óseo, lo que contribuiría a la degradación de componentes de la matriz ósea bajo el borde en cepillo, ya que moléculas estructurales de la matriz como el colágeno o el ácido hialurónico son susceptibles al daño oxidativo por radicales libres<sup>102</sup>.

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



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



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

El papel fisiológico de estas ROS en el proceso de reabsorción ósea no es del todo conocido, pero sí sabemos que atacan directamente al colágeno tipo I y otras proteínas estructurales de la matriz extracelular, contribuyendo a su fragmentación. Los productos resultantes penetran mediante endocitosis en vesículas intracelulares que contienen TRAP, enzima encargada de la degradación última de los componentes de la matriz. Por tanto, la degradación de la matriz ósea no sólo ocurriría extracelularmente a nivel de las lagunas de reabsorción, sino también intracelularmente en las vesículas endocíticas con TRAP y productos derivados de la acción de las ROS. Finalmente, estos productos de degradación son secretados al espacio extracelular a nivel de la membrana basolateral de la célula<sup>103</sup>.

## **2.2. REMODELADO ÓSEO**

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

El remodelado se lleva a cabo por grupos de células osteoblásticas y osteoclasticas que constituyen las llamadas “unidades de remodelado” o “unidades multicelulares básicas”. El proceso se inicia cuando, por mecanismos desconocidos, pero en los que pueden estar implicadas las células de revestimiento<sup>104</sup>, los precursores de los osteoclastos son atraídos a un lugar determinado del hueso, y por la acción de citoquinas (TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6, M-CSF, RANK-L), se diferencian a osteoclastos *in situ*. Éstos comienzan a reabsorber el hueso, de forma que a lo largo de unas dos semanas labran una pequeña cavidad.

Al finalizar esta fase de reabsorción de hueso, la cavidad labrada por los osteoclastos es tapizada por células mononucleares de naturaleza no bien conocida. Es la llamada fase de inversión. Después se reclutan precursores de osteoblastos, que proliferan y se diferencian. Los osteoblastos se disponen en una monocapa y comienzan a sintetizar osteoide que va rellenando el hueco abierto por los osteoclastos. Es la fase de formación de hueso, que se prolonga durante 2-4 meses. La mineralización de las láminas de osteoide se va produciendo según se depositan, pero con un retraso de unas dos semanas. Al final del proceso, el resultado es que un pequeño volumen de hueso viejo ha sido renovado por hueso nuevo<sup>105</sup>.

## **2.2.1. FACTORES REGULADORES DEL REMODELADO ÓSEO: REGULACIÓN HORMONAL Y PARACRINA.**

### **2.2.1.1. Paratohormona (PTH)**

Producida en las glándulas paratiroides que responden al descenso de la calcemia, es la hormona hipercalcemiente por excelencia, al favorecer la reabsorción. No obstante, en los últimos años se ha descubierto un papel estimulador en la formación ósea, a través de la

síntesis de IGF-I y TGF- $\beta$ <sup>106</sup>. Este doble efecto de reabsorción y formación se explicaría porque la PTH en administración continua estimularía la reabsorción ósea a través de la síntesis de un factor favorecedor de la osteoclastogénesis (RANKL) por parte de las células osteoblásticas, mientras que a dosis intermitentes estimularía la formación de hueso, asociado a un incremento de los factores de crecimiento mencionados anteriormente y a una disminución de la apoptosis de los osteoblastos.

#### **2.2.1.2. Calcitonina.**

Es inhibidora de la reabsorción ósea, al reducir el número y la actividad de los osteoclastos. Sin embargo, esta acción es transitoria, ya que los osteoclastos parecen volverse “impermeables” a la calcitonina en pocos días<sup>107</sup>.

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

Hormona esteroidea que favorece la absorción intestinal de calcio y fosfato y, por tanto, la mineralización ósea. Algunos autores piensan que puede ser producida por células linfocíticas o monocíticas del hueso, ejerciendo un papel importante como regulador local de la diferenciación de los osteoclastos<sup>108</sup>.

#### **2.2.1.4. Estrógenos.**

Los estrógenos tienen un doble efecto sobre el metabolismo óseo: por un lado favorecen la formación ósea al aumentar el número y función de los osteoblastos y por otro lado, disminuyen la reabsorción. Se han descrito receptores de estrógenos en osteoblastos, osteocitos y osteoclastos humanos. Investigaciones recientes han comprobado que los estrógenos pueden aumentar los niveles de osteoprotegerina (OPG), proteína producida por

los osteoblastos que inhibe la reabsorción<sup>109</sup>, por lo que podrían jugar un papel importante en la regulación de la osteoclastogénesis. Es por esto que la deficiencia de estrógenos durante la menopausia constituye el factor patogénico más importante de la pérdida ósea asociada a la osteoporosis.

#### **2.2.1.5. Glucocorticoides.**

A dosis altas tienen efectos catabólicos sobre el hueso, ya que inhiben la síntesis de IGF-I por los osteoblastos, y suprimen directamente la BMP-2 y el Cbfa1, factores críticos para la osteoblastogénesis<sup>110</sup>. Sin embargo, estudios recientes han demostrado que a dosis fisiológicas tienen capacidad osteogénica favoreciendo la diferenciación osteoblástica<sup>111</sup>.

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

Tiene dos acciones sobre el hueso, directa e indirecta. La GH actúa directamente sobre los osteoblastos, con receptores para la hormona, estimulando su actividad, lo que produce un aumento en la síntesis de colágeno, osteocalcina y fosfatasa alcalina. La acción indirecta se produce a través del aumento de la síntesis de IGF-I y II por los osteoblastos. Estos factores favorecen la proliferación y diferenciación de los osteoblastos, aumentando su número y función. Desde hace unos años se viene considerando a la GH como un factor de crecimiento local, ya que no sólo se sintetiza en la adenohipófisis, sino en casi todas las células del organismo, incluidos los osteoblastos, teniendo un efecto autocrino y paracrino, además de endocrino<sup>112</sup>.

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

Los factores de crecimiento análogos a la insulina son polipéptidos similares a esta hormona sintetizados por el hígado y los osteoblastos, entre otros tejidos. Se hallan en gran concentración en la matriz osteoide<sup>113</sup>. Incrementan el número y función de los osteoblastos, favoreciendo la síntesis de colágeno. Circulan unidos a proteínas de unión (IGFBP de *IGF-binding protein*), que a su vez pueden ejercer efectos estimulantes o inhibidores sobre el hueso. Los IGFs están regulados por hormonas y factores de crecimiento locales; así la GH, los estrógenos y la progesterona aumentan su producción, mientras que los glucocorticoides la inhiben. Asimismo, median en la interacción osteoblasto-osteoclasto e intervienen de forma activa en el remodelado óseo<sup>114</sup>. El IGF-II es el factor de crecimiento más abundante de la matriz ósea, es importante durante la embriogénesis, pero sus efectos sobre el esqueleto ya desarrollado actualmente se desconocen<sup>115</sup>.

### 2.2.1.8. Citoquinas.

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

- Interleuquina 1 (IL-1): Estimula directamente la reabsorción osteoclástica, incrementando la proliferación y diferenciación de los pre-osteoclastos así como la actividad osteoclástica e inhibiendo la apoptosis de los osteoclastos<sup>116</sup>. En realidad son 3 moléculas diferentes relacionadas: IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$  y antagonista del receptor de IL-1, siendo esta



última inhibidora del efecto de las dos primeras. Su acción sobre la reabsorción es directa e indirecta, a través de la síntesis de prostaglandinas.

- Interleuquina 6 (IL-6): Estimula la reabsorción ósea y parece implicada en la patogenia de la enfermedad de Paget<sup>117</sup>. Se cree que juega un papel importante en las etapas iniciales de la osteoclastogénesis. Se produce en respuesta a PTH, IL-1 y 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>.
- Interleuquina 11 (IL-11): De reciente descubrimiento, se produce en la médula ósea e induce la osteoclastogénesis.
- Prostaglandinas (PG): *In vitro* favorecen la reabsorción ósea, fundamentalmente la PGE<sub>2</sub>, pero también la PGE<sub>1</sub>, PGG<sub>2</sub>, PGI<sub>2</sub> y PGH<sub>2</sub><sup>118</sup>. Estudios *in vivo*, midiendo los niveles de prostaglandinas en el líquido crevicular, han demostrado su participación en la destrucción ósea que tiene lugar en la enfermedad periodontal<sup>119</sup>.

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

Las proteínas morfogenéticas óseas están incluidas dentro de la familia de los TGF- $\beta$ . Constituyen un grupo de 15 proteínas capaces de conseguir la transformación de tejido conjuntivo en tejido óseo, por lo que se consideran osteoinductivas. Asimismo, son capaces de estimular la diferenciación de células pluripotenciales hacia diferentes líneas celulares (tejido adiposo, cartílago y hueso). Son muy abundantes en el tejido óseo y durante la embriogénesis participan en la formación de hueso y cartílago.

Actualmente se las considera como los factores más potentes de la diferenciación osteoblástica<sup>95</sup>. Canalis *et al.*<sup>120</sup> creen que además de estimular la osteogénesis inhiben la osteoclastogénesis.

#### **2.2.1.10. SISTEMA OPG/RANK/RANKL**

La acción biológica del osteoclasto se ve regulada primordialmente por la tríada molecular OPG/RANK/RANKL<sup>104</sup>. El receptor RANK (receptor activador del factor nuclear kB) es un péptido que se expresa en osteoclastos maduros y preosteoclastos, cuya activación da lugar a cambios en el citoesqueleto y actividad del osteoclasto, de tal forma que induce al osteoclasto a reabsorber hueso y a no morir por apoptosis; se trata de una señal de activación y supervivencia para el osteoclasto. El ligando encargado de activar al receptor RANK es RANK-L (ligando de unión al receptor activador del factor nuclear kB), que es una molécula que aparece anclada a la membrana del osteoblasto, aunque aparece también en células inmaduras mesenquimales de médula ósea. Su principal función es, mediante la unión a RANK, estimular la diferenciación de los osteoclastos, su activación y la inhibición de su apoptosis. Existe una tercera molécula, que es la osteoprotegerina (OPG). Se llama también factor de inhibición de la osteoclastogénesis y es un nuevo miembro de la superfamilia de los receptores del factor de necrosis tumoral (TNFR) que se expresa en diversos tejidos humanos además de en hueso. En hueso inhibe la maduración y activación de los osteoclastos al unirse al RANKL e impedir la unión del RANK<sup>121</sup>.

### 2.3. OSTEOINTEGRACIÓN Y BIOLOGÍA ÓSEA EN IMPLANTOLOGÍA ORAL

Las enormes posibilidades terapéuticas que ofrece han hecho de la implantología oral la rama de la Odontología que más se ha desarrollado en los últimos 15 años.

Un requisito imprescindible para el éxito del tratamiento implantológico es la unión firme, estable y duradera del implante bucal al sustrato óseo que lo engloba para luego poder construir sobre él una prótesis dental. En este sentido, Branemark (1965) fue el primero en definir el concepto de osteointegración como *“La conexión estructural y funcional directa entre el hueso vivo, ordenado, y la superficie de un implante sometido a carga funcional”*<sup>122</sup>.

La osteointegración requiere la formación de hueso nuevo alrededor del implante, proceso resultante de la remodelación en el interior del tejido óseo. El proceso lo inician los osteoclastos, que son las células responsables de reabsorber la zona necrótica originada por el fresado óseo durante la preparación del lecho receptor. Junto a ellos, la neoformación vascular aportará los elementos celulares, los osteoblastos, que crearán hueso nuevo capaz de interactuar con la capa de óxido de titanio del implante para integrar biológicamente al mismo. Los osteoblastos se diferenciarán posteriormente a osteocitos incluidos en la matriz ósea mineralizada.

Si consideramos ultraestructuralmente la interfase hueso-implante debemos referirnos al concepto de biointegración, que es la unión bioquímica directa entre el hueso vivo y la superficie del implante, demostrable a través de microscopía electrónica, independientemente de cualquier mecanismo mecánico de interunión. Así, el espacio existente entre el tejido óseo mineralizado y la capa de plasma de titanio del implante no es mayor de 10 Å y aparece lleno

de un material matriz, los proteoglicanos<sup>123</sup>. Una red de colágeno rodea los osteocitos y se inserta en la capa de glucoproteínas, que se fusiona con la capa de óxido de titanio. Se cree que el óxido de titanio del implante induce la formación de glucosaminoglucanos sulfatados<sup>124</sup>. Las trabéculas óseas crecen acercándose al implante y contactando con la capa de plasma. Por ellas llegan los vasos que aportan nutrición, elementos celulares para la remodelación y rodean el implante; los fibroblastos y osteoblastos aumentan y al acercarse al implante se unen a la capa de óxido. Forman sustancia fundamental que llena los espacios trabeculares y se fusiona con la capa de óxido de titanio. Por tanto, y en contra de lo que se creía hasta hace unos años, la interfase implante-tejidos orales es una zona dinámica sometida a una intensa actividad remodeladora por parte de las células óseas y la matriz extracelular<sup>125</sup>. Aunque hoy en día los nuevos diseños y tratamientos de superficie de los implantes están permitiendo en algunos casos reducir los tiempos de carga, se establece de forma general un periodo de osteointegración de 3 meses en mandíbula, y de 6 meses en el maxilar superior.

### **3. MELATONINA**

#### **3.1. ¿QUÉ ES LA MELATONINA?**

La melatonina (aMT) es la N-acetil-5-metoxitriptamina, una hormona sintetizada y secretada por la glándula pineal, descrita inicialmente por McCord y Allen (1917)<sup>126</sup> y aislada por primera vez por Lerner y cols. (1958)<sup>127</sup>.

La melatonina se libera durante la noche a través de la activación postsináptica de receptores  $\beta$ -adrenérgicos. Esto es así, ya que la luz evita la activación adrenérgica de la glándula pineal, produciéndose una inhibición en la síntesis de melatonina. La célula

parenquimal de la glándula pineal es el pinealocito, que responde a los cambios en la luminosidad durante el ciclo luz/oscuridad, lo que hace que su actividad metabólica se sincronice a un periodo de 24 horas denominado ritmo circadiano que está mediado por el núcleo supraquiasmático del hipotálamo, de manera que en sujetos normales la mayor secreción de melatonina se produce entre las doce de la noche y las dos de la madrugada, y la mínima entre el mediodía y las dos de la tarde<sup>128</sup>.

Inicialmente la melatonina se definió como la hormona que mediaba las variaciones anuales en la capacidad reproductora de animales con ciclos de reproducción estacionales. Actualmente se sabe que influye en numerosos aspectos de la biología circadiana, acciones mediadas por la unión de la hormona a receptores de membrana<sup>129,130</sup>. Estudios posteriores han permitido relacionar a la melatonina con aspectos de la fisiología intracelular a través de mecanismos que son independientes de la acción de la hormona sobre receptores de membrana. En este sentido, se han identificado y caracterizado receptores nucleares para la melatonina en órganos periféricos<sup>131,132</sup> y células del sistema nervioso central<sup>133</sup>. Se ha demostrado también la capacidad de la melatonina para unirse a proteínas citosólicas como la proteína quinasa C<sup>134</sup>, la calmodulina<sup>135</sup> y la calreticulina<sup>136</sup>, modulando a través de esta interacción las acciones intracelulares del calcio y la dinámica de determinados receptores nucleares, respectivamente.

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

1. No se sintetiza en un órgano específico. Se sabe que las enzimas requeridas para la biosíntesis de la melatonina se encuentran en otros tejidos además de la pineal, y se sabe que diversos de estos tejidos, entre los cuales están la retina, el timo, el bazo, los linfocitos B, el ovario, el testículo y el intestino, producen melatonina. De todas formas, la melatonina circulante deriva esencialmente de la producida por la pineal, que pasa tanto a la circulación cerebral y sistémica como al líquido cefalorraquídeo. La melatonina extrapineal es producida por órganos específicos para su uso y no sale a la circulación<sup>137</sup>.
2. No actúa en un órgano diana específico. La melatonina alcanza todos los tejidos de la economía<sup>138,139</sup> y, al ser muy lipofílica, puede actuar a todos los niveles de la célula. Además, diversas organelas acumulan melatonina, como el núcleo y la mitocondria<sup>131,140</sup>.

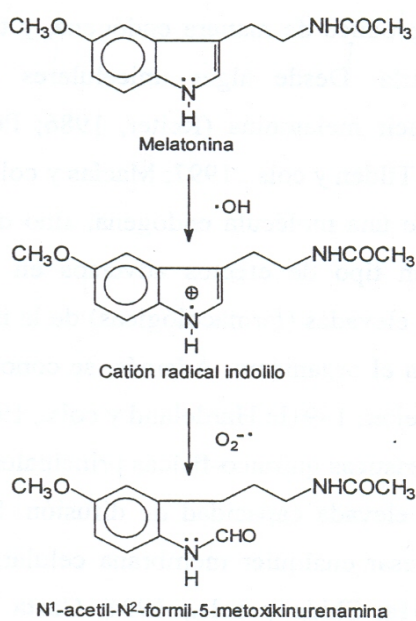
### **3.2. ANTIOXIDANTE Y DEPURADOR DE RADICALES LIBRES**

Se ha demostrado que la melatonina tiene propiedades antioxidantes. Esta característica, descrita inicialmente por Ianas y colaboradores<sup>141</sup>, ha sido posteriormente confirmada por numerosos estudios utilizando diferentes modelos experimentales. La melatonina tiene la capacidad de eliminar, depurar o neutralizar radicales libres, principalmente el radical hidroxilo ( $\text{HO}\cdot$ )<sup>142</sup>, pero también radicales peroxilo ( $\text{ROO}\cdot$ )<sup>143</sup>, peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ )<sup>144</sup>, óxido nítrico ( $\text{NO}\cdot$ ) y peroxinitritos ( $\text{ONOO}^-$ )<sup>145</sup>.

Una de las principales características físico-químicas de la melatonina para entender su gran eficacia como antioxidante es su elevada capacidad de difusión. Se trata de una molécula muy lipofílica, capaz de atravesar cualquier membrana celular, o de las diferentes organelas subcelulares<sup>146</sup>. Esta propiedad implica una función de la melatonina en todas las partes del organismo, dado que tiene acceso a todas las células y a todos sus compartimentos.

En segundo lugar, tiene un potencial redox muy alto, de alrededor de 0.74 V, lo que le confiere una alta capacidad de ceder un electrón para reducir cualquier molécula que esté a su alcance<sup>147</sup>.

El mecanismo por el cual la melatonina puede neutralizar ROS y fundamentalmente el radical HO• consiste en que esta indolamina cede un electrón al radical, eliminando su elevada reactividad, y por tanto, su toxicidad. De esta manera, la propia melatonina se convierte en un radical denominado *radical catión indolilo*<sup>148</sup>. Éste interacciona entonces con un radical anión superóxido, precursor del HO•, para generar el metabolito no enzimático de la melatonina, la N<sup>1</sup>-acetil-N<sup>2</sup>-formil-5-metoxiquinurenamina (aFMK), que se elimina en la orina (**Figura 3**). En este sistema directo de eliminación de radicales libres, la melatonina y su radical catión indolilo eliminan en realidad dos radicales libres a la vez, uno hidroxilo y otro superóxido. Por tanto, la capacidad de actuar como neutralizador de radicales HO• de la melatonina es altamente específica, y depende, como hemos visto ya, de la estructura química de la molécula.



**FIGURA 3. Mecanismo de neutralización de un radical hidroxilo y un radical anión superóxido por la melatonina.**

Esta acción directa como neutralizador de radicales libres se complementa con un efecto estimulante de la actividad de algunas enzimas antioxidantes de la célula<sup>149</sup>, y de inducción de la expresión de estas enzimas, tales como la SOD, GPx y GRd<sup>150</sup>. Debido a este efecto y a su elevada lipofilia, que le permite actuar a todos los niveles celulares (membrana, citosol, núcleo, mitocondria), su actividad antioxidante es más eficaz que la de otros antioxidantes ya conocidos<sup>143</sup>.

### 3.3. INMUNOMODULADOR

La relación entre melatonina y sistema inmune es cada vez más estrecha. En situaciones en las que se produce una inhibición en la producción de melatonina se observa un estado de inmunodepresión que desaparece cuando se administra la hormona. También



ciertos efectos inmunodepresivos producidos por algunos fármacos son contrarrestados por la melatonina<sup>151</sup>.

Aunque está clara la relación entre la melatonina y el sistema inmune, no es así la forma en la cual se realiza esta influencia sobre la denominada cascada natural de las citokinas en el sistema inmunitario. La relación entre IL-2 y melatonina (función de neuroinmunomodulación) se demuestra en diversas investigaciones<sup>152</sup>. En un estudio realizado por Lisoni y cols.<sup>153</sup> muestran que la secreción de IL-2 aumenta durante la noche, de una forma concomitante a la melatonina, mientras que no existen evidencias de secreción circadiana de otras citoquinas. La glándula pineal estimula la producción endógena de IL-2. El aumento nocturno de las concentraciones sanguíneas de IL-2 podría depender, al menos en parte, de la acción promotora de la melatonina, cuya liberación aumenta durante el periodo de oscuridad.

García-Maurino y cols.<sup>154</sup> señalan en un estudio realizado *in vitro* que la melatonina es capaz de activar los linfocitos CD4+ aumentando la producción de IL-2 e IFN- $\gamma$ , lo que podría sugerir que la melatonina puede estar implicada en la regulación de las funciones inmunes en humanos modulando la actividad de las células CD4 y monocitos.

### **3.4. ESTIMULADOR DE LA FORMACIÓN ÓSEA**

Numerosos trabajos señalan a la melatonina como un importante mediador en la estimulación y formación de hueso. A concentraciones micromolares la melatonina estimula la proliferación y la síntesis de fibras de colágeno tipo I en osteoblastos humanos *in vitro*<sup>155</sup>.

Por otra parte, en cultivos de preosteoblastos procedentes de ratas aumenta la expresión génica de la sialoproteína ósea y de otros marcadores proteicos de hueso, incluyendo la fosfatasa alcalina, la osteopontina y la osteocalcina, de una manera dosis-dependiente, reduciendo su periodo de diferenciación a osteoblastos de 21 días, que es lo normal, a 12 días. Esta acción parece estar mediada por los receptores de membrana de la hormona<sup>156</sup>.

Dentro del metabolismo óseo, otra importante acción biológica directa de la melatonina se centra en el osteoclasto, célula multinucleada encargada de la reabsorción de matriz extracelular mediante diversos mecanismos, dentro de los cuales ya hemos visto que se encuentra la producción de radicales libres. La melatonina, a través de su acción antioxidante y depuradora de radicales libres comentada anteriormente, podría interferir en esta función del osteoclasto e inhibir de esta forma la reabsorción ósea<sup>157</sup>. Esta inhibición en la reabsorción ósea se vería potenciada por otra acción de la indolamina a nivel de la osteoclastogénesis, ya que Koyama *et al.* han observado que la aplicación de melatonina en rangos de 5 a 500  $\mu\text{M}$  disminuye de manera dosis-dependiente la expresión de mRNA de RANK y aumenta tanto los niveles de OPG como de mRNA de OPG en líneas celulares preosteoblásticas MC3T3-E<sub>1</sub><sup>158</sup>.

Todos estos datos confirman un efecto osteogénico de la melatonina que puede ser clínicamente importante, ya que podría ser usada como potencial agente terapéutico en situaciones en las que sea deseable un aumento de la formación ósea, como cicatrización de fracturas u osteoporosis<sup>157</sup>.

### **3.5. MELATONINA Y CAVIDAD ORAL**

La melatonina llega a la cavidad oral a través de las glándulas salivales, donde se filtra desde la circulación general. La proporción de melatonina salival/melatonina plasmática en un patrón de 24 horas oscila entre 0.24 y 0.33, esto quiere decir que las concentraciones de melatonina en saliva están en torno al 24-33% de las que la hormona alcanza en plasma. Los autores coinciden en que aproximadamente el 70% de la melatonina plasmática está ligada a albúmina, por lo que esta melatonina ligada no aparecerá en saliva en cantidad apreciable. De este modo, la melatonina salival representa la porción de melatonina circulante no ligada a albúmina, es decir, melatonina libre<sup>159,160</sup>.

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

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

La importancia de la melatonina como antioxidante a nivel oral depende de su efecto paralelo sobre el sistema inmune. En trabajos publicados previamente por nuestro grupo de investigación hemos comprobado que la melatonina ejerce también en la cavidad oral una acción reguladora sobre el sistema inmune. Así, en pacientes con CPI (Índice Periodontal

Comunitario) 3 y 4, con focos infecciosos asociados, se produce un aumento en el número de linfocitos T CD4 que guarda gran similitud con la curva de concentraciones de melatonina en plasma. De la misma forma, aumentan también los linfocitos CD8 conforme empeora el estado oral. Por tanto, un estado oral deficiente (con índices CPI elevados) podría ser un factor de estimulación que actuara sobre la melatonina, la cual ejerce una acción impulsora sobre los linfocitos T CD4<sup>161,162</sup>.

# OBJETIVOS



## OBJETIVOS

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

1. Cuantificar el grado de estrés oxidativo producido en condiciones basales y después de realizar una intervención quirúrgica en la cavidad oral (exodoncias múltiples y seriadas), mediante la determinación de los siguientes marcadores plasmáticos de estrés oxidativo:
  - Glutation peroxidasa (GPx)
  - Glutation reductasa (GRd)
  - Glutation oxidado (GSSG)
  - Glutation reducido (GSH)
  - Peroxidación lipídica (LPO)
  - Nitritos ( $\text{NO}_2^-$ )
2. Estudiar si la aplicación tópica de melatonina tras dichas exodoncias modifica los parámetros de estrés oxidativo, aparecido en forma secundaria a la intervención quirúrgica.
3. Evaluar el efecto de la aplicación tópica de la melatonina en el proceso de osteointegración de implantes dentales a las dos semanas de su colocación.
4. Valorar la posible aplicación clínica de la melatonina en los procesos de estrés oxidativo y de osteointegración en la cavidad oral.





# MATERIAL Y MÉTODOS



# MATERIAL Y MÉTODOS

## 1. ANIMALES, PROCEDIMIENTO QUIRÚRGICO Y TRATAMIENTO.

Tras obtener la aprobación por parte del Comité de Ética de la Universidad de Granada (con fecha de 19 de noviembre de 2004), el estudio se realizó en 24 perros de raza *Beagle*, procedentes del Servicio de Reproducción Animal de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Córdoba. Dichos perros fueron remitidos al Servicio de Experimentación Animal de la Universidad de Granada, centro homologado para el cuidado, crianza y manejo de estos perros, donde realizamos nuestros trabajos de experimentación. Los animales, que recibieron alimentación *ad libitum* con dieta sólida a base de pienso y agua y cuyos estabularios fueron cuidados diariamente, permanecieron en el animalario hasta la edad de estudio, que comenzó a los 14 meses.

El estudio siguió en todo momento los principios éticos en investigación y docencia con modelos animales definidos internacionalmente<sup>163</sup> y aceptados por la Sociedad Española para las Ciencias del Animal de Laboratorio (SECAL), dentro de la legislación básica actual: REAL DECRETO 223/1988, de 14 de Marzo, sobre protección de los animales utilizados para experimentación y otros fines científicos<sup>164</sup>.

### 1.1. EXODONCIAS.

Con la finalidad de la colocación posterior de implantes dentales, entre los 14 y 16 meses de edad se realizaron las exodoncias de premolares y molares superiores e inferiores a los 24

perros bajo anestesia general (un total de 24 dientes por perro en una sola sesión). Se conservó el sector anterior (superior e inferior) de canino a canino para que los perros pudieran mantener una mínima función masticatoria.

Con el objetivo de determinar los parámetros plasmáticos más importantes de estrés oxidativo, se obtuvieron muestras sanguíneas una hora antes de realizar las exodoncias en condiciones basales (en forma previa a la inducción anestésica), y el día después de la intervención quirúrgica.

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

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

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

Como medicación antiinflamatoria/analgésica y antimicrobiana se utilizó:

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

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

Inmediatamente después de realizar las exodoncias, a ***12 de los 24 perros*** se les aplicó ***melatonina en forma tópica en las heridas de los alveolos dentarios, distribuyendo homogéneamente una dosis de 5 mg de melatonina por cuadrante.*** La melatonina utilizada fue obtenida de Helssin Chemicals (Helsinn Advanced Synthesis SA, Via Industria 24, 6710 Biasca, Suiza) en forma de polvo, y fue pesada y depositada en tubos ependorff la mañana de la intervención.

Tras realizar las exodoncias y aplicar la melatonina a la mitad de los perros, se suturó cuidadosamente con seda reabsorbible (seda trenzada estéril 3/0 TB-15. Lorca Marín. Ref. 55346). Durante todo el procedimiento quirúrgico la vía i.v. del perro fue mantenida con un suero glucosalino (250 cc.) que permitía la administración de la medicación anteriormente referida. El suero era transfundido en su totalidad después de terminar la intervención para facilitar la hidratación y recuperación postquirúrgica del animal.

Después de la intervención quirúrgica se trasladaban a los perros, aún bajo los efectos de la anestesia general, del quirófano a su estabulario para que, bajo supervisión veterinaria, se recuperasen progresivamente de la operación. Durante los días posteriores se revisaron periódicamente los perros, sobre todo el estado de las heridas postexodoncias, cuidado y

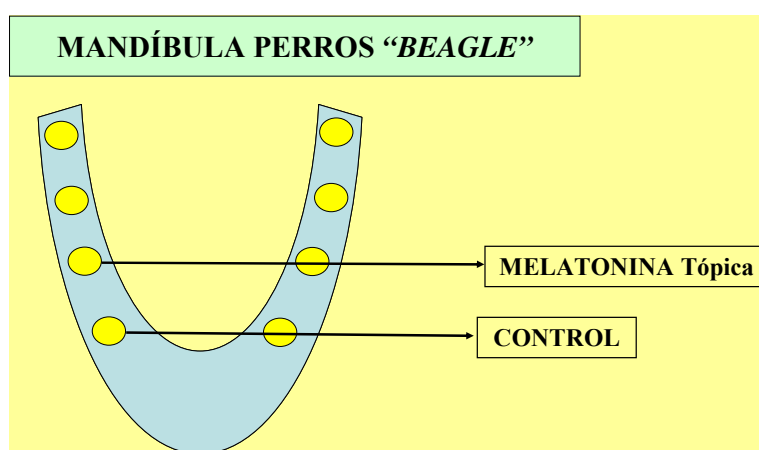
limpieza de las mismas para evitar infecciones, así como la evolución del estado general de los animales.

## 1.2. COLOCACIÓN DE LOS IMPLANTES.

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

Se colocaron cuatro implantes por perro: dos en la hemiarcada mandibular derecha y dos en la hemiarcada mandibular izquierda. Los implantes se clasificaron en dos grupos en función del tratamiento tópico aplicado a cada uno de ellos previamente a su colocación (**Figura 4**):

- Los dos implantes más anteriores de ambas hemiarcadas correspondieron a implantes control en los que no se aplicó ningún tratamiento tópico.
- Los dos implantes más distales que siguieron a los implantes control se impregnaron de melatonina tópica.



**FIGURA 4.** Distribución de los implantes dentales en la mandíbula de los perros *Beagle* en función del tratamiento tópico aplicado.

*Técnica Quirúrgica.*

El protocolo seguido correspondió a la técnica convencional de colocación de implantes oseointegrados<sup>165</sup>, cuyos pasos se describen a continuación:

- Incisión crestral con un bisturí con hoja del número 15, que se extendió a lo largo del cuerpo mandibular desde distal del canino hasta 15 ó 20 mm hacia distal del punto de colocación del último implante.
- Disección roma mediante el uso de periostotomos de Molt y Williger. Se procede a levantar un colgajo de espesor total, de amplitud suficiente para tener acceso a la cresta edéntula, incluyendo las corticales vestibular y lingual; de esta forma se verifica la integridad del reborde alveolar después de las exodoncias.
- Elaboración del lecho receptor de los implantes. Se realiza en el reborde óseo un lecho de morfología y dimensiones similares al implante a colocar. Utilizamos un micromotor (CHIROPRO 980. CA 100121. Bien Air®) con irrigación externa con suero fisiológico para evitar el sobrecalentamiento y necrosis del tejido óseo, y fresas de osteotomía de diámetros progresivamente mayores para realizar las preparaciones mediante un fresado secuencial (kit de fijación de implantes *Implant Microdent System*):
  - Fresa de marcaje o piloto, recta, de pequeño diámetro (1-1.5 mm). Es la primera fresa utilizada una vez que disponemos del campo operatorio correctamente preparado. Nos sirve para marcar el lugar de colocación e iniciar la preparación a través de la cortical y de los primeros milímetros de hueso esponjoso.
  - Fresa intermedia, de diámetro inferior al de la fresa definitiva. Se utiliza para ampliar la osteotomía, ensanchando el diámetro de la preparación iniciada con la

fresa de marcaje, hasta la longitud definitiva (10 mm) preestablecida para la fijación.

- Fresa de avellanado. Sirve para preparar los primeros milímetros del neoalveolo, en los que se alojará la porción más cervical del implante.
- Fresa final, de longitud y diámetro definitivos.
- Aplicación del tratamiento tópico. Después de labrar el lecho receptor, aplicamos a cada implante el tratamiento tópico que correspondió:
  - Los dos implantes más anteriores, correspondientes al grupo control, no recibieron tratamiento tópico alguno.
  - Los dos implantes distales de ambas hemiarquadas, correspondientes al grupo con *melatonina tópica*, fueron humedecidos con suero fisiológico y posteriormente se impregnaron con 2 mg de *melatonina en polvo* (Helsinn Advanced Synthesis SA, Via Industria 24, 6710 Biasca, Suiza), pesada en la mañana de la intervención. Una vez recubierto el implante de melatonina, la sobrante se introdujo de forma cuidadosa en la preparación. Todos los implantes recibieron siempre la misma cantidad de melatonina (2 mg).
- Colocación de los implantes. Los implantes utilizados fueron implantes roscados (*Implant Microdent System*, plataforma diámetro 5.60 mm y diámetro de núcleo 3.25 mm, longitud 10.00 mm - MK 555010. Barcelona). Los implantes fueron llevados a la preparación para proceder al roscado de forma manual, y terminar de forma mecánica mediante llave de presión o carraca.
- Colocación del tornillo de cierre o de cicatrización.



- Sutura con seda reabsorbible (seda trenzada estéril 3/0 TB-15. Lorca Marín. Ref. 55346) y administración del remanente de suero glucosalino utilizado durante la intervención.

### **1.3. SACRIFICIO Y EXTRACCIÓN DE LA MANDÍBULA.**

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

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

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

Una vez constatada por el veterinario la muerte del perro, procedimos a la disección y extracción de la mandíbula para llevar a cabo el estudio histomorfométrico. Para ello, utilizando un bisturí con hoja del número 15 y un periostotomo de Molt, se diseccionaron los tejidos orales adheridos al cuerpo mandibular. Primero se diseccionó la mucosa y musculatura de la cara vestibular, y después la mucosa lingual, tejidos y músculos del suelo de la boca. Posteriormente, con la ayuda de un micromotor (Microprocesor Vmax Volvere NE 120®, Nakanishi INC.) y una fresa de osteotomía, con irrigación con suero salino, realizamos dos cortes transversales en ambos lados del cuerpo mandibular, con un margen distal de aproximadamente 10 ó 15 mm con respecto a los últimos implantes colocados, y se

procedió de forma cuidadosa a la extracción de la mandíbula. Ésta se introdujo en un recipiente de plástico herméticamente cerrado con formaldehído 3.7-4.0%, tamponado a pH=7 y estabilizado con metanol DC (Panreac DC ref. 252931.1214).

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

## **2. OBTENCIÓN Y PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS.**

### **2.1. MÉTODO DE OBTENCIÓN DEL PLASMA Y GLÓBULOS ROJOS.**

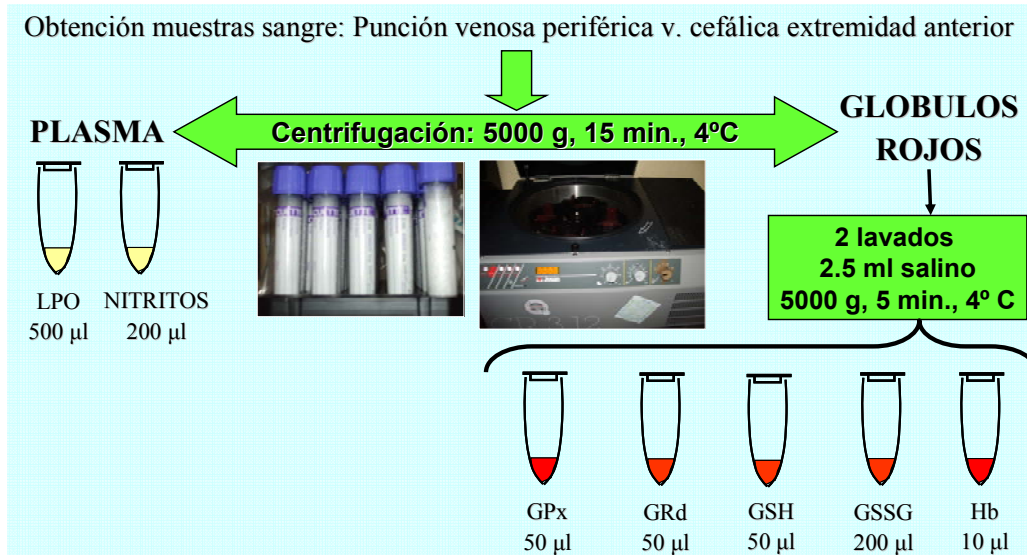
Para la obtención del plasma y glóbulos rojos utilizamos los siguientes materiales: goma elástica para venopunción, torundas de algodón, alcohol 96°, tubos para sistema Vacutainer® de 3 ml libres con anticoagulante (K<sub>3</sub> EDTA 5.4mg.), gradilla de acero esterilizable, jeringas de 10 ml de capacidad para extracción sanguínea y agujas de calibre grande para evitar la hemólisis.

Las muestras de sangre se extrajeron mediante punción venosa periférica en la vena cefálica de la extremidades anteriores del perro, y siempre a la misma hora (9:30-10 h a.m.). La sangre se distribuyó en diferentes tubos con EDTA-K<sub>3</sub> como anticoagulante, aproximadamente 3 ml en cada tubo, de forma cuidadosa (haciéndola deslizar sobre las paredes del tubo) para evitar la lisis de los hematíes, colocando los tubos verticalmente en una gradilla situada en un recipiente con agua helada a 0-4° C. A continuación la sangre se centrifugó durante 10 minutos a 4000 rpm a 4° C. Tras la centrifugación y obtención del plasma se hicieron las siguientes alícuotas (**Figura 5**):

- 500 µl para la determinación de la peroxidación lipídica (LPO).
- 200 µl para la determinación de nitritos ( $\text{NO}_2^-$ ).

Tras la obtención de las alícuotas plasmáticas se realizaron dos lavados de los glóbulos rojos sedimentados con suero fisiológico (solución isotónica NaCl 0.9%), centrifugando cada vez a 4000 rpm durante 10 min a 4° C. Los hematíes lavados resultantes se alícuotaron para la determinación de los siguientes parámetros:

- 50 µl para medir la actividad de la glutatión peroxidasa (GPx).
- 50 µl para medir la actividad de la glutatión reductasa (GRd).
- 50 µl para la determinación del glutatión reducido (GSH).
- 200 µl para la determinación del glutatión oxidado (GSSG).
- 10 µl para la determinación de Hemoglobina (Hb).



**FIGURA 5. Procesamiento de las muestras sanguíneas.**

Todas las alícuotas, plasmáticas y de glóbulos rojos se guardaron a -80°C hasta su posterior procesamiento. Es importante destacar que no se hizo ninguna manipulación hasta el día en que se realizaron las determinaciones.

## **2.2. PREPARACIÓN HISTOLÓGICA DE LAS MUESTRAS DE TEJIDO ÓSEO.**

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

Las muestras fueron procesadas para su estudio utilizando las técnicas de inclusión en metacrilato descritas por Donath<sup>166</sup>, realizando los pasos que siguen:

### **2.2.1. Fijación**

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

### **2.2.2. Deshidratación**

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

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

### **2.2.3. Infiltración**

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

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

### **2.2.4. Inclusión y polimerización**

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

La polimerización tuvo lugar en dos pasos:

- **Paso 1:** usando una luz de baja intensidad (manteniendo los moldes a una temperatura por debajo de 40° C, para que la resina se polimerizara extensamente). Este paso dura 4 horas.
- **Paso 2:** usando una luz azul de gran intensidad, de forma que el metacrilato que ha sido incluido dentro del tejido también resulte completamente polimerizado.

Este paso tiene una duración de doce horas, debido al gran grosor de nuestras muestras.

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

### **2.2.5. Preparación del bloque para obtener una superficie paralela**

Una vez polimerizado, se extrajo el bloque del molde. El siguiente paso fue realizar un corte preliminar para aproximar el área de interés más cerca de la superficie del bloque. Esto se realizó con la ayuda de una sierra de banda (Exakt 300), e irrigando para evitar el sobrecalentamiento de la muestra, que deterioraría los tejidos que rodean al implante. Después se procede a realizar una radiografía del espécimen en dos proyecciones para hacer un corte del implante por la mitad. Una vez cortado por la mitad los bloques se montaron en una lámina acrílica con ayuda de una resina (**Technovit 4000<sup>®</sup>** - Heraeus Kulzer GMBH, Werheim, Alemania) mediante el empleo de una prensa de pegado y una bomba de vacío, que sujeta el porta a la parte superior de la prensa. La resina se extendió por la parte de atrás del bloque, de manera que la parte que va a ser examinada contacte con la parte de debajo de la prensa de pegado. Cuando la polimerización finalizó el bloque estuvo listo para ser pulido.

### **2.2.6. Preparación de la superficie de interés**

El siguiente paso fue el pulido de la muestra por la superficie de interés con la ayuda de papeles abrasivos del número 1200. Tras realizar esta práctica, y con la ayuda de la prensa de fotopegado y una resina específica (**Technovit 7210<sup>®</sup>** - Heraeus Kulzer GMBH, Werheim, Alemania) la cara a estudiar se pegó en el porta definitivo. Posteriormente, utilizando una

sierra de banda (Exakt 400, System, Aparatebau GMBH, Hamburg, Alemania) y un portamuestra de vacío, se realizó un corte preliminar obteniendo una sección fina de 200 micras aproximadamente. Esta sección fue sometida a un microdesgaste (Exakt-Micro Grinding System<sup>®</sup>, Aparatebau GMBH, Hamburg, Alemania) y pulido con papeles de carburo de silicio de 1200 y 4000.

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

2.2.7. Tinciones

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

**TABLA 3. Tinción de LÉVAI LACZCÓ.**



### 3. MÉTODOS ANALÍTICOS.

#### 3.1. ESTRÉS OXIDATIVO

##### 3.1.1. MÉTODO DE DETERMINACIÓN DE HEMOGLOBINA.

Para la determinación de la hemoglobina se utilizó el método de la cianmetahemoglobina. El principio de este método se basa en que el Fe (II) de la hemoglobina, oxihemoglobina y carboxihemoglobina es oxidado a Fe (III) por el ferrocianuro, dando lugar a la metahemoglobina que, en presencia de ión cianuro, origina la cianmetahemoglobina, compuesto de color rojo y estable, que puede determinarse fotométricamente.

Protocolo:

- En una microplaca se añaden 150 µl por duplicado de un estándar equivalente a 20g. de hemoglobina/dl y normalizado frente al estándar internacional de referencia (ICSH).
- Se diluyen en un tubo de poliestireno de 10 ml, 10 µl de la muestra de glóbulos rojos en 5.000 µl de reactivo de Drabkin, que contiene ferrocianuro potásico 20 mM y cianuro potásico 43 mM. A continuación se agita con vórtex.
- Tras agitar las disoluciones con las muestras se añaden 150 µl de cada una por duplicado a los pocillos correspondientes de la placa.
- La reacción resulta en una coloración roja de la muestra como resultado de la formación de cianmetahemoglobina. Aunque este cromógeno es estable durante ocho horas, la medida de la densidad óptica (D.O.) de las muestras se realizó siempre

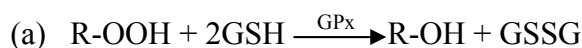
dentro de la primera hora de la reacción en un espectrofotómetro de placa ( $\lambda=540$  nm) (Bio-Tek Power-Wave<sub>x</sub> Microplate Scanning Spectrophotometer).

- Realización de los cálculos: (D.O. problema/D.O. estándar) x 20 = concentración de hemoglobina, expresada en g/dl.

La hemoglobina es la proteína a la cual referiremos los resultados del resto de los parámetros que determinaremos en glóbulos rojos (actividad enzimática de glutathion peroxidasa y reductasa, niveles de glutathion oxidado y reducido).

### 3.1.2. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA GLUTATION PEROXIDASA (GPx).

El método empleado consiste en una técnica espectrofotométrica indirecta, basado en una reacción acoplada con GRd y utilizando cumeno hidroperóxido como substrato<sup>167</sup>. Las reacciones que tienen lugar son:



De manera que la actividad de la GPx se puede medir indirectamente determinando la oxidación del NADPH en el tiempo a una longitud de onda de 340 nm.

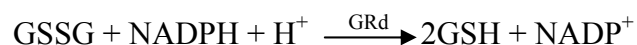
#### Protocolo:

- Se diluyen 50  $\mu\text{l}$  de glóbulos rojos en 950  $\mu\text{l}$  de tampón de hemólisis (tampón fosfato-EDTA 10 mM, pH 6.25, EDTA- $\text{Na}_2$  1 mM), se deja cinco minutos en reposo y a continuación se centrifuga a 20.000 g, 10 min, 4° C.

- Se prepara una solución extemporánea de trabajo B con 10 ml de tampón A (tampón fosfato-EDTA 100 mM, pH 7.5, EDTA-Na<sub>2</sub> 1 mM), al que se le añaden 2.8 mg de azida sódica, 13.2 mg de GSH, 1.78 mg de NADPH y GRd (0.5 U/ml).
- Como sustrato de reacción para la enzima se utilizó cumeno hidroperóxido disuelto al 0.1% en tampón A.
- Se incuban 10 µl de muestra en una microplaca durante 4 minutos a 37° C con 240 µl de solución de trabajo B.
- Tras la incubación se añaden 10 µl de cumeno hidroperóxido al 0.1% para iniciar la reacción y se mide la absorbancia a 340 nm durante tres minutos en un espectrofotómetro de placa (Bio-Tek Power-Wave<sub>x</sub> Microplate Scanning Spectrophotometer). En todas las determinaciones se resta la oxidación no enzimática del NADPH sustituyendo los 240 µl de la solución de trabajo B por NADPH 0.2 mM.
- La actividad de la GPx se expresa en µmol/min/g Hb.

### **3.1.3. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA GLUTATION REDUCTASA (GRd).**

La medida de la actividad de la GRd se realizó siguiendo el método de Jaskot<sup>167</sup>. Este método se basa en el mismo principio que el anterior, es decir, cuantificar la oxidación del NADPH en el tiempo como consecuencia del proceso de reducción del GSSG. La reacción que tiene lugar es la siguiente:



Protocolo:

- Se diluyen 50  $\mu$ l de glóbulos rojos en 950  $\mu$ l de tampón de hemólisis (tampón fosfato-EDTA 10 mM, pH 6.25, EDTA- $\text{Na}_2$  1 mM), se deja cinco minutos en reposo y a continuación se centrifuga a 20.000 g, 10 min, 4° C.
- 35  $\mu$ l de muestra se añaden a 465  $\mu$ l de una solución extemporánea de trabajo C compuesta por tampón A y GSSG 2 mM.
- Tras una incubación a 37° C durante cuatro minutos, se añaden 8.5  $\mu$ l de NADPH 9.5 mM para disparar la reacción y la oxidación del NADPH se mide durante tres minutos a 340 nm en un espectrofotómetro de cubeta (UV1603 Shimadzu spectrophotometer).
- En todas las determinaciones se resta la oxidación no enzimática del NADPH sustituyendo los 465  $\mu$ l de solución de trabajo por tampón A.
- La actividad de la GRd se expresa en  $\mu$ mol/min/g Hb.

### **3.1.4. DETERMINACIÓN DE LOS NIVELES DE GLUTATION REDUCIDO (GSH) Y GLUTATION OXIDADO (GSSG).**

El glutacion oxidado y reducido fueron medidos mediante un ensayo fluorimétrico<sup>168</sup>.

Cuantificación GSSG.

- Previamente se hemolizó y desproteinizó la muestra añadiendo a 200  $\mu$ l de glóbulos rojos, 400  $\mu$ l de ácido tricloroacético al 10% y 200  $\mu$ l de tampón de hemólisis (tampón fosfato-EDTA 10 mM, pH 6.25, EDTA- $\text{Na}_2$  1 mM), y centrifugando a 20.000 g durante 15 minutos a 4° C, obteniendo el sobrenadante que utilizaremos para la medición de GSSG.
- Se utilizó una modificación del método de Cohn y Lyle<sup>169</sup>.

- Se incubaron 200  $\mu$ l del sobrenadante con 40  $\mu$ l de N-etilmaleinimida (NEM) durante 40 minutos a temperatura ambiente. La NEM previene la oxidación del GSH presente en la muestra a GSSG.
- Tras la incubación, se añaden 760  $\mu$ l de NaOH 0.1 N.
- A continuación se añaden a los pocillos de una microplaca 10  $\mu$ l de la muestra con NEM y NaOH, 10  $\mu$ l de oftalaldehído (OPT) y 180  $\mu$ l de NaOH. EL OPT reacciona con el GSSG a pH alcalino, emitiendo fluorescencia en proporción directa a la cantidad de GSSG presente.
- Se incuba 15 minutos a temperatura ambiente y se lee la fluorescencia en un fluorímetro de placas (FL<sub>x</sub> 800 Microplate Fluorescence Reader, Bio-Tek Instruments, Inc).
- Para cuantificar el GSSG se comparó la fluorescencia emitida por las muestras con las de una curva de disoluciones estándar con concentraciones conocidas de GSSG.
- Los valores de GSSG se expresan en  $\mu$ mol/g Hb.

#### Cuantificación GSH.

- Previamente se hemolizó y desproteinizó la muestra añadiendo a 50  $\mu$ l de glóbulos rojos, 1000  $\mu$ l de ácido tricloroacético al 10% y 950  $\mu$ l de tampón de hemólisis (tampón fosfato-EDTA 10 mM, pH 6.25, EDTA-Na<sub>2</sub> 1 mM), y centrifugando a 20.000 g durante 15 minutos a 4°C, obteniendo el sobrenadante que utilizaremos para la medición de GSH.
- En los pocillos de la microplaca se añadieron 10  $\mu$ l de la muestra, 10  $\mu$ l de OPT y 180  $\mu$ l de tampón fosfato-EDTA 100 mM, pH 8.0, EDTA-Na<sub>2</sub> 5 mM.

- Se incubó 15 minutos a temperatura ambiente y se lee en un lector de fluorescencia (FL<sub>x</sub> 800 Microplate Fluorescence Reader, Bio-Tek Instruments, Inc).
- Para cuantificar el GSH se comparó la fluorescencia emitida por las muestras con las de una curva de diluciones estándar con concentraciones conocidas de GSH.
- Los valores de GSH se expresan en  $\mu\text{mol/g Hb}$ .

### **3.1.5. DETERMINACIÓN DE LA PEROXIDACIÓN LIPÍDICA (LPO).**

El índice de peroxidación lipídica se determinó cuantificando el malonildialdehído (MDA) y 4-hidroxi-nonenal (4-HNE) presentes en la muestra, los cuales son importantes productos de descomposición de los peróxidos derivados de los ácidos grasos poliinsaturados y sus ésteres relacionados. Las concentraciones de MDA y 4-HNE proporcionan un índice apropiado de la peroxidación lipídica<sup>170</sup>.

Estos aldehídos reaccionan con el agente cromogénico, el N-metil-2-fenilindol (NMFI), a una temperatura de 45° C. La condensación de una molécula de MDA o 4-HNE con dos moléculas de NMFI produce un cromóforo estable que en presencia de ácido metanosulfónico tiene una absorbancia máxima de 586 nm.

Se utilizó un kit comercial (Bioxytech LPO-586 Assay; OXIS International Inc., Portland, Oregon, USA) que contiene el reactivo cromógeno NMFI para la reacción.

#### Protocolo:

- En tubos de vidrio limpios, se añaden 200  $\mu\text{l}$  de plasma de cada perro y 650  $\mu\text{l}$  de reactivo R1 (compuesto por 0.5337 g de NMFI en 250 ml de acetonitrilo) diluido al 75% en metanol.

- Tras agitar durante 3-4 segundos, se añaden 150 µl de reactivo R2 (ácido metanosulfónico) y se cierran los tubos.
- Los tubos tapados se introducen en un baño y se incuban durante 40 minutos a 45° C.
- Transcurrida la incubación, se colocan los tubos en agua helada a 0-4° C para parar la reacción y las muestras se centrifugan a 4.000 rpm durante 15 minutos a 4° C.
- Las muestras que presentan turbidez tras la centrifugación, se vuelven a centrifugar 4.000. rpm durante 5 minutos a 4° C.
- A continuación se añaden 200 µl de la curva estándar y 200 µl del sobrenadante de las muestras, por duplicado, a una microplaca, midiendo la absorbancia a 586 nm.
- Para construir la curva estándar, se utilizaron diluciones seriadas de concentración conocida de 4-hidroxinonenal 10 mM en acetonitrilo.
- Los valores de LPO se expresan en nmol/ml.

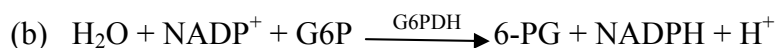
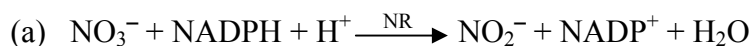
### **3.1.6. DETERMINACIÓN DE LOS NIVELES PLASMÁTICOS DE NITRITOS.**

Dado que el NO• es una molécula altamente inestable y de vida media muy corta, la medida directa de su concentración *in vivo* resulta difícil. La cuantificación de nitratos y nitritos, que son derivados más estables, en los fluidos orgánicos y en los tejidos, proporciona un método útil de estimación indirecta del NO• producido endógenamente.

El NO• reacciona rápidamente con el agua para producir nitritos, siendo la concentración de éstos directamente proporcional a la cantidad de NO•. A su vez, los nitritos se oxidan fácilmente en solución acuosa y a pH 7.4 a nitratos, lo que ocurre normalmente en el organismo en proporción variable. Por tanto, para poder determinar feacientemente la

concentración de NO•, es necesario determinar los niveles de nitritos y nitratos. El método que utilizamos en el laboratorio sirve para determinar nitritos. Esta técnica se basa una reacción colorimétrica por medio de la reacción de Griess<sup>171</sup>. El reactivo de Griess, formado por naftil-etilen-diamina (NEDA) y sulfanilamida, se combina con los nitritos para formar un compuesto nitrogenado coloreado. La intensidad del color púrpura producido es proporcional a la cantidad de cromógeno formado y, en consecuencia, a la cantidad de nitritos existentes según la ley de Lambert-Beer.

Para determinar nitratos, lo que hacemos es reducirlos a nitritos previamente, para después determinar éstos por el método anteriormente descrito. Para dicha reducción utilizamos las enzimas nitrato reductasa (NRd), que reduce los nitratos a nitritos a expensas del NADPH, y glucosa 6-fosfato deshidrogenasa (GP6DH), que recicla el NADPH a partir del NADP<sup>+</sup> producido, evitando que la reacción de la NRd se detenga por falta de cofactores. Estas reacciones se esquematizan de la siguiente forma<sup>172</sup>:



Protocolo:

- Desproteinización del plasma: 130 µl de muestra + 26 µl ácido sulfosalicílico 6%.
- Se agita y se incuba 30 minutos a temperatura ambiente agitando cada 5 minutos.
- Se centrifuga 15 minutos a 10.000 g y a 4° C.
- Se toman 50 µl por duplicado del sobrenadante.



- En un tubo eppendorff se mezclan los siguientes reactivos para preparar el medio de reacción:
  - Glucosa 6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH) (50 mU/muestra) ..... 2  $\mu$ l
  - Glucosa 6-fosfato (G6P) (750  $\mu$ M/muestra) ..... 3,75  $\mu$ l
  - Nitrato reductasa (NR) (30 mU/muestra) ..... 12  $\mu$ l
  - Tampón fosfato (14 mM, pH = 7,4) ..... 18,25  $\mu$ l
  
- En una microplaca se añaden:
  - 50  $\mu$ l de muestra
  - 4  $\mu$ l de NaOH
  - 36  $\mu$ l de medio de reacción
  - 10  $\mu$ l de NADPH (concentración 3  $\mu$ M/muestra)
  
- Se agita en vórtex
  
- Se incuba 90 minutos a temperatura ambiente tapada con papel aluminio
  
- Pasados los 90 minutos se añaden 100  $\mu$ l de reactivo de GRIESS y se incuba 10 minutos a temperatura ambiente
  
- Se mide la absorbancia a 540 nm frente a una curva estándar construida con nitrito sódico (NO<sub>2</sub>Na) en un espectrofotómetro de placa (Bio-Tek Power-Wave<sub>x</sub> Microplate Scanning Spectrophotometer).
  
- La concentración de nitritos se expresa en nmol/ml.

### **3.2. EVALUACIÓN HISTOLÓGICA E HISTOMORFOMÉTRICA.**

La histomorfometría es una valoración cuantitativa que permite la medición bidimensional (anchura, longitud, perímetro y área) y tridimensional (volumen, anchura y superficie) en diferentes tejidos vivos, entre ellos el tejido óseo. La evaluación histológica del hueso se ha

visto limitada durante años por las dificultades técnicas, de tal manera que antes de 1960 se realizaban únicamente técnicas de decalcificación que permitían obtener un tejido lo suficientemente blando para incluirlo en parafina. Sin embargo, esta técnica presentaba una serie de inconvenientes<sup>173</sup>:

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

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

Los parámetros histomorfométricos resultan de relacionar entre sí una serie de recuentos y mediciones efectuadas en el tejido óseo, permitiéndonos definir cuantitativamente las características estructurales y funcionales del hueso en condiciones normales, patológicas o experimentales<sup>174</sup>.

En nuestro estudio, para el análisis histomorfométrico se procedió a la captura de las imágenes con un microscopio óptico (Olympus CH30, Nagano, Japón), al que se le acopló una cámara digital (Olympus DP12, Nagano, Japón). La captura de las imágenes se realizó con un objetivo de cuatro aumentos, y utilizando filtros para polarizar la luz. El análisis de

imágenes se realizó con el programa informático Microimage 4.0® (Olympus Optical Co., Hamburgo, Alemania).

Los parámetros histomorfométricos analizados en nuestro estudio fueron los siguientes **(Figura 6)**<sup>175</sup>:

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

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

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

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

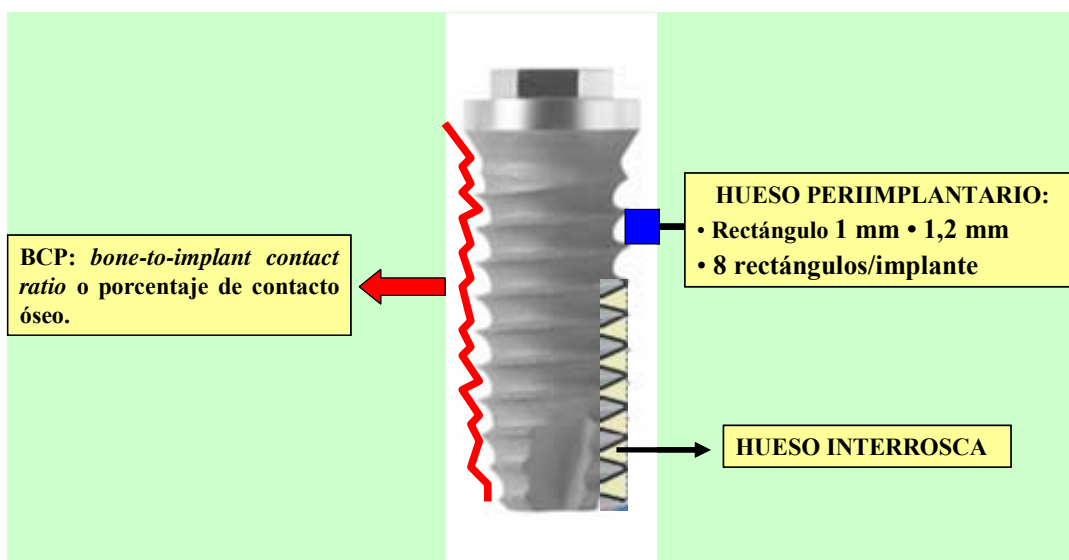
Para determinar la densidad ósea alrededor del implante se utilizaron en la histometría pequeños rectángulos formados por una línea que une los picos de las roscas de los implantes, y a una distancia de un milímetro de éstas (dimensiones aproximadas del rectángulo: 1 mm x 1,2 mm) **(Figura 6)**; de esta manera, el hueso periimplantario total se define como el área de hueso dentro de los rectángulos dividida entre el área total de tejido en el interior de los mismos (aproximadamente 1.247.227 micras cuadradas) (x 100). En cada implante se determinaron ocho rectángulos y se calcularon la media y el total de las áreas. El

resultado final es la media de los porcentajes de hueso de todos los rectángulos alrededor del implante.

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

Se define como el área de hueso dentro de las roscas del implante dividida entre el área total de tejido comprendida en las mismas (el área de cada triángulo interrosca tiene aproximadamente una superficie de 155.993,40 micras cuadradas) (**Figura 6**). El resultado final se multiplica por 100 y se expresa, como en las variables anteriores, en forma de porcentaje.

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



**FIGURA 6.** Representación de los parámetros de osteointegración determinados en el estudio histomorfométrico.

#### ➤ **PORCENTAJE DE NEOFORMACIÓN ÓSEA.**

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

#### **4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.**

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



# **RESULTADOS**





## RESULTADOS

Los resultados obtenidos tras la realización de las distintas determinaciones experimentales se describen a continuación. Se exponen las variables analizadas en relación al estrés oxidativo, y posteriormente los marcadores de osteointegración obtenidos tras el estudio histomorfométrico.

### **1. ESTRÉS OXIDATIVO.**

Como se indicó en material y métodos, para la valoración del estrés oxidativo se establecieron tres grupos de estudio:

- **Grupo basal:** correspondiente a las determinaciones de los parámetros de estrés oxidativo en los 24 perros una hora antes de las exodoncias.
- **Grupo control:** compuesto por 12 perros que no recibieron ningún tratamiento tópico tras las exodoncias.
- **Grupo tratado con melatonina tópica** tras las exodoncias, compuesto igualmente por 12 perros.

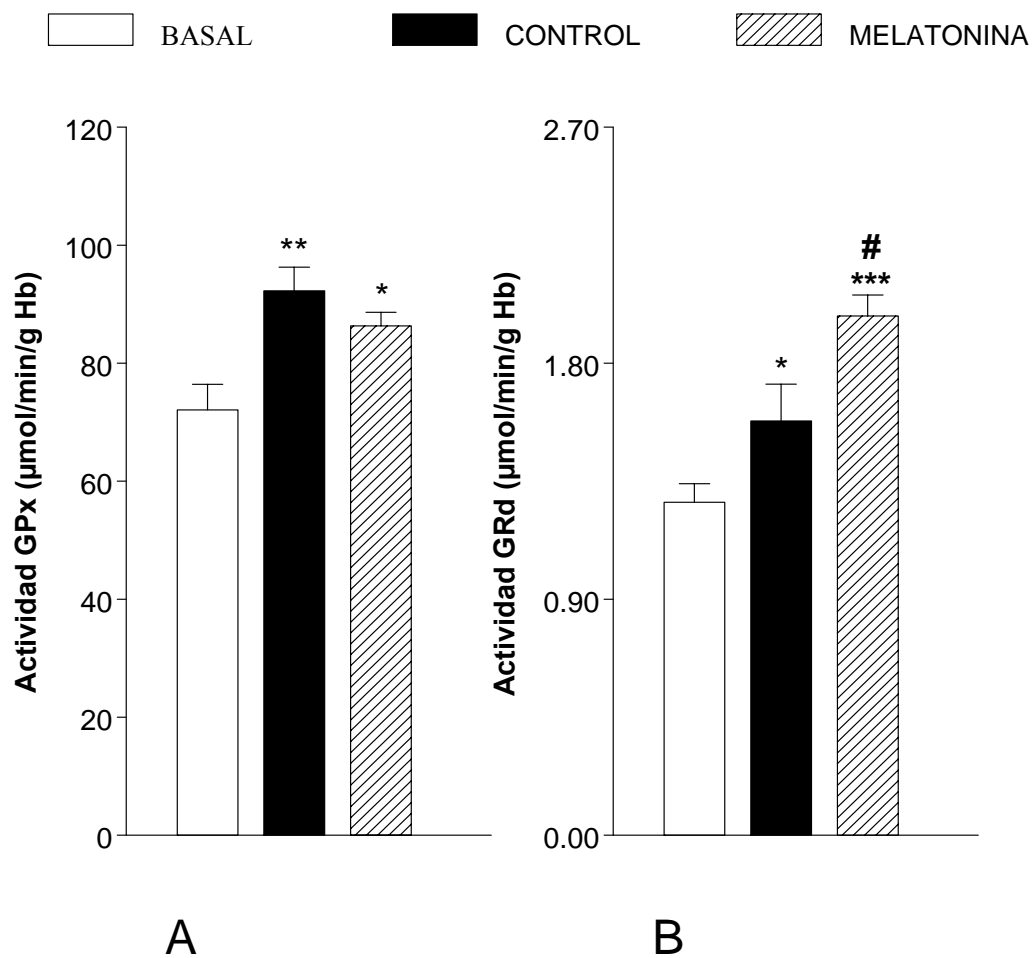
En la **Tabla 4** se muestran los valores numéricos de las distintas variables en los tres grupos estudiados.

La exposición de los resultados se hará siguiendo las gráficas explicativas para cada una de las variables.

### **1.1. ACTIVIDAD DE LA GLUTATION PEROXIDASA (GPx) Y GLUTATION REDUCTASA (GRd).**

En la **Figura 7** se aprecia la actividad de las enzimas GPx (A) y GRd (B) en los grupos basal, control y tratado con melatonina. El grupo control, que no recibió ningún tratamiento tópico tras las exodoncias, presentó 24 horas después de las mismas un aumento en la actividad de ambas enzimas, GPx ( $P<0.01$ ) y GRd ( $P<0.05$ ), en comparación con los niveles basales. Los perros tratados con melatonina mostraron igualmente un aumento significativo en la actividad de GPx ( $P<0.05$ ) y GRd ( $P<0.001$ ) 24 horas después de la intervención en comparación con los valores basales.

Por otra parte, al comparar la actividad de las dos enzimas un día después de las exodoncias entre los perros control sin tratamiento tópico y los tratados con melatonina, podemos observar como la melatonina aumentó significativamente la actividad de la GRd ( $P<0.05$ ) con respecto al grupo control.



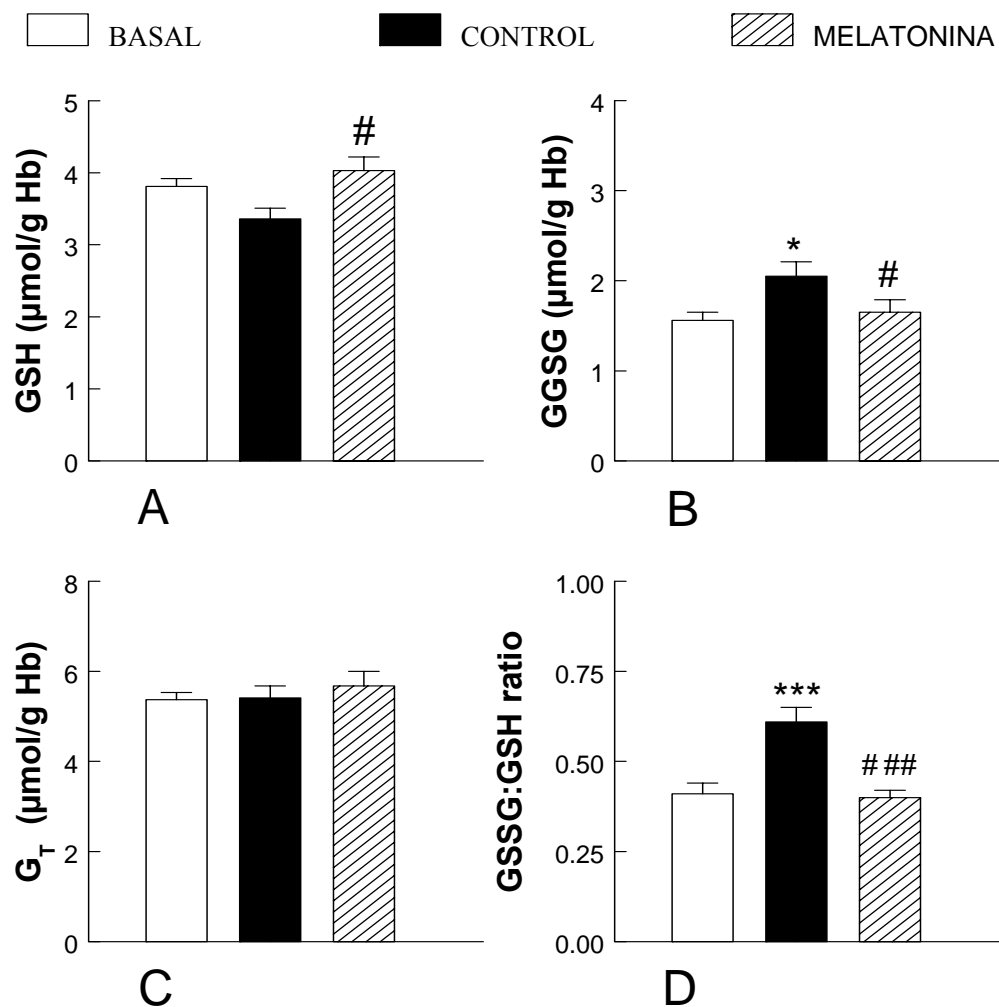
**Figura 7.** Actividad de las enzimas glutatión peroxidasa (GPx) (A) y glutatión reductasa (GRd) (B) en los grupos basal, control y tratado con melatonina. \*  $P < 0.05$ ; \*\*  $P < 0.01$  y \*\*\*  $P < 0.001$  vs. grupo basal; #  $P < 0.05$  vs. grupo control.

## 1.2. NIVELES DE GLUTATION REDUCIDO (GSH), GLUTATION OXIDADO (GSSG), GLUTATION TOTAL ( $G_T$ ) Y COCIENTE GSSG:GSH.

En la **Figura 8** se representan los niveles de GSH (A), (GSSG) (B), glutacion total ( $G_T$ ) (C) y cociente glutacion oxidado/glutacion reducido (GSSG:GSH ratio) (D) determinados en glóbulos rojos de los 24 perros en condiciones basales, y un día después de la intervención en el grupo control y en el grupo tratado con melatonina.

Podemos observar que aunque no existan diferencias apreciables en los niveles de glutacion total entre los tres grupos de estudio, un día después de las exodoncias los perros del grupo control sin tratamiento mostraron niveles significativamente mayores de GSSG ( $P<0.05$ ) con respecto a antes de la intervención, al igual que una tendencia a la disminución, aunque no significativa, en los niveles de GSH. Por tanto, el cociente GSSG:GSH fue considerablemente mayor ( $P<0.001$ ) en los perros del grupo control con respecto a los valores basales una hora antes de las exodoncias.

Se puede apreciar por otra parte, como la melatonina recuperó los niveles de GSH ( $P<0.05$ ) y disminuyó los de GSSG ( $P<0.05$ ) con respecto a los perros del grupo control que no recibieron tratamiento tópico. Así, el tratamiento con melatonina disminuyó considerablemente el cociente GSSG:GSH con respecto al grupo control ( $P<0.001$ ), hasta alcanzar prácticamente los valores obtenidos en condiciones basales una hora antes de las exodoncias.

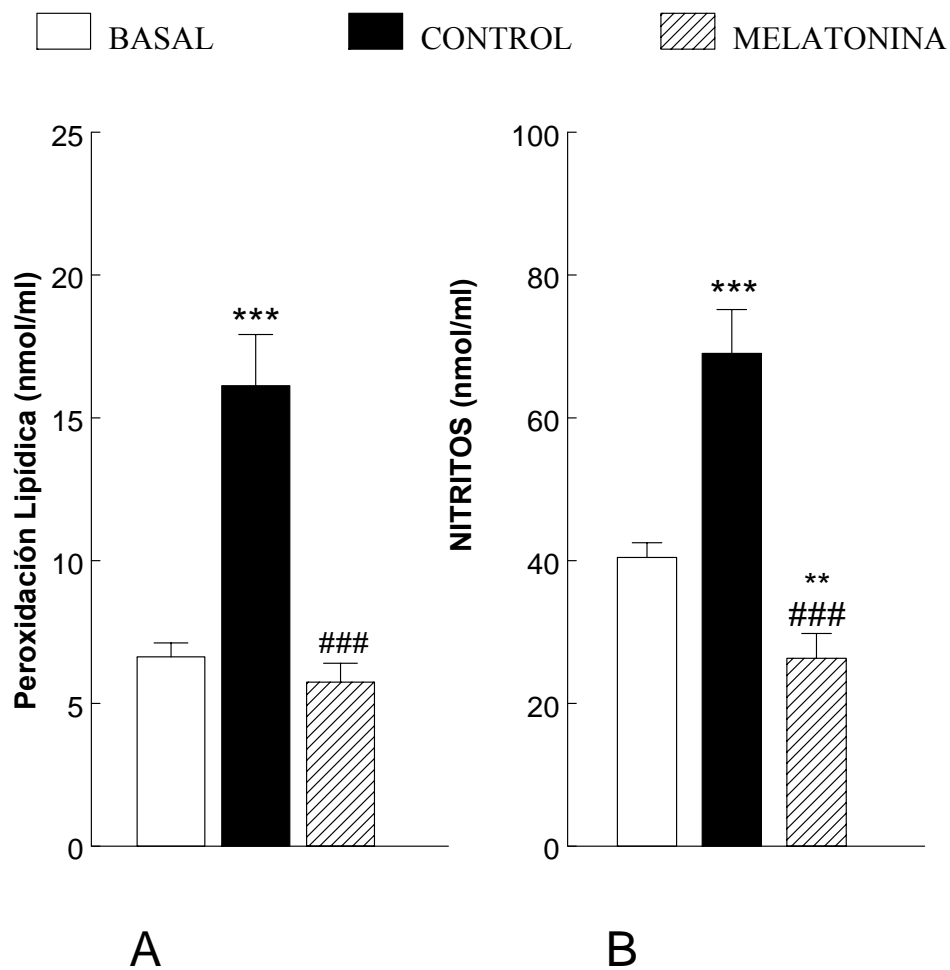


**Figura 8.** Niveles de glutatión reducido (GSH) (A), glutatión oxidado (GSSG) (B), glutatión total ( $G_T$ ) (C) y cociente glutatión oxidado/glutatión reducido (GSSG:GSH ratio) (D) determinados en glóbulos rojos en los grupos basal, control y tratado con melatonina. \*  $P < 0.05$  y \*\*\*  $P < 0.001$  vs. grupo basal; #  $P < 0.05$  y ###  $P < 0.001$  vs. grupo control.

### 1.3. NIVELES DE PEROXIDACIÓN LIPÍDICA (LPO) Y DE NITRITOS ( $\text{NO}_2^-$ ).

En la **Figura 9** se muestran los niveles plasmáticos de LPO (A) y  $\text{NO}_2^-$  (B) en los tres grupos de perros estudiados. Podemos observar como la LPO aumentó significativamente en los perros del grupo control sin tratamiento postexodoncias con respecto al grupo basal ( $P<0.001$ ). Los perros del grupo tratado con melatonina no mostraron cambios significativos un día después de las exodoncias con respecto a los valores basales de LPO, mostrando niveles inferiores a los perros del grupo control sin tratamiento ( $P<0.001$ ).

Con respecto a los niveles plasmáticos de nitritos podemos observar como siguen un camino paralelo a la LPO. De esta forma, encontramos elevados niveles de  $\text{NO}_2^-$  un día después de la intervención en el grupo control con respecto a las determinaciones basales ( $P<0.001$ ), mientras que en los perros que recibieron melatonina obtuvimos valores de  $\text{NO}_2^-$  inferiores con respecto al grupo basal ( $P<0.01$ ). La melatonina disminuyó igualmente de forma significativa los niveles de nitritos un día después de la intervención con respecto al grupo control que no recibió tratamiento postexodoncias ( $P<0.001$ ).



**Figura 9.** Niveles plasmáticos de peroxidación lipídica (LPO) (A) y nitritos ( $\text{NO}_2^-$ ) (B) en los grupos basal, control y tratado con melatonina. \*\*  $P < 0.01$  y \*\*\*  $P < 0.001$  vs. grupo basal; ###  $P < 0.001$  vs. grupo control.

**Tabla 4.** Parámetros de estrés oxidativo en condiciones basales y después de las exodoncias en el grupo control y tratado con melatonina.

PARÁMETROS ESTRÉS OXIDATIVO	BASAL (n=24)	GRUPO CONTROL (n=12)	GRUPO MELATONINA (n=12)
GPx (μmol/min/g Hb.)	72.08 ± 4.35	92.29 ± 4.02 **	86.32 ± 2.32 *
GRd (μmol/min/g Hb.)	1.27 ± 0.071	1.58 ± 0.14 *	1.98 ± 0.08 ***, #
GSH (μmol/g Hb.)	3.81 ± 0.11	3.36 ± 0.15	4.03 ± 0.19 #
GSSG (μmol/g Hb.)	1.56 ± 0.09	2.05 ± 0.16 *	1.65 ± 0.14 #
Cociente GSSG / GSH	0.41 ± 0.03	0.61 ± 0.04 ***	0.4 ± 0.02 ###
GLUTATION TOTAL (μmol/g Hb.)	5.37 ± 0.16	5.41 ± 0.27	5.68 ± 0.32
LPO (nmol/ml)	6.63 ± 0.49	16.13 ± 1.79 ***	5.75 ± 0.66 ###
NITRITOS (nmol/ml)	40.44 ± 2.08	69.04 ± 6.13 ***	26.33 ± 3.47 **, ###

Los datos se expresan como valor medio ± error estándar de la media (SEM).

Las determinaciones se realizaron una hora antes de realizar las exodoncias (grupo basal) y a las 24 horas de la intervención. El grupo control no recibió ningún tratamiento tópico tras las exodoncias, y en el grupo tratado con melatonina, ésta se aplicó en forma tópica en las heridas de los alveolos dentarios.

\*  $P < 0.05$ ; \*\*  $P < 0.01$  y \*\*\*  $P < 0.001$  vs. grupo basal; #  $P < 0.05$ ; ##  $P < 0.01$  y ###  $P < 0.001$  vs. grupo control.



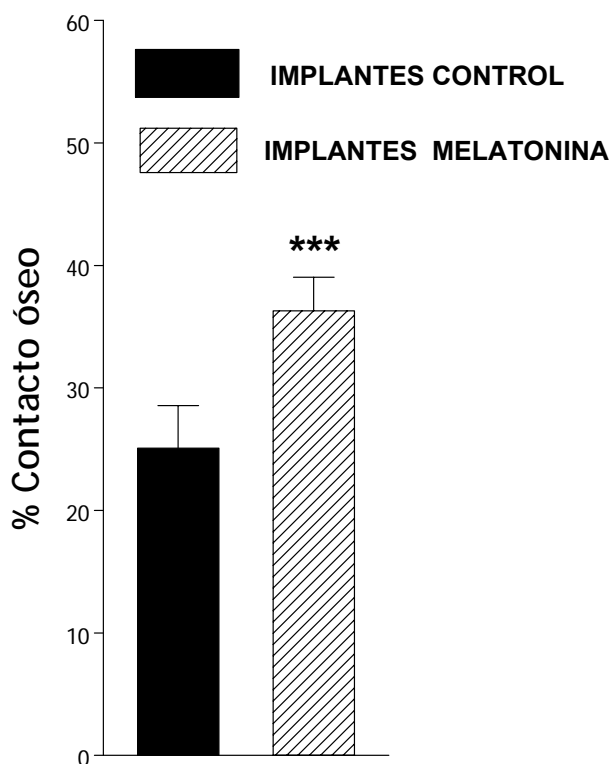
## **2. OSTEointegración.**

Para estudiar el efecto de la melatonina sobre la osteointegración de los implantes dentales, se procedió al sacrificio de la mitad de los perros a las dos semanas de la intervención, y se realizó el análisis histológico de las muestras. A cada perro se le colocaron dos implantes control y dos implantes con melatonina tópica. Por tanto, al final tuvimos un total de 24 implantes control sin tratamiento, y 24 implantes impregnados con melatonina tópica ( $n = 24$  en los dos grupos). Hemos de señalar que en este periodo de dos semanas se perdieron dos implantes del grupo control.

A continuación se describen los resultados obtenidos en relación a los distintos parámetros histomorfométricos de osteointegración (**Tabla 5**):

### **2.1. BCP (BONE-TO-IMPLANT CONTACT RATIO).**

En la **Figura 10** se representa el porcentaje de contacto óseo en los implantes control y en los implantes impregnados con melatonina tópica. Se puede apreciar como dos semanas después de la intervención, la melatonina aumentó de forma significativa ( $P < 0.0001$ ) el perímetro de hueso en contacto directo con los implantes, en relación a aquellos del grupo control que no recibieron tratamiento.



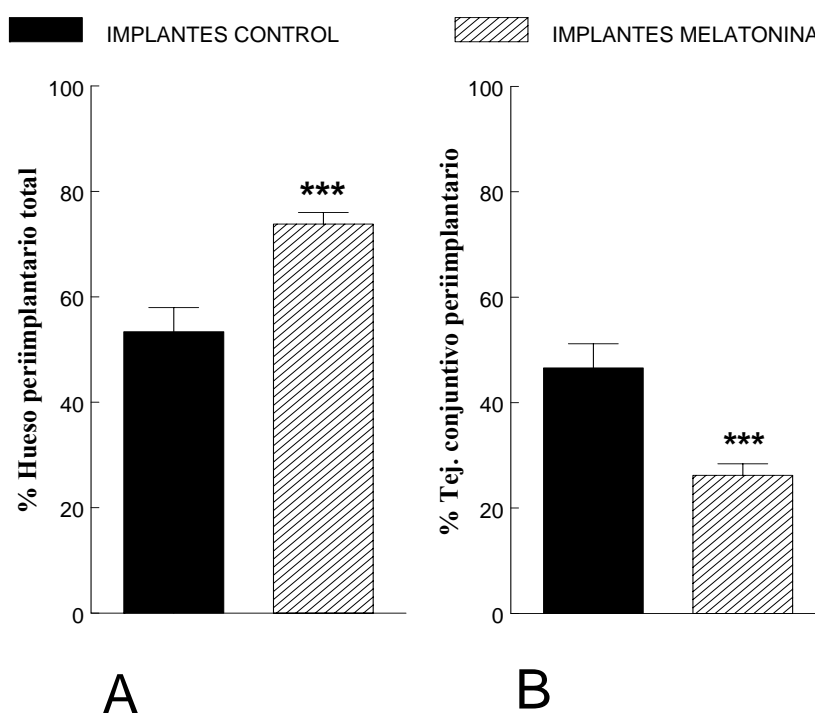
**Figura 10.** Porcentaje de contacto óseo (*bone-to-implant contact ratio: BCP*) en los implantes control y tratados con melatonina tópica dos semanas después de la intervención implantológica.

\*\*\*  $P < 0.0001$  vs. implantes control.

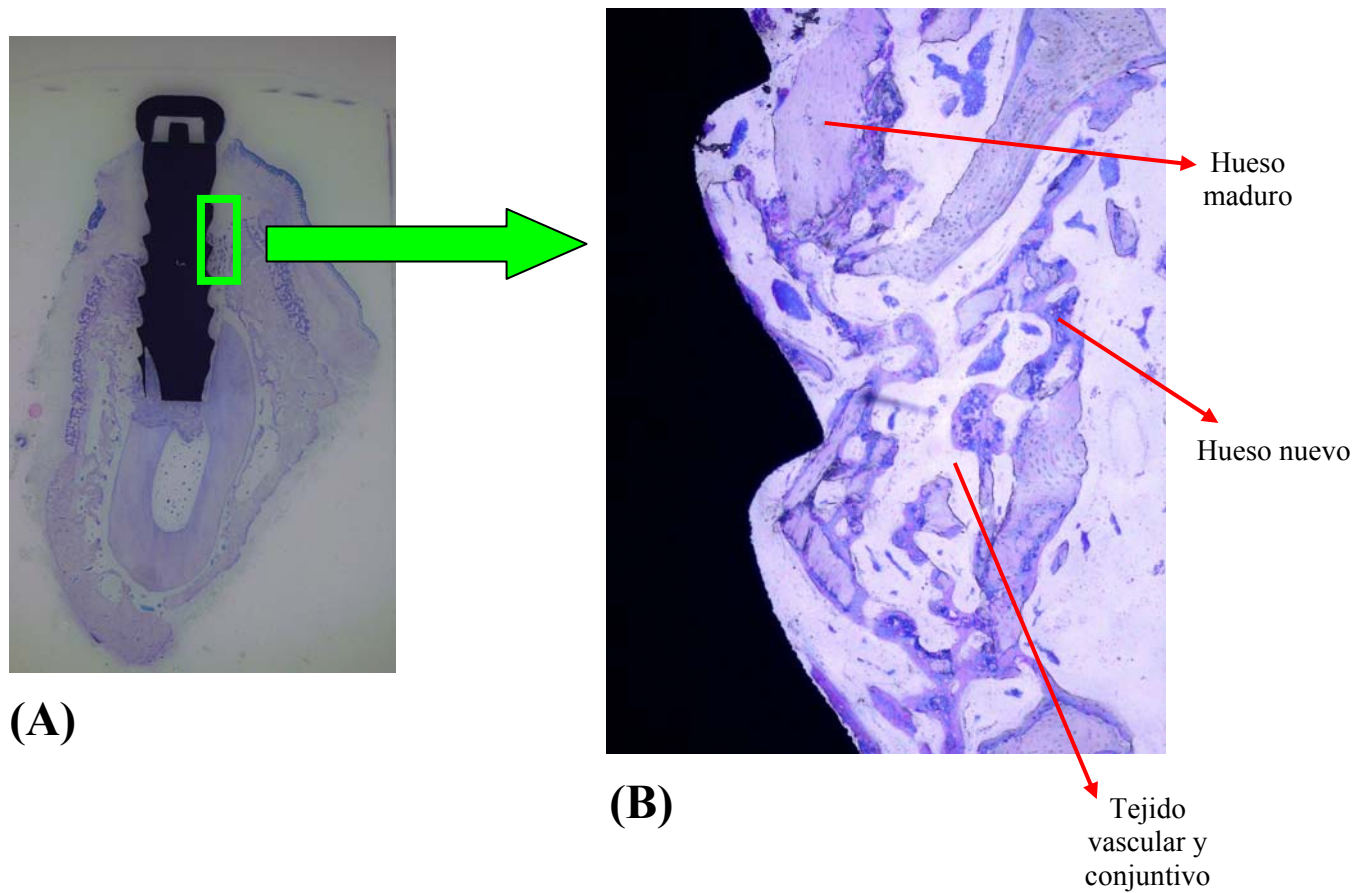
## 2.2. HUESO PERIIMPLANTARIO TOTAL (*PERIIMPLANT BONE AREA*).

En la **Figura 11** se expresa el porcentaje de hueso (A) y tejido conjuntivo (B) en la zona periimplantaria en los implantes control y tratados con melatonina tópica. La melatonina aumentó significativamente ( $P < 0.0001$ ) la densidad ósea alrededor de los implantes dos semanas después de su colocación.

La diferencia entre el área periimplantaria total (100%) y el porcentaje de hueso corresponde a tejido conjuntivo. Por tanto, la relación entre hueso y tejido conjuntivo es inversa, de manera que los implantes tratados con melatonina mostraron un menor porcentaje de tejido conjuntivo ( $P<0.0001$ ) en la zona periimplantaria dos semanas después de su colocación en relación a los implantes control.

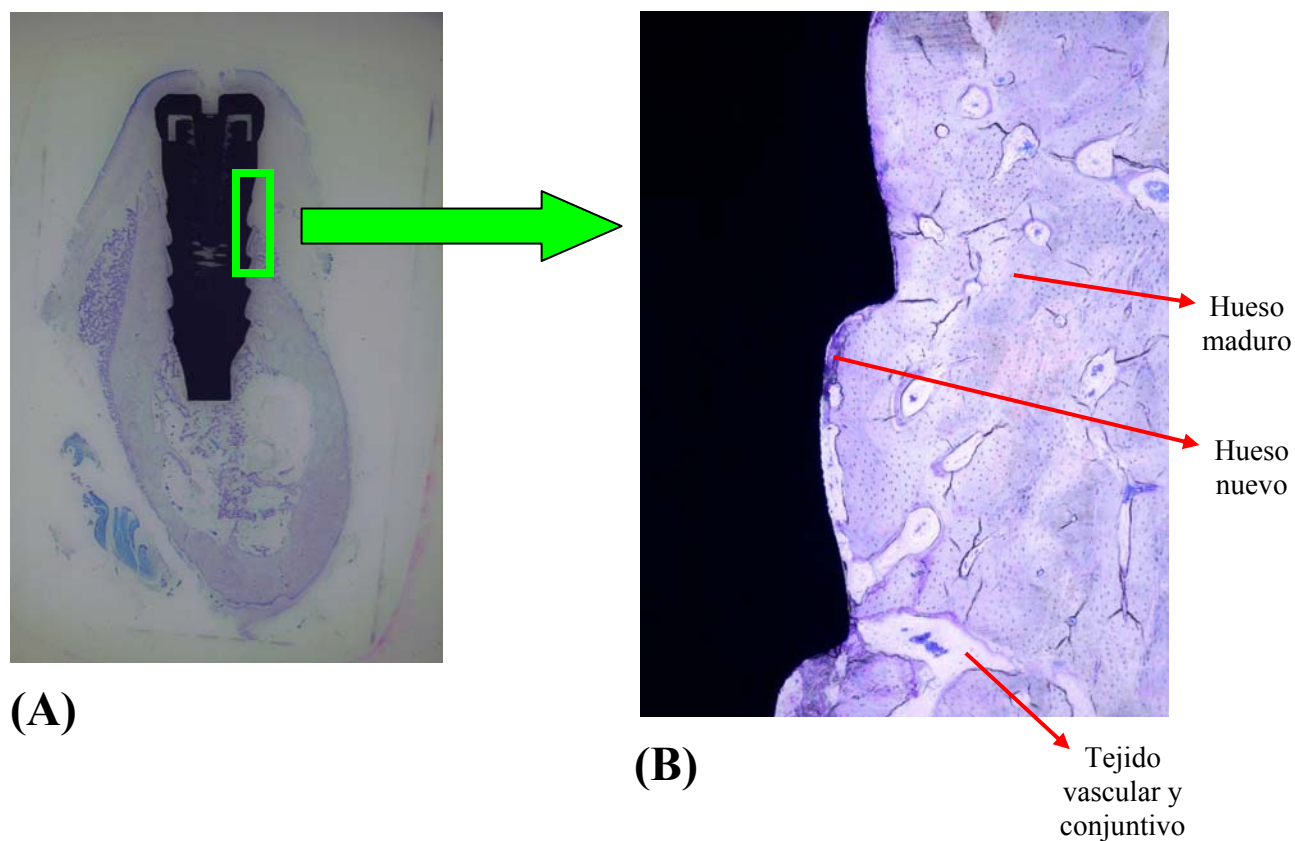


**Figura 11.** Porcentaje de hueso total (A) y tejido conjuntivo (B) en la zona periimplantaria (*periimplant bone area*) en los implantes control y tratados con melatonina tópica dos semanas después de la intervención implantológica. \*\*\*  $P<0.0001$  vs. implantes control.



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

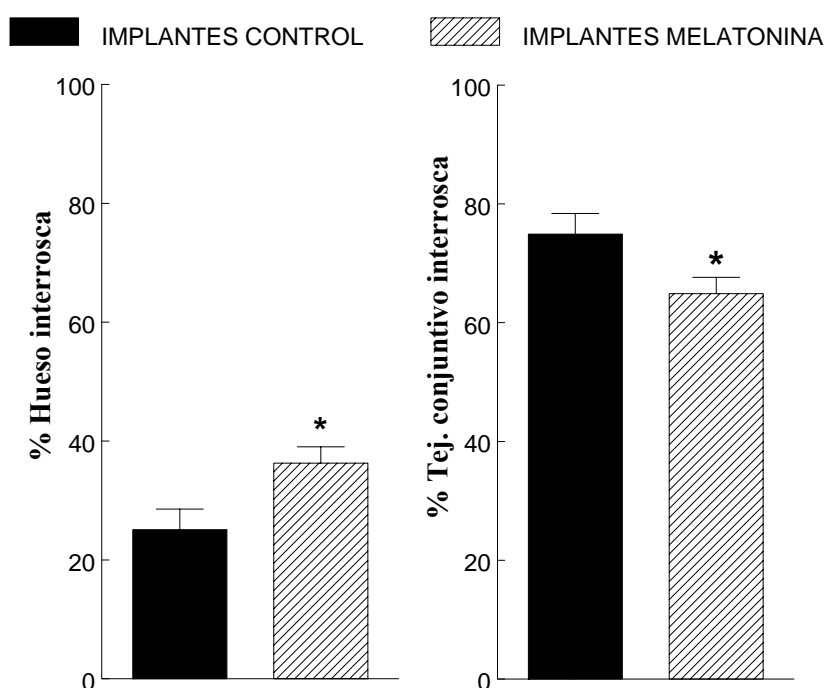
Esta imagen refleja los resultados obtenidos en los implantes del grupo control dos semanas después de la intervención. Podemos apreciar un bajo porcentaje de tejido óseo en contacto con el implante, y una gran cantidad de tejido vascular y conjuntivo, con poca formación de hueso, en la zona periimplantaria.



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

### 2.3. HUESO INTERROSCA (INTER-THREAD BONE AREA).

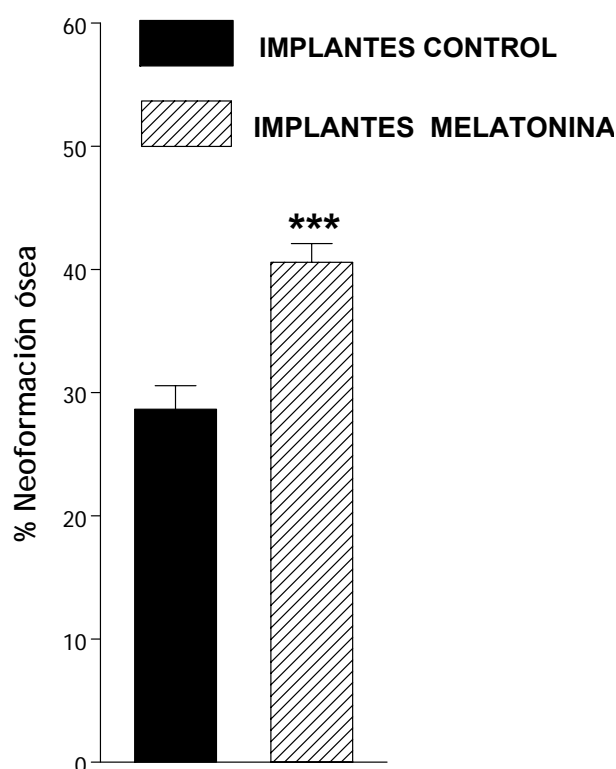
En la **Figura 12** se representa el porcentaje de hueso y tejido conjuntivo en la zona interroscas, en los implantes control y tratados con melatonina t6pica. La melatonina aument6 significativamente ( $P < 0.05$ ) la densidad 6sea entre las roscas de los implantes dos semanas despu6s de su colocaci6n, es decir, el porcentaje de tejido conjuntivo fue menor en los implantes impregnados con melatonina ( $P < 0.05$ ) que en los implantes control.



**Figura 12.** Porcentaje de hueso y tejido conjuntivo en la zona interroscas (*inter-thread bone area*) en los implantes control y tratados con melatonina t6pica 2 semanas despu6s de la intervenci6n implantol6gica. \*  $P < 0.05$  vs. implantes control.

## 2.4. PORCENTAJE DE NEOFORMACIÓN ÓSEA.

En la **Figura 13** podemos observar el porcentaje de neoformación ósea en los implantes control y tratados con melatonina tópica. La melatonina aumentó significativamente ( $P < 0.0001$ ) la formación de hueso nuevo dos semanas después de la colocación de los implantes.



**Figura 13.** Porcentaje de neoformación ósea en los implantes control y tratados con melatonina tópica dos semanas después de la intervención implantológica. \*\*\*  $P < 0.0001$  vs. implantes control.

**Tabla 5.** Parámetros histomorfométricos de osteointegración de implantes control e implantes impregnados con melatonina tópica, dos semanas después de la colocación de los mismos.

PARÁMETROS HISTOMORFOMÉTRICOS	IMPLANTES CONTROL (n=24)	IMPLANTES MELATONINA (n=24)
BCP (% contacto óseo)	25.05 ± 2.43	38.73 ± 1.46 ***
Hueso periimplantario total (%)	53.40 ± 4.58	73.80 ± 2.21 ***
Tejido conjuntivo periimplantario (%)	46.60 ± 4.58	26.20 ± 2.21 ***
Hueso interrosca (%)	25.08 ± 3.47	36.3 ± 2.73 *
Tejido conjuntivo interrosca (%)	74.92 ± 3.47	64.90 ± 2.73 *
Neoformación ósea (%)	28.65 ± 1.92	40.58 ± 1.52 ***

Los datos se expresan como valor medio ± error estándar de la media (SEM).

Los implantes control no recibieron ningún tratamiento. Los implantes del grupo con melatonina fueron humedecidos con suero fisiológico y posteriormente se impregnaron con 2 mg de *melatonina pura Helssin Chemicals® en forma de polvo*. Se perdieron dos implantes del grupo control.

\*\*\*  $P < 0.0001$  y \*  $P < 0.05$  vs. implantes control



# DISCUSIÓN



---

## DISCUSIÓN

### 1. ESTRÉS OXIDATIVO Y EXODONCIAS.

En los últimos años las investigaciones dentro del campo biomédico implican a los radicales libres y a los sistemas de defensa antioxidante en la génesis y el desarrollo de numerosas patologías como las enfermedades cardiovasculares, diabetes, cáncer, enfermedades inflamatorias y neurodegenerativas (enfermedad de Alzheimer y Parkinson) entre otras<sup>60,176-180</sup>. En esta línea, trabajos recientes de nuestro grupo de investigación indican que patologías sistémicas como la diabetes se manifiestan a nivel oral con un aumento significativo en los parámetros de estrés oxidativo en saliva, y un riesgo notable de desarrollar complicaciones tanto orales como sistémicas de esta enfermedad<sup>162</sup>.

A nivel odontológico, el estrés oxidativo se ha relacionado con diversos procesos fisiopatológicos en la cavidad oral, el más destacado de ellos la enfermedad periodontal<sup>76-80</sup>. Sin embargo, existen pocas referencias en la literatura científica que aludan al papel de los radicales libres y el estrés oxidativo en los procedimientos quirúrgicos orales. Aghabeigi *et al.* encontraron elevados niveles de  $\text{NO}_2^-$  (estimación indirecta de la producción de óxido nítrico) tras una cirugía aspirativa de ATM, tanto en pacientes sintomáticos como asintomáticos<sup>72</sup>. Minczykowski *et al.* refieren una disminución de los niveles de  $\text{H}_2\text{O}_2$  y  $\text{O}_2^{\bullet-}$  tras la remoción quirúrgica de un granuloma crónico periapical con un importante infiltrado inflamatorio con predominio de polimorfonucleares neutrófilos<sup>73</sup>.

En lo que se refiere a las extracciones dentales no existen evidencias directas sobre el papel que puedan desempeñar los radicales libres. Sí existen en cambio datos indirectos, ya que algunos autores defienden la utilización de antioxidantes como la vitamina C y E en el

proceso de cicatrización tras una extracción dental, e incluso tratar complicaciones como la alveolitis seca con estos compuestos<sup>181,182</sup>.

Nuestros resultados ponen de manifiesto por primera vez, que existe un incremento del estrés oxidativo en el periodo post-operatorio inmediato que sucede a la exodoncia, y que este incremento es neutralizado por la aplicación tópica de melatonina en las heridas alveolares.

Podemos apreciar cómo un día después de las exodoncias, los perros del grupo control que no recibieron melatonina presentaron un aumento significativo en los parámetros de estrés oxidativo medidos en plasma, que puede deberse a varios factores.

En primer lugar, es evidente que existe un proceso inflamatorio como consecuencia de las extracciones. Las bacterias de la cavidad oral colonizan en mayor o menor grado la parte superior del coágulo que se forma tras la exodoncia, lo que determina una respuesta inflamatoria aguda de la mucosa gingival que lo rodea, observándose durante las primeras 24-48 horas postextracción en la periferia del coágulo un edema por vasodilatación, con importante infiltrado de leucocitos polimorfonucleares neutrófilos, responsables de la producción de ROS<sup>183</sup>. Estas ROS aumentan la síntesis de otras citoquinas proinflamatorias, factores de transcripción como el NF- $\kappa$ B y moléculas de adhesión leucocitaria, favoreciendo la progresión del proceso inflamatorio y la síntesis de otras especies reactivas como NO• y ONOO<sup>-</sup> <sup>60</sup>.

Tanto las ROS como las RNS producidas localmente como consecuencia del proceso inflamatorio que sucede a las exodoncias pueden pasar a la circulación general, con lo que el estrés oxidativo en la cavidad oral tendría su reflejo a nivel plasmático. En nuestro estudio, la sobreproducción de NO• y ONOO<sup>-</sup> por la progresión del proceso inflamatorio a nivel local

se traduce en un aumento muy significativo de los niveles plasmáticos de nitritos en los perros del grupo control un día después de la intervención.

Tanto los  $\text{ONOO}^-$  como el  $\text{HO}\cdot$  son moléculas altamente reactivas y con capacidad de producir oxidaciones en las células del tejido gingival circundante, y de reaccionar con proteínas, enzimas, carbohidratos y lípidos de las membranas celulares<sup>184</sup>. Este mecanismo provoca un aumento de la peroxidación lipídica y de la liberación de productos de descomposición derivados del ataque oxidativo a los ácidos grasos poliinsaturados. Nuestros resultados parecen corroborar la secuencia descrita, y muestran cómo el aumento de especies reactivas tras las exodoncias se traduce en elevados niveles plasmáticos de MDA y 4-HNE un día después de la intervención.

Aunque el proceso inflamatorio que sucede a la exodoncia es la principal fuente de estrés oxidativo y nitrosativo, no es la única. Es evidente que tras una extracción dentaria hay rotura de fibras gingivales y lesión de los vasos sanguíneos periodontales, y la agresión a la que son sometidos los tejidos orales produce también muerte celular epitelial a nivel de la inserción dentaria. Estos hechos contribuirían a aumentar aún más la peroxidación lipídica y el estrés oxidativo generado por el proceso inflamatorio<sup>183</sup>.

Para contrarrestar este aumento del estrés oxidativo, la célula posee sus propios sistemas de defensa antioxidante, siendo el glutatión uno de los más importantes. Durante el ciclo del glutatión, éste convierte el  $\text{H}_2\text{O}_2$  a  $\text{H}_2\text{O}$  por acción de la GPx. En este proceso, el GSH es oxidado a GSSG y la GRd restaura los niveles de GSH. Por tanto, condiciones de elevado estrés oxidativo tienen su reflejo en alteraciones de este sistema. De hecho, el aumento de ROS y RNS, junto con la sobreproducción de hidroperóxidos y compuestos aldehídicos

derivados de la peroxidación lipídica tras las exodoncias, pueden causar un descenso en los niveles de GSH por un consumo excesivo, a la vez que por un daño directo a los enzimas del ciclo del glutatión, principalmente GRd<sup>185-187</sup>. En nuestro estudio este descenso no llega a ser significativo en los perros del grupo control. Sin embargo, estos perros sí mostraron un importante aumento del GSSG y del cociente GSSG:GSH un día después de la intervención. Es importante destacar que la relación GSSG:GSH es uno de los principales y más sensibles marcadores de estrés oxidativo intracelular, ya que la desproporción entre la forma oxidada y reducida del glutatión puede tener importantes consecuencias para la célula<sup>188</sup>. El GSH juega un papel fundamental en la protección celular frente al ataque oxidativo por radicales libres. Es el principal componente encargado de mantener los grupos sulfidrilos de las proteínas en su estado reducido y de regular la actividad de diversas enzimas celulares. El GSH participa igualmente en la regulación de la síntesis de proteínas y de la proliferación celular<sup>22,189</sup>. En situaciones en las que aumenta la producción de radicales libres, aumenta paralelamente la generación de GSSG a expensas del GSH, que intenta reducir los peróxidos formados por acción de la GPx. De esta manera se desequilibra la relación entre GSSG:GSH, aumentando progresivamente la concentración de GSSG con respecto a la de GSH<sup>190</sup>. Los valores obtenidos en los perros del grupo control sugieren que el estrés oxidativo, producido como consecuencia de las exodoncias, ha superado la capacidad de la célula para reducir el GSSG a GSH, con la consiguiente acumulación de GSSG y alteración del equilibrio redox celular. Además, los productos de peroxidación lipídica y el aumento en la concentración de GSSG citosólico en respuesta al estrés oxidativo causan una rápida

ubiquitinización y fosforilación del complejo IκB, que conduce a una activación del factor NF-κB y a la propagación del daño celular<sup>191,192</sup>.

La alteración del cociente GSSG:GSH se refleja en cambios en la actividad de las enzimas del ciclo del glutatión. De hecho, nuestros resultados muestran un aumento en la actividad de la GPx en los perros del grupo control un día después de las exodoncias, que reflejaría la activación de la maquinaria antioxidante, y que se explica fácilmente teniendo en cuenta la función del enzima en su intento por depurar el aumento de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Aunque la GRd es una enzima vulnerable al estrés oxidativo y que se daña fácilmente en estas condiciones, nuestros resultados muestran en cambio un aumento en la actividad de dicha enzima un día después de la intervención. Este aumento podría deberse a un mecanismo compensatorio en un intento por reducir el exceso de GSSG a GSH y de esta forma contrarrestar el estrés oxidativo postexodoncias.

## **2. MELATONINA Y ESTRÉS OXIDATIVO POSTEXODONCIAS.**

Numerosos trabajos publicados hasta el momento describen el efecto protector de la melatonina en diferentes modelos experimentales de estrés oxidativo<sup>141-150</sup>. Los resultados obtenidos en nuestro estudio son los primeros en relación a la acción antioxidante de la melatonina *in vivo* en la cavidad oral, y corroboran los datos encontrados en la bibliografía, ya que esta indolamina fue capaz de contrarrestar de forma notable el aumento en los marcadores plasmáticos de estrés oxidativo derivado de las exodoncias.

Al estudiar el grupo de perros al que aplicamos melatonina tópica en las heridas alveolares, podemos apreciar cómo la melatonina redujo significativamente los elevados niveles de LPO del grupo control un día después de las exodoncias, incluso ligeramente por debajo de los

valores basales. Nuestros resultados coinciden con los trabajos de otros autores que demuestran que la melatonina es capaz de reducir eficazmente *in vivo* la peroxidación de los lípidos<sup>35,193</sup>. Yamamoto y Tang<sup>194</sup> refieren que la melatonina previene la peroxidación lipídica inducida por cianuro en ratones. Del mismo modo, el pretratamiento con esta indolamina redujo la formación de malonildialdehído (MDA), un indicador de peroxidación lipídica, en animales con otitis media, donde existía, como en nuestro trabajo, una respuesta inflamatoria de base<sup>195</sup>. Además, según Gitto y cols. la melatonina aumenta la acción protectora de otros antioxidantes como vitamina E, vitamina C y GSH contra la oxidación de las grasas poliinsaturadas mediada por radicales libres, incrementando claramente su eficacia<sup>196</sup>. Cuando se comparan bajo condiciones de alto estrés oxidativo *in vivo*, la melatonina resulta superior a las vitaminas C y E en la reducción del daño oxidativo<sup>147</sup>, algo que también ha sido demostrado *in vitro*<sup>197</sup>.

Los menores niveles de LPO en el grupo de perros tratados con melatonina demuestran que ésta consigue un alto grado de protección lipídica tras las exodoncias, a través de dos mecanismos principales: 1) interfiriendo directamente con los radicales que inician el proceso, fundamentalmente OH• y ONOO<sup>-</sup>, y 2) situándose entre los lípidos de las membranas celulares gracias a su elevada liposolubilidad y gran capacidad de difusión, de forma que impediría la oxidación de los ácidos grasos poliinsaturados<sup>198,199</sup>.

La disminución en los niveles de MDA y 4-HNE en el grupo tratado con melatonina se acompaña también de una disminución de ROS y RNS a nivel oral. En relación a esto, podemos observar como la melatonina redujo igualmente los niveles plasmáticos de nitritos un día después de la intervención de forma muy significativa prácticamente a la tercera parte



en comparación al grupo control sin tratamiento, y a un poco más de la mitad con respecto a los valores basales. Este efecto de la melatonina dependería, al menos en parte, de su capacidad para depurar directamente  $\text{NO}\bullet$ <sup>200</sup>. Sin embargo, estudios experimentales *in vivo* han demostrado que la melatonina es capaz de inhibir tanto la expresión como la actividad de la iNOS en procesos infecciosos e inflamatorios<sup>186,187,201</sup>. A nivel local, el aumento en la actividad de la iNOS se ha relacionado con distintas enfermedades inflamatorias de la mucosa oral<sup>74,75,81</sup>, y es probable que contribuya a la sobreproducción de  $\text{NO}\bullet$  y  $\text{ONOO}^-$  en el proceso inflamatorio que sucede a las exodoncias.. La inhibición de la iNOS por parte de la melatonina podría ser responsable de la reducción en los niveles de nitritos un día después de la intervención, lo que disminuiría el daño gingival y el estrés oxidativo tras las exodoncias en la cavidad oral. En relación a las RNS, la melatonina podría disminuir también el estrés nitrosativo a nivel local neutralizando directamente el radical  $\text{ONOO}^-$ <sup>200,202</sup>.

Además de su acción directa como depurador de especies reactivas, es importante destacar llegados a este punto, que uno de los principales blancos donde se centra el efecto antioxidante de la melatonina es a nivel de la homeostasis mitocondrial del glutation. La mitocondria es la fuente principal de radicales libres en la célula, donde se producen grandes cantidades de  $\text{O}_2^-\bullet$  y  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Para evitar la formación de radical  $\text{HO}\bullet$ , altamente tóxico, y contrarrestar la propagación del daño oxidativo, la mitocondria cuenta con sus propios mecanismos de defensa antioxidante, donde destaca el GSH, que es la principal vía mitocondrial de depuración de  $\text{H}_2\text{O}_2$ . En condiciones de estrés oxidativo, la melatonina incrementa el nivel de GSH y reduce el contenido en GSSG, además de estimular la actividad de las dos enzimas antioxidantes dependientes de glutation, la GPx y la GRd, encargadas de

mantener el equilibrio GSSG:GSH<sup>197,203</sup>. Estas acciones de la melatonina a nivel mitocondrial se reflejan perfectamente en nuestros resultados, que muestran una considerable reducción del cociente GSSG:GSH un día después de las exodoncias con respecto al grupo control, recuperando incluso los valores basales.

Además de neutralizar el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en la mitocondria, que disminuye el consumo de GSH a nivel local, un efecto destacado de la melatonina y documentado por numerosos trabajos es la estimulación de la expresión y de la actividad enzimática de la GRd<sup>204,205</sup>, que explicaría el aumento de esta enzima un día después de la intervención con respecto a los perros que no recibieron tratamiento. Este aumento en la GRd, contribuiría, según muestran nuestros resultados, a una significativa disminución en los niveles de GSSG del grupo tratado con melatonina en relación al grupo control, y a un aumento en los niveles de GSH, reforzando la capacidad antioxidante a nivel de la cavidad oral. En este sentido, se sabe que la melatonina también induce la expresión de la  $\gamma$ -glutamyl-cistein-sintetasa, la enzima limitante en la síntesis de GSH<sup>206</sup>. Todo ello facilitaría la normalización del cociente GSSG:GSH comentada anteriormente.

En definitiva, nuestros resultados indican que existe un incremento significativo del estrés oxidativo en la cavidad oral un día después de las exodoncias, consecuencia fundamentalmente del proceso inflamatorio que sucede a las mismas. La melatonina es capaz de contrarrestar eficazmente este estrés oxidativo, aumentando la defensa antioxidante y preservando por tanto la integridad celular a nivel oral.

Estos resultados podrían tener importantes aplicaciones clínicas en los procedimientos quirúrgicos/inflamatorios de diversa índole que acontecen en la cavidad oral. Si el organismo

reacciona adecuadamente al acto operatorio, y los sistemas de defensa antioxidante en la cavidad oral se sobreponen y contrarrestan este daño oxidativo, la resolución del proceso y posterior cicatrización acontecerá sin mayores problemas en un corto periodo de tiempo. Ahora bien, en aquellos pacientes con bajos niveles de defensas antioxidantes, o con patologías que conlleven por sí mismas un aumento del estrés oxidativo (diabetes, parkinson, trastornos autoinmunitarios, enfermedad periodontal), las ROS y RNS pueden agravar el daño en los tejidos orales, y retrasar los procesos de reparación y regeneración. En estos pacientes, la aplicación tópica de melatonina podría ser un arma terapéutica de utilidad ante posibles complicaciones infecciosas e inflamatorias tras las exodoncias.

### **3. MELATONINA Y OSTEOINTEGRACIÓN EN LA CAVIDAD ORAL.**

La segunda parte de nuestro trabajo consistió en el estudio de otra función de esta indolamina estrechamente relacionada con la anterior: su acción osteogénica y osteomoduladora a nivel oral.

Para ello nos propusimos evaluar la acción de la melatonina sobre el proceso de osteointegración tras la colocación de implantes dentales, a nivel mandibular en perros *Beagle*, a las dos semanas de la intervención. Decidimos optar por el perro *Beagle* por la capacidad que presenta para imitar la cresta alveolar del humano, siendo su manejo más sencillo y su costo menor que los otros tres biomodelos más evolucionados en la escala filogenética (oveja, minipig, primate). Además, este modelo experimental proporciona un volumen óseo adecuado para la colocación de los implantes, similar al del humano, lo cual sería inviable en otras especies más pequeñas (rata o conejo). Al igual que en nuestro estudio,

se ha observado en otros trabajos con perros<sup>207,208</sup> que la espera de un periodo de curación (ocho semanas) tras las exodoncias se hace indispensable para obtener una cresta alveolar edéntula, que presente un hueso organizado y unos tejidos blandos cicatrizados y estables para colocar los implantes.

La relación entre melatonina y metabolismo óseo ha sido puesta de manifiesto por numerosos estudios<sup>155-158</sup>. Según algunos de sus autores, la melatonina actuaría a nivel óseo como un factor de crecimiento local, con efectos paracrinos sobre las células contiguas<sup>209,210</sup>. De hecho, se sabe que la melatonina se puede sintetizar a elevadas concentraciones en la médula ósea. En este sentido, Tan y cols<sup>139</sup> detectaron concentraciones muy altas de melatonina en médula ósea, alrededor de 100 veces más que en suero. Haldar y cols<sup>211</sup> han descrito efectos de la melatonina sobre precursores de células óseas en médula ósea de ratas. Adicionalmente, se sabe también que la indolamina es un importante modulador del metabolismo del calcio, y es capaz de prevenir ciertas situaciones de osteoporosis e hipocalcemia, probablemente debido a su interacción con otros factores de regulación óseos como la parathormona, calcitonina o prostaglandinas<sup>212,213</sup>.

Todos estos datos han de tener sin duda un significado biológico, y nuestros resultados parecen encaminarse en este sentido. A las dos semanas de la colocación de los implantes, la melatonina aumentó significativamente todos los parámetros de osteointegración de los mismos: porcentaje de contacto óseo (BCP), hueso periimplantario total, hueso interrosca, así como el porcentaje de neoformación ósea. De forma general, podemos decir que a las dos semanas existe una mayor densidad ósea en los implantes impregnados con melatonina tópica en relación a los implantes control sin tratamiento

La mayor cantidad de tejido óseo en contacto directo con los implantes que recibieron melatonina tópica (BCP), sería reflejo de una mayor síntesis de matriz ósea en la zona periimplantaria, bien por un aumento en el número o en la actividad de células osteoblásticas, bien por una inhibición en la actividad osteoclástica a este nivel. En efecto, una importante acción de la melatonina a nivel óseo se centra sobre las células formadoras de hueso. En este sentido, distintos estudios señalan que la melatonina estimula la proliferación y diferenciación de osteoblastos humanos *in vitro*, así como la síntesis de colágeno tipo I y otras proteínas de la matriz ósea<sup>155,156,214</sup>. Nakade *y cols.* observaron como la melatonina, a concentraciones micromolares, aumentó la proliferación de células óseas humanas obtenidas de muestras mandibulares (HOB-M cells), y de una línea celular osteoblástica humana (SV-HFO), y lo hizo de una forma dosis-dependiente, con un máximo efecto a 50  $\mu$ M de concentración<sup>155</sup>. Roth *y cols.* observaron que la melatonina estimulaba la diferenciación de líneas preosteoblásticas, de forma que las células tratadas con melatonina maduraron a osteoblastos en un plazo de 12 días, frente a los 21 días de los preosteoblastos del grupo control<sup>156</sup>. En nuestro trabajo, el aumento en la proliferación de los osteoblastos llevado a cabo por la melatonina, se traduciría en un mayor número de estas células a nivel periimplantario, y la temprana diferenciación celular aceleraría notablemente la síntesis y mineralización de la matriz osteoide. Todo ello originaría una mayor cantidad de matriz ósea mineralizada alrededor de los implantes con melatonina; de ahí el aumento tan significativo a las dos semanas en el BCP y hueso periimplantario total.

El hueso de la zona periimplantaria está sometido a un intenso proceso de remodelado tras la colocación del implante, por lo que gran parte de este hueso se encuentra en una fase más

avanzada en su formación, en forma de matriz ósea ya mineralizada, mientras que existirá también hueso periimplantario en fase de osteoide aún no mineralizado<sup>124,215</sup>. Por tanto, el proceso de osteointegración incluye también, además de la remodelación del hueso ya existente, la formación de hueso nuevo alrededor del implante, y fundamentalmente en la zona interroscas<sup>216,217</sup>. La melatonina contribuiría notablemente a la neoformación ósea alrededor de los implantes al estimular la diferenciación de nuevos preosteoblastos, que llegan desde la médula ósea al lecho alveolar a través de los vasos sanguíneos. Otra acción de la melatonina a nivel preosteoblástico que contribuiría a aumentar la formación de nuevo tejido óseo, es la estimulación de la expresión génica de ciertas proteínas de la matriz ósea<sup>214</sup>. *Roth y cols.* observaron como la melatonina estimulaba, tras un periodo de tiempo de cinco a nueve días, la expresión de los genes de la sialoproteína ósea (BSP), fosfatasa alcalina (ALP) y osteocalcina (OC)<sup>156</sup>.

Todos estos hallazgos estarían en relación con nuestros resultados, que muestran un mayor porcentaje de hueso interroscas y de neoformación ósea en los implantes tratados con melatonina tópica. Una evidencia muy significativa a favor de esta relación, es que los genes de gran parte de las proteínas de la matriz ósea (BSP, ALP, OC, SPARC), contienen la secuencia de bases (RGGTCA) requerida para la unión del receptor nuclear de melatonina (RZR) a su región promotora. No obstante, este incremento en la formación de tejido óseo podría estar mediado también por los receptores de membrana de la indolamina, ya que el tratamiento con luzindol o toxina pertusis es capaz de reducir la expresión de BSP y ALP<sup>156,214</sup>.

Dado que el hueso periimplantario está sometido a un proceso de remodelado tras la colocación del implante, si la melatonina estimulara la formación de tejido óseo por un lado, pero por otro lado éste se reabsorbiera durante dicho proceso, el aumento en los parámetros de osteointegración probablemente no habría sido tan notable en tan corto periodo de tiempo (dos semanas). Este incremento tan rápido en la formación de hueso sugiere que la melatonina estaría actuando simultáneamente a distintos niveles dentro del proceso de remodelado óseo. Para explicar este hecho hemos de considerar las acciones de esta indolamina a nivel de la reabsorción ósea.

Se sabe que los osteoclastos, células multinucleadas encargadas de la reabsorción ósea, poseen superóxido dismutasa y son responsables de la producción de ROS en el microambiente óseo, lo que contribuiría a la degradación de componentes de la matriz ósea bajo el borde en cepillo, ya que moléculas estructurales de la matriz como el colágeno o el ácido hialurónico son susceptibles al daño oxidativo por radicales libres<sup>101,102</sup>. Los osteoclastos expresan además otra enzima, la fosfatasa ácida resistente a tartrato (TRAP), que posee un centro binucleado con un hierro activo que es capaz de reaccionar con el peróxido de hidrógeno mediante la reacción de Fenton para producir radical hidroxilo ( $\text{Fe}^{2+} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{Fe}^{3+} + \text{OH}^- + \text{HO}\cdot$ ). El ión férrico formado en la reacción es capaz de reaccionar también con  $\text{H}_2\text{O}_2$  para formar anión superóxido e ión ferroso ( $\text{Fe}^{3+} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{Fe}^{2+} + 2\text{H}^+ + \text{O}_2^-\cdot$ ). Por tanto, se establece a nivel osteoclástico una secuencia de reacciones que originan  $\text{HO}\cdot$  y  $\text{O}_2^-\cdot$  mediante la continua oxidación y reducción del hierro activo de la TRAP, lo que hace posible la síntesis de elevadas cantidades de ROS en la medida en que se encuentre disponible el  $\text{H}_2\text{O}_2$  en el medio<sup>103</sup>.

La melatonina actuaría a nivel de la laguna osteoclástica, gracias a su capacidad antioxidante y depuradora de especies reactivas, inhibiendo la reabsorción ósea<sup>157,209</sup>. Por tanto, el efecto antioxidante observado en nuestro trabajo en relación al estrés oxidativo postexodoncias, podría tener también su aplicación a nivel óseo en la cavidad oral. Además, tras la colocación de un implante, por cuidadosa que sea la técnica quirúrgica, se produce una zona de necrosis ósea alrededor de éste y existe una reacción inflamatoria como consecuencia directa del acto quirúrgico<sup>124,218</sup>. Los macrófagos y leucocitos procedentes de los vasos periimplantarios aumentarían la producción de radicales libres<sup>218,219</sup>, los cuales pueden estimular la reabsorción ósea por parte de los osteoclastos<sup>220,221</sup>. Las propiedades antioxidante y antiinflamatoria de la melatonina contribuirían a atenuar esta reacción y a frenar la producción de especies reactivas, y por tanto la reabsorción ósea, tras la intervención implantológica.

Esta inhibición en la reabsorción ósea se vería reforzada por otra acción que ejerce la melatonina sobre el proceso de osteoclastogénesis. Según distintos autores, la aplicación de la indolamina en rangos de 5 a 500  $\mu\text{M}$  disminuye de manera dosis-dependiente la expresión de mRNA de RANK y aumenta tanto los niveles de OPG como de mRNA de OPG en líneas celulares preosteoblásticas MC3T3-E<sub>1</sub><sup>158</sup>. Esto implicaría que la melatonina a dosis farmacológicas puede causar una inhibición de la reabsorción ósea y un incremento en la masa ósea por inhibición de la activación osteoclástica mediada por RANK<sup>157</sup>.

En resumen, las acciones de la melatonina sobre el tejido óseo, que avalan y dan coherencia a nuestros resultados, son ejercidas a diferentes niveles:



- A nivel de la formación ósea, estimulando la proliferación y diferenciación osteoblástica, y aumentando la expresión génica de diversas proteínas de la matriz osteoide (sialoproteína ósea, fosfatasa alcalina, osteocalcina).
- A nivel de la reabsorción ósea, contribuyendo a disminuir la degradación de la matriz gracias a su capacidad antioxidante y depuradora de radicales libres, e inhibiendo por otra parte el proceso de osteoclastogénesis.

El interés de estas acciones sobre el tejido óseo a nivel de la cavidad oral radica en la posibilidad de la aplicación de la melatonina en el acto de colocación de implantes dentales endo-óseos, a modo de agente biomimético<sup>222</sup>, de modo que pueda mejorar la predictibilidad de los mismos y las condiciones tisulares iniciales del tejido receptor del implante.

De esta forma, nuestro trabajo se enmarca dentro de las actuales investigaciones y tendencias en el campo de la implantología oral, dirigidas hacia la búsqueda de nuevas moléculas y tratamientos de superficie que influyan sobre el metabolismo óseo, y consigan reducir de esta forma el periodo de osteointegración y carga de los implantes<sup>223,224</sup>. Con ello conseguimos dos objetivos fundamentales: mejorar la calidad de vida de los pacientes por una parte, ya que éstos podrían disfrutar en un menor periodo de tiempo de sus prótesis implantosoportadas o implantoretenidas; y por otra parte, conseguir una mayor predictibilidad en nuestros procedimientos clínicos implantológicos, con un hueso de mejor calidad y más preparado biomecánicamente para soportar al implante

En cualquier caso, las acciones de la melatonina a nivel óseo no sólo serían aplicables en el campo de la implantología oral, sino también en otros procesos odontológicos como la enfermedad periodontal, que sabemos que cursa con una progresiva pérdida ósea en sus fases más avanzadas. Además, estudios recientes han relacionado la enfermedad periodontal con alteraciones en el complejo OPG/RANK/RANKL. Liu *et al.*<sup>225</sup> han demostrado que el ratio RANKL con respecto a OPG está incrementado a favor del primero en pacientes con periodontitis, encontrándose valores de mRNA de RANKL muy elevados en pacientes con enfermedad periodontal avanzada, a la vez que la expresión del mRNA de OPG está muy disminuida con respecto a sujetos sanos. De esta forma, la inhibición en el proceso de osteoclastogénesis ejercida por la melatonina, podría complementar su acción antioxidante a nivel periodontal.

En definitiva, los resultados presentados en este trabajo de investigación sitúan a la melatonina como un potencial agente terapéutico a nivel odontológico debido a las propiedades antioxidante y osteogénica dentro de la cavidad oral, acciones que ya han sido constatadas en el resto del organismo<sup>33,138,209</sup>.

# **CONCLUSIONES**



## CONCLUSIONES

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

1. Existe un aumento del estrés oxidativo en la cavidad oral en el periodo post-operatorio inmediato a las exodoncias de perros *Beagle*, que tiene su reflejo a nivel plasmático, y que es consecuencia fundamentalmente del proceso inflamatorio que sucede a las mismas.
2. La melatonina contrarresta de forma eficaz este incremento del estrés oxidativo después de las exodoncias y refuerza la defensa antioxidante a nivel de la cavidad oral, a través de la estimulación en la actividad de la GRd y de un aumento en los niveles de GSH, así como de la inhibición de la peroxidación lipídica y de la producción de nitritos.
3. La melatonina aumenta significativamente la osteointegración de implantes dentales a las dos semanas de su colocación en los perros *Beagle*, hecho que se manifiesta por un aumento del hueso periimplantario, hueso interrosca y porcentaje de neoformación ósea en relación al grupo control.
4. La aplicación tópica de melatonina debe ser considerada seriamente como un arma terapéutica de utilidad ante posibles complicaciones infecciosas e inflamatorias tras exodoncias, además de actuar a modo de agente biomimético en la colocación de implantes dentales endo-óseos, de forma que reduciría los periodos de osteointegración y carga de los mismos.



# **BIBLIOGRAFÍA**





## BIBLIOGRAFÍA

1. Fridovich I. The biology of oxygen radicals. *Science* 1978; 201:875-80.
2. Halliwell B. The chemistry of free radicals. *Toxicol Ind Health* 1993; 9:1-21.
3. Barja G. Mitochondrial oxygen radical generation and leak: Sites of production in states 4 and 3, organ specificity, and relation to aging and longevity. *J Bioenerg Biomembr* 1999; 31:347-66.
4. Cadenas E. Mitochondrial free radical production and cell signaling. *Mol Aspects Med* 2004; 25:17-26.
5. del Rio LA, Sandalio LM, Palma JM, Bueno P, Corpas FJ. Metabolism of oxygen radicals in peroxisomes and cellular implications. *Free Radic Biol Med* 1992; 13:557-80.
6. Pincemail J, Deby C, Thirion A, Dethier A, Deby-Dupont G, Goutier R. Stimulation of cyclooxygenase by activated human neutrophils is enhanced by uric acid. *Prostaglandins* 1986; 32:101-5.
7. Market M, Andrew PC, Babiar BM. Measurement of superoxide production by human neutrophils. *Methods Enzimol* 1984; 105:358-65.
8. Elsbach P, Weiss J. Oxygen-dependent and oxygen-independent mechanisms of microbicidal activity of neutrophils. *Immunol Lett* 1985; 11:159-63.
9. Root RK, Metcalf JA. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> release from human granulocytes during phagocytosis. Relationship to superoxide anion formation and cellular catabolism of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: studies with normal and cytochalasin B-treated cells. *J Clin Invest* 1977; 60:1266-79.
10. McCord JM. Oxygen-derived free radicals in postischemic tissue injury. *N Engl J Med* 1985; 312:159-63.
11. Halliwell B, Gutteridge JMC. Oxygen free radicals and iron in relation to biology and medicine: some problems and concepts. *Arch Biochem Biophys* 1986; 246:501-14.
12. Fridovich I. Superoxide dismutases: an adaptation to a paramagnetic gas. *J Biol Chem* 1989; 264:7761-4.
13. Reiter RJ, Poeggeler B, Tan DX, Chen LD, Manchester L, Guerrero JM. Antioxidant capacity of melatonin: A novel action not requiring a receptor. *Neuroendocrinol Lett* 1993; 15:103-16.

14. Reiter RJ. Oxidative processes and antioxidative defense mechanisms in the aging brain. *FASEB J* 1995; 9:526-33.
15. McCord JM, Fridovich I. Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyuprein (hemocuprein). *J Biol Chem* 1969; 244:6049-55.
16. Fridovich I. Superoxide dismutases. *Annu Rev Biochem* 1975; 44:147-59.
17. Marklund SL. Extracellular superoxide dismutase in human tissues and human cell lines. *J Clin Invest* 1984; 74:1398-1403.
18. Percy ME. Catalase: an old enzyme with a new role? *Can J Biochem Cell Biol* 1984; 62:1006-14.
19. Mills GC. Hemoglobin catabolism. I. Glutathione peroxidase, an erythrocyte enzyme which protects hemoglobin from oxidative breakdown. *J Biol Chem* 1957; 229:189-97.
20. Mills GC. The purification and properties of glutathione peroxidase of erythrocytes. *J Biol Chem* 1959; 234:502-6.
21. Hopkins FG, Elliot KA. The relation of the glutathione to cell respiration with special reference to hepatic tissue. *Proc Roy Soc B* 1931; 109:58-63.
22. Viña J. *Glutathione: Metabolism and Physiological Functions*. Boston (ISBN: 0-8493-3274-5): CRC Pres; 1990.
23. Sies H. Biochemistry of oxidative stress. *Angewandte Chem* 1986; 25:1058-71.
24. Ochoa S. Regulation of protein synthesis initiation in eukaryotes. *Arch Biochem Biophys* 1983; 223:325-49.
25. Dickens F, Glock GE. Direct oxidation of glucose-6-phosphate, 6-phosphogluconate and pentose-5-phosphate by enzymes of animal origin. *Biochem J* 1951; 50:81-95.
26. Marks PA, Szeinberg A, Banks J. Erythrocyte glucose 6-phosphate dehydrogenase of normal and mutant human subjects: properties of the purified enzymes. *J Biol Chem* 1961; 236:10-7.
27. Van der Zee J, Kroatjes BBH, Chignell CF, Dubbelman TAMR, Van Steverinck. Hydroxyl radical generation by a light-dependent Fenton reaction. *Free Radic Biol Med* 1993; 14:105-13.
28. Halliwell B, Gutteridge JMC. Iron and free radical reactions: two aspects of antioxidant protection. *Trends Biochem Sci* 1986; 11:372-5.

29. Marklund SL. Ceruloplasmin, extracellular-superoxide dismutase, and scavenging of superoxide anion radicals. *J Free Radic Biol Med* 1986; 2:255-60.
30. Halliwell B. Ascorbic acid, iron overload, and desferrioxamine. *Br Med J (Clin Res Ed)* 1982; 285(6337):296.
31. Liu H, Kehrer JP. The reduction of glutathione disulfide produced by t-butyl hydroperoxide in respiring mitochondria. *Free Radic Biol Med* 1996; 20:433-42.
32. Miccadei S, Kyle ME, Gilfor D, Farber JL. Toxic consequence of the abrupt depletion of glutathione in cultured rat hepatocytes. *Arch Biochem Biophys* 1988; 265:311-20.
33. Reiter RJ. Oxidative damage in the central nervous system: protection by melatonin. *Prog Neurobiol* 1998; 56:359-84.
34. Reiter RJ. Antioxidant actions of melatonin. *Adv Pharmacol* 1997; 38:103-17.
35. Reiter RJ, Tan DX, Mayo JC, Sainz RM, Leon J, Czarnocki Z. Melatonin as an antioxidant: biochemical mechanisms and pathophysiological implications in humans. *Acta Biochim Pol* 2003; 50(4):1129-46.
36. Cutando A, Gómez-Moreno G, Villalba J, Ferrera MJ, Escames G, Acuña-Castroviejo D. Relationship between salivary melatonin levels and periodontal status in diabetic patients. *J Pineal Res* 2003; 35:239-44.
37. Cutando A, Gómez-Moreno G, Arana C, Bolaños J, Acuña-Castroviejo D. Melatonin in plasma and saliva and lymphocyte subpopulations in periodontal patients. *Special Care in Dentistry* 2004; 24:169.
38. Slater TF. Free radical mechanism in tissue injury. *Biochem J* 1984; 222:1-15.
39. Halliwell B. Antioxidants in human health and disease. *Annu Rev Nutr* 1996; 16:33-50.
40. Gerschman R. Oxygen poisoning and X-Irradiation. A mechanism in common. *Science* 1954; 119:623-6.
41. Davies KJA. Protein damage and degradation by oxygen radicals. General aspects. *J Biol Chem* 1987; 262:9895-9901.
42. Stadtman ER. Protein oxidation and aging. *Science* 1992; 257:1220-4.
43. Breen AP, Murphy JA. Reactions of oxyl radicals with DNA. *Free Radic Biol Med* 1995; 18:1033-77.
44. Halliwell B, Auroma OI. DNA damage by oxygen derived species. Its mechanism of action and measurement in mammalian systems. *FEBS Lett* 1991; 281:9-19.

45. Albertini R, Rindi S, Passi A, Bardoni A, Salvini R, Pallavicini G et al. The effect of cornea proteoglycans on liposome peroxidation. *Arch Biochem Biophys* 1996; 327(2):209-14.
46. Borel JP, Monboise JC, Bellon G. Inflammation, collagene et radicaux libres oxygénés. *Med Sci* 1988; 5:304-11.
47. Greenwald RA, Moy WW. Effect of oxygen derived free radicals on hyaluronic acid. *Arthritis Rheum* 1980; 23:455-63.
48. McCord JM, Keele BB Jr, Fridovich I. An enzyme-based theory of obligate anaerobiosis: the physiological function of superoxide dismutase. *Proc Natl Acad Sci USA* 1971; 68(5):1024-7.
49. Cheeseman KH, Slater TF. An introduction to free radical biochemistry. *Br Med Bull* 1993; 49:588-603.
50. Halliwell B. Reactive oxygen species in living systems: Source, biochemistry and role in human disease. *Am J Med* 1991; 91:14-22.
51. Halliwell B, Gutteridge JMC. Lipid peroxidation, oxygen radicals, cell damage, and antioxidant therapy. *Lancet* 1984; 1:1396-7.
52. Sandstrom PA, Tebbey PW, Van Cleave S, Buttke TM. Lipid hydroperoxides induce apoptosis in T cells displaying a HIV-associated glutathione peroxidase deficiency. *J Biol Chem* 1994; 269:798-801.
53. Salvemini D, Wang ZQ, Bourdon DM, Stern MK, Currie MG, Manning PT. Evidence of peroxynitrite involvement in the carrageenan-induced rat paw edema. *Eur J Pharmacol* 1996; 303(3):217-20.
54. Doring G, Worlitzsch D. Reactive oxygen species and arachidonic acid metabolites of polymorphonuclear leukocytes. *Immun Infekt* 1995; 23:148-57.
55. Samuelsson B. Arachidonic acid metabolism: role in inflammation. *Z Rheumatol* 1991; 50:3-6.
56. Suzuki YJ, Forman HJ, Sevanian A. Oxidants as stimulators of signal transduction. *Free Radic Biol Med* 1997; 22:269-85.
57. Patrignani P. Oxidized lipids. *Ital Heart J* 2001; 2:873-7.
58. Sagone AL Jr, Wells RM, DeMocko C. Evidence that OH• production by human PMNs is related to prostaglandin metabolism. *Inflammation* 1980; 4:65-71.

59. Cuzzocrea S, Reiter RJ. Pharmacological Actions of Melatonin in Acute and Chronic Inflammation. *Curr Topics Med Chem* 2002; 2:153-65.
60. Conner EM, Grisham MB. Inflammation, Free Radicals, and Antioxidants. *Nutrition* 1996; 12:274-7.
61. Collins T, Read MA, Neish AS, Whitley MZ, Thanos D, Maniatis T. Transcriptional regulation of endothelial cell adhesion molecules: NF-kB and cytokine-inducible enhancers. *FASEB J* 1995; 9(10):899-909.
62. Baines M, Shenkin A. Use of antioxidants in surgery: a measure to reduce postoperative complications. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2002; 5:665-70.
63. Kreinhoff U, Elmadfa I, Salomon F, Weidler B. Antioxidant status after surgical stress. *Infusionstherapie* 1990; 17:261-7.
64. Thomas S, Balasubramanian KA. Role of Intestine in postsurgical complications: involvement of free radicals. *Free Radic Biol Med* 2004; 36:745-56.
65. Rubin BB, Smith A, Liauw S, Isenham D, Romaschin AD, Walker PM. Complement activation and white cell sequestration in post-ischaemic skeletal muscle. *Am J Physiol* 1990; 259:525-31.
66. Welsh L, Casanueva E, Zúñiga A, Meza C, Tejero E. Efecto de la cirugía (cesárea) sobre el estado de nutrición en vitamina C y cinc en gestantes sanas. *Perinatol Reprod Hum* 2004; 18:172-8.
67. Abidova SS, Ishankulova GF. Effect of the joint administration of ketamine and propofol on the lipid metabolism and peroxidation in rats. *Eksp Klin Farmakol* 2004; 67:45-7.
68. Awad JA, Horn JL, Roberts II LJ, Franks JJ. Demonstration of Halothane-induced Hepatic Lipid Peroxidation in Rats by Quantification of Flourine sub2 -Isoprostanes. *Anesthesiology* 1996; 84:910-6.
69. Pérez O, Castro P, Díaz-Araya G, Nettle D, Moraga F, Chiong M et al. Persistencia del estrés oxidativo postrasplante cardíaco: estudio comparativo entre pacientes con trasplante cardíaco y con insuficiencia cardíaca crónica estable. *Rev Esp Cardiol* 2002; 55:831-7.
70. Christen S, Finckh B, Lykkesfeldt J, Gessler P, Frese-Schaper M, Nielsen P et al. Oxidative stress precedes peak systemic inflammatory response in pediatric patients undergoing cardiopulmonary bypass operation. *Free Radic Biol Med* 2005; 38:1323-32.

71. Sloventantor VIu, Poluektova MV, Khmelevskii IaM, Poverennyi AM. Changes in plasma levels of lipid peroxidation products and myoglobin in patients with malignant tumors in the early postoperative period. *Vestn Ross Akad Med Nauk* 1996; 12:32-4.
72. Aghabeigi B, Cintra N, Meghji S, Reher P, Evans AV, Hopper C. Measurement of nitric oxide in temporomandibular joint saline aspirates. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2003; 32:401-3.
73. Minczykowski A, Woszczyk M, Szczepanik A, Lewandowski L, Wysocki H. Hydrogen peroxide and superoxide anion production by polymorphonuclear neutrophils in patients with chronic periapical granuloma, before and after surgical treatment. *Clin Oral Invest* 2001; 5:6-10.
74. Brennan PA, Thomas GJ, Langdon JD. The role of nitric oxide in oral diseases 68. *Arch Oral Biol* 2003; 48:93-100.
75. Ohashi M, Iwase M, Nagumo M. Elevated production of salivary nitric oxide in oral mucosal diseases 44. *J Oral Pathol Med* 1999; 28(8):355-9.
76. Battino M, Bullón P, Wilson M, Newman H. Oxidative injury and inflammatory periodontal diseases: the challenge of anti-oxidants to free radicals and reactive oxygen species. *Crit Rev Oral Biol Med* 1999; 10:458-76.
77. Shapira L BRSMSA. Superoxide formation and chemiluminescence of peripheral polymorphonuclear leukocytes in rapidly progressive periodontitis patients. *J Clin Periodontol* 1991; 18:44-8.
78. Yonemura T. Phagocytosis, intracellular killing and interleukin 1 production of polymorphonuclear leukocytes in human periodontal diseases. *Nippon Shishubyo Gakkai Kaishi* 1989; 31:403-23.
79. Altman LC, Baker C, Fleckman P, Luchtel D, Oda D. Neutrophil-mediated damage to human gingival epithelial cells. *J Periodontal Res* 1992; 27:70-9.
80. Voskresenskii ON TE. The role of lipid peroxidation in the pathogenesis of periodontitis. *Stomatologii Mosk* 1991; 4:5-10.
81. Lohinai Z, Stachlewitz R, Virág L, Székely AD, Haskó G, Szabó C. Evidence for Reactive Nitrogen Species Formation in the Gingivomucosal Tissue. *J Dent Res* 2001; 80(2):470-5.
82. Slomiany BL, Slomiany A. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs impair oral mucosal repair by eliciting disturbances in endothelin-converting enzyme-1 and constitutive nitric oxide synthase. *J Physiol Pharmacol* 2001; 52:81-92.

83. Van Dyke TE, Levine MJ, Genco RJ. Neutrophil function and oral disease. *J Oral Pathol* 1985; 14:95-120.
84. Babich H, Zuckerbraun HL, Hirsch ST, Blau L. In vitro cytotoxicity of the nitric oxide donor, S-nitroso-N-acetyl-penicillamine, towards cells from human oral tissue. 1999; 84:218-25.
85. Lohinai Z, Benedek P, Rosivall L, Fehér E, Gyorfí A, Fazekas A et al. Protective effects of mercaptoethylguanidine, a selective inhibitor of inducible nitric oxide synthase in ligature-induced periodontitis in the rat. *Br J Pharmacol* 1998; 123:353-60.
86. Lewkowicz N, Lewkowicz P, Kurnatowska A, Banasik M, Glowacka E, Cedzynski M et al. Innate immune system is implicated in recurrent aphthous ulcer pathogenesis. *J Oral Pathol Med* 2003; 32:475-81.
87. Kimura H, Simodate H, Suzuki M. Free radicals and SOD activity of jaw cyst. Direct measurement and spin trapping studies by ESR. *Free Radic Res Commun* 1990; 9:279-85.
88. Zardeneta G, Milam SB, Schmitz JP. Iron-dependent generation of free radicals: plausible mechanisms in the progressive deterioration of the temporomandibular joint. *J Oral Maxillofac Surg* 2000; 58:302-8.
89. Yamaza T, Masuda KF, Atsuta I, Nishijima K, Kido MA, Tanaka T. Oxidative stress-induced DNA damage in the synovial cells of the temporomandibular joint in the rat. *J Dent Res* 2004; 83:619-24.
90. Beevi SS, Rasheed AM, Geetha A. Evaluation of oxidative stress and nitric oxide levels in patients with oral cavity cancer. *Jpn J Clin Oncol* 2004; 34:379-85.
91. Arnett, TR. Estructura y remodelado del hueso. En: J. A. Riancho Moral and J. Gonzales Macías, editors. *Manual Práctico de Osteoporosis y Enfermedades del Metabolismo Mineral*. Madrid: Jarpyo Editores; 2004. p. 1-6.
92. Gehron Robey P. Bone matrix proteoglycans and glycoproteins. In: Bilezikian JP, Raisz LG and Rodan GA, editors. *Principles of bone biology*. 2<sup>o</sup> edition. Volume 1. San Diego, California: Academic Press; 2002. p. 225-238.
93. Prieto S. Fisiología del hueso. En: Tresguerres JAF, editor. *Fisiología Humana*. 3<sup>a</sup> edición. Madrid: McGraw-Hill; 2005. p. 981-994.
94. Otto F, Thornell AP, Crompton T, Denzel A, Gilmour KC, Rosewell IR et al. *Cbfa1*, a candidate gene for cleidocranial dysplasia syndrome, is essential for osteoblast differentiation and bone development. *Cell* 1997; 89:765-71.

95. Yamaguchi A, Komori T, Suda T. Regulation of osteoblast differentiation mediated by bone morphogenetic proteins, hedgehogs, and Cbfa1. *Endocr Rev* 2000; 21(4):393-411.
96. McCarthy TL, Ji C, Centrella M. Links among growth factors, hormones, and nuclear factors with essential roles in bone formation. *Crit Rev Oral Biol Med* 2000; 11(4):409-22.
97. Lean JM, Mackay AG, Chow JW, Chambers TJ. Osteocytic expression of mRNA for c-fos and IGF-I: an immediate early gene response to an osteogenic stimulus. *Am J Physiol* 1996; 270(6):937-45.
98. Takahashi N, Udagawa N, Takami M, Suda T. Cells of bone: osteoclast generation. In: Bilezikian JP, Raisz LG and Rodan GA, editors. *Principles of bone biology*. 2<sup>o</sup> edition. Volume 1. San Diego, California: Academic Press; 2002. p. 109-126.
99. Väänänen K, Zhao H. Osteoclast function: biology and mechanisms. In: Bilezikian JP, Raisz LG and Rodan GA, editors. *Principles of bone biology*. 2<sup>o</sup> edition. Volume 1. San Diego, California: Academic Press; 2002. p. 127-140.
100. Teitelbaum SL. Bone resorption by osteoclasts. *Science* 2000; 289(5484):1504-8.
101. Ross Garret I, Boyce BF, Oreffo RO, Bonewald L, Poser J, Mundy GR. Oxygen-derived free radicals stimulate osteoclastic bone resorption in rodent bone in vitro and in vivo. *J Clin Invest* 1990; 85:632-9.
102. Fallon M, Silvertown S, Smith P, Moskal T, Constantinescu C, Feldman R et al. The oxidative metabolism of isolated osteoclasts is regulated by calcitropic agents. *J Bone Miner Res* 1986; Abstr.1(Suppl.1).
103. Halleen JM, Raisanen S, Salo JJ, Reddy SV, Roodman GD, Hentunen TA et al. Intracellular fragmentation of bone resorption products by reactive oxygen species generated by osteoclastic tartrate-resistant acid phosphatase. *J Biol Chem* 1999; 274(33):22907-10.
104. Riancho JA, Gutiérrez GE. Factores Reguladores de la Resorción Ósea. *Rev Metab Oseo Min* 2003; 1(2):51-66.
105. Fernández-Tresguerres Hernández-Gil I, Alobera García MA, Del Canto Pingarrón M, Blanco Jerez L. Bases fisiológicas de la regeneración ósea II. El proceso de remodelado. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 2006; 11:151-7.
106. Canalis E, McCarthy TL, Centrella M. The role of growth factors in skeletal remodelling. *Endocrinol Metab Clin North Am* 1989; 18:903-18.



107. Prieto S. Control del metabolismo del calcio, fósforo y magnesio. En: Tresguerres JAF, editor. *Fisiología Humana*. 2ª edición. Madrid: McGraw-Hill-Interamericana; 1999. p. 979-993.
108. Raisz LG. Bone cell biology: New approaches and unanswered questions. *J Bone Miner Res* 1993; 8:457-65.
109. Hofbauer LC, Khosla S, Dunstan CR, Lacey DL, Spelsberg TC, Riggs BL. Estrogen stimulates gene expression and protein production of osteoprotegerin in human osteoblastic cells. *Endocrinology* 1999; 140:4367-70.
110. Manolagas SC. Birth and death of bone cells: Basic regulatory mechanisms and implications for the pathogenesis and treatment of osteoporosis. *Endocr Rev* 2000; 21:115-37.
111. Lukert BP, Kream BE. Clinical and basic aspects of glucocorticoid action in bone. En: Bilezikian JP, Raisz LG, Rodan GA, eds. *Principles of Bone Biology*. San Diego, California: Academic Press; 1996.p.533-48.
112. Tresguerres IF, Clemente C, Donado M, Gómez-Pellico L, Blanco L, Alobera MA et al. Local administration of growth hormone enhances periimplant bone reaction in an osteoporotic rabbit model. *Clin Oral Implants Res* 2002; 13(6):631-6.
113. Cohick WS, Clemmons DR. The insulin-like growth factors. *Ann Rev Physiol* 1993; 55:131-53.
114. Hill PA, Reynolds JJ, Meikle MC. Osteoblasts mediate insulin-like growth factor-I and -II stimulation of osteoclasts formation and function. *Endocrinology* 1995; 136:124-31.
115. Mohan S, Baylink DJ. Bone growth factors. *Clin Orthop* 1991; 263:30-48.
116. Horowitz MC and Lorenzo JA. Local regulators of bone: IL-1, TNF, lymphotoxin, Interferon- $\gamma$ , IL-8, IL-10, IL-4, the LIF/IL-6 family, and additional cytokines. In: Bilezikian JP, Raisz LG and Rodan GA, editors. *Principles of bone biology*. 2º edition. Volume 2. San Diego, California: Academic Press; 2002. p. 961-978.
117. Roodman GD, Kurihara N, Ohsaki Y, Kukita A, Hosking D, Demulder A. Interleukin-6: A potential autocrine/paracrine agent in Paget's disease of bone. *J Clin Invest* 1992; 89:46-52.
118. Kawaguchi H, Pilbean CC, Harrison JR, Raisz LG. The role of prostaglandins in the regulation of bone metabolism. *Clin Orthop* 1995; 313:36-46.
119. Offenbacher S, Heasman PA, Collins JG. Modulation of host PGE2 secretion as a determinant of periodontal disease expression. *J Periodontol* 1993; 64:432-44.

120. Canalis E, Economides AN, Gaggero E. Bone morphogenetic proteins, their antagonists, and the skeleton. *Endocr Rev* 2003; 24:218-35.
121. Hofbauer LC, Heufelder AE. Role of receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand and osteoprotegerin in bone cell biology. *J Mol Med* 2001; 79:243-53.
122. Branemark PI, Zarb GA, Albrektsson T. Prótesis Tejido-Integrada. La oseointegración en la Odontología Clínica. Barcelona: Quintessence; 1999. p.11-13.
123. Schoeder A, Van der Zipen E, Stich H, Sutter F. The reaction of bone, connective tissue and epithelium to endosteal implants with sprayed titanium surfaces. *J Maxillofac Surg* 1981; 9:15-25.
124. Peñarrocha Diago M, Oltra Moscardó MJ, Sanchís Bielsa JM. Conceptos generales de implantología. En: Peñarrocha Diago M, editor. *Implantología oral*. Barcelona: Ars Médica; 2005. p. 3-17.
125. Steflik DE, Parr GR, Sisk AL, Lake FT, Hanes PJ, Berkery DJ. Osteoblast activity at the dental implant-bone interface: transmission electron microscopic and high voltage electron microscopic observations. *J Periodontol* 1994; 65:404-13.
126. McCord CP, Allen FB. Evidences associating pineal gland function with alterations in pigmentation. *J Exp Zool* 1917; 23:207-24.
127. Lerner AB, Case JD, Takahashi Y, Lee TH, Mori W. Isolation of melatonin, the pineal gland factor that lightens melanocytes. *J Am Chem Soc* 1958; 80:2587.
128. Simonneaux V, Ribelayga C. Generation of the Melatonin Endocrine Message in mammals: a review of the complex regulation of melatonin synthesis by norepinephrine, peptides, and other pineal transmitters. *Pharmacol Rev* 2003; 55:325-95.
129. Vanecek J. Melatonin binding sites. *J Neurochem* 1988; 51:1436-40.
130. Cajochen C, Kräuchi K, Wirz-Justice A. Role of Melatonin in the regulation of Human Circadian Rhythms and Sleep. *J Neuroendocrinol* 2003; 15:432-7.
131. Acuña-Castroviejo D, Pablos MI, Menéndez-Peláez A, Reiter RJ. Melatonin receptors in purified cell nuclei of liver. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol* 1993; 82:253-6.
132. Hirose T, Smith RJ, Jetten AM. The third member of RZR/ROR orphan receptor subfamily that is highly expressed in skeletal muscle. *Biochem Biophys Res Commun* 1994; 205:1976-83.

133. Carlberg C, Hooft van Huijsduijnen R, Staple J, DeLamater JF, Becker-André M. RZR<sub>s</sub>, a novel class of retinoid related orphan receptors that function as both monomers and homodimers. *Mol Endocrinol* 1994; 8:757-70.
134. Anton-Tay F, Ramirez G, Martinez I, Benitez-King G. In vitro stimulation of protein kinase C by melatonin. *Neurochem Res* 1998; 23:601-6.
135. Huerto-Delgadillo L, Antón-Tay F, Benitez-King G. Effects of melatonin on microtubule assembly depend on hormone concentration: Role of melatonin as a calmodulin antagonist. *J Pineal Res* 1994; 17:55-62.
136. Macías M, Escames G, Leon J, Coto A, Sbihi Y, Osuna A et al. Calreticulin-melatonin. An unexpected relationship. *Eur J Biochem* 2003; 270(5):832-40.
137. Reiter RJ. Pineal melatonin: cell biology of its synthesis and of its physiological interactions. *Endocrine Rev* 1991; 12:151-80.
138. Acuña-Castroviejo D, Escames G, Macías M, Muñoz-Hoyos A, Molina-Carvalho A, Arauzo M et al. Cell protective role of melatonin in the brain. *J Pineal Res* 1995; 19:57-63.
139. Tan DX, Manchester LC, Reiter RJ, Qi WB, Zhang M, Weintraub ST et al. Identification of highly elevated levels of melatonin in bone marrow: Its origin and significance. *Biochim Biophys Acta* 1999; 1472:206-14.
140. Acuña-Castroviejo D, Escames G, Carazo A, Leon J, Khaldy H, Reiter RJ. Melatonin, mitochondrial homeostasis and mitochondrial-related diseases. *Curr Topics Med Chem* 2002; 2(2):133-51.
141. Ianas O, Olnescu R, Badescu I. Melatonin involvement in oxidative stress. *Rom J Endocrinol* 1991; 29:147-53.
142. Tan DX, Chen LD, Poeggeler B, Manchester LC, Reiter RJ. Melatonin: A potent, endogenous hydroxyl radical scavenger. *Endocr J* 1993; 1:57-60.
143. Pieri C, Marra M, Moroni F, Recchioni R, Marcheselli F. Melatonin: A peroxy radical scavenger more potent than vitamin E. *Life Sci* 1994; 55:271-6.
144. Barlow-Walden LR, Reiter RJ, Abe M, Pablos MI, Menéndez-Peláez A, Chen LD et al. Melatonin stimulates brain glutathione peroxidase activity. *Neurochem Int* 1995; 26:497-502.
145. Reiter RJ, Tan DX, Manchester LC, Lopez-Burillo S, Sainz RM, Mayo JC. Melatonin: detoxification of oxygen and nitrogen-based toxic reactants. *Adv Exp Med Biol* 2003; 527:539-48.

146. Costa EJX, Lopes RH, Lamy-Freund MT. Permeability of pure lipid bilayers to melatonin. *J Pineal Res* 1995; 19:123-6.
147. Tan DX, Reiter RJ, Manchester CL, Yan M, El-Sawi M, Sainz RM et al. Chemical and Physical Properties and Potential Mechanisms: Melatonin as a broad spectrum antioxidant and free radical scavenger. *Curr Topics Med Chem* 2002; 2:181-97.
148. Poeggeler B, Saarela S, Reiter RJ, Tan DX, Chen LD, Manchester LC et al. Melatonin a highly potent endogenous radical scavenger and electron donor: New aspects of the oxidation chemistry of this indole assessed *in vitro*. *Ann N Y Acad Sci* 1994; 738:419-20.
149. Pablos MI, Agapito MT, Gutierrez I, Recio JM, Reiter RJ, Barlow-Walden LR et al. Melatonin stimulates the activity of the detoxifying enzyme glutathione peroxidase in several tissues of chicks. *J Pineal Res* 1995; 19:111-5.
150. Antolín A, Rodríguez C, Sáinz RM, Mayo JC, Uria H, Kotler ML et al. Neurohormone melatonin prevents cell damage: Effect on gene expression of antioxidative enzymes. *FASEB J* 1996; 10:882-90.
151. Guerrero JM, Reiter RJ. Melatonin - Immune System Relationships. *Curr Topics Med Chem* 2002; 2:167-79.
152. García-Maurino S, González-Haba MG, Calvo JR, Goberna R, Guerrero JM. Involvement of nuclear bindings sites for melatonin in the regulation of IL-2 and IL-6 production by human blood mononuclear cells. *J Neuroimmunol* 1998; 92:76-84.
153. Lissoni P, Rovelli F, Brivio F, Brivio O, Fumagalli L. Circadian secretions of IL-2, IL-12, IL-6 and IL-10 in relation to the light/dark rhythm of the pineal hormone melatonin in healthy humans. *Nat Immun* 1998; 16:1-5.
154. García-Maurino S, González-Haba MG, Calvo JR, Rafii El Idrissi M, Sánchez-Margalet V, Goberna R et al. Melatonin enhances IL-2, IL-6, and IFN-gamma production by human circulating CD4+ cells: a possible nuclear receptor-mediated mechanism involving T helper type 1 lymphocytes and monocytes. *J Immunol* 1997; 159:574-81.
155. Nakade O, Koyama H, Arijji H, Yajima A, Kaku T. Melatonin stimulates proliferation and type I collagen synthesis in human bone cells in vitro. *J Pineal Res* 1999; 27:106-10.
156. Roth JA, Kim BG, Lin WL, Cho MI. Melatonin promotes osteoblast differentiation and bone formation. *J Biol Chem* 1999; 274:22041-7.
157. Cardinali DP, Ladizesky MG, Boggio V, Cutrera RA, Mautalen C. Melatonin effects on bone: experimental facts and clinical perspectives. *J Pineal Res* 2003; 34:81-7.

158. Koyama H, Nakade O, Takada Y, Kaku T, Lau KH. Melatonin at pharmacologic doses increases bone mass by suppressing resorption through down-regulation of the RANKL-mediated osteoclast formation and activation. *J Bone Miner Res* 2002; 17:1219-29.
159. McIntyre IM, Norman TR, Burrows GD, Armstrong SM. Melatonin rhythm in human plasma and saliva. *J Pineal Res* 1987; 4:177-83.
160. Vakkuri O. Diurnal rhythm of melatonin in human saliva. *Acta Physiol Scand* 2004; 124:409-12.
161. Cutando A, Gómez-Moreno G, Villalba J, Ferrera MJ, Escames G, Acuña-Castroviejo D. Relationship between salivary melatonin levels and periodontal status in diabetic patients. *J Pineal Res* 2003; 35:239-44.
162. Cutando A, Gómez-Moreno G, Galindo P, Arana C, Bolaños MJ, Acuña-Castroviejo D et al. Relationship between salivary melatonin and severity of periodontal disease. *J Periodontol* 2006; 77(9):1533-8.
163. Institute of Laboratory Animal Resources, Commission on Life Sciences. Guide for the care and use of laboratory animals. Washington DC: National Academy Press; 1996.
164. Real Decreto 223/1988, de 14 de marzo, sobre proteccion de los animales utilizados para la experimentacion y otros fines científicos. (Nº 7026, B.O.E. nº 67, 18 de marzo de 1988, pag. 8509-8511).
165. Herrero Climent M, Herrero Climent F. Atlas de procedimientos clínicos en implantología oral. Madrid: TRP Ediciones; 1995.
166. Donath K. Preparation of histologic sections by the cutting-grinding technique for hard tissue and other material not suitable to be sectioned by routine methods. Equipment and methodical performance. Norderstedt: Exakt-Kulzer-Publication; 1995.
167. Jaskot RH, Charlet EG, Grose EC, Grady MA, Roycroft JH. An automatic analysis of glutathione peroxidase, glutathione-S-transferase, and reductase activity in animal tissue. *J Anal Toxicol* 1983; 7:86-8.
168. Hissin PJ, Russel H. A fluorometric method for determination of oxidized and reduced glutathione in tissues. *Anal Biochem* 1976; 74:214-26.
169. Cohn VH, Lyle J. A fluorometric assay for glutathione. *Anal Biochem* 1966; 14:434-40.
170. Esterbauer H, Cheeseman KH. Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malonaldehyde and 4-hydroxynonenal. *Methods Enzimol* 1990; 186:407-21.

171. Green LC, Ruiz de Luzuriaga K, Wagner DA. Nitrate biosynthesis in man. *Proc Natl Acad Sci USA* 1981; 78(12):7764-8.
172. Verdon CP, Burton CA, Prior RL. Sample pretreatment with nitrate reductase and glucose-6-phosphate dehydrogenase quantitatively reduces nitrate while avoiding interference by NADP<sup>+</sup> when the Griess reaction is used to assay for nitrite. *Anal Biochem* 1995; 224(2):502-8.
173. Baron R, Vignery A, Neff L, Silverglate A, Santa María A. Processing of undecalcified bone specimens for bone histomorphometry. In: Becker RR, editor. *Bone histomorphometry: techniques and interpretation*. Boca Raton, FL: CRC Press; 1993. p.13-37.
174. Eriksen EF, Axelrod DW, Melsen F (eds.). *Bone histomorphometry*. New York: Raven Press; 1994.
175. Nkenke E, Lehner B, Weinzierl K, Thams U, Neugebauer J, Steveling H et al. Bone contact, growth, and density around immediately loaded implants in the mandible of mini pigs. *Clin Oral Impl Res* 2003; 14(3):312-21.
176. Abrescia P, Golino P. Free radicals and antioxidants in cardiovascular diseases. *Expert Rev Cardiovasc Ther* 2005; 3:159-71.
177. Vincent AM, Russell JW, Low P, Feldman EL. Oxidative stress in the pathogenesis of diabetic neuropathy. *Endocr Rev* 2004; 25:612-28.
178. Valko M, Izakovic M, Mazur M, Rhodes CJ, Telser J. Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence. *Mol Cell Biochem* 2004; 266:37-56.
179. Beal MF. Mitochondrial dysfunction and oxidative damage in Alzheimer's and Parkinson's diseases and coenzyme Q10 as a potential treatment. *J Bioenerg Biomembr* 2004; 36:381-6.
180. Gibson GE, Huang HM. Oxidative stress in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 2005; 26:575-8.
181. Calandriello M, Capuzzi P, Martani F, Stefanini F. Experimental research in the use of vitamin E (alpha-tocopherol) in the healing process of post-extraction wounds in rats. *Riv Ital Stomatol* 1967; 22:743-71.
182. Halberstein RA, Abrahamsohn GM. Clinical management and control of alveolalgia ("dry socket") with vitamin C. *Am J Dent* 2003; 16:152-4.
183. Rómulo L. Cabrini. Cicatrización. En: *Anatomía Patológica Bucal*. 1ª ed. Buenos Aires: MUNDI S.A.I.C. y F.; 1980.

184. Radi R, Cassina A, Hodara R, Quijano C, Castro L. Peroxynitrite reactions and formation in mitochondria. *Free Radic Biol Med* 2002; 33(11):1451-64.
185. Parola M, Bellomo G, Robino G, Barrera G, Dianzani MU. 4-Hydroxynonenal as a biological signal: Molecular basis and pathophysiological implications. *Antioxid Redox Signal* 1999; 1:255-84.
186. Escames G, Leon J, Macías M, Khaldy H, Acuña-Castroviejo D. Melatonin counteracts lipopolysaccharide-induced expression and activity of mitochondrial nitric oxide synthase in rats. *FASEB J* 2003; 17(8):932-4.
187. Escames G, López LC, Tapias V, Utrilla P, Reiter RJ, Hitos AB et al. Melatonin counteracts inducible mitochondrial nitric oxide synthase-dependent mitochondrial dysfunction in skeletal muscle of septic mice. *J Pineal Res* 2006; 40:71-8.
188. Jones DP, Carlson JL, Mody VC, Cai J, Lynn MJ, Sternberg P. Redox state of glutathione in human plasma. *Free Radic Biol Med* 2000; 28(4):625-35.
189. Pompella A, Visvikis A, Paolicchi A, De Tava V, Casini AF. The changing faces of glutathione, a cellular protagonist. *Biochem Pharmacol* 2003; 66(8):1499-1503.
190. De Leve L, Kaplowitz N. Glutathione metabolism and its role in hepatotoxicity. *Pharmacol Ther* 1991; 52:287-305.
191. Bowie AG, Moynagh PN, O'Neill LA. Lipid peroxidation is involved in the activation of NF- $\kappa$ B by tumour necrosis factor but not interleukin-1 in the human endothelial cell line ECV304. *J Biol Chem* 1997; 272:25941-50.
192. Rahman I. Regulation of Nuclear Factor- $\kappa$ B, Activator Protein-1, and Glutathione Levels by Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  and Dexamethasone in Alveolar Epithelial Cells. *Biochem Pharmacol* 2000; 60:1041-9.
193. Reiter RJ, Tan DX, Kim SJ, Qi W. Melatonin as a pharmacological agent against damage to lipids and DNA. *West Pharmacol Soc* 1998; 41:229-36.
194. Yamamoto HA, Tang HW. Preventive effect of melatonin against cyanide-induced seizures and lipid peroxidation in mice. *Neurosci Lett* 1996; 207(2):89-92.
195. Taysi S, Ucuncu H, Elmastas M, Aktan B, Buyukokuroglu ME. Effect of melatonin on lipid peroxidation, glutathione and glutathione-dependent enzyme activities in experimental otitis media with effusion in guinea pigs. *J Pineal Res* 2005; 39:283-6.
196. Gitto E, Tan DX, Reiter RJ, Karbownik M, Manchester LC, Cuzzocrea S et al. Individual and synergistic actions of melatonin: Studies with vitamin E, vitamin C, glutathione and desferoxamine in liver homogenates. *J Pharm Pharmacol* 2001; 53:1393-1401.

197. Martin M, Macías M, Escames G, León J, Acuña-Castroviejo D. Melatonin but not vitamins C and E maintains glutathione homeostasis in t-butyl hydroperoxide-induced mitochondrial oxidative stress. *FASEB J* 2000; 14(12):1677-9.
198. Reiter RJ, Tan DX, Burkhardt S. Reactive oxygen and nitrogen species and cellular and organismal decline: amelioration with melatonin. *Mechanisms of Ageing and Development* 2002; 123:1007-19.
199. Livrea, M.A., Tesoriere, L., Tan, D.X., and Reiter, R.J. Radical and reactive intermediate scavenging properties of melatonin in pure chemical systems: In: *Advances in Pharmacology*, Cadenas, E., and Packer, L., Eds., Marcell Dekker, New York, pp 615-631, 2002.
200. Blanchard B, Pompon D, Ducrocq C. Nitrosation of melatonin by nitric oxide and peroxynitrite. *J Pineal Res* 2000; 29:184-92.
201. Gilad E, Wong HR, Zingarelli B, Virag L, O'Connor M, Salzman AL et al. Melatonin inhibits expression of the inducible isoform of nitric oxide synthase in murine macrophages: role of inhibition of NFkappaB activation. *FASEB J* 1998; 12(9):685-93.
202. Gilad E, Cuzzocrea S, Zingarelli B, Salzman AL, Szabo C. Melatonin as a scavenger of peroxynitrite. *Life Sci* 1997; 60:169-74.
203. Acuña-Castroviejo D, Martin M, Macías M, Escames G, León J, Khaldy H et al. Melatonin, mitochondria and cellular bioenergetics. *J Pineal Res* 2001; 30(2):65-74.
204. Rodríguez C, Mayo JC, Sainz RM, Antolín I, Herrera F, Martín V et al. Regulation of antioxidant enzymes: a significant role for melatonin. *J Pineal Res* 2004; 36:1-9.
205. Pablos MI, Guerrero JM, Ortiz GG, Agapito MT, Reiter RJ. Both melatonin and a putative nuclear melatonin receptor agonist CGP 52608 stimulate glutathione peroxidase and glutathione reductase activity in mouse brain in vivo. *Neuroendocrinol Lett* 1997; 18:49-58.
206. Urata Y, Honma S, Goto S, Todoroki S, Ueda T, Cho S et al. Melatonin induces gamma-glutamylcysteine synthetase mediated by activator protein-1 in human vascular endothelial cells. *Free Radic Biol Med* 1999; 27:838-47.
207. Block MS, Gardiner D, Almerico B, Neal C. Loaded Hydroxylapatite-coated implants and uncoated titanium-threaded implants in distracted dog alveolar ridges. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol End* 2000; 89(6):676-85.
208. Oda T, Sawaki Y, Ueda M. Experimental alveolar ridge augmentation by distraction osteogenesis using a simple device that permits secondary implant placement. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2000; 15(1):95-102.



209. Pandi-Perumal SR, Srinivasan V, Maestroni GJ, Cardinali DP, Poeggeler B, Hardeland R. Melatonin. Nature's most versatile biological signal? FEBS J 2006; 273(13):2813-38.
210. Conti A, Conconi S, Hertens E, Skwarlo-Sonta K. Evidence for melatonin synthesis in mouse and human bone marrow cells. J Pineal Res 2000; 28:193-202.
211. Haldar C, Haussler D, Gupta D. Effect of the pineal gland on circadian rhythmicity of colony forming units for granulocytes and macrophages (CFU-GM) from rat bone marrow cell cultures. J Pineal Res 1992; 12(2):79-83.
212. Hakanson DO, Penny R, Berstrom WH. Calcemic responses to photic and pharmacologic manipulation of serum melatonin. Pediatr Res 1987; 22(4):414-6.
213. Ostrowska Z, Kos-Kudla B, Nowak M, Swietochowska E, Marek B, Gorski J et al. The relationship between bone metabolism, melatonin and other hormones in sham-operated and pinealectomized rats. Endocr Regul 2003; 37(4):211-24.
214. Radio NM, Doctor JS, Witt-Enderby PA. Melatonin enhances alkaline phosphatase activity in differentiating human adult mesenchymal stem cells grown in osteogenic medium via MT2 melatonin receptors and the MEK/ERK (1/2) signaling cascade. J Pineal Res 2006; 40(4):332-42.
215. Lopes Cde C, Konig Junior B. Histological findings of bone remodeling around smooth dental titanium implants inserted in rabbit's tibias. Ann Anat 2002; 184(4):359-62.
216. Berglundh T, Abrahamsson I, Lang NP, Lindhe J. De novo alveolar bone formation adjacent to endosseous implants. Clin Oral Impl Res 2003; 14(3):251-62.
217. Dahlin C, Sennerby L, Lekholm U, Linde A, Nyman S. Generation of new bone around titanium implants using a membrane technique: an experimental study in rabbits. Int J Oral Maxillofac Implants 1989; 4(1):19-25.
218. Lee MC, Yoshino F, Shoji H, Takahashi S, Todoki K, Shimada S et al. Characterization by electron spin resonance spectroscopy of reactive oxygen species generated by titanium dioxide and hydrogen peroxide. J Dent Res 2005; 84(2):178-82.
219. Taylor GC, Waddington RJ, Moseley R, Williams KR, Embery G. Influence of titanium oxide and titanium peroxy gel on the breakdown of hyaluronan by reactive oxygen species. Biomaterials 1996; 17:1313-9.
220. Bai XC, Lu D, Liu AL, Zhang ZM, Li XM, Zou ZP et al. Reactive Oxygen Species Stimulates Receptor Activator of NF- $\kappa$ B Ligand Expression in Osteoblast. J Biol Chem 2005; 280(17):17497-506.

221. Lee NK, Choi YG, Baik JY, Han SY, Jeong DW, Bae YS et al. A crucial role for reactive oxygen species in RANKL-induced osteoclast differentiation. *Blood* 2005; 106(3):852-9.
222. Simon Z, Watson PA. Biomimetic dental implants - New ways to enhance osseointegration. *J Can Dent Assoc* 2002; 68:286-8.
223. Tresguerres IF, Blanco L, Clemente C, Tresguerres JA. Effects of local administration of growth hormone in peri-implant bone: an experimental study with implants in rabbit tibiae. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2003; 18(6):807-11.
224. Tresguerres IF, Alobera MA, Baca R, Tresguerres JA. Histologic, morphometric, and densitometric study of peri-implant bone in rabbits with local administration of growth hormone. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2005; 20(2):193-202.
225. Liu D, Xu JK, Figliomeni L, Huang L, Pavlos NJ, Rogers M et al. Expression of RANKL and OPG mRNA in periodontal disease: possible involvement in bone destruction. *Int J Mol Med* 2003; 11(1):17-21.